

**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.

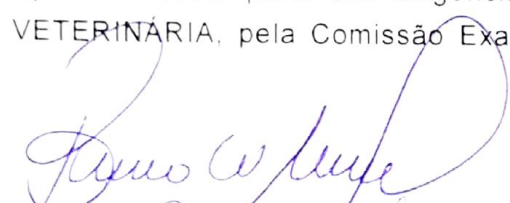
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

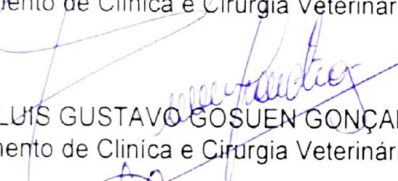
TÍTULO DA TESE: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO NAS OSTEOSSÍNTESES MINIMAMENTE INVASIVAS NA TÍBIA DE CÃES

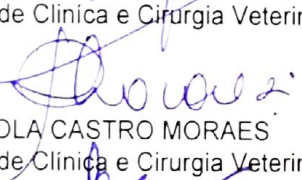
AUTOR: GUILHERME GALHARDO FRANCO

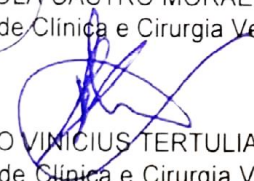
ORIENTADOR: BRUNO WATANABE MINTO

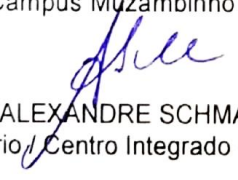
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


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 ADIPOSEO 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.

Revisão de literatura

A fixação interna biológica prioriza a manutenção do ambiente da fratura, tentando minimizar danos ao suprimento sanguíneo e evitando manipulação excessiva dos fragmentos ósseos (Perren, 2002). O foco da fratura não é exposto e os fragmentos são reduzidos indiretamente (Peirone et al., 2012).

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 et al., 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) (Hudson et al., 2009).

A MIPO é indicada principalmente para fraturas diafisárias não passíveis de reconstrução anatômica com trauma extenso aos tecidos moles, ou seja, quando não é possível reconstruir a coluna óssea (Pozzi e Lewis, 2009). Entretanto, não há contraindicações para realizar a MIPO, desde que se tenha intensificador de imagem transoperatório. Dessa forma, pode-se realizar até mesmo nas fraturas articulares, nas quais há a necessidade de redução anatômica e estabilização absoluta (Beale e Cole, 2012; Beale e Mccally, 2012).

A complicação mais comum decorrente da aplicação da MIPO é o mau alinhamento do membro (Boero Baroncelli et al., 2012; Guiot e Déjardin, 2011; Pozzi et al., 2013). Essa falha técnica pode ser evitada com a utilização de intensificadores

de imagem como o fluoroscópio (Beale e Mccally, 2012). Outras complicações importantes incluem lesão em vasos sanguíneos e nervos devido à tração excessiva do membro, infecção, inserção de parafuso na articulação e falhas do implante (Peirone et al., 2012).

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. Neste mecanismo complexo, as células-tronco mesenquimais presentes no tecido danificado diferenciam-se em fibroblastos, condroblastos, condrócitos e osteoblastos, os quais formam o calo ósseo da fratura (Kraus e Kirker-Head, 2006). As vantagens biológicas destas técnicas podem, potencialmente, acelerar a união óssea clínica, permitindo retorno a função locomotora mais rápido (Perren, 2003).

O ponto-chave da formação e reparação óssea são as células chamadas de células-tronco mesenquimais (CTM), que atuam produzindo efeitos parácrinos e autócrinos para restabelecer a função esquelética (Kraus e Kirker-Head, 2006). As CTM são células multipotenciais capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos e tenócitos (Pittenger et al., 1999). São originadas da medula óssea e do periósteo embora outras fontes, tais como o músculo, gordura e sinóvia podem ser observadas, entretanto representam fonte limitada (Levi e Longaker, 2011). A medula óssea e periósteo são as fontes mais ricas em animais jovens, com quantidades progressivamente reduzidas, mas ainda presentes, nos animais com idade avançada (Pittenger et al., 1999). Em ossos metafisários o número de CTM é maior, o que contribui para reparação óssea mais rápida (Kraus e Kirker-Head, 2006).

O potencial osteogênico das CTM foi confirmado por várias técnicas. No cultivo *in vitro* de CTM purificadas na presença de dexametasona, ácido ascórbico, e glicerofosfato, as células progrediram por meio de linhagem osteoblástica (Jaiswal et al., 1997). Uma cultura de células expandidas foi semeada em suportes cerâmicos porosos, os quais foram implantados no tecido subcutâneo de um animal vivo. Tecidos ósseos vascularizados foram visibilizados nos limites dos implantes de cerâmica e não nos implantes acelulares, documentando o potencial osteoblástico das CTM (Kadiyala et al., 1997).

As células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo (CTM-AD) foram primariamente isoladas e descritas em humanos por Zuk et al. (2001), mas atualmente já foram isoladas de diversas espécies como ratos (Zaminy et al., 2008), camundongos, coelhos, cães (Neupane et al., 2008; Vieira et al., 2010) e suínos (Qu et al., 2007). As CTM-AD podem ser extraídas do tecido adiposo intra-abdominal ou subcutâneo (Gomes et al., 2009). O primeiro artigo que descreveu a formação de tecido ósseo a partir de CTM-AD foi publicado por Hicok et al. (2004), no qual cubos de hidroxiapatita foram semeados com CTM-AD humanas osteogenicamente induzidas e foram implantados no subcutâneo em camundongos. Houve a formação de matriz osteoide em 80% dos cubos semeados com CTM-AD, o que demonstra seu potencial terapêutico na reparação óssea (Hicok et al., 2004).

Estudos sobre o processo de reparação óssea ganham cada vez mais ênfase na ortopedia. O principal desafio é a diminuição no tempo de consolidação e dos índices de complicações. Na área da ortopedia veterinária, essa 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 (Vallefuoco et al., 2016).

Biomateriais, técnicas minimamente invasivas e outras estratégias facilitadoras da regeneração são cada vez mais estudadas e utilizadas 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) ganharam destaque como método terapêutico, devido às suas propriedades biológicas e às necessidades médicas (Grayson et al., 2015). 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 bastante promissores na melhoria da reparação óssea utilizando a terapia celular associada aos biomateriais (Gómez-Barrena et al., 2015; Grayson et al., 2015; Tajima et al., 2015; Tevlin et al., 2016; Venkatesan et al., 2016). Entretanto, mais estudos clínicos e *in vivo* são necessários para determinar o seu real potencial terapêutico na ortopedia.

Procedimentos minimamente invasivos, com trauma cirúrgico limitado aos tecidos moles e osso, já têm sido aplicados no manejo de fraturas por longo período na medicina (Laflamme et al., 2008). 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 (Aita et al., 2014). Na Medicina Veterinária, são crescentes os estudos com essa técnica, demonstrando baixo índice de complicações e precocidade no tempo de reparação óssea (Beale e Mccally, 2012; Guiot e Déjardin, 2011; Hudson et al., 2012; Hudson e Pozzi, 2012; Hulse, 2012; Pozzi et al., 2013; Schmökel et al., 2007; Witsberger et al., 2010).

Desta forma, acredita-se que a associação de técnicas minimamente invasivas no tratamento das fraturas associado à terapia celular pode potencializar o processo de reparação óssea.

Objetivos

Avaliar a reparação óssea após a realização da técnica de osteossíntese minimamente invasiva com placa bloqueada na tíbia de cães associada à terapia celular percutânea no foco de fratura.

Objetivos específicos

- Avaliar a reparação óssea em uma série de casos clínicos que foram submetidos à aplicação percutânea no foco de fratura de células-tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo em fraturas de tíbia de cães tratadas com osteossíntese minimamente invasiva com placa.
- Avaliar a reparação óssea em uma série de casos clínicos que foram submetidos à aplicação percutânea no foco de fratura de concentrado de medula óssea autóloga em fraturas de tíbia de cães tratadas com osteossíntese minimamente invasiva com placa.
- Comparar a reparação óssea entres esses dois grupos de casos clínicos

Hipótese

- Que os pacientes tratados com MIPO e terapia celular com CTM-AD alógena ou concentrado de medula óssea autóloga apresentem eficaz processo de reparação óssea e não apresentem complicações relacionadas à aplicação.

- Que os pacientes com fratura de tíbia tratados com MIPO e terapia celular com CTM-AD apresentem menor tempo de união óssea e maior qualidade no processo de reparação óssea quando comparada com os pacientes tratados com MIPO e medula óssea.

Referências

Aita MA et al. (2014) Ensaio clínico randomizado de osteossíntese percutânea e minimamente invasiva das fraturas da extremidade distal do rádio. **Revista Brasileira de Ortopedia** 49: 218–226.

Beale BS, Cole G (2012) Minimally Invasive Osteosynthesis Technique for Articular Fractures. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice** 42:1051–1068.

Beale BS, Mccally R (2012) Minimally Invasive Plate Osteosynthesis. Tibia and Fibula. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice** 42:1023–1044.

Boero Baroncelli A et al. (2012) Retrospective comparison between minimally invasive plate osteosynthesis and open plating for tibial fractures in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 25:410–417.

Chen J. et al. (2010) Boning up on Wolff ' s Law : Mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. **Journal of Biomechanics** 43:108–118.

Déjardin LM, Guiot LP, Von Pfeil DJF (2012) Interlocking Nails and Minimally Invasive Osteosynthesis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice** 42:935–962.

Garofolo S, Pozzi A (2013) Effect of Plating Technique on Periosteal Vasculature of the Radius in Dogs: A Cadaveric Study. **Veterinary Surgery** 42:255–261.

Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D (2007) Fracture healing : The diamond concept. **Injury** 38:3–6.

Gomes ME, Rada T, Reis RL (2009) Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. **Tissue Engineering - Part B: Reviews** 15:113–125.

Gómez-barrena E et al. (2015) Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. **Bone** 70, 93–101.

Grayson WL et al. (2015) Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. **Nat Rev Endocrinol**.11:140–150.

Guiot LP, Déjardin, LM (2011) Prospective Evaluation of Minimally Invasive Plate Osteosynthesis in 36 Nonarticular Tibial Fractures in Dogs and Cats. **Veterinary Surgery** 40:171–182.

Hicok KC et al. (2004) Human Adipose-Derived Adult Stem Cells Produce Osteoid in Vivo. **Tissue Engineering** 10:371–380.

Hudson CC, Lewis, DD, Pozzi, A (2012) Minimally Invasive Plate Osteosynthesis in Small Animals. Radius and Ulna Fractures. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice** 42:983–996.

Hudson CC, Pozzi A (2012) Minimally invasive repair of central tarsal bone luxation in a dog. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 25:79–82.

Hudson CC, Pozzi A, Lewis DD (2009) Minimally invasive plate osteosynthesis: applications and techniques in dogs and cats. **Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology** 22:175–182.

Hulse D (2012) MIPO Techniques for the Humerus in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice** 42:975–982.

Jaiswal N et al. (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. **Journal of cellular biochemistry** 64:295–312.

Kadiyala S et al.(1997) Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplantation** 6:125–134.

Kraus KH, Kirker-Head C (2006) Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery** 35:232–242.

Kregor PJ et al. (2004) Treatment of Distal Femur Fractures Using the Less Invasive Stabilization System of Distal Femur Fractures Using the Less Invasive Stabilization System. **Journal of Orthopaedic Trauma** 18:509–520.

Laflamme GY et al. (2008) Percutaneous humeral plating of fractures of the proximal humerus: results of a prospective multicenter clinical trial. **Journal of orthopaedic trauma** 22:153–158.

Levi B, Longaker MT (2011) Concise review: Adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. **Stem Cells** 29:576–582.

Mizuno K et al. (1990) The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. **Journal of Bone and Joint Surgery** 72, 882-829.

Neupane M et al. (2008) Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering** 14:1007–1015.

Palmer RH (1999) Biological osteosynthesis. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice** 29:1171–1185.

Peirone B et al. (2012) Minimally Invasive Plate Osteosynthesis Fracture Reduction Techniques in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 42:873–895.

Perren SM (2002) Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. **The Journal of bone and joint surgery** 84:1093–1110.

Perren SM (2003) Biological internal fixation interface between biology and biomechanics. **European Cells and Materials** 5, p. 22–23.

Pittenger MF et al. (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science** 284:143-147.

Pozzi A et al. (2013) Retrospective Comparison of Minimally Invasive Plate Osteosynthesis and Open Reduction and Internal Fixation of Radius-Ulna Fractures in Dogs. **Veterinary Surgery** 42:19–27.

Pozzi A, Lewis D (2009) Surgical approaches for minimally invasive plate osteosynthesis in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 22:316-320.

Qu CQ et al. (2007) Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal** 43:95–100.

Schmökel HG et al.(2007) Treatment of tibial fractures with plates using minimally invasive percutaneous osteosynthesis in dogs and cats: Paper. **Journal of Small Animal Practice** 48:157–160.

Tajima S et al. (2015) Direct and Indirect Effects of a Combination of Adipose-Derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration. **Tissue Engineering Part A** 21:895-905.

Tevlin R et al.(2016) Stem and progenitor cells : advancing bone tissue engineering. **Drug Delivery and Translational Research** 6:159-173.

Vallefuoco R et al. (2016) Complications of appendicular fracture repair in cats and small dogs using locking compression plates. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 29:46–52.

Venkatesan J et al. (2016) Combination of nano-hydroxyapatite with stem cells for bone tissue engineering. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 16:8881–8894.

Vieira NM et al. (2010) Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation** 19:279–289.

Witsberger TH et al. Minimally invasive application of a radial plate following placement of an ulnar rod in treating antebrachial fractures. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 23:459–467.

Zaminy A et al. (2008) Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: Melatonin as a differentiation factor. **Iranian Biomedical Journal** 12:133–141.

Zuk PA et al. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering** 7: 211–228.

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

Normas do periódico *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* (VCOT) (Anexo 1)

Resumo

Objetivos: Avaliar o resultado clínico 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), na tíbia de cães.

Métodos: Foram utilizados 20 cães apresentando fratura completa e fechada da tíbia, tratada com MIPO e aplicação percutânea, no foco de fratura, de 3 milhões de CTM-AD alógenas. Os exames radiográficos foram realizados no período pré-operatório, pós-operatório imediato e 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós-operatórios. Foram avaliados a aposição dos fragmentos, o alinhamento ósseo, a evolução da união óssea e as complicações.

Resultados: A aposição dos fragmentos foi considerada boa em 60% dos casos, adequada em 35% e inaceitável em 5%. 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%) ocorreu desvio angular moderado após a fixação da fratura, porém sem repercussões clínicas aparentes. Complicações menores incluíram seroma (5%) e soltura de um parafuso (10%) enquanto que complicações maiores foram representadas pela inserção do parafuso mais proximal no espaço articular do joelho (10%).

Significância Clínica: Todos cães tratados com MIPO e CTM-AD alógenas neste estudo apresentaram resultado final de bom a excelente corroborando com a ação potencializadora do processo de reparação óssea destas duas técnicas já relatada em outros estudos *in vitro* e *in vivo*.

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

Introdução

As fraturas da tíbia estão entre as mais comuns em cães (1,2). O tratamento é usualmente cirúrgico, envolvendo criteriosa avaliação de fatores mecânicos e biológicos, além da análise de possíveis complicações associadas ao indivíduo (3).

Os avanços no entendimento sobre a biologia óssea e as complicações advindas das abordagens cirúrgicas convencionais têm influenciado sobremaneira a elaboração de técnicas inovadoras e diferenciadas para fixação interna das fraturas. A redução anatômica dos fragmentos nas fraturas diafisárias, especialmente nas cominutivas, já não é mais o objetivo principal das osteossínteses (4,5). O conceito de tratamento biológico de fraturas requer técnicas cirúrgicas que garantam preservação máxima da integridade e vascularização dos tecidos moles adjacentes, e utilização mínima necessária de implantes para a consolidação óssea (3).

A osteossíntese minimamente invasiva com placa (MIPO) é a evolução mais recente da osteossíntese biológica, na qual o foco de fratura não é exposto e os fragmentos ósseos são reduzidos com técnicas indiretas (6,7). Essa técnica baseia-se no alinhamento dos fragmentos com a distração das extremidades ósseas, ao invés de manipular diretamente o osso no local da fratura (8,9). Desta forma, o método resulta em manipulação mínima do hematoma da fratura, além de preservar o suprimento sanguíneo periosteal (10). A utilização da MIPO no tratamento de fraturas diafisárias e metafisárias de tíbia em cães está associada à consolidação óssea mais rápida em comparação às técnicas tradicionais, e a baixos índices de complicações (11–13).

Além de técnicas minimamente invasivas de fixação das fraturas, o conhecimento do processo de reparação óssea é importante para promover novas

estratégias no manejo de fraturas. O osso tem propensão inata para se reparar após lesão traumática. Quando ocorre a fratura, células-tronco progenitoras residentes agem em conjunto com macrófagos com ação pró e anti-inflamatória (14,15), além de outras células sanguíneas circulantes (16), para orquestrar o complexo processo de reparação óssea (17). Apesar desta expressiva capacidade, uma série de situações clínicas fazem com que a intervenção terapêutica seja necessária para facilitar a reparação óssea (18). A terapia celular visa, em particular, corrigir a osteogênese insuficiente (19). As células-tronco podem ser isoladas de diferentes tecidos, autólogos ou alógenos, e favorecem a reparação óssea, o que permite sua utilização como terapia complementar no tratamento de fraturas complexas ou após a não-união (19).

Estudos que avaliem a utilização da terapia celular concomitante à MIPO são escassos em Medicina Veterinária. Por este motivo, o objetivo geral deste trabalho foi descrever de modo prospectivo o uso da MIPO em associação à terapia com células-tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo (CTM-AD) em vinte cães com fraturas diafisárias e/ou metafisárias de tíbia.

Material e métodos

Animais

Toda a metodologia prevista para o trabalho foi encaminhada e aprovada para Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo: 19864/2016).

Foram incluídos neste estudo, 20 cães que apresentaram fraturas tibiais extra articulares fechadas, associadas ou não à fratura da fíbula. As fraturas foram tratadas com osteossíntese minimamente invasiva com placa (MIPO) associada à aplicação

percutânea de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo alógenas (CTM-AD) no foco de fratura.

Os critérios de inclusão foram: apresentar fratura de tíbia diafisária ou metafisária e ser passível de realização da técnica de MIPO para a osteossíntese. Os critérios de exclusão foram: apresentar fratura classificada como fratura articular e/ou aberta; e apresentar contraindicação para a terapia celular com CTM-AD como presença de neoplasias ou focos de infecção. 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, respiratórias, hepáticas e hormonais, foram excluídos do estudo.

Planejamento pré-operatório

Os pacientes foram submetidos ao exame radiográfico da tíbia acometida, utilizando duas projeções ortogonais (craniocaudal e mediolateral), a fim de classificar o tipo de fratura (transversa, oblíqua curta, oblíqua longa, espiral ou cominutiva) e o local de fratura (metafisária ou diafisária).

A tíbia intacta do membro contralateral também foi submetida ao mesmo exame radiográfico para auxiliar o planejamento pré-operatório, permitindo avaliação do comprimento do membro e orientar a moldagem do implante.

Para o método de fixação das fraturas, foram utilizadas placas bloqueadas na função ponte aplicadas na face medial da tíbia, respeitando a relação máxima de 50% do número totais de orifícios na placa sobre o número total de parafusos utilizados. O tamanho dos implantes foi selecionado com base nas mensurações realizadas na radiografia pré-operatória e no tamanho e massa corporal do paciente.

Obtenção das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

Obtenção de tecido adiposo do cão doador

As CTM-AD foram processadas e fornecidas pelo laboratório BIO CELL^a. Para a obtenção do tecido adiposo, foi utilizado um cão doador, fêmea, de 1 ano de idade, hígido, sendo a colheita realizada durante o procedimento anestésico e cirúrgico para castração.

Morfina (0,5 mg/kg) e acepromazina (0,03 mg/kg) foram administrados por via intramuscular para a medicação pré-anestésica. A anestesia geral foi induzida pela administração intravenosa de propofol (1-2 mg/kg) e a manutenção anestésica realizada por meio de anestesia inalatória com isoflurano (1,5-2%) em 100% de oxigênio.

Após a anestesia do animal doador foi realizada incisão de aproximadamente 2 cm na pele na região lombar e, após divulsão do tecido subcutâneo, foi colhido aproximadamente 10 a 25 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa presente na base da cauda. O tecido adiposo foi acondicionado em tubo de 50 mL contendo meio de lavagem estéril onde permaneceu por 2 minutos. Imediatamente após esse tempo o tecido adiposo foi retirado do primeiro tubo de lavagem e acondicionado no segundo tubo de lavagem onde permaneceu por 3 minutos. Após este tempo o tecido adiposo foi acondicionado no tubo contendo o meio de transporte. O tubo foi identificado com o número de identificação do animal e acondicionado sob refrigeração de 4 a 8°C até o momento do envio do material para o laboratório.

Processamento do tecido adiposo e cultivo celular

^a BIO CELL LTDA – Brasília -DF, Brasil

Após a chegada do material ao laboratório, o tecido adiposo foi lavado várias vezes em solução tampão fosfato salina (PBS) para retirar debris celulares e excesso de sangue. Logo após foi cortado em partículas pequenas e colocado em contato com a solução de collagenase e hialuronidase para que fosse realizada a digestão enzimática. Esta mistura foi centrifugada por 15 minutos a 1250 rotações por minuto (RPM) e o botão celular foi ressuspendido. O mesmo procedimento foi repetido quatro vezes. Realizou-se o método de exclusão *trypan blue*. Esse processo constituiu a preparação da fração vascular estromal.

Após a obtenção das CTM, estas foram colocadas em garrafas de cultivo de 25 cm³ contendo meio TCM 199. As garrafas de cultivo foram acondicionadas em estufas de cultivo celular à temperatura de 39,5 °C e 5 % de CO₂.

Após aproximadamente sete dias de cultivo foi realizado o repique celular e foi iniciado novo cultivo celular em garrafa de 75 cm³. Ao se obter 80% de confluência celular foi realizado a tripsinização. Parte das células permaneceu na garrafa de cultivo e cerca de 1 milhão de células foram acondicionadas em palhetas com o meio de congelamento celular e mantidas congeladas em nitrogênio líquido até a utilização nos animais do experimento.

Como procedimento padrão para o controle de qualidade do cultivo celular, parte das células que permaneceram no laboratório foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo. Aproximadamente 2 milhões de células tronco foram fixadas em solução de formaldeído e encaminhadas para os Estados Unidos da América no laboratório MOFA Global para ser realizada a caracterização celular. A outra parte das células que permaneceu no Laboratório foi congelada permanecendo em nitrogênio líquido.

Descongelamento para a aplicação percutânea das CTM-AD no foco de fratura

O processo de descongelamento de 3 palhetas, contendo 1 milhão de CTM-AD cada, foi realizado aproximadamente 25 minutos antes do término do procedimento de MIPO em um laboratório montado próximo ao centro cirúrgico.

Primeiramente, 3 palhetas foram retiradas do nitrogênio líquido e mantidas por 10 segundos em temperatura ambiente. Imediatamente após, foram imersas em banho-maria com a água na temperatura de 37,5°C durante 30 segundos. Após o completo descongelamento, as palhetas foram cortadas e seu conteúdo adicionado a um tubo *falcon* contendo 5 mL de meio de descongelamento. Este tubo foi centrifugado durante 3 minutos na velocidade de 1250 RPM. Logo após esse processo, todo conteúdo sobrenadante foi descartado mantendo somente o botão celular formado no fundo do tubo. Foi adicionado ao tubo 5 mL de meio de lavagem celular e o botão celular foi ressuspensionado com auxílio de pipeta realizando turbilhonamento do meio. Logo após o tubo foi centrifugado durante 3 minutos a 1250 RPM. O mesmo processo de lavagem celular foi repetido mais 2 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante de meio de lavagem foi descartado, permanecendo somente o botão celular, o qual foi ressuspensionado em 1 mL a 2 mL, a depender do porte do paciente, de solução salina 0,9% estéril. Essa solução contendo 3 milhões de CTM-AD foi acondicionado em seringa de 3 mL acoplada a agulha hipodérmica 30x0,8mm para aplicação percutânea no foco da fratura, dentro do centro cirúrgico, imediatamente após o término da MIPO.

Técnica cirúrgica

Morfina (0,5 mg/kg) e acepromazina (0,03mg/kg) foram administrados por via intramuscular para a medicação pré-anestésica. A anestesia geral foi induzida pela

administração intravenosa de propofol (1-2 mg/kg) e a manutenção anestésica realizado por meio de anestesia inalatória com isoflurano (1,5-2%) em 100% de oxigênio. Todos os pacientes foram submetidos à anestesia epidural com lidocaína 2% sem vasoconstritor (0,25 mL/kg, volume máximo de 6 mL por paciente).

Cefalotina (22 mg/kg) foi administrada por via intravenosa 30 minutos antes da incisão e, quando necessário, reaplicada a cada 90 minutos de procedimento cirúrgico.

Após a preparação de rotina do membro pélvico para cirurgia asséptica, o paciente foi posicionado em decúbito lateral com o membro acometido diretamente sobre a mesa. O membro contralateral sadio foi posicionado e fixado abduzido a fim de expor a superfície medial da tíbia do membro acometido.

A fratura foi reduzida de maneira fechada e indireta, com o mínimo de manipulação. O alinhamento e comprimento ósseos foram alcançados com base nas referências anatômicas do próprio membro e comparação com o membro contralateral, sem uso de fluoroscopia ou radiografias intraoperatórias.

O acesso cirúrgico foi realizado conforme já descrito na literatura (20). Incisão linear foi iniciada 1 cm proximal ao côndilo tibial medial e estendida distalmente por aproximadamente 3 cm. Os tendões de inserção dos músculos sartório, grácil e semitendinoso foram incisados e elevados superfície tibial. A retração caudal desses músculos permitiu a exposição do aspecto medial da tíbia proximal. Túnel epiperiosteal foi realizado, poupando cuidadosamente a artéria e veia safena medial. Incisão cutânea de 2 a 4 cm foi feita sobre o aspecto medial da tíbia distal. A dissecação romba com tesoura de Metzenbaum permitiu que o túnel fosse estendido de distal para proximal. A placa foi inserida através da incisão distal ou 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 guia de perfuração e broca longa. A placa foi moldada em alguns pacientes. Os parafusos bloqueados foram inseridos no tecido ósseo através das incisões previamente realizadas para inserção da placa. A quantidade necessária de parafusos a ser colocada foi definida de acordo com cada fratura. Foram utilizadas placas bloqueadas nos sistemas 1,5 mm, 2,0 mm, 2,7 mm e 3,5 mm e todos os implantes foram fabricados pela Focus (Focus – ortopedia veterinária, Indaiatuba, SP, Brasil).

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.

Após a sutura de pele, foi inserida agulha calibre 30x0,8 mm dentro da falha óssea por via percutânea por meio de palpação no foco da fratura e injetado de 1 a 2 mL de solução salina estéril com 3 milhões de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo alógenas em todos os pacientes (Figura 1).

Foram prescritos antibiótico (cefalexina na dose de 25 mg/kg, a cada 12 horas) durante 10 dias, anti-inflamatório (meloxicam na dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia e 0,1 mg/kg nos demais dias, a cada 24 horas) durante 3 dias e cloridrato de tramadol (na dose de 3 mg/kg a cada oito horas por cinco dias) como analgésico. Também foi recomendada limpeza da ferida cirúrgica com solução salina 0,9%, uma vez ao dia durante 15 dias. As suturas cutâneas foram removidas no décimo quinto dia de pós-operatório.

Avaliação pós-operatória

Os exames radiográficos em duas projeções ortogonais da tíbia acometida dos pacientes foram realizados nos momentos pré-operatório, pós-operatório imediato, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório.

A avaliação radiográfica dos parâmetros alinhamento ósseo da tíbia, aposição dos fragmentos da fratura, posicionamento e integridade dos implantes e a reparação óssea foi realizada por dois avaliadores em cada momento de avaliação. As complicações também foram registradas.

Para avaliar o alinhamento ósseo no plano frontal, foram obtidos os ângulos mecânicos tibiais mediais proximal e distal (mMPTA e mMDTA) nas radiografias craniocaudais pós-operatórias e comparados aos valores de referência já publicados (21) ou com a radiografia do membro contralateral com a tíbia intacta quando existente. Após estas mensurações cada paciente foi classificado como: presença de desvio *varus* (discreto, moderado e intenso); presença de desvio *valgus* (discreto, moderado e intenso); ausência de desvio angular neste plano (Figura 2).

Para avaliar o plano sagital, foram obtidos os ângulos do platô tibial (TPA), o ângulo mecânico caudal proximal da tíbia (mCaPTA) e o ângulo mecânico cranial distal da tíbia (mCrDTA) nas radiografias mediolaterais e comparados com o membro contralateral ou com os valores de referência já publicados (22). Após estas mensurações cada paciente foi classificado como: presença de desvio *recurvatum* (discreto, moderado e intenso); presença de desvio *procurvatum* (discreto, moderado e intenso); ausência de desvio angular neste plano.

O alinhamento em relação a torção da tíbia foi descrito como subjetivamente aceitável quando a sobreposição das bordas caudais medial e lateral do platô tibial,

bem como a sobreposição concêntrica das cristas trocleares do *tálus*, foram observadas simultaneamente nas radiografias mediolaterais (13).

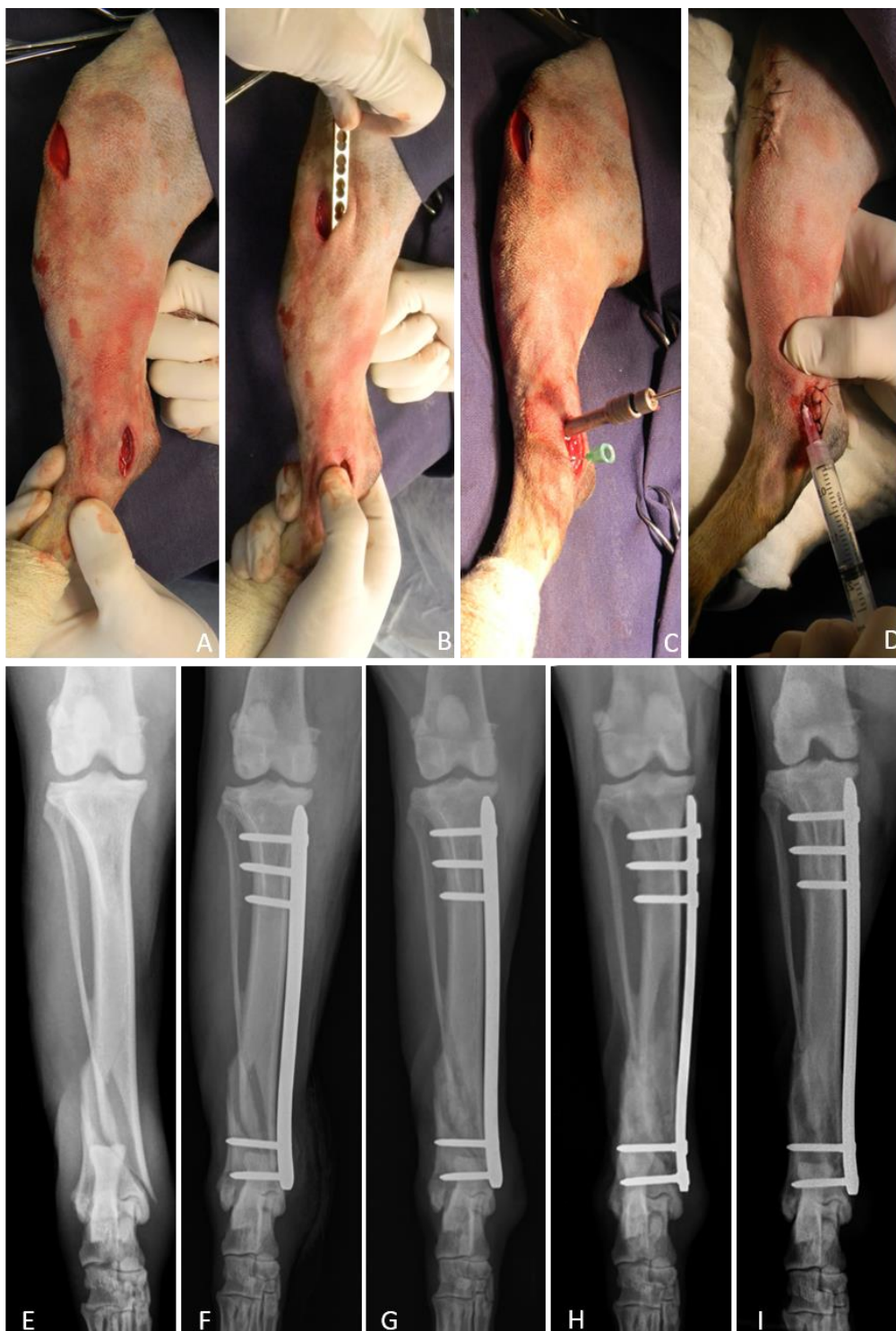


Figura 1. Fotografias intraoperatórias do procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa e aplicação de células-tronco

mesenquimais derivadas de tecido adiposo (A-D) e sequência radiográfica na projeção craniocaudal (E-I) de um cão (cão 19), sem raça definida (SRD), de 15 anos de idade, com massa corporal de 13 kg e fratura metafisária distal de Tíbia em espiral, completa, fechada com a fíbula fraturada. A fratura foi reduzida indiretamente por tração manual (A) e a placa foi inserida através do acesso proximal e deslizada pelo túnel epiperiosteal sobre a face medial da tíbia (B) e as perfurações ósseas para aplicação dos parafusos foram realizadas pelos acessos distal e proximal. Uma agulha foi inserida no espaço articular para delimitar a tíbia (C). Após a dermorrafia, 3 milhões de CTM-AD alógenas diluídas em 2 mL de solução salina 0,9% foram aplicadas de forma percutânea no foco da fratura com auxílio de agulha hipodérmica e seringa (D). A fratura metafisária distal de tíbia em espiral (E) foi tratada com uma placa bloqueada 2,7 mm de 12 furos, aplicando-se 3 parafusos bloqueados proximais e 2 parafusos bloqueados distais (F). Acompanhamento radiográfico da fratura em 15 dias (G), 30 dias (H) e 60 dias (I), demonstrando a consolidação óssea.

Como o planejamento pré-operatório para todas as fraturas não era atingir a reconstrução anatômica da coluna óssea, a aposição dos fragmentos foi avaliada com base no distanciamento entre os fragmentos da fratura, definido como dispersão. A dispersão foi avaliada nas duas projeções ortogonais (plano frontal e sagital) e classificada de acordo com a relação da distância entre os fragmentos e o diâmetro do terço médio da diáfise da tíbia. Desta forma, a aposição dos fragmentos foi classificada como boa, adequada ou inaceitável quando a dispersão era, respectivamente, 50%, de 51 a 100% ou maior que 100% em relação ao diâmetro do terço médio da diáfise da tíbia nos dois planos.

Os implantes foram avaliados e descritos quanto ao tamanho da placa e número de parafusos utilizados por fragmento da fratura, o posicionamento dos parafusos e da placa na tíbia, a relação entre o comprimento da tíbia e o comprimento da placa, a densidade de parafusos utilizados em relação número de orifícios da placa.

A reparação óssea foi avaliada em todos os momentos de avaliação radiográfica e foi constatada a união clínica quando existisse calo ósseo fazendo a ponte entre os fragmentos ou maior que 50% do diâmetro da tíbia no foco de fratura em pelo menos 3 das 4 corticais visibilizadas nas 2 projeções radiográficas ortogonais. A consolidação óssea foi constatada quando se observou radiograficamente a continuidade cortical e medular no foco de fratura.

Complicações menores foram definidas como aquelas que são facilmente resolvidas com terapia medicamentosa e não necessitam de intervenção cirúrgica para seu tratamento (edema, hematomas, seroma, deiscência de sutura). Complicações maiores foram definidas como aquelas mais graves que necessitam de cirurgia de revisão sob anestesia geral (falha de implantes, falha grave no alinhamento, osteomielite, parafuso inserido no espaço articular).

O resultado clínico foi classificado como: excelente, quando a claudicação se apresentava completamente ausente na última avaliação clínica do paciente; bom, quando houve retorno completo à função do membro, mas ocasionalmente ocorria claudicação leve, controlada com terapia medicamentosa, ou quando desvios angulares sem importância clínica estavam presentes; ruim, quando a claudicação era constante e era necessário o uso contínuo de terapia medicamentosa, ou cirurgia adicional era necessária (23,24).

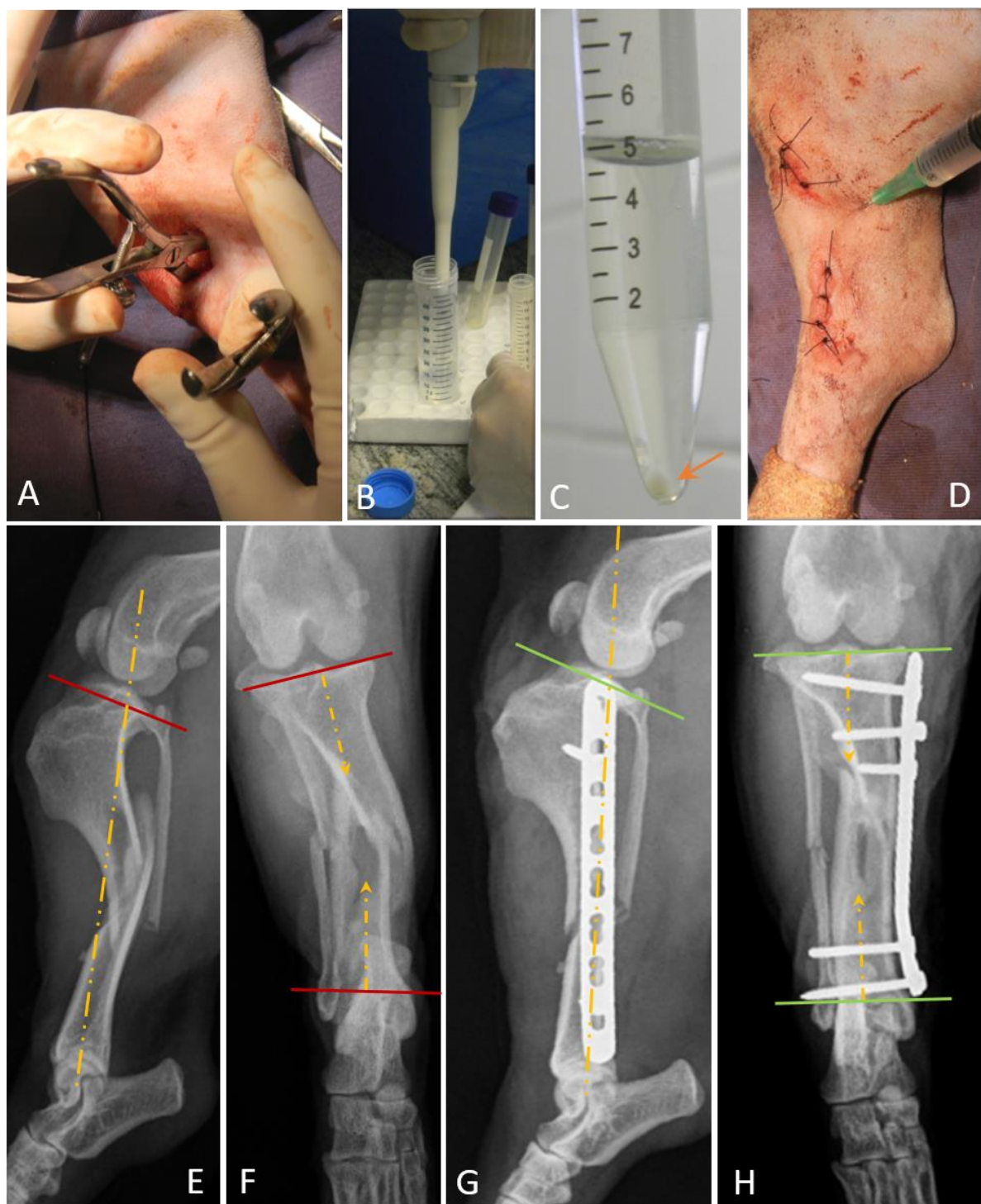


Figura 2. Fotos do procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa e aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (A-D) e imagens radiográficas (E-F) de um cão sem raça definida de 5 anos de idade, massa corporal de 7,1 kg com fratura diafisária de tíbia em espiral, em terço médio com a fíbula fraturada. A fratura foi reduzida indiretamente com auxílios de pinças ósseas aplicadas ao osso através dos acessos

proximal e distal (A). Processo de lavagem das CTM-AD em 5 mL de solução de lavagem celular com auxílio de uma pipeta (B). Fotografia demonstrando o botão celular (seta laranja) formado após a centrifugação a 1250 RPM durante 3 minutos realizada no processo de descongelamento e lavagem celular (C). Após a dermorráfia, 3 milhões de CTM-AD alógenas diluídas em 2 mL de solução salina 0,9% foram aplicadas de forma percutânea no foco da fratura com auxílio de agulha hipodérmica e seringa (D). Imagens radiográficas pré-operatórias da fratura (E, F) e no pós-operatório imediato, demonstrando a correção dos desvios *valgus* e *recurvatum*.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo *software* (Prism Windows 6.0, GraphPad Software, CA, USA). Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Variáveis com distribuição paramétrica foram representadas por média $\pm$ desvio padrão, e comparadas pelo teste T de Student, enquanto os dados não paramétricos foram representados por mediana [intervalo interquartil], e comparados pelo teste de Wilcoxon. Para todas as análises foi considerado estatisticamente significativo $P < 0,05$.

Resultados

Foram incluídos neste estudo 20 cães. Destes, 17 (85%) apresentaram fraturas completas e fechadas em tíbia e fíbula e 3 (15%) apresentaram somente fratura completa e fechada na tíbia (Tabela 1).

A população estudada foi composta por quantidade equinúmerica de machos e fêmeas. A mediana da idade no momento do trauma foi de 12 meses [8 - 57 meses], com o mínimo de 2 meses e máximo de 15 anos de idade. Cinquenta e cinco por cento dos pacientes foram classificados como esqueleticamente imaturos, ou seja, apresentaram as linhas de crescimento abertas nas radiografias pré-operatórias. Por outro lado, 15% dos pacientes apresentaram idade superior a 13 anos no momento

do trauma. A mediana da massa corporal dos animais foi de 23,7 kg [14,5 - 33,8 kg], e incluiu pacientes com mínimo de 2,7 kg e máximo de 36 kg.

Em relação à classificação das fraturas, 17 (85%) foram diafisárias e 3 (15%) metafisárias, sendo 14 em terço médio, 3 em terço proximal e 3 em terço distal da tíbia. Setenta por cento das fraturas eram oblíquas ou em espiral, 10% eram transversas e 20% eram cominutivas. Todas as fraturas eram completas e fechadas. Todas as fraturas foram operadas pela mesma equipe cirúrgica, e a mediana do tempo entre o momento do trauma até o procedimento cirúrgico foi de 4 dias [3-6 dias] (mínimo de 1 dia e máximo de 15 dias). Não foram observadas nenhuma complicação intraoperatória. As fraturas cominutivas foram observadas em animais com a linha de crescimento fechadas (esqueleticamente maduros), enquanto que todos os animais com a linha de crescimento abertas apresentaram fraturas oblíquas/ espirais ou transversas.

A etiologia da fratura variou entre atropelamento por automóvel (65% dos casos), quedas (25% dos casos) e causas desconhecidas (10% dos casos).

O método de fixação de escolha para todas as fraturas de tíbia foi a aplicação de placa bloqueada (mais longa possível), de contato limitado, com orifícios combinados (sistema bloqueado e compressão dinâmica no mesmo orifício), exercendo a função ponte, aplicada na face medial da tíbia, inserindo-se o mínimo de 2 e no máximo 4 parafusos bloqueados bicorticais em cada fragmento da fratura.

Os parafusos foram aplicados nas epífises e metáfises através dos orifícios das extremidades distal e proximal da placa. Foram utilizados diversos comprimentos e sistemas de implantes de acordo com o tamanho de cada paciente e de cada tíbia. O sistema mais utilizado foi o de 2,0 mm (35%), seguido pelo de 3,5 mm (30%) e de 2,7

mm (30%). Em somente 1 caso (5%) foi utilizado o sistema de placa bloqueada 1,5 mm. A densidade de parafusos na placa (relação do número de parafusos aplicados sobre o número de orifícios da placa) foi menor que 0,56 em todos os casos (mediana 0,42 [0,40 – 0,48]). Em nenhum caso utilizou-se o pino intramedular como método de fixação adicional ou, até mesmo, como método indireto de redução da fratura.

Em nenhuma fratura foi realizada a reconstrução anatômica dos fragmentos por meio de compressão dinâmica ou qualquer tipo de compressão interfragmentária. A aposição dos fragmentos foi classificada como boa em 60% dos casos, adequada em 35% dos casos e inaceitável em 5% dos casos.

Os ângulos mecânicos tibiais mediais proximal e distal (mMPTA e mMDTA) nas radiografias craniocaudais pós-operatórias não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparados aos valores de referência já publicados na literatura (21). Entretanto, 4 casos apresentaram desvio *valgus* classificado como discreto quando comparados com a tíbia contralateral intacta. Estes desvios angulares não acarretaram em repercussões clínicas aparentes durante todo período de avaliação.

A mediana e intervalo interquartil do ângulo do platô tibial (TPA) avaliado nas radiografias mediolaterais do pós-operatório imediato, foi de 25° [22,25° - 27,75°] (mínimo de 5° e máximo de 32°). Estes valores foram classificados como dentro dos valores de referência publicados em cães normais na literatura (22). Apesar disso, um caso apresentou desvio *recurvatum* moderado na radiografia médio lateral do pós-operatório imediato, tornando o TPA final de 5°. Em outros 3 casos, foi detectado *recurvatum* discreto e em outros 2 casos *procurvatum*, porém sem repercussões clínicas aparentes no período estudado. A torção da tíbia foi avaliada subjetivamente e em nenhum caso foi detectada.

Tabela 1. Resumo dos dados clínicos dos 20 cães incluídos neste estudo com fraturas de tíbia tratadas com osteossíntese minimamente invasiva com placa e células-tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo.

	Cães		MC(kg)	Fratura	Placa bloqueada	União óssea clínica
1	5a	SRD	7,1	Diaf., espiral, médio	2,0 mm, 9 F., 5 paraf.	30 dias
2	13a	Rott.	36	Meta., com. distal	3,5 mm B., 14 F., 6 paraf.	30 dias
3	13a	Pinscher	2.7	Diaf., oblíq., prox.	1,5 mm, 10 F., 4 paraf.	60 dias
4	8m	Shih Tzu	6.6	Diaf., espiral, médio	2,0 mm, 8 F., 4 paraf.	30 dias
5	9m	SRD	7.9	Diaf., trans, médio	2,0 mm, 10 F., 4 paraf.	60 dias
6	2a	SRD	17	Diaf., espiral, médio	2,7 mm, 8 F., 4 paraf.	30 dias
7	1a	Bull Ter.	14	Diaf., oblíq., médio	2,7 mm, 11 F., 5 paraf.	30 dias
8	5m	Boxer	10	Diaf., oblíq., médio	2,0 mm, 10 F., 4 paraf.	15 dias
9	7m	SRD	6,3	Diaf., oblíq., médio	2,0 mm, 10 F., 4 paraf.	15 dias
10	8a	SRD	18	Diaf., com., médio	2,7 mm, 12 F., 5 paraf.	30 dias
11	2a	SRD	23,2	Meta., com., prox.	3,5 mm, 12 F., 5 paraf.	30 dias
12	3m	Dober.	5.6	Diaf., trans., médio	2,0 mm, 8 F., 4 paraf.	15 dias
13	7m	SRD	7.1	Diaf., oblíq., médio	2,0 mm, 9 F., 4 paraf.	15 dias
14	3a	SRD	24,2	Diaf., oblíq., distal	3,5 mm, 11 F., 4 paraf.	30 dias
15	11m	Am.Staf.Ter.	27	Diaf., oblíq., prox.	3,5 mm, 10 F., 4 paraf.	30 dias
16	9m	SRD	20,5	Diaf., espiral, médio	3,5 mm, 11 F., 4 paraf.	15 dias
17	4a	C. Chow	25,2	Diaf., com., médio	3,5 mm, 11 F., 5 paraf.	30 dias
18	1a	Rott.	25,8	Diaf., oblíq., médio	2,7 mm, 12 F., 5 paraf.	15 dias
19	15a	SRD	13	Meta.,espiral., distal	2,7 mm, 12 F., 5 paraf.	30 dias
20	9m	Bull. Ing.	16	Diaf., espiral, médio	2,7 mm, 9 F., 5 paraf.	30 dias

a., anos; m., meses; SRD, sem raça definida; Rott., Rottweiler; Bull Ter., Bull Terrier; Dober., Dobermann Pinscher.; Am. Staf. Ter., American Staffordshire Terrier; C.Chow, Chow-Chow; Bull. Ing., Bulldog Inglês; diaf., diáfisária; meta., metafisária; oblíq., oblíqua; trans., transversa; com., cominutiva; B., *Broad*; F., Furos; paraf., parafusos; kg, quilograma.

No geral, o tempo mediano de união clínica radiográfica foi de 30 dias [15-30 dias] (mínimo de 15 dias e máximo de 60 dias). Não houve diferença entre o tempo de consolidação óssea dos cães esqueleticamente imaturos (15 dias [15 – 30 dias]) para os cães que já apresentavam a linha de crescimento fechadas no momento do trauma (30 dias [30 – 30 dias]) ($P=0,26$). Em 60% dos casos foi observada reação

periosteal moderada a intensa, demonstrando organizada formação de calo ósseo no foco de fratura.

As complicações menores incluíram a formação de seroma no acesso distal em um dos casos, o qual foi tratado clinicamente de forma efetiva, e a soltura (*pullout*) do parafuso mais proximal em dois casos, porém sem repercussão na consolidação óssea e no quadro clínico. Nestes dois casos os implantes foram removidos após a união óssea.

Foram observadas 3 complicações maiores (15%). Uma complicação maior ocorreu no cão número 3, Pinscher, macho 13 anos de idade, 2,7 kg, com fratura diafisária de terço proximal da tíbia oblíqua curta, em que, nas radiografias pós-operatórias imediatas, foi constatada aposição inaceitável ocasionando desvio *recurvatum* e *valgus* moderado. Devido a complicações anestésicas de hipotensão no trans-operatório, optou-se por não intervir cirurgicamente para corrigir o mau alinhamento. Apesar disso, o paciente apresentou boa evolução clínica e a consolidação óssea ocorreu em 60 dias. Em 120 dias, observou-se avançado processo de remodelamento ósseo atenuando a intensidade de desvio *recurvatum* e *valgus* da tíbia deste paciente, tornando o resultado final satisfatório. As outras duas complicações maiores foram a penetração do parafuso mais proximal da placa no espaço articular do joelho. Estas complicações foram diagnosticadas somente com as radiografias pós-operatórias imediatas, pois em nenhum caso foram usadas fluoroscopia ou radiografias intraoperatórias, e necessitaram de segunda intervenção cirúrgica no pós-operatório imediato para a remoção ou a troca do parafuso por um mais curto (Figura 3). Não foram observadas outras complicações.

Com base na avaliação clínica e ortopédica no momento da alta dos pacientes, todos os casos foram classificados como bom a excelente, ou seja, todos apresentaram reparação óssea adequada e nenhum desenvolveu claudicação grave e constante, que necessitasse do uso contínuo de terapia analgésica.



Figura 3. Imagens radiográficas craniocaudal e mediolateral da tíbia do cão 11, sem raça definida de 2 anos de idade, com massa corporal 23,2 kg fratura metafisária proximal de tíbia, cominutiva e com a fíbula fraturada no pré-operatório (A, B). As radiografias pós-operatórias imediatas (C, D) demonstraram a complicação de inserção do parafuso no espaço articular do joelho (seta laranja). Projeções radiográficas craniocaudais com 60 dias (E) e 90 dias (F) de pós-operatória, demonstrando boa consolidação óssea. Nota-se o parafuso mais proximal sem penetrar o espaço articular após a troca (E, F).

Discussão

Os critérios de inclusão e exclusão para a seleção dos casos descritos neste estudo foram respeitados de forma criteriosa. Dentre os 20 cães selecionados, todos apresentavam algum tipo de fratura não articular de tíbia na qual era possível a

utilização de MIPO como forma de tratamento. Em nenhum cão foram detectadas alterações ou doenças sistêmicas que pudessem comprometer indiretamente o processo de reparação óssea ou contraindicar a terapia celular com CTM-AD. Sabe-se que alterações sistêmicas decorrentes de doenças cardíacas, hepáticas, renais, endócrinas, respiratória, infecções bacterianas e distúrbios nutricionais podem retardar o tempo de união óssea (25). Além disso, fraturas abertas com possível osteomielite e pacientes com alguns tipos de neoplasmas são situações que contraindicam o uso de células-tronco mesenquimais, devido ao seu potencial imunomodulador e neoangiogênico (26).

A população estudada apresentou moderada variabilidade em algumas características como massa corporal e idade, entretanto aproximadamente metade dos cães eram esqueleticamente imaturos e a outra metade apresentavam as linhas de crescimento fechadas. Características inerentes à classificação das fraturas tibiais também variaram, porém em 85% dos casos foram diafisárias, 70% no terço médio e 70% oblíquas ou em espiral. Comparado com alguns estudos clínicos já publicados que avaliaram o tratamento de fraturas em cães atendidos na rotina clínica (13,23,27,28), a população estudada neste trabalho apresenta variabilidade aceitável, embora, ainda assim, possa ser considerada uma limitação do estudo.

Em todos os casos do presente estudo foram utilizados os princípios da osteossíntese minimamente invasiva (MIO), de modo que o hematoma do foco da fratura fosse preservado o máximo possível. Técnicas de redução indireta como tração manual e utilização de garras ósseas nas extremidades do osso através dos portais criados para a inserção da placa, permitiram menor lesão aos tecidos moles e ao periósteo.

A principal vantagem da MIPO em comparação com a técnica de redução aberta e fixação interna (ORIF) é a preservação do suprimento sanguíneo extra ósseo proveniente do periósteo e tecidos moles adjacentes à fratura, o qual é fundamental para a criação de ambiente biológico favorável para a formação de calo cartilaginoso e posterior mineralização e formação do calo ósseo (29).

O hematoma tem a função de sinalizar com moléculas, as quais têm a capacidade de desencadear cascatas inflamatórias e promover respostas celulares críticas à reparação da fratura (30). As células inflamatórias migram do sangue periférico e do compartimento intramedular ao foco de fratura. Elas secretam citocinas, como a interleucina-1, interleucina-6 e o fator de necrose tumoral (TNF- α), as quais são importantes na regulação dos eventos prematuros relativos à regeneração das fraturas (25). As citocinas secretadas no foco de fratura induzem a produção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e outros fatores angiogênicos para promover a neoangiogênese (31). As plaquetas, provavelmente, são a primeira fonte do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e do fator de crescimento transformador (TGF-1), ambos reguladores importantes da proliferação e diferenciação celular (32). Acredita-se que a associação da MIPO com terapia celular com CTM-AD realizada nos casos do presente estudo, propiciou a preservação de ambiente biológico no foco da fratura favorável para a sinalização celular, estímulo da neoangiogênese e osteogênese.

Preconizou-se a padronização em relação ao método de fixação utilizado nos 20 cães incluídos neste estudo para que este fator influenciasse o mínimo possível no processo de reparação óssea. Todas as fraturas foram tratadas com placa bloqueada (LCP) na função ponte com parafusos bloqueados bicorticais na extremidade distal e

proximal da tíbia. Preconizou-se a utilização de placa mais longa possível e de menor número de parafusos possível por fragmento (mínimo 2 e máximo 4), a fim de promover estabilização elástica com mobilidade relativa. Observa-se que a mediana da densidade de parafusos na placa foi de 46% neste estudo. Esta estratégia de fixação em ponte foi relatada como fator benéfico para estimular a reparação óssea secundária e formação precoce de calo ósseo, quando comparada com a fixação com compressão interfragmentária e estabilidade absoluta (33,34). A reparação óssea ocorre por processo bastante semelhante à formação embrionária do tecido ósseo (35) e, parece ser primariamente influenciada pela quantidade de movimento interfragmentar, causada pelo estresse aplicado sobre a fratura, e modulado pela estabilidade de sua fixação (36).

Os implantes utilizados foram escolhidos de acordo com as dimensões da tíbia, os quais variaram desde o sistema de placa e parafusos bloqueados 1,5 mm até o sistema 3,5 mm reforçado. A estabilidade angular oferecida pelos sistemas bloqueados oferecem vantagens mecânicas e biológicas, o que favorece sua utilização em fixações em ponte nas MIPO (6,29,37). As principais vantagens observadas são a não obrigatoriedade de moldagem precisa da placa à superfície da tíbia e, por conta do contato ósseo limitado, a preservação do suprimento sanguíneo periosteal abaixo da placa (33,38). Além disso, os sistemas bloqueados oferecem ótima estabilidade e resistência à falha do implante quando comparados aos sistemas não bloqueados(34), permitindo a aplicação de menos parafusos por fragmento. Em grande parte dos casos descritos neste estudo, foram utilizados somente 2 parafusos bloqueados distais e 2 proximais, os quais se mostraram suficientes para promover

estabilidade adequada para rápido processo de reparação óssea sem falhas graves nos implantes.

Independentemente das técnicas de redução e fixação, a restauração de comprimento e alinhamento adequados em todos os planos é primordial para a recuperação funcional. Reconhecidamente por causa da falta de observação do foco de fratura, o mau alinhamento pós-operatório representa um dos maiores desafios a serem superados quando se usa a MIPO (29). No presente estudo, os ângulos mecânicos tibiais mediais proximal e distal (mMPTA e mMDTA) e o TPA não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) quando comparados aos valores de referência já publicados na literatura (21,22). O mau alinhamento nos planos frontal e sagital podem levar a repercussões clínicas, incluindo osteoartrite secundária à alteração nos padrões de carga da cartilagem articular e aumento do risco de ruptura do ligamento cruzado cranial (39,40). Mesmo nos casos em que foi constatado desvio *valgus* e *recurvatum* discretos, não foram observadas estas alterações clínicas no período estudado.

No presente trabalho, radiografias transoperatórias ou fluoroscopia não foram utilizadas. Alguns autores defendem (41) o uso de intensificadores de imagens como ferramenta indispensável, uma vez que permite observar em tempo real a aposição dos fragmentos ósseos, da placa e dos parafusos, sendo o método mais útil para avaliar o alinhamento ósseo (42). Observou-se que nos casos descritos neste estudo, não foi necessário o uso de fluoroscopia pois a tíbia é um dos ossos longos que mais se adequa a técnica da osteossíntese minimamente invasiva, devido à sua anatomia permitir fácil acesso a superfície medial para aplicação da placa e a escassa cobertura muscular contribuir para a redução indireta da fratura.

Os exames radiográficos realizados nos tempos pré-determinados deste estudo foram importantes para o acompanhamento precoce do processo de reparação óssea. Aos 15 dias de pós-operatório 60% dos animais apresentaram reação periosteal moderada a intensa, com organizada formação de calo ósseo no foco de fratura e 30% apresentaram união clínica da fratura. Alguns autores que avaliaram a reparação óssea em fraturas submetidas à MIPO ou ORIF relataram que a falta de avaliação radiográfica mais precoce (antes dos 30 dias) foi importante limitação do estudo. Acredita-se que em muitos casos a reparação óssea possa ter ocorrido antes dos 30 dias, o que atrapalhou a comparação entre os grupos e culminou com resultados sem diferença estatística (11,28). Outro estudo, que comparou de forma experimental a formação de calo ósseo e mineralização em fraturas de ulna submetidas à MIPO *versus* ORIF em cães, demonstrou que a principal diferença entre os grupos foi a maior formação de calo ósseo com 2 semanas de pós-operatório no grupo MIPO. Esta diferença foi constatada por meio de avaliação radiográfica, histológica, micro-CT, histomorfometria e marcação fluorescente (43).

Na população estudada, o tempo mediano de união clínica radiográfica foi de 30 dias [15-30 dias] (mínimo de 15 dias e máximo de 60 dias). Além da precocidade do processo de reparação óssea, também foram observadas aos 15 dias intensa formação de calo ósseo em 12 casos. Estes resultados foram melhores do que o relatado usando ORIF com placas ósseas (87 - 121 dias) ou com redução fechada e fixação externa (69 – 82 dias) (44,45). Entretanto, estes resultados foram relativamente semelhantes aos relatados usando MIPO em tíbias. Um estudo prospectivo que avaliou a MIPO em 36 fraturas tibiais não articulares em cães e gatos, obteve tempo médio de reparação óssea de 45 dias (13). Outro estudo que avaliou o

tratamento de fraturas de tíbia usando a MIPO em 6 cães e 4 gatos apresentou tempo médio de reparação óssea de 35 dias.

Diversos estudos, "*in vitro*" e "*in vivo*", demonstraram resultados promissores no beneficiamento da reparação óssea utilizando a terapia celular (18,19,46–48). As CTM podem responder ao ambiente biológico e mecânico local e diferenciar-se em qualquer componente celular necessário na união óssea secundária, portanto, oferecem importante potencial de reparo ósseo para uma variedade de situações (49). Além disso, CTM secretam uma variedade de fatores de crescimento e citocinas importantes para o processo de reparação óssea (26). Dentre eles, destacam-se o VEGF, o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1(IGF-1) e o fator de crescimento hepático (HGF), os quais são importantes fatores angiogênicos e estimuladores de proliferação e diferenciação celular (31,50,51).

Os resultados do presente estudo são importantes para sustentar a terapia celular em casos de uniões retardadas, não uniões, defeitos ósseos críticos ou fraturas complexas, além das técnicas já amplamente utilizadas como enxerto ósseo esponjoso e/ou uso de biomateriais. O processo de neoangiogênese é o ponto-chave para a restauração do suprimento sanguíneo dos fragmentos da fratura e, conseqüentemente, elevar a tensão de oxigênio local, criando ambiente favorável para a diferenciação das células progenitoras em osteoblastos. A aplicação de CTM-AD alógenas promove a liberação de VEGF, otimizando este processo que frequentemente está prejudicado nos casos de não uniões atróficas (19,31). Além disso, a aplicação percutânea de CTM-AD alógena é uma técnica pouco invasiva, pois não necessita de preparo e acesso cirúrgico de outro sítio doador, o que diminui a

morbidade e tempo cirúrgico. Outra grande vantagem é a disponibilidade de aplicação ao se utilizar banco de CTM-AD criopreservadas.

No presente estudo, utilizou-se células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-AD) e são diversas as justificativas para sua escolha. O tecido adiposo subcutâneo é rica fonte de CTM-AD, está disponível em grandes quantidades e, é relativamente fácil de se obter (52). Além disso, relatos recentes demonstraram que, em condições adequadas, as CTM-AD têm o potencial de se diferenciarem em linhagem osteogênica tão eficientemente quanto as CTM derivadas de medula óssea (53). Adicionalmente, tanto as respostas parácrinas quanto autócrinas podem ser provocadas por fatores de crescimento secretados pelas CTM-AD (46). As CTM-AD não somente secretam os fatores de crescimento, mas podem também responder a eles, ampliando assim a resposta biológica do corpo à terapia celular (54). Muitos fatores que são secretados pelas CTM-AD funcionam em mecanismos antiapoptóticos ou, alternativamente, induzem migração e proliferação celular (50).

No presente estudo, utilizou-se CTM-AD alógenas, ou seja, as células foram isoladas do tecido adiposo de um animal doador da mesma espécie e cultivadas no laboratório. As CTM alógenas são utilizadas atualmente na rotina veterinária e apresentam como vantagem a disponibilização imediata de material biológico de maneira rápida e segura, tendo em vista, a possibilidade de manutenção de banco de células congeladas em nitrogênio líquido. As CTM expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I), porém não apresentam marcadores para as moléculas de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (55). Por estas razões, as CTM são consideradas células não imunogênicas, ou seja, incapazes de induzir aloreatividade em mamíferos (55). Esta propriedade é extremamente

importante, pois evita manifestações de sintomas de rejeição pelo paciente após o transplante de CTM alógenas.

Três animais apresentaram complicações maiores no presente estudo. Destas, duas foram a invasão da extremidade do parafuso mais proximal no espaço articular da articulação do joelho. Este tipo de complicação é relativamente comum nas osteossínteses de tíbia, principalmente quando se utilizam parafusos bloqueados e não é possível imagens radiográficas ou fluoroscopia no período transoperatório. A moldagem da placa na face medial da metáfise e epífise proximal da tíbia cria tendência de direcionamento do parafuso para o espaço articular devido a necessidade de perpendicularidade do parafuso bloqueado com a superfície da placa. A outra complicação maior foi a aposição inaceitável em um paciente deste estudo detectada na radiografia pós-operatória imediata. Esta complicação foi considerada falha técnica na execução da técnica de MIPO e nota-se que fraturas transversas e oblíquas curtas são mais suscetíveis à falha na redução fechada. Isto ocorre, principalmente quando não se utiliza radiografia transoperatórias ou intensificador de imagem. Apesar dos desvios angulares gerados pela falha na redução fechada neste caso, o processo de reparação óssea evoluiu satisfatoriamente e o processo de remodelamento ósseo observado em 90 a 120 dias atenuou estes desvios.

Estudos clínicos que avaliam a tratamento de fraturas apresentam diversas limitações. A variabilidade das características da população e dos fatores que influenciam o processo de reparação óssea são de difícil controle. Entretanto, estudos prospectivos e com tamanho da população adequados visam atenuar estas limitações a fim de trazer resultados com maior confiabilidade.

Conclusão

O rápido processo de reparação óssea e o baixo índice de complicações observados nos casos deste estudo sugerem que a associação da terapia celular com CTM-AD alógena e MIPO se mostrou uma alternativa segura, viável e eficaz na promoção da reparação óssea em fraturas não articulares de tíbia em cães.

Referências

1. Harasen G. Common long bone fracture in small animal practice--part 2. Can Vet J = La Rev Vet Can. 2003 Jun;44(6):503–4.
2. Harasen G. Common long bone fractures in small animal practice--part 1. Can Vet J = La Rev Vet Can. 2003 Apr;44(4):333–4.
3. Palmer RH. Biological osteosynthesis. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1999;29(5).
4. Heitemeyer U, Kemper F, Hierholzer G, Haines J. Severely comminuted femoral shaft fractures: treatment by bridging-plate osteosynthesis. Arch Orthop Trauma Surg. 1987;106(5):327–30.
5. Augat P, von Rüden C. Evolution of fracture treatment with bone plates. Injury. 2018 Jun;49:S2–7.
6. Krettek C, Müller M, Miclau T. Evolution of minimally invasive plate osteosynthesis (MIPO) in the femur. Injury 2001;32 Suppl 3:SC14-23.
7. Farouk O, Krettek C, Miclau T, Schandelmaier P, Guy P, Tscherne H. Minimally invasive plate osteosynthesis: does percutaneous plating disrupt femoral blood supply less than the traditional technique? J Orthop Trauma 1999;13(6):401–6.

8. Johnson AL. Current concepts in fracture reduction. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2003;16(2):59–66.
9. Leunig M, Hertel R, Siebenrock KA, Ballmer FT, Mast JW, Ganz R. The evolution of indirect reduction techniques for the treatment of fractures. *Clin Orthop Relat Res* 2000;(375):7–14.
10. Rovesti GL, Margini A, Cappellari F, Peirone B. Clinical application of intraoperative skeletal traction in the dog. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2006;19(1):14–9.
11. Boero Baroncelli A, Peirone B, Winter MD, Reese DJ, Pozzi A. Retrospective comparison between minimally invasive plate osteosynthesis and open plating for tibial fractures in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2012;25(5):410–7.
12. 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: Paper. *J Small Anim Pract* 2007;48(3):157–60.
13. 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.
14. Raggatt LJ, Wulschleger ME, Alexander KA, Wu ACK, Millard SM, Kaur S, et al. Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. *Am J Pathol* 2014;184(12):3192–204.

15. Das A, Segar CE, Hughley BB, Bowers DT, Botchwey EA. The promotion of mandibular defect healing by the targeting of S1P receptors and the recruitment of alternatively activated macrophages. *Biomaterials* 2013;34(38):9853–62.
16. Kuroda R, Matsumoto T, Kawakami Y, Fukui T, Mifune Y, Kurosaka M. Clinical Impact of Circulating CD34-Positive Cells on Bone Regeneration and Healing. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20(3):190–9.
17. Hutton DL, Grayson WL. Stem cell-based approaches to engineering vascularized bone. *Curr Opin Chem Eng* 2014;3:75–82.
18. Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimple JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(3):140–50.
19. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* 2015;70:93–101.
20. Pozzi A, Lewis D. Surgical approaches for minimally invasive plate osteosynthesis in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009;22:316-320.
21. 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.
22. 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.

23. 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* 2007;48(3):157–60.
24. von Pfeil D, Glassman M, Ropski M. Percutaneous tibial physeal fracture repair in small animals: technique and 17 cases. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2017 Oct;30(4):1–9.
25. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011;42(6):551–5.
26. 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.
27. Boero Baroncelli A, Peirone B, Winter MD, Reese DJ, Pozzi A. Retrospective comparison between minimally invasive plate osteosynthesis and open plating for tibial fractures in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2012;25(5):410–7. A
28. Pozzi A, Hudson CC, Gauthier CM, Lewis DD. Retrospective Comparison of Minimally Invasive Plate Osteosynthesis and Open Reduction and Internal Fixation of Radius-Ulna Fractures in Dogs. *Vet Surg*. 2013;42(1):19–27.
29. 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.
30. 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.

31. 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).
32. Poniatowski LA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor beta family: Insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
33. 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.
34. Perren SM. Biological internal fixation interface between biology and biomechanics. *Eur Cells Mater* 2003;5(SUPPL. 2):22–3.
35. Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 2015;70:19–27.
36. Chao P, Lewis DD, Kowaleski MP, Pozzi A. Biomechanical Concepts Applicable to Minimally Invasive Fracture Repair in Small Animals. 2015;42(2012):853–72.
37. Beale BS, McCally R. Minimally Invasive Plate Osteosynthesis. Tibia and Fibula. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* 2012;42(5):1023–44.
38. Garofolo S, Pozzi A. Effect of Plating Technique on Periosteal Vasculature of the Radius in Dogs: A Cadaveric Study. *Vet Surg*. 2013;42(3):255–61.

39. Selmi AL, Padilha Filho JG. Rupture of the cranial cruciate ligament associated with deformity of the proximal tibia in five dogs. *J Small Anim Pract* 2001;42:390–3.
40. Janovec J, Kyllar M, Midgley D, Owen M. Conformation of the proximal tibia and cranial cruciate ligament disease in small breed dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2017 30(3):178–83.
41. Hulse D. MIPO Techniques for the Humerus in Small Animals. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 2012;42(5):975–82.
42. 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.
43. Xu H, Xue Z, Ding H, Qin H, An Z. Callus Formation and Mineralization after Fracture with Different Fixation Techniques: Minimally Invasive Plate Osteosynthesis versus Open Reduction Internal Fixation. *PLoS ONE* 2015; 10(10): e0140037:1–13.
44. 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.
45. 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.

46. 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.
47. Tevlin R, Walmsley GG, Marecic O, Hu MS, Wan DC, Longaker MT. Stem and progenitor cells: advancing bone tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res*. 2016;6(2):159–73.
48. Venkatesan J, Lowe B, Anil S, Kim S-K, Shim MS. Combination of nano-hydroxyapatite with stem cells for bone tissue engineering. *J Nanosci Nanotechnol* 2016;16(9):8881–94.
49. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg*. 2006;35(3):232–42.
50. Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, Gimple 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.
51. Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimple JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(3):140–50.
52. 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.
53. 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.

54. 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.
55. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105(4):1815–22.

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

Normas do periódico *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* (VCOT) (Anexo 1)

Resumo

Objetivos: Comparar a reparação óssea em fraturas diafisárias de tíbia utilizando a técnica de osteossíntese minimamente invasiva com placa (MIPO) sem intensificador de imagem associada à aplicação percutânea, no foco de fratura, de células-tronco mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo (CTM-AD) ou concentrado de medula óssea (MO).

Métodos: Os cães de cada grupo foram pareados por semelhança de idade, massa corporal e tipo de fratura para um estudo retrospectivo de coorte. Foram utilizados 8 pares de cães apresentando 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. Os exames radiográficos foram realizados no momento imediato após a cirurgia e com 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós-operatórios e avaliados quanto à aposição dos fragmentos, alinhamento da tíbia, evolução da reparação óssea e complicações.

Resultados: 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 apresentou score final médio superior ($P < 0,05$) demonstrando mais precocidade e qualidade no processo de reparação óssea.

Significância Clínica: Os cães tratados com MIPO e CTM-AD alógenas neste estudo apresentaram resultado superior aos tratados com MIPO e MO corroborando a ação potencializadora da reparação óssea da terapia celular.

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

Introdução

A osteossíntese minimamente invasiva com placa (MIPO) tornou-se um método de estabilização amplamente difundido para o tratamento de fraturas fechadas de tíbia nas últimas décadas (1,2). Dentre as principais vantagens da MIPO destacam-se a preservação do suprimento sanguíneo para acelerar o processo de reparação óssea, menor morbidade do paciente e retorno mais rápido à função (1,3).

Em medicina veterinária de pequenos animais, diversos fatores inerentes ao tipo de fratura (p. ex. grandes defeitos ósseos, não união) e/ou ao indivíduo (p.ex. comorbidades que resultem em atrasos na reparação óssea, idade avançada, comportamento) podem resultar no insucesso do tratamento cirúrgico. As uniões retardadas e as não-uniões são complicações comuns na rotina clínica, sendo mais frequentes nas fraturas de tíbia e de rádio e ulna (4).

A terapia celular visa suprir a osteogênese insuficiente, acelerando a reparação e regeneração óssea, devido as propriedades osteoindutoras e osteogênicas das células-tronco mesenquimais (CTM) (5,6). As CTM são multipotentes, ou seja, capazes de se diferenciar em vasta linhagem celular, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos e tenócitos (7). As CTM são originadas da medula óssea e do perióstio, embora outras fontes também possam ser utilizadas para sua obtenção, como, por exemplo, o tecido adiposo (7).

O concentrado de medula óssea contém CTM derivadas de medula óssea (CTM-MO) e pode ser obtido do próprio indivíduo (autólogas), por meio da punção medular na crista ilíaca, na tuberosidade do úmero ou no esterno (8,9). A colheita do aspirado de medula óssea requer a preparação do sítio doador, aumentando o tempo

e o custo da cirurgia (8). A quantidade de aspirado de medula óssea, e consequentemente de CTM-MO autógenas, que pode ser colhido pode ser insuficiente, especialmente em pacientes idosos ou muito pequenos (8).

As CTM derivadas do tecido adiposo (CTM-AD) representam fonte de células-tronco multipotentes, com características morfológicas, de diferenciação celular e fenotípicas similares às CTM derivadas da medula óssea ou do cordão umbilical (10). A vantagem é que as CTM-AD podem ser obtidas previamente, de outros indivíduos da mesma espécie (alógenas) e submetidas posteriormente a processos laboratoriais de cultivo e replicação celular para obtenção de quantidade mais expressiva e homogênea de CTM-AD (10).

Estudos que avaliaram a utilização de concentrado de medula óssea ou CTM-AD concomitante à MIPO são escassos em Medicina Veterinária. Por este motivo, o objetivo geral deste trabalho foi comparar a reparação óssea por meio de avaliações radiográficas seriadas em dezesseis cães com fraturas diafisárias e/ou metafisárias de tíbia submetidos à MIPO sem intensificador de imagem em associação ao uso de concentrado de medula óssea ou CTM-AD, pelo período de 120 dias no pós-operatório.

Material e métodos

Toda a metodologia prevista para o trabalho foi encaminhada e aprovada para Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo: 19864/2016).

Foram avaliadas, de forma retrospectiva, as fichas clínicas de 29 cães que apresentaram fratura de tíbia, associada ou não à fratura de fíbula, os quais foram atendidos entre março de 2014 a setembro de 2018. Todos pacientes apresentaram fratura completa e fechada de tíbia, a qual foi tratada com a técnica de MIPO. Dos 29

cães avaliados, 20 foram submetidos à terapia celular com 3 milhões de CTM-AD alógenas injetadas no foco de fratura, de forma percutânea, imediatamente após o término da cirurgia e 8 cães foram submetidos à aplicação percutânea de concentrado de medula óssea autóloga (MO), no foco de fratura, imediatamente após o término da cirurgia.

Foram selecionados 8 cães tratados com MIPO e CTM-AD (Grupo CTM) e 8 cães tratados com MIPO e MO (Grupo MO) para um estudo de coorte. Os cães de cada grupo foram divididos em 8 pares, contendo 1 cão do grupo CTM e 1 cão do grupo MO. Os cães de cada par foram selecionados, a fim de apresentar a maior semelhança nas características e classificação da fratura e na massa corporal entre si. Com o objetivo de parear casos com idades semelhantes, os cães foram divididos em 5 grupos. Grupo 1: cães com menos de 3 meses de idade; grupo 2: cães de 3 a 6 meses de idade; grupo 3: cães de 6 a 12 meses de idade; grupo 4: cães de 1 a 7 anos de idade; grupo 5: cães acima de 7 anos de idade. Todos os cães tiveram suas fraturas de tíbia tratadas com MIPO em até 7 dias após o trauma. A seleção dos casos foi realizada por um dos autores deste estudo de forma a pareá-los, mantendo a maior semelhança possível entre as características da fratura e do paciente entre os cães de cada grupo.

Obtenção, cultivo, e descongelamento das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

As células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo foram processadas e fornecidas pelo laboratório BIO CELL^b. Para a obtenção do tecido

^b BIO CELL LTDA – Brasília -DF, Brasil

adiposo, foi utilizado um cão doador, fêmea, de 1 ano de idade, hígido, sendo a colheita realizada durante o procedimento anestésico e cirúrgico para castração.

Morfina (0,5 mg/kg) e acepromazina (0,03 mg/kg) foram administrados por via intramuscular para a medicação pré-anestésica. A anestesia geral foi induzida pela administração intravenosa de propofol (1-2 mg/kg) e a manutenção anestésica realizado por meio de anestesia inalatória com isoflurano (1,5-2%) em 100% de oxigênio.

Após a anestesia do animal doador foi realizada incisão de aproximadamente 2 cm na pele na região lombar. Com o auxílio de material cirúrgico foi colhido aproximadamente 10 a 25 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa presente na base da cauda. O tecido adiposo foi acondicionado em um tubo de 50 mL contendo meio de lavagem estéril por 2 minutos. Imediatamente após esse tempo o tecido adiposo foi retirado do primeiro tubo de lavagem e acondicionado no segundo tubo de lavagem por 3 minutos. Após este tempo o tecido adiposo foi acondicionado no tubo contendo o meio de transporte. O tubo foi identificado com os dados do animal e armazenado refrigerado a 4°C até o momento do envio do material para o laboratório.

Após a chegada do material ao laboratório, o tecido adiposo foi lavado várias vezes em solução tampão fosfato salina (PBS) para retirar debris celulares e excesso de sangue. Logo após foi cortado em partículas pequenas e colocado em contato com a solução de collagenase e hialuronidase para que fosse realizada a digestão enzimática. Esta mistura foi centrifugada por 15 minutos a 1250 rpm e o botão celular foi ressuspendido. O mesmo procedimento foi repetido quatro vezes. Realizou-se o método de exclusão *trypan blue*. Esse processo constituiu a preparação da fração estromal vascular.

Após a obtenção das CTM, estas foram colocadas em garrafas de cultivo de 25 cm³ contendo meio TCM 199. As garrafas de cultivo foram acondicionadas em estufas de cultivo celular à temperatura de 39,5 °C e 5 % de CO².

Após aproximadamente sete dias de cultivo foi realizado o repique celular e foi iniciado novo cultivo celular em garrafa de 75 cm³. Ao se obter 80% de confluência celular foi realizado a tripsinização. Parte das células permaneceu na garrafa de cultivo e cerca de 1 milhão de células foram acondicionadas em palhetas com o meio de congelamento celular e mantidas congeladas em nitrogênio líquido até a utilização nos animais do experimento.

Como procedimento padrão para o controle de qualidade do cultivo celular, parte das células que permaneceram no laboratório foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo. Aproximadamente 2 milhões de células tronco foram fixadas em solução de formaldeído e encaminhadas para os Estados Unidos da América no laboratório MOFA Global para ser realizada a caracterização celular. A outra parte das células que permaneceu no Laboratório foi congelada permanecendo em nitrogênio líquido.

O processo de descongelamento de 3 palhetas, contendo 1 milhão de CTM-AD cada, foi realizado aproximadamente 25 minutos antes do término do procedimento de MIPO em um laboratório montado próximo ao centro cirúrgico.

Primeiramente, 3 palhetas foram retiradas do nitrogênio líquido e mantidas por 10 segundos em temperatura ambiente. Imediatamente após, foram imersas em banho-maria com a água na temperatura de 37,5°C durante 30 segundos. Após o completo descongelamento, as palhetas foram cortadas e seu conteúdo adicionado em tubo *falcon* contendo 5 mL de meio de descongelamento. Este tubo foi

centrifugado durante 3 minutos (1250 RPM). Logo após esse processo, todo conteúdo sobrenadante foi descartado mantendo somente o botão celular formado no fundo do tubo.

Foi adicionado ao tubo 5 mL de meio de lavagem celular e o botão celular foi ressuspenso com auxílio de pipeta realizando turbilhonamento do meio. Logo após o tubo foi centrifugado durante 3 minutos a 1250 rpm. O mesmo processo de lavagem celular foi repetido mais 2 vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante de meio de lavagem foi descartado, permanecendo somente o botão celular, o qual foi ressuspenso em 1 mL a 2 mL de solução salina 0,9% estéril. Essa solução contendo 3 milhões de CTM-AD foi acondicionado em seringa de 3 ou 5 mL acoplada a agulha hipodérmica 30x0,8mm para aplicação percutânea no foco da fratura, dentro do centro cirúrgico, imediatamente após o término da MIPO.

Obtenção e aplicação do concentrado de medula óssea autóloga (MO)

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 2 mL de concentrado medular foi levado ao centro cirúrgico para aplicação percutânea no foco da fratura imediatamente após o término da MIPO. 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.

Técnica cirúrgica

Após a medicação pré-anestésica, a anestesia geral foi induzida pela via intravenosa e a manutenção anestésica realizada por meio de anestesia inalatória com isoflurano (1,5-2%) em 100% de oxigênio. Todos os pacientes foram submetidos à anestesia epidural com lidocaína 2% sem vasoconstritor (0,25 mL/kg, volume máximo de 6 mL por paciente).

Cefalotina (22 mg/kg) foi administrada por via intravenosa 30 minutos antes da incisão e, quando necessário, reaplicada a cada 90 minutos de procedimento cirúrgico.

Após a preparação de rotina do membro pélvico para cirurgia asséptica, o paciente foi posicionado em decúbito lateral com o membro acometido diretamente sobre a mesa. O membro contralateral sadio foi posicionado e fixado abduzido lateralmente para expor a superfície medial da tíbia do membro acometido.

A fratura foi reduzida de maneira fechada e indireta, com o mínimo de manipulação. O alinhamento e comprimento ósseos foram atingidos com base nas referências anatômicas do próprio membro, sem uso de fluoroscopia ou radiografias intraoperatórias.

O acesso cirúrgico foi restrito a duas pequenas incisões na face medial da tíbia, 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 distal ou 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 guia de

perfuração e broca longa. A placa foi moldada em alguns pacientes. Os parafusos corticais bloqueados foram inseridos no tecido ósseo através das incisões que foram feitas para inserção da placa (Figura 1).



Figura 1. Fotos intraoperatórias do procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa em um cão (A-D) mostrando o passo a passo da

técnica. Primeiramente os acessos proximal e distal (setas amarelas) foram realizados (A). Em seguida a placa, já moldada, foi inserida através de um túnel epiperiosteal (B, C). Em seguida, as perfurações foram realizadas e os parafusos aplicados através dos acessos proximal e distal (C, D). Imagens radiográficas pré-operatórias da fratura (E, F) e no pós-operatório imediato (G, H), demonstrando alinhamento ósseo aceitável. Nota-se moderada translação caudal do fragmento proximal da fratura na projeção lateral (G).

A quantidade necessária de parafusos a ser colocada foi definida de acordo com cada fratura. Foram utilizadas placas bloqueadas nos sistemas 1,5 mm, 2,0 mm, 2,7 mm e 3,5 mm e todos os implantes foram fabricados pela empresa Focus (Focus – ortopedia veterinária, Indaiatuba, SP, Brasil).

Após a colocação dos parafusos, a ferida cirúrgica foi suturada em três camadas. Utilizou-se o fio poliglecaprone 2-0 para a sutura de musculatura e do tecido subcutâneo com o padrão simples contínuo em ambas, e o fio de náilon 3-0 foi utilizado, com o padrão simples separado, na sutura de pele.

Após a sutura de pele, foi inserida agulha calibre 30x0,8 mm dentro da falha óssea por via percutânea por meio de palpação no foco da fratura, foi injetado 1 a 2 mL de solução salina estéril com 3 milhões de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo alógenas (Grupo CTM) ou o concentrado de medula óssea (Grupo MO) (Figura 2).



Figura 2. Fotografias intraoperatórias de cães com fratura tibial submetidos ao procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa, demonstrando a aplicação percutânea no foco de fratura (círculo amarelo) de 2 mL de concentrado de medula óssea (seta amarela) (A) e a aplicação percutânea no foco de fratura (círculo amarelo) de 3 milhões de CTM-AD diluídas em 1 mL de solução salina (seta amarela).

Foram prescritos antibiótico (cefalexina na dose de 25 mg/kg, a cada 12 horas) durante 10 dias, anti-inflamatório (meloxicam na dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia e 0,1 mg/kg nos demais dias, a cada 24 horas) durante 3 dias e cloridrato de tramadol (na dose de 3 mg/kg a cada oito horas por cinco dias) como analgésicos. Também foi recomendada limpeza da ferida cirúrgica com solução salina 0,9%, uma vez ao dia durante 15 dias. As suturas cutâneas foram removidas no décimo quinto dia de pós-operatório.

Avaliações pós-operatórias

Os exames radiográficos em duas projeções ortogonais da tíbia acometida dos pacientes foram realizados nos momentos pré-operatório, pós-operatório imediato, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório. Alguns dos pacientes que apresentaram

união óssea em 15 ou 30 dias não retornaram para avaliações radiográficas subsequentes.

A avaliação radiográfica dos parâmetros alinhamento ósseo da tíbia, redução da fratura, posicionamento e integridade dos implantes e a regeneração óssea foi realizada por um avaliador, de forma cega, em cada momento de avaliação. As complicações também foram registradas.

Para avaliar o alinhamento ósseo no plano frontal, foram obtidos os ângulos mecânicos tibiais mediais proximal e distal (mMPTA e mMDTA), nas radiografias craniocaudais pós-operatórias e comparados aos valores de referência já publicados (11) e com a radiografia do membro contralateral com a tíbia intacta. Após estas mensurações cada paciente foi classificado como: presença de desvio *varus* (discreto, moderado e intenso); presença de desvio *valgus* (discreto, moderado e intenso); ausência de desvio angular neste plano.

Para avaliar o plano sagital, foram obtidos os ângulos do platô tibial (TPA) nas radiografias mediolaterais e comparados com o membro contralateral ou com os valores de referência já publicados (12). Após estas mensurações cada paciente foi classificado como: presença de desvio *recurvatum* (discreto, moderado e intenso); presença de desvio *procurvatum* (discreto, moderado e intenso); ausência de desvio angular neste plano.

O alinhamento em relação à torção da tíbia foi descrito como subjetivamente aceitável quando a sobreposição das bordas caudais medial e lateral do platô tibial, bem como a sobreposição concêntrica das cristas trocleares do *tálus* foram observados simultaneamente nas radiografias mediolaterais.

Os implantes foram avaliados e descritos quanto às seguintes características: o tamanho da placa e número de parafusos utilizados por fragmento da fratura; o posicionamento dos parafusos e da placa na tíbia; a relação entre o comprimento da tíbia e o comprimento da placa (relação placa em ponte); o número de parafusos utilizados em relação ao número total de orifícios da placa (densidade da placa); a relação entre a distância entre o parafuso proximal e distal mais próximos da linha de fratura e o comprimento da placa (comprimento de trabalho da placa).

A reparação óssea foi avaliada em todos os momentos por meio da escala de união radiográfica em fraturas de tíbia (RUST - *radiographic union scale in tibial fractures*) modificada (13,14) (Tabela 1). A união clínica da fratura foi constatada quando se observou calo ósseo fazendo a ponte entre os fragmentos em pelo menos 3 das 4 corticais visibilizadas nas 2 projeções radiográficas ortogonais.

Complicações menores foram definidas como aquelas que são facilmente resolvidas com terapia medicamentosa e não necessitam de intervenção cirúrgica para seu tratamento (edema, hematomas, seroma, deiscência de sutura). Complicações maiores foram definidas como aquelas mais graves que necessitaram de cirurgia de revisão sob anestesia geral (falha de implantes, falha grave no alinhamento, osteomielite, parafuso inserido no espaço articular).

O resultado clínico foi classificado como: excelente, quando a claudicação se apresentava completamente ausente na última avaliação clínica do paciente; bom, quando houve retorno completo à função do membro, mas ocasionalmente havia claudicação leve controlada utilizando terapia medicamentosa, ou desvios angulares sem importância clínica estavam presentes; ruim, quando a claudicação era

constante, e foi necessário o uso contínuo de terapia medicamentosa, ou cirurgia adicional.

Tabela 1. Método “RUST – *Radiographic Union Scale for Tibial fractures*”(13,14) para avaliação da consolidação de fraturas diafisárias de tíbia. Avalia-se em duas projeções ortogonais, sendo atribuídos escores para cada uma das quatro corticais. O escore final (RUST) é a soma dos escores por cortical. Uma fratura não consolidada terá escore final 4 (mínimo) e uma completamente consolidada terá escore final 12 (máximo).

Escore por cortical	Critério radiográfico	
	Calo ósseo	Linha da fratura
1	Ausente	Visível
2	Presente	Visível
3	Presente, ponte óssea	Invisível
4	Presente, remodelamento	Invisível
RUST (4 a 16)	4 (não consolidada), 11 (união clínica), 16 (remodelamento)	

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por *software* apropriado (Prism Windows 6.0, GraphPad Software, CA, USA). Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Variáveis com distribuição paramétrica foram representadas por média $\pm$ desvio padrão, e comparadas pelo teste T de Student, enquanto os dados não paramétricos foram representados por mediana [intervalo interquartil], e comparados pelo teste de Wilcoxon. Para todas as análises foi considerado estatisticamente significativo $P < 0,05$.

Resultados

A mediana da idade dos animais do grupo CTM foi de 22 meses [5-57 meses], enquanto do grupo MO foi de 10 meses [5-51 meses] ($P=0,16$). Da mesma forma, a massa corporal foi considerada similar entre os grupos CTM e MO, respectivamente (7,1 kg [6,3-23,3 kg] *versus* 9 kg [6,2-21,2 kg], $P=0,61$). O grupo CTM foi composto por 5 machos e 3 fêmeas, e o grupo MO por 4 fêmeas e 4 machos, sem diferença na distribuição do gênero entre os tratamentos ($P=1,0$) (Tabela 2).

Todas as fraturas de tíbia foram completas e fechadas. No grupo CTM, dois animais (25%) apresentavam fratura completa de tíbia com a fíbula intacta, e 75% apresentavam fratura completa em ambas. No grupo MO, quatro pacientes (50%) tinham fratura completa de tíbia com a fíbula intacta, e quatro (50%) tinham fratura completa em ambas. Foi observado o mesmo número de animais com fraturas cominutivas (um animal – 12,5%) e oblíquas/espiral (sete cães – 87,5%) em ambos os grupos. Da mesma forma, ambos os grupos apresentaram o mesmo número de cães com fraturas localizadas em terço médio (sete animais – 87,5%) e terço distal (um animal – 12,5%).

O método de fixação de escolha para todas as fraturas de tíbia foi a aplicação de placa bloqueada, de contato limitado, com orifícios combinados (sistema bloqueado e compressão dinâmica no mesmo orifício), exercendo a função ponte, aplicada na face medial da tíbia, inserindo-se no mínimo dois e no máximo quatro parafusos bloqueados bicorticais em cada fragmento da fratura (Figura 3).

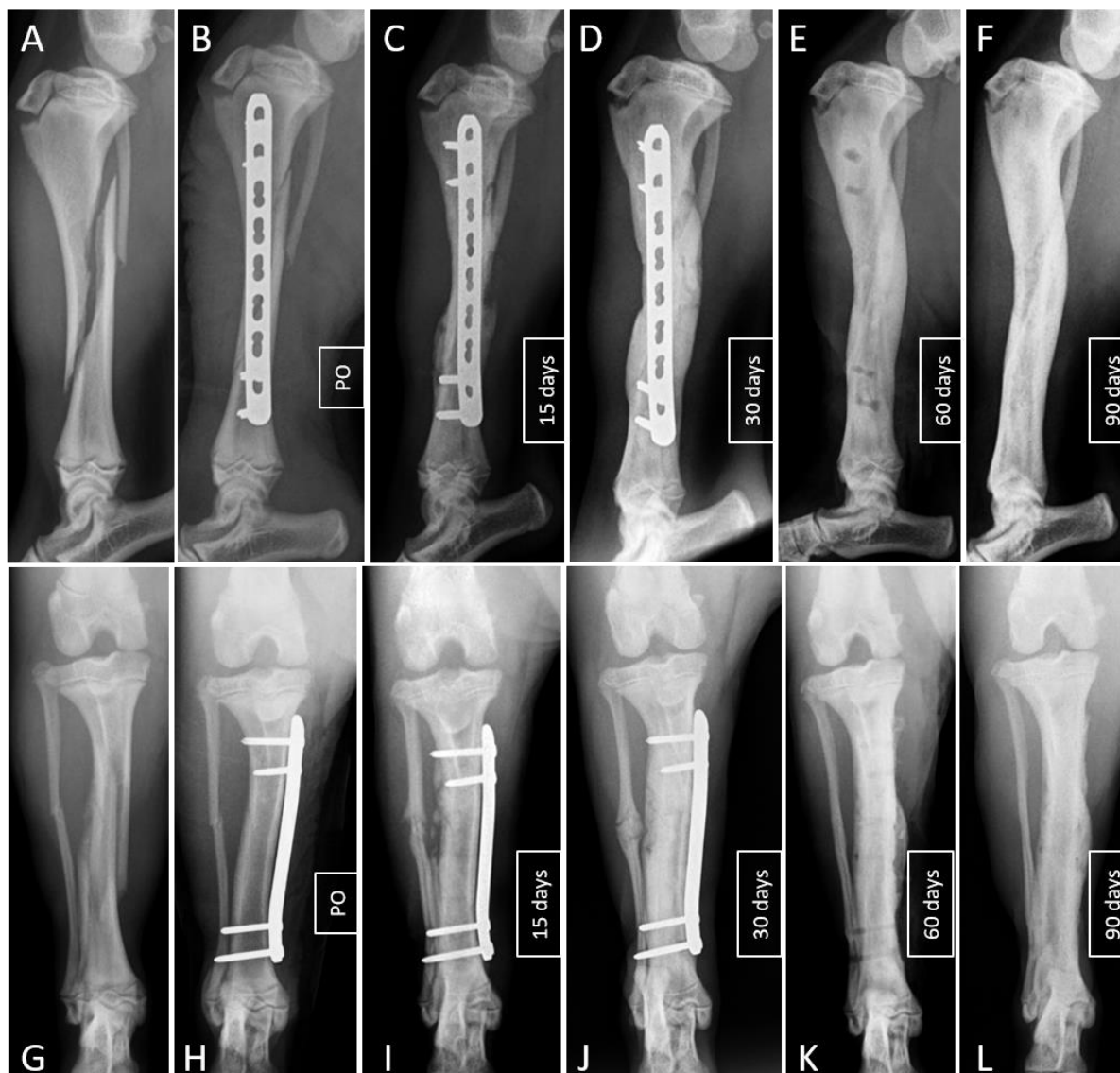


Figura 3. Imagens radiográficas na projeção mediolateral da tíbia de um cão submetido ao procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa e aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (A-F) nos momentos pré-operatório (A), pós-operatório imediato (B), 15 dias (C), 30 dias (D), 60 dias (E) e com 90 dias (F) do cão 5 do grupo CTM. Imagens radiográficas na projeção craniocaudal da tíbia do mesmo cão (G-L) nos momentos pré-operatório (G), pós-operatório imediato (H), 15 dias (I), 30 dias (J), 60 dias (E) e com 90 dias (F) do mesmo paciente. Observa-se união clínica com 15 dias (C, I). Nota-se a retirada dos implantes com 60 dias de pós-operatório (E, K).

Os parafusos foram aplicados nas epífises e metáfises através dos orifícios das extremidades distal e proximal da placa. Foram utilizados diversos comprimentos e sistemas de implantes de acordo com o tamanho de cada paciente e de cada tíbia, conforme descrito na Tabela 3. Das variáveis avaliadas em relação aos implantes, somente a densidade da placa (DP) e o comprimento de trabalho da placa (CTP) apresentou diferença significativa ($p<0,05$), demonstrando a tendência de maior número de parafusos por fragmento e comprimento de trabalho menor no grupo MO (Tabela 4).

Tabela 2. Dados clínicos dos 8 casos do grupo CTM e 8 casos do grupo MO, demonstrando as variáveis pareadas para o estudo coorte e o momento de união clínica.

Pares	Grupo MIPO e CTM-AD					Grupo MIPO e MO				
	Idade	MC (kg)	Raça	Fratura*	União clínica	Idade	MC (kg)	Raça	Fratura*	União clínica
1	6 m	6,6	Shih Tzu	42A1	30 dias	5 m	7,0	SRD	42A1	30 dias
2	7 m	6,3	SRD	42A2	15 dias	6 m	6,1	SRD	42A2	15 dias
3	7 a	3,0	Pinscher	42A2	60 dias	5 a	5,0	Pinscher	42B3	60 dias
4	4 a	25,2	C. Chow	42B1	30 dias	5 a	25,1	SRD	42B1	60 dias
5	7 m	7,1	SRD	42A2	15 dias	8 m	13,4	SRD	42A2	15 dias
6	3 a	24,2	SRD	42B3	30 dias	2 a	24,7	SRD	42B3	90 dias
7	5 a	7,1	SRD	42A1	30 dias	1 a	10,0	Poodle	42A1	30 dias
8	9 m	20,5	SRD	42A2	15 dias	7 m	16,7	B. Heel.	42A2	15 dias

MIPO, osteossíntese minimamente invasiva com placa; CTM-AD, células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo; MO, concentrado de medula óssea; m., meses; a., anos; MC, Massa corporal, SRD, sem raça definida; C. Chow, Chow-Chow; B. Heel., Blue Heeler; kg, quilograma

* Classificação das fraturas AO/ASIF(15)

Em nenhuma fratura foi realizada a reconstrução anatômica dos fragmentos por meio de compressão dinâmica ou qualquer tipo de compressão interfragmentária. No grupo CTM, a aposição dos fragmentos foi classificada como boa em 50% dos casos, adequada em 37,5% dos casos e inaceitável em 12,5% dos casos. Já no grupo MO, foi boa em 37,5% e adequada em 62,5% dos casos.

Os ângulos mecânicos tibiais mediais proximal e distal (mMPTA e mMDTA) nas radiografias craniocaudais pós-operatórias não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparados aos valores de referência já publicados na literatura (11) em ambos os grupos. Entretanto, no grupo CTM um caso e no grupo MO dois casos apresentaram desvio *valgus* classificado como discreto quando comparados com a tibia contralateral intacta. Estes desvios angulares não levaram a repercussões clínicas aos pacientes no período estudado.

Em relação aos desvios no plano sagital, foi observado desvio *recurvatum* moderado na radiografia mediolateral do pós-operatório imediato em 62,5% dos casos no grupo MO e em 37,5% dos casos no grupo CTM. Somente a média do ângulo do platô tibial do grupo MO foi abaixo dos valores de referência já publicados na literatura (12). A torção da tibia foi avaliada subjetivamente e em nenhum caso foi detectada.

A mediana do tempo para união clínica das fraturas foi considerada similar entre os grupos CTM e MO, respectivamente (30 dias [15-30 dias] *versus* 30 dias [15-60 dias], $P = 0,50$). Cinco animais do grupo CTM apresentaram intensa reação periosteal e formação de calo ósseo na avaliação radiográfica de 15 dias, e destes, três (37,5%) cães obtiveram união clínica neste momento. No grupo MO, três animais apresentaram o mesmo padrão radiográfico e união clínica com 15 dias. No grupo CTM, somente um animal apresentou união clínica com 60 dias, enquanto os demais

consolidaram com 15 ou 30 dias. Por outro lado, no grupo MO, dois cães obtiveram união clínica com 60 dias e um com 90 dias, e os demais consolidaram com 15 ou 30 dias.

Tabela 3. Implantes utilizados nos cães deste estudo e os resultados da relação de placa em ponte (RPP), comprimento de trabalho da placa (CTP) e densidade da placa (DP) em cada tratamento.

Pares	Grupo MIPO e CTM-AD					Grupo MIPO e MO				
	Placa*	Paraf.	RPP	CTP	DP	Placa*	Paraf.	RPP	CTP	DP
1	2,0 mm 8 F.	2 pro., 2 dis.	79%	55%	50%	2,7 mm 7 F.	2 pro., 2 dis.	91%	51%	57%
2	2,0 mm 10 F..	2 pro., 2 dis.	82%	64%	40%	2,0 mm 10 F.	2 pro., 3 dis.	63%	46%	50%
3	1,5 mm 10 F.	2 pro., 2 dis.	70%	57%	40%	2,0 mm 10 F.	4 pro., 2 dis.	82%	45%	60%
4	3,5 mm 11 F.	3 pro., 2 dis.	88%	61%	45%	3,5 mm 10 F.	3 pro., 3 dis.	84%	45%	60%
5	2,0 mm 9 F.	2 pro., 2 dis.	73%	58%	44%	2,7 mm 8 F.	2 pro., 3 dis.	70%	41%	63%
6	3,5 mm 11 F.	2 pro., 2 dis.	87%	67%	36%	3,5 mm 12 F.	3 pro., 2 dis.	97%	63%	42%
7	2,0 mm 9 F.	3 pro., 2 dis.	94%	51%	56%	2,7 mm 6 F.	2 pro., 2 dis.	77%	36%	67%
8	3,5 mm 11 F.	2 pro., 2 dis.	85%	66%	36%	2,7 mm 9 F.	2 pro., 2 dis.	74%	61%	44%

MIPO, osteossíntese minimamente invasiva com placa; CTM-AD, células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo; MO, concentrado de medula óssea; Paraf., parafusos; F., Furos; pro., proximais; dis., distais; RPP, relação de placa em ponte; CTP, comprimento de trabalho da placa; DP, densidade da placa

*Todas as placas 2,0mm, 2,7mm e 3,5mm são LCP (*locking compression plate*) e as placas 1,5mm são placas bloqueadas sem orifícios combinados (ambas: Focus Ortopedia Veterinária®, Indaiatuba- SP)

Em relação ao escore RUST para avaliação da consolidação de fraturas diafisárias de tíbia no grupo CTM e no grupo MO, somente a avaliação radiográfica

de 30 dias apresentou diferença estatística, demonstrando média de escore final superior no grupo CTM (Tabela 5).

Nenhuma complicação menor ou maior foi detectada no grupo MO. Uma complicação maior ocorreu no cão número 3 do grupo CTM, que apresentou fratura diafisária de terço proximal da tíbia oblíqua curta, e que, nas radiografias pós-operatórias imediatas, foi constatado aposição inaceitável ocasionando desvio *recurvatum* e *valgus* moderado. Devido a complicações anestésicas de hipotensão no trans-operatório, optou-se por não intervir cirurgicamente para corrigir o mau alinhamento. Apesar disso, o paciente apresentou boa evolução clínica e a consolidação óssea ocorreu em 60 dias. Em 120 dias, observou-se avançado processo de remodelamento ósseo, o que atenuou a intensidade de desvio *recurvatum* e *valgus* da tíbia deste paciente, tornando o resultado final satisfatório.

Tabela 4. Média, desvio padrão e valor de p da análise dos resultados da relação placa em ponte (RPP), Densidade da placa (DP), Comprimento de trabalho da placa (CTP) e ângulo do platô tibial (TPA) entre os grupos células-tronco mesenquimais (CTM) e medula óssea (MO) nas radiografias pós-operatórias imediatas de cães com fraturas da tíbia submetidos ao procedimento de osteossíntese minimamente invasiva com placa.

	CTM	MO	Valor de p
Relação placa em ponte (%)	82 ± 8	80 ± 11	0,60
Densidade da placa (%)	43 ± 7	55 ± 9	0,0004
Comprimento de trabalho da placa (%)	60 ± 7	49 ± 9	0,001
TPA°	21 ± 9	16 ± 5	0,35

Tabela 5. Escores RUST – “*Radiographic Union Scale for tibial fractures*” para avaliação da reparação de fraturas diafisárias de tibia no grupo células-tronco mesenquimais (CTM) e no grupo medula óssea (MO) de acordo com o momento no pós-operatório. Os dados com distribuição paramétrica estão representados como média $\pm$ desvio padrão, e os não paramétricos estão representados como mediana [intervalo interquartil].

RUST	CTM	MO	p
15 dias	10 $\pm$ 2,7	8,5 $\pm$ 3,7	0,42
30 dias	13,3 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3	0,04
60 dias	15,2 $\pm$ 2	13,6 $\pm$ 2,2	0,20
90 dias	16 [16-16]	16 [15,8-16]	>0,99
120 dias	16 [16-16]	16 [16-16]	>0,99

Discussão

As características da população como idade, sexo e massa corporal não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Da mesma forma, as características das fraturas foram semelhantes. Estes resultados são desejados no modelo experimental escolhido para um estudo de coorte, onde os animais de cada grupo são pareados por semelhanças nestas características, a fim de diminuir a variabilidade entre os grupos.

Em todos os animais de cada grupo foram utilizados os princípios da osteossíntese minimamente invasiva (MIO), de modo que o hematoma do foco da fratura fosse preservado o máximo possível. Técnicas de redução indireta como tração manual e utilização de garras ósseas nas extremidades do osso através dos portais criados para a inserção da placa, permitiram menor lesão aos tecidos moles e ao periósteo.

No presente estudo, o uso de placa bloqueada em ponte como método de fixação das fraturas em ambos os grupos foi padronizada e seguiu algumas diretrizes. Preconizou-se a utilização da placa mais longa possível, utilização de 2 a 4 parafusos em cada fragmento da fratura e manter a densidade da placa próximo de 50%. Esta estratégia de fixação em ponte foi relatada como fator benéfico para estimular a reparação óssea secundária e formação precoce de calo ósseo, quando comparada com a fixação com compressão interfragmentária e estabilidade absoluta (16,17).

Não houve diferença estatística na comparação da relação placa em ponte entre os grupos CTM e MO, a qual se manteve próximo de 80% em ambos os grupos. Os cães de cada grupo foram pareados por semelhança do tipo de fratura e manteve-se a utilização de maior comprimento da placa em relação ao comprimento da tíbia. Entretanto, houve diferença estatística na densidade da placa e no comprimento de trabalho da placa. O grupo CTM apresentou menor média de densidade da placa (43%) e, conseqüentemente, maior média de comprimento de trabalho (60%). Observou-se a tendência de aplicação de maior número de parafusos por fragmento no grupo MO, diminuindo, dessa forma, cerca de 11% o comprimento de trabalho da placa em relação ao grupo CTM. A elasticidade relativa gerada por maior comprimento de trabalho da placa pode ter influenciado como fator benéfico na estimulação da reparação óssea secundária e formação precoce de calo ósseo observado no grupo CTM, quando comparada com fixações em ponte com menor elasticidade observadas no grupo MO.

Embora os ângulos mecânicos tibiais mediais proximal e distal (mMPTA e mMDTA) não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparados aos valores de referência já publicados na literatura, um caso no grupo CTM e dois casos

no grupo MO apresentaram desvio *valgus* discreto na comparação com a tíbia contralateral. A restauração do alinhamento e comprimento após a realização da MIPO é o maior desafio da técnica (18). Principalmente quando não se utiliza imagens radiográficas transoperatórias ou intensificadores de imagem (19). Estes desvios angulares discretos foram observados neste estudo, principalmente nas fraturas classificadas como simples (transversa e oblíqua curta), devido à dificuldade de alcançar aposição e redução adequadas com as técnicas de redução indireta. Observou-se a prevalência de desvios *valgus* e *recurvatum* após a MIPO. Acredita-se que a contratura dos grupamentos musculares presentes na face cranial da tíbia contribuíram para estes resultados.

Não houve diferença significativa entre os tempos medianos de união clínica de cada grupo. Ambos os grupos apresentaram a mediana de 30 dias. Apesar disso, observou-se a precocidade na formação de calo ósseo com 15 dias no grupo CTM em comparação com o grupo MO. Estes resultados foram melhores do que o relatado usando ORIF com placas ósseas (87 - 121 dias) ou com redução fechada e fixação externa (69 – 82 dias) (20,21). Entretanto, estes resultados foram relativamente semelhantes aos relatados usando MIPO em tíbias. Um estudo prospectivo que avaliou a MIPO em 36 fraturas tibiais não articulares em cães e gatos, obteve um tempo médio de reparação óssea de 45 dias (22). Outro estudo que avaliou o tratamento de fraturas de tíbia usando a MIPO em 6 cães e 4 gatos apresentou tempo médio de reparação óssea de 35 dias.

Para avaliação mais objetiva do processo de reparação óssea, utilizou-se a escala de união radiográfica para fraturas de tíbia, a qual já foi descrita e validada (13,14,23). As médias dos escores RUST nas avaliações radiográficas mais precoces

(15, 30 e 60 dias) do grupo CTM foram maiores, comparadas com as médias do grupo MO. Entretanto, somente aos 30 dias essa diferença foi estatisticamente significativa. Com base nestes resultados, acredita-se que a terapia celular com CTM-AD potencializou o processo de reparação óssea nas fraturas do grupo CTM, observada, principalmente, nos momentos iniciais de avaliação radiográfica.

Os princípios da osteossíntese minimamente invasiva (MIO) objetivam a preservação do hematoma do foco da fratura. Esta estratégia terapêutica para o tratamento das fraturas objetivou criar um ambiente biológico no foco da fratura favorável à neoangiogênese e sinalização celular para quimiotaxia e diferenciação de células progenitoras (24–26). Estes mecanismos são fundamentais para a fase inicial de formação do calo ósseo no processo de reparação óssea.

Durante o processo de reparação óssea, as células-tronco mesenquimais presentes em diversos nichos teciduais, tais como medula óssea, tecido adiposo e tecido muscular, migram para o foco da fratura desempenhando dupla função: autócrina e parácrina. A partir da sinalização celular por meio de citocinas e mediadores inflamatório, e da resposta ao estresse mecânico relativo no foco da fratura, as CTM se diferenciam em qualquer componente celular necessário na união óssea secundária. Além disso, CTM secretam uma variedade de fatores de crescimento e citocinas importantes para o processo de reparação óssea (27). A aplicação de células-tronco no foco da fratura utilizada neste estudo tem por objetivo potencializar as funções autócrinas e parácrinas exercidas por estas células progenitoras. No presente estudo, acredita-se que a associação da preservação do ambiente biológico ideal no foco da fratura por meio da MIPO e a ações autócrinas e

parácrinas das CTM, corresponde a uma estratégia terapêutica promissora a fim de otimizar o processo de reparação óssea.

O aspirado de medula óssea concentrado é um enxerto autólogo no qual a medula óssea colhida passa por processo de centrifugação para aumentar a quantidade de células progenitoras (28). A medula óssea é colhida do próprio paciente e aplicada de forma percutânea no foco da fratura (29). Diversos estudos sugerem que o concentrado de medula óssea tem vários efeitos benéficos no reparo ósseo, já demonstrados por meio de avaliações radiográficas, histológicas e biomecânicas (30). A grande vantagem da utilização desta terapia é baixa morbidade, fácil obtenção e baixo custo. Entretanto, alguns estudos demonstraram que existe grande variabilidade do número de células-tronco mesenquimais presentes no aspirado de medula óssea entre cada animal (31). Observou-se que a concentração de células progenitoras presentes no concentrado de medula óssea tem importante influência nos resultados (32). No presente estudo, o grupo MO apresentou bons resultados na avaliação da reparação óssea em todos os cães, entretanto, acredita-se que a baixa concentração de células-tronco mesenquimais esperada no aspirado de medula óssea, influenciou os resultados. No presente estudo não foi realizada a contagem de células progenitoras.

No grupo CTM, utilizou-se a terapia celular por meio do isolamento, cultivo e aplicação percutânea de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-AD) e são diversas as justificativas para sua escolha. O tecido adiposo subcutâneo é rica fonte de CTM-AD, está disponível em grandes quantidades e, é relativamente fácil de obter (33). Além disso, relatos recentes demonstraram que, em condições adequadas, as CTM-AD têm o potencial de se diferenciar em linhagem

osteogênica tão eficientemente quanto as CTM derivadas de medula óssea (34). Adicionalmente, tanto as respostas parácrinas quanto autócrinas podem ser provocadas por fatores de crescimento secretados pelas CTM-AD (35). As CTM-AD não somente secretam os fatores de crescimento, mas podem também responder a eles, ampliando assim a resposta biológica do corpo à terapia celular (36). Muitos fatores que são secretados pelas CTM-AD funcionam em mecanismos antiapoptóticos ou, alternativamente, induzem migração e proliferação celular (37). No presente estudo, optou-se pela utilização de 3 milhões de CTM-AD por aplicação. Embora estudos demonstraram que um maior número de células pode potencializar a reparação óssea, a concentração terapêutica mínima e máxima continua incerta (8,30).

Observou-se somente uma complicação maior entre os 16 cães avaliados neste estudo. O cão número 3 do grupo CTM apresentava fratura de tíbia oblíqua curta com considerado desvio e distanciamento dos fragmentos observados na radiografia pré-operatórias. Os métodos de redução indireta não foram suficientes para promover aposição adequada dos fragmentos da fratura, ocasionando os desvios angulares na avaliação pós-operatória imediata. Apesar do mau alinhamento inicial da tíbia observado neste cão, com o avanço da fase de remodelamento ósseo em 120 dias, notou-se a diminuição considerável do desvio *recurvatum* e *valgus*. Além disso, estes desvios não levaram a sinais clínico ortopédicos durante o período avaliado.

Embora o delineamento experimental escolhido foi o de estudo clínico de coorte, diversas limitações devem ser consideradas. Este modelo experimental para a comparação de dois grupos de tratamento objetiva parear 1 indivíduo de cada grupo por semelhança de características que potencialmente poderiam influenciar nos

resultados encontrados. Entretanto, por causa deste pareamento, só foi possível incluir neste estudo 8 pares de cães com características semelhantes. Dessa forma o baixo poder estatístico ocasionado pelo tamanho da amostra diminui a representatividade dos resultados. Acredita-se que um estudo longitudinal com maior número de pares pode detectar maior diferença entre os tratamentos.

Este é o primeiro estudo na literatura veterinária que relata comparação direta entre a utilização de terapia celular com CTM-AD ou concentrado de medula óssea de forma percutânea nas MIPO de tíbia em cães. Mais estudos com maiores amostras devem ser considerados para avaliar o potencial destas técnicas de terapia celular associadas às técnicas de osteossíntese biológica em fraturas de tíbias em cães e gatos.

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.

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

As fraturas de ossos longos em cães e gatos correspondem à grande parcela da casuística da ortopedia veterinária. A MIPO é uma técnica que permite estabilização adequada da fratura, enquanto preserva o ambiente biológico, otimizando o processo de reparação óssea.

A importância científica da terapia celular cresce a cada dia e atualmente representa importante método terapêutico na medicina veterinária demonstrada por inúmeros trabalhos *in vitro* e *in vivo*. Estudos em situações clínicas reais são muito importantes para validar a eficácia desta terapia em diferentes afecções. Portanto, acredita-se que o presente estudo, após finalizado, trará resultados relevantes para a ortopedia veterinária.

Limitações do estudo

A principal limitação do estudo foi a falta de compromisso por parte de alguns tutores, 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. A escolha pelo estudo de coorte como metodologia do capítulo 3 (artigo 2) objetivou homogeneizar a população estudada entre os dois grupos. Para isso, os casos de cada grupo foram pareados de forma que algumas variáveis importantes no processo de reparação óssea ficassem o mais niveladas possível.

Perspectivas

Apesar das limitações, estudos clínicos são fundamentais para avaliar a eficácia e a resposta de diversas técnicas e tratamentos para determinada afecção. Este estudo apresentou importantes resultados iniciais em relação ao uso de células-

tronco mesenquimais em fraturas de cães. Entretanto, estudos maiores, mais detalhados, prospectivos e multicêntricos são importantes para promover maior poder estatístico aos resultados, a fim de avaliar o potencial da terapia celular no tratamento de fraturas em pequenos animais.

ANEXO 1 - Normas do periódico Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology (VCOT)

VCOT – Open

Author Instructions

Thank you for contributing to *VCOT- Open*. Please read the instructions carefully and observe all the directions given. Failure to do so may result in unnecessary delays in publishing your article.

VCOT- Open is an open access international peer-reviewed companion journal to the renowned *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology (VCOT)*, published online.

MANUSCRIPT FORMAT

Article Types

The following graph shows what types of articles are accepted for publication, and what requirement they may have.

Article Type	Abstract Limit	Keywords Limit	Title Limit	References	Figures/Tables
Review Articles (20,000 characters with spaces)	1,500 characters (with spaces)	5	50 words	Up to 40 references	n/a
Original Research (20,000 characters with spaces)	1,500 characters (with spaces)	5	50 words	Up to 40 references	n/a
Clinical Communications (20,000 characters with spaces)	1,500 characters (with spaces)	5	50 words	Up to 40 references	n/a
Case Reports (15,000 characters with spaces)	1,500 characters (with spaces)	5	50 words	Up to 30 references.	5 essential figures or tables (figures can have sub-parts)
Brief Communications (10,000 with spaces)	1,500 characters (with spaces)	5	50 words	Up to 10 references.	2 essential figures or tables
Letters to the Editor (6,000 with spaces)	NA	5	50 words	2 essential figures or tables	

What is your Diagnosis (2,500 with spaces)	1,500 characters (with spaces)	5	50 words	Up to 6 references.
--	--------------------------------------	---	----------	---------------------

Please note that the total character counts apply only to the main body of the text; starting with first word of the Introduction and ending with the last word of the Conclusion. Manuscripts exceeding these character counts will be returned to the authors for shortening before peer review.

- ☐ **Original Research:** papers documenting the finding of clinical or experimental investigations should contain a testable hypothesis or clear statement of purpose.
- ☐ **Clinical Communications:** Papers reporting the diagnosis, treatment or outcome in clinical patients that lack a testable hypothesis.
- ☐ **Brief Communications:** are short papers reporting on a clinical or research material of special interest.
- ☐ **Letters to the Editor:** can be a response to a previous article or a comment or observation which the author would like to address to the readership.
- ☐ **What is your Diagnosis:** are shorter articles presented in a Question-Answer format (submit as “Clinical Communication”).
- ☐ **Case Reports:** documenting one or several clinical cases will be considered for publication only if the disease, disorder, injury, or procedure is exceptionally unique and has not been reported previously. The report must provide new and clinically important information about the disorder, which must be well characterized by appropriate documentation of clinical findings, diagnostic pathology, diagnostic imaging, or preferably a combination of these. Similarly, longterm follow-up data must be included, as appropriate to the case(s). The reason(s) why the case is important, and the impact of this new knowledge on furthering our understanding of the particular subject must be discussed. Reports that are primarily describing additional cases of a previously reported disorder, albeit rare or unusual, will not be considered for publication. Moreover, variations in the manifestation of a disorder are not considered sufficiently unique to warrant publication – for example the occurrence of a fracture, tumor, infection or foreign body in an atypical species of animal or anatomical location.

General Guidelines

- You must submit a digital copy of your manuscript. Hard copy submissions are not accepted.
- Keep the format of your manuscript simple and clear. We will set your manuscript according to our style—do not try to “design” the document.
- The manuscript, including the title page, abstract and keywords, text, references, figure captions, and tables should be typewritten, double-spaced in 12-point font with 1-inch margins all around and saved as one file.
- Each figure should be saved as its own separate file. Do not embed figures within the manuscript file. This requires special handling by Thieme’s Production Department.
- Keep abbreviations to a minimum and be sure to explain all of them the first time they are used in the text.
- The manuscripts should be written in American English.
- The authors should use Système International (SI) measurements. For clarity, nonmetric equivalents may be included in parentheses following the SI measurements.
- Use generic names for drugs. You may cite proprietary names in parentheses along with the name and location of the manufacturer.
- Credit suppliers and manufacturers of equipment, drugs, and other brand-name material mentioned in the manuscript within parentheses, giving the company name and primary location.

MANUSCRIPT FORMAT *continued*

The following is a list of formatting requirements for submitted manuscripts. Papers that deviate from this will be returned with a request for changes and will not undergo review until these changes have been made. Each of the following sections should be submitted as a separate document: Title Page, Summary + Main Text + References, Legends, Tables, Figures. Word or Rich Text Format files should be used for the manuscript files; gif, jpeg, tif, or eps should be used for all image files; and word or excel for all Tables. Do not embed Figures or Tables in the text of the manuscript.

Title Page

Should include all author names and affiliations, correspondence author and contact

information, Acknowledgments, Funding, Author Contributions and Conflict of interest statements.

Formatting

Continuous line numbering should be used throughout the text along with double line spacing.

Blinding

All identification information should be removed from the paper for double blind peer review. This includes author names, initials, institutions countries and cities, as well as information which may appear in radiographs or other images. Either “Blinded” or “XX” can be used in the text for any places where this information was.

Animal Care

A section detailing the perioperative care which was given should be included, if relevant, as well as whether institutional approval was gained and what guidelines were followed. Please see the “Animal Care Guidelines”.

Character Count

Total character count for your main text should not exceed the allowed limits. Please see the “Article Types” section for this.

Author Contributions Form

Following the first online submission of your manuscript, the Corresponding Author should fill out the Author Contributions form on behalf of all

Abstract and Keywords

See the section Article Types for word limits.

The abstract should briefly outline the content of the article and any conclusions it may reach. It should be structured as follows: Objective, Study Design, Results, Conclusion. The keywords should be words a reader would be likely to use in searching for the content of the article.

Main Document

- ☐ Please clearly distinguish the hierarchy of headings within the manuscript by using capital letters, underline, italic, and bold styles as necessary.
- ☐ As needed, use italic, superscripts, subscripts, and boldface, but otherwise do not use multiple fonts and font sizes.
- ☐ Do not insert page or section breaks except where noted in the Author Instructions.
- ☐ Use hard returns (the Enter key) only at the end of a paragraph, not at the end of a line. Allow lines of text to break automatically in your word-processing software. Do not justify your text.
- ☐ Use only one space, not two, after periods.
- ☐ Create tables using the Table function in Microsoft Word.
- ☐ For Original Research, Clinical Communications, & Brief Communications, the manuscript should be divided into sections, including an Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. The most important sections within each main section should be stressed by subheadings.
- ☐ Review Articles should have an Introduction, and then the appropriate section headings in bold.
- ☐ For Case Reports, please include an Introduction followed by a Discussion. Additional section headings can be included.
- ☐ What is your Diagnosis should be divided into a Question & an Answer and the 2 main sections should be Case History & Discussion/Diagnosis.

Formulas

Special care should be taken with the presentation of formulas, especially complex ones. In order to save formulas into your document in a manner that will ensure their accurate appearance in the proof generated by the system, create the formulas as text or use the “Formula” toolbar. Alternatively, upload as a separate document and refer to the formula as you would a Figure or Table.

Acknowledgments

Scientific advice, technical assistance, and credit for financial support and materials

may be grouped in a section headed 'Acknowledgements'. Those who do not qualify for authorship should also be included here. This section will be placed at the very end of the text. For submission however, please place this information with the Title page.

Funding

Authors should provide all relevant information regarding the funding which was received, including any provision of experimental materials, equipment, writing assistance, or related. It should also be stated what role the research funder had, for instance, whether they were also involved in other aspects of the study such as the design. This information will be published with the paper, should it be accepted. If no funding was received, please state this.

Conflict of Interest

Please click <http://www.icmje.org/conflicts-of-interest> to download a Conflict of Interest form.

Upon Submission, it is required to indicate on the Title page for each author if there is, or has been a situation where a conflict of interest could be construed. This includes both financial and personal relationships that might bias or be seen to bias their work. Each author should also acknowledge the source of any extra-institutional funds or support. Any financial interests in companies that market material that are, or have been, the subject of research reported in the manuscript should be acknowledged. Such information may or may not be held in confidence while the paper is under review, and should the article be accepted for publication, this information will be published with the paper.

Style Specifics

- ☐ Contributions should be submitted in UK English; this however is not a requirement, and if the paper is accepted, the Editorial Office will make all necessary changes. For non-English speaking authors, it may be of benefit to use a English editing firm to help in improving the English usage.
- ☐ Abbreviations should be spelled out for the first use followed by the abbreviation in parentheses; thereafter the abbreviation can be used. The use of abbreviations

however should be kept to a minimum.

- Nomenclature should be done according to internationally approved rules. All anatomical nomenclature should be written in full and Anglicized.
- Units of measurement should be given in the metric system or in SI units and temperatures should be in °C.
- For instruments, specific equipment, or drugs which are referred to in your paper, please cite the specific information (model number if relevant, generic and trade name, manufacturer and their location) as a footnote using roman letters at the end of the paper or as footnotes in the text.
- Figures and Tables should be cited in sequential order, in parentheses, in the text. The actual file for each figure and table should be named according to its number in the text (i.e. Figure 1, Table 2).
- Greek letters, special characters, & mathematical symbols should be insert using the “Symbol” or “Formula” toolbar menu in your word processing program. Before submitting your manuscript, please verify in the system-created pdf that all have converted correctly.

References

References should be the most recent and pertinent literature available. It is essential that they are complete and thoroughly checked. If the reference information is incomplete, good online sites to search for full details are the National Library of Medicine: www.nlm.nih.gov; Books in Print: www.booksinprint.com; PubMed: www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/; or individual publisher Web sites.

- References must be listed in AMA style, using Index Medicus journal title abbreviations.
- References follow the article text. Insert a page break between the end of text and the start of references.
- The Vancouver style should be used - references are numbered consecutively in order of appearance in the text, and identified by Arabic numerals in parentheses at the end of the sentence. By way of exception to AMA style, do not italicize book titles or journal title abbreviations and do not put a period at the end of a reference.
- List all author names, up to and including six names. For more than six authors, list

the first three followed by et al.

□ References should be styled per the following examples:

1. Citing a journal article:

Newburger JW, Takahashi M, Burns JC, et al. The treatment of Kawasaki syndrome with intravenous gamma-globulin. *N Engl J Med* 1986;315:341–347

2. Citing a chapter in a book:

Toma H. Takayasu's arteritis. In: Novick A, Scoble J, Hamilton G, eds. *Renal Vascular Disease*. Philadelphia: WB Saunders; 1995:47–62

3. Citing a book:

Stryer L. *Biochemistry*. 2nd ed. San Francisco: WH Freeman; 1981:559–596

4. Citing a thesis:

Stern I. Hemorrhagic Complications of Anticoagulant Therapy [Ph.D. dissertation]. Evanston, IL: Northwestern University; 1994

5. Citing a government publication:

Food and Drug Administration. Jin Bu Huan Herbal Tablets. Rockville, MD: National Press Office; April 15, 1994. Talk Paper T94-22

6. Citing an online article:

Rosenthal S, Chen R, Hadler S. The safety of acellular pertussis vaccine vs whole-cell pertussis vaccine [abstract]. *Arch Pediatr Adolesc Med* [serial online]. 1996; 150:457–460. Available at: http://www.amaassn.org/scipubs/journals/archive/ajdc/vol_150/no_5/abstract/htm. Accessed November 10, 1996

7. Citing a symposium article:

Eisenberg J. Market forces and physician workforce reform: why they may not work. Paper presented at: Annual Meeting of the Association of American Medical Colleges; October 28, 1995; Washington, DC

Figure Captions

- Figures include photographs or radiographs, drawings, graphs, bar charts, flow charts, and pathways, but NOT lists or tables.
- Figures must be cited sequentially in the text. Number all figures (and corresponding figure captions) sequentially in the order they are cited in the text.
- Figure captions should be written after the reference list. Insert a page break between the end of references and the start of figure captions.
- Figure captions should include a description of the figure and/or each lettered part (A, B, etc.) and of any portions of the figure highlighted by arrows, arrowheads, asterisks, etc.
- For a figure borrowed or adapted from another publication (used with permission), add a credit line in parentheses at the end of each figure legend. This credit line should be a complete bibliographic listing of the source publication (as a reference), or other credit line as supplied by the copyright holder. For example (Reprinted with permission from Calfee DR, Wispelwey B. Brain abscess. *Semin Neurol* 2000; 20:357.)

Tables

- Data given in tables should be commented on but not repeated in the text. Be sure that lists or columns of related data are composed in a word-processing program like the rest of the text.
- Do not intersperse tables in the text. Tables should appear after the figure captions. Insert a page break between the end of the figure captions and the start of the tables.
- Tables must be double-spaced and numbered in the same sequence they are cited in the text. A short descriptive title should be provided for each table.
- If a table contains artwork, supply the artwork separately as a digital file.
- For tables borrowed or adapted from another publication (used with permission), add a credit line as the first footnote beneath each table. This credit line should be a complete bibliographical listing of the source publication (as a reference), or other credit line as supplied by the copyright holder. For example, “Reprinted with permission from Calfee DR, Wispelwey B. Brain abscess. *Semin Neurol* 2000;20:357.” (“Data from . . .” or “Adapted from . . .” may also be used, as appropriate.)

- Other footnotes for tables should be indicated in the table using superscript letters in alphabetical order.
- Any abbreviations used in the table should be explained at the end of the table in a footnote.

Videos

- The following formats are acceptable: *.avi, *.mov and *.mpg.
- For supplementary videos, the length should not exceed 4 minutes, and a legend of no more than 40 words per video or per sequence is required (it should also be included in the main document).
- All videos should include a clear, English language voice over explaining the demonstration or operation being presented. Be precise, informative, and clear in your speech. Re-record audio in post-production for sound quality.
- Be slow and deliberate in all movements. Be cautious of bad lighting, and white balance the camera each time you turn it on. Place the camera on a tripod and obscure the faces of any patients, or obtain a signed Statement of Consent.

General Guidelines

- It is best to use Adobe Photoshop to create and save images, and Adobe Illustrator for line art and labels.
- Do not submit art created in Microsoft Excel, Word, or PowerPoint. These files cannot be used by the typesetter.
- Save each figure in a separate file.
- Do not compress files.
- All black-and-white and color artwork should be at a resolution of 300 dpi (dots per inch) in TIFF format. Line art should be 1,200 dpi in EPS or TIFF format. Contact the Production Editor at Thieme if you are unsure of the final size.
- It is preferable for figures to be cropped to their final size (approximately 3½ inches for a single column and up to 7 inches for a double column), or larger, and in the correct orientation. If art is submitted smaller and then has to be enlarged, its resolution (dpi) and clarity will decrease.

Note: Lower resolutions (less than 300 dpi) and JPEG format (.jpg extension) for grayscale and color artwork are strongly discouraged due to the poor quality they yield in printing, which requires 300 dpi resolution for sharp, clear, detailed images. JPEG format, by definition, is a lower resolution (compressed) format designed for quick upload on computer screens.

Black-and-White Art

- Black-and-white artwork can be halftone (or grayscale) photographs, radiographs, drawings, line art, graphs, and flowcharts. Thieme will only accept digital artwork.
- If possible, do not send color art for conversion to black-and-white. Do the conversion yourself so that you can check the results and confirm in advance that no critical details are lost or obscured by the change to black-and-white.
- For best results, line art should be black on a white background. Lines and type should be clean and evenly dark. Avoid screens or cross-hatching, as they can darken or be uneven in printing and lead to unacceptable printing quality.

Convention for Radiographic Orientation

For radiographic images, please follow the guidelines below. When preparing illustrations from native DICOM format, please note that most clinical DICOM viewers export images with the low resolution, typically 90–100 dpi, used by most operating systems. Use a program that maintains the original matrix to prepare illustrations, for example Image J, and thus meet or exceed the requirement of a minimum resolution of 300 dpi. Knowing the original acquisition matrix size allows a simple calculation to determine the number of dpi based on a width or height of the finished illustration of 12–15 cm.

Radiographs: Lateral views of any part should be orientated with the cranial or rostral part to the viewers left. Ventrodorsal or dorso-ventral images should be viewed with the left side on the reader's right. Images of extremities should have the proximal portion of the limb at the top of the image. There is not a convention as to whether the lateral or medial aspect of the limb should be to the right or the left, but the orientation should be consistent within the manuscript.

Ultrasound: For abdominal imaging with the patient in dorsal recumbency, sagittal images should be orientated with the ventral surface at the top of the image, and the cranial aspect to the left. In the transverse plane, the patient's right side should be on the left of the image. If the transducer has been placed on the right side of the abdomen in a transverse plane, ventral should be on the right of the image and dorsal on the left. For images obtained from the left side of the abdomen, ventral should be on the left side of the image and dorsal on the right.

Echocardiographic images: Computed tomography and magnetic resonance images should be orientated in the following manner:

Head and spine

- ☐ Sagittal plane: cranial (rostral) to the left, dorsal at the top.
- ☐ Transverse plane: dorsal at the top, left to the reader's right.
- ☐ Dorsal plane: cranial (rostral) at the top, left to the reader's right.

Thorax and Abdomen

- ☐ Images should be displayed as they were acquired.

References

1. Thrall DE. Textbook of Veterinary Diagnostic Imaging (3rd Ed). Philadelphia, WB Saunders 1998; 26.
2. Nyland TG, Mattoon JS. Veterinary Diagnostic Ultrasound. Philadelphia, WB Saunders 1995; 11–12.
3. Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, et al. Recommendations for standards in transthoracic two dimensional echocardiography in dogs and cats. J Vet Intern Med 1993; 7: 247–252.
4. Anon. Instructions to authors. Vet Radiol Ultrasound 2000; 41: 584.

Art Labels

- ☐ Arrows, asterisks, and arrowheads (or other markers) should be white in dark or black areas and black in light or white areas, and large in size. If not, these highlighting

marks may become difficult to see when figures are reduced in size during the typesetting process.

- ☐ Use 1-point (or thicker) rules and leader lines.
- ☐ Capitalize the first word of each label and all proper nouns. Consider using all capitals if you need a higher level of labels.
- ☐ Where there are alternate terms or spellings for a named structure, use the most common one and make sure it is consistent with what is used in the text.
- ☐ Avoid using multiple fonts and font sizes for the labels; use only one or two sizes of a serif font.

SUBMISSION PROCEDURE

Submission Procedure

- ☐ Consult the checklist on the first page of this document to ensure that you are ready to submit your manuscript.
- ☐ Manuscripts must be submitted electronically at the following link: <https://mc.manuscriptcentral.com/vcotopen>
- ☐ Always review your manuscript before submitting it. You may stop a submission at any phase and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation email. You can also check the status of your manuscript by logging in to the submission system. The Editor in Chief will inform you via email once a decision has been made.

Revision Procedure

Please submit your revised manuscript before the deadline stated in your decision letter has been reached. Please also note that the deadline has actually expired by the end of the day (midnight), German time, on the day just before the deadline. For example, for a deadline of May 21, when the clock turns midnight and the date officially changes from May 20 to the 21, the deadline has expired. If more time is needed, please contact the Editorial Office. Revisions should be submitted as a revision under the original manuscript number - if the deadline has passed, inform the Editorial Office rather than submitting as a new manuscript. Do not forget to activate **Track Changes** when making revisions, or to highlighting the areas where text was changed, and to submit a **point by point** response to the reviewers comments along with your revision.

Peer Review Process

All articles submitted to the Journal will first be checked by the Managing Editor to ensure they conform to the guidelines listed in this document. Manuscripts that fail to meet these requirements will not be sent for review and you will be asked to resubmit in an appropriate format. VCOT-Open reserves the right to reject any manuscript. Manuscripts that enter the peer review process will be examined by a minimum of two expert reviewers. They will be asked to comment on the scientific quality of the work, and its contribution to the field. The entire process is blinded: the authors do not know who is reviewing the paper, and the reviewers do not know who the authors are or where they come from. Based on the reviews, the Editor-in-Chief will then issue a decision concerning acceptance, major or minor revision, or rejection. Those which are accepted for publication are subject to the authors addressing all editorial and production concerns.

PRODUCTION PROCEDURE

Page Proofs

All accepted manuscripts are subject to editing by the Editor-in-Chief and the Managing Editor. The designated Correspondence Author will receive the final proofs for approval and corrections. All corrections must be returned within the stated time period; if this is not possible please inform the Managing Editor.

POLICY STATEMENTS

Reporting Guidelines

The following reporting guidelines may be of use when conducting and reporting your research:

- ☐ Standards for the reporting of diagnostic accuracy studies (STARD): <http://www.stard-statement.org>
- ☐ Consolidated standards for reporting randomized clinical trials (CONSORT): <http://www.consortstatement.org>
- ☐ Systematic reviews and meta-analyses (PRISMA): <http://www.prisma-statement.org>
- ☐ Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE Guidelines): <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>
- ☐ MOOSE (for reporting of meta-analyses of observational studies)

- COREQ (for reporting qualitative research)
- Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE): www.icmje.org

Authorship

VCOT-Open follows the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>) in regards to authorship. The editorial office is not responsible for resolving disputes between authors or potential authors of manuscripts submitted or accepted for publication, and it is the duty of the authors to decide upon the author order.

Authors must meet all of the following requirements:

1) Substantial contributions to the conception, study design, or acquisition of data, as well as participation in the analysis and interpretation of data; **2)** Drafting of the article or revising it critically for important intellectual content; **3)** Approval of the submitted version of the manuscript, all revised versions, and the final version to be published; and **4)** Agreement to be publicly accountable for the appropriate portions of the content. The number of authors of any full length paper is limited to 10, case reports are limited to 5. Requests to exceed these limits must be accompanied by detailed justification. Any person who contributed materially to the paper, but does not meet these qualifications for authorship may be recognized for their function or contribution in the “Acknowledgements”.

Authorship Contribution form: Starting in 2017, authors will be required to fill out this form – noting the contributions of each author - and submit with their manuscript.

Change in Authorship: Any requests for the addition or deletion of author names, as well as re-ordering of the names following acceptance of the manuscript must be sent to the Managing Editor from the corresponding author of the manuscript. **This request must include:** The reason for the change and written confirmation from all authors that they agree with this change. In the case of the addition or removal of authors, this includes a confirmation from the author(s) being added or removed. The Editor-in-Chief will be informed of such requests and publishing of the manuscript online and in print will be postponed until the authorship has been agreed upon. Should such changes

occur following online or print publication of the manuscript, publishing of a corrigendum may be required.

Statement on Liability

The legislation on product liability makes increased demands on the duty of care to be exercised by authors of scientific research and medical publications. This applies in particular to papers and publications containing therapeutic directions or instructions and doses or dosage schedules. We therefore request you to examine with particular care, also in your own interest, the factual correctness of the contents of your manuscript once it has been copyedited and returned to you in the form of galley proofs. The responsibility for the correctness of data and statements made in the manuscript rests entirely with the author.

Animal Care Guidelines

All material published in VCOT-Open must adhere to high ethical standards concerning animal welfare. In order to be considered for publishing, the following requirements must be met and noted in the manuscript:

1. Follows international, national and/or institutional guidelines for humane animal treatment and complies with relevant legislation (i.e. EU Convention on the protection of animals revised directive 86/609/EEC, USA Animal Welfare Acts, American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals, ARRIVE Guidelines – Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments).
2. Has been approved by the ethics review committee at the institution or practice at which the study/studies were conducted where such a committee exists. If there is no existing committee, it is expected that the research have been conducted in a manner likely to be approved by an ethics committee in most countries.
3. For studies using client-owned animals, client consent must be obtained and the study needs to demonstrate best practice of veterinary care.
4. Include the detailed care which was given, and the drug dosages and regimes which were instituted for analgesia and euthanasia, if applicable.

Details regarding the above requirements are to be included in your manuscript at the time of submission, either as a separate heading or as part of the “Materials and

Methods” section; the specifics should be blinded (institutional names and locations should be removed) so as to preserve the doubleblind review process. The Editor-in-Chief reserves the right to reject manuscripts on the basis of ethical or welfare concerns.

Copyright Statement

Submitted manuscripts must represent original research not previously published nor being considered for publication elsewhere. The editors and Thieme combat plagiarism, double publication, and scientific misconduct with the software CrossCheck powered by iThenticate. Your manuscript may be subject to an investigation and retraction if plagiarism is suspected.

If you plan to reproduce text, tables, or figures from a published source, you must first obtain written permission from the copyright holder (usually the publisher). This is required even if the material is from your own published work. For material never before published and given to you by another person, you must obtain permission from that person. Serious delays to publication can be incurred if permissions are not obtained. As the author, it is your responsibility to obtain all permissions, pay any permission fees, furnish copies of permissions to Thieme with your manuscript, and include a credit line at the end of the figure caption, beneath the table, or in a text footnote.

Upon publication of an article, all rights are held by the publishers, including the rights to reproduce all or part of any publication. The reproduction of articles or illustrations without prior consent from the publisher is prohibited.

Statement of Ethics

This journal adheres to the ethical standards described by the Committee on Publication Ethics and the International Committee of Medical Journal Editors. Authors are expected to adhere to these standards.

For all manuscripts reporting data from studies involving human or animal participants, formal review and approval, or formal review and waiver (exemption), by an appropriate institutional review board (IRB) or ethics committee is required, as well as any necessary HIPAA consent, and should be described in the Methods section with the full name of the reviewing entity. All clinical trials must be registered in a public

trials registry. Denote the registry and registry number.

EDITORIAL CONTACTS

Please contact the Editors or Thieme Publishers with any questions.

Thieme Publishers – Project Manager Journals

Dr. Elinor Switzer Thieme Publishers

Rüdigerstr. 14

70469 Stuttgart, Germany

Tel: +49 711 8931 230 / Fax: +49 711 8931 323

elinor.switzer@thieme.de