

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ESTÁGIOS

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA NO TRATAMENTO
DA NÃO-UNIÃO DE FRATURAS EM CÃES – RELATO DE CASO.**

KARINA MAGANO GUIMARÃES

PORTO ALEGRE

2011/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ESTÁGIOS

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA NO TRATAMENTO
DA NÃO-UNIÃO DE FRATURAS EM CÃES – RELATO DE CASO.**

Elaborado por: Karina Magano Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Monografia apresentada a Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como requisito parcial para
a obtenção do título de Graduação em Medicina
Veterinária.

PORTO ALEGRE

2011/2

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática, demonstrando em detalhes o tecido ósseo compacto e o tecido ósseo esponjoso. Fonte: <http://marciolcastro.blogspot.com/2009/02/tecido-osseo.html>.....05
- Figura 2** – Representação esquemática do processo de formação do calo ósseo. Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/sustentacao2.php>..10
- Figura 3** – Representação esquemática do processo de consolidação da fratura. Fonte: <http://brazilianphysiotherapist.blogspot.com/>.....11
- Figura 4** – Representação esquemática da capacidade de diferenciação celular das MSCs em osteócitos, adipócitos e condrócitos.....13
- Figura 5** – Representação esquemática demonstrando a associação de componentes osteogênicos e osteoindutores da medula óssea à hidroxiapatita para promover nova formação óssea em defeitos segmentares (ARINZEH et. al., 2003).....19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	05
1.1 O TECIDO ÓSSEO.....	05
1.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA EM HUMANOS.....	07
1.3 CONSOLIDAÇÃO DAS FRATURAS.....	08
1.4 MEDULA ÓSSEA.....	11
1.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	12
1.6 NÃO-UNIÃO DE FRATURAS.....	14
1.7 TRATAMENTO DA NÃO-UNIÃO ÓSSEA.....	16
1.8 USO TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA.....	18
2 RELATO DE CASO	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4 CONCLUSÕES	26
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

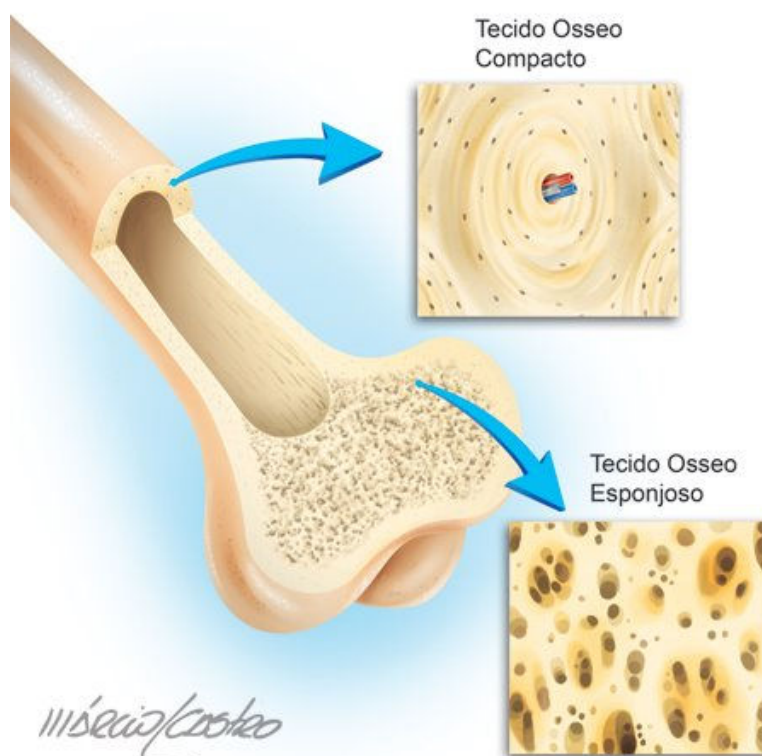
1 INTRODUÇÃO

1.1 O TECIDO ÓSSEO

Os ossos são constituídos por uma forma de tecido conjuntivo rígido cuja matriz extracelular encontra-se impregnada por cristais de fosfato de cálcio depositado através do processo de mineralização. Com sua estrutura altamente vascularizada e metabolicamente ativa, os ossos exercem funções de suporte e proteção e representam o principal reservatório de íon de cálcio e fosfato (WHITEFIELD e ROSEMBERG, 2005).

Os ossos podem ser constituídos por tecido ósseo compacto (ou cortical) ou tecido ósseo esponjoso (ou medular), como representado na **Figura 1**. A superfície externa dos ossos é recoberta pelo perióstio, enquanto que o endóstio recobre a superfície interna (KIERSZENBAUM, 2002).

Figura 1 – Representação esquemática óssea, demonstrando em detalhes o tecido ósseo compacto e o tecido ósseo esponjoso. Fonte: <http://marciolcastro.blogspot.com/2009/02/tecido-osseo.html>



Do ponto de vista microscópico, o tecido ósseo é composto por matriz óssea, osteoblastos (formas ativas e inativas), osteócitos e osteoclastos (HOLMBECK et al., 2005).

A matriz óssea consiste de 35% de componentes orgânicos, incluindo prioritariamente colágeno tipo I (90%), proteoglicanos como o sulfato de condroitina e ácido hialurônico e proteínas não colágenas (osteocalcina, osteopontina e osteonectina) e 65% de componentes inorgânicos. Os componentes inorgânicos são representados predominantemente pela hidroxiapatita (KIERSZENBAUM, 2002).

Os osteoblastos são células de formato cuboidal ou colunar que recobrem todas as áreas de formação óssea ativa, sob a forma de monocamada (HOLMBECK et al., 2005). Os osteoblastos depositam na interface com a trave mineralizada uma matriz orgânica denominada de matriz osteóide, onde posteriormente terá início o processo de mineralização (HOLMBECK et al., 2005). Durante o processo de deposição da matriz osteóide alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz e se diferenciam em osteócitos. Estas células maduras, localizadas no interior de lacunas e completamente envolvidas por matriz óssea mineralizada, estão conectadas por canálculos pelos quais atravessam prolongamentos celulares que integram os osteócitos através de junções comunicantes (WANG et al., 2000). Por esta rede de canais circula um fluido que é impulsionado para dentro das lacunas e de volta para os canálculos de acordo com os movimentos dos ossos. A intensidade com que esse fluido alcança os osteócitos determina a oscilação de íons de cálcio. Ademais, este fluido participa do transporte de nutrientes, de oxigênio e metabólitos dos/para os osteócitos controlando o processo de ativação ou não destas células (KNOTHE-TATE et al., 2001).

O osteoclasto é uma célula multinucleada que tem sua origem a partir da fusão de monócitos, provenientes da circulação sanguínea (BLAIR, 1998) ou a partir da fusão de pré-osteoclastos existentes na medula óssea (WHITEFIELD e ROSEMBERG, 2005). Essas células são responsáveis pela reabsorção óssea, através da secreção de enzimas na superfície óssea que promovem a dissolução da matriz mineralizada e degradação enzimática da matriz orgânica. A formação dos osteoclastos é controlada pelo paratormônio (PTH), produzindo nas glândulas paratireóides. Essa glândula possui receptores de membrana que respondem aos níveis séricos de Ca^{++} . Quando a concentração sérica declina, o PTH é secretado e os osteoclastos são formados a fim de promover a reabsorção óssea, restaurando os níveis de cálcio (BLAIR, 1998).

1.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA EM HUMANOS

Os osteócitos são responsáveis pelo monitoramento das forças exercidas sobre o osso e programados para responder as alterações biomecânicas (KLEIN-NULENT et al., 2003), iniciando o processo de remodelação (WHITEFIELD e ROSEMBERG, 2005). Em resposta a micro danos e subsequente ativação dos osteócitos, os osteoclastos migram para o sítio onde o processo de remodelação está se iniciando. Através da ação da catepsina K os osteoclastos iniciam a degradação da matriz óssea (BLAIR, 1998). Com a degradação da matriz e morte dos osteócitos, é provável que os osteoclastos sejam recrutados pelos percussores estromais osteoblásticos por quimiotaxia, através da liberação de M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) e RANKL (*receptor activator of NF- κ B Ligand*). Uma vez aderidos à zona de reabsorção, os osteoclastos promovem a escavação da matriz óssea durante 2 a 3 semanas. Durante esse período de tempo o fluxo do fluido extracelular cessa por completo naquela região (KLEIN-NULENT et al., 2003) e o local fica preparado para que ocorra a deposição de matriz protéica pelos osteoblastos e sua subsequente mineralização (KIERSZENBAUM, 2002).

Durante o processo de escavação, BMP-2 (proteína morfogênica óssea 2), FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico 2), IGFs-I e II (fatores de crescimento insulínico I e II), IGFBP-5 (proteína de ligação do fator de crescimento insulínico 5) e TGF- β (fator de crescimento transformante β), são liberados da matriz óssea estimulando a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos (WHITEFIELD e ROSEMBERG, 2005). O TGF- β estimula particularmente a diferenciação das células do estroma da medula óssea em osteoblastos, através da via de ativação Cbfa1/Runx-2 e concomitantemente a diminuição da formação de osteoclastos através da redução da expressão de RANKL (TROEN, 2003). Cessada a escavação, os osteoclastos sofrem apoptose. Estas células deixam um rastro de Mim-1 (*myb-induced myeloid protein 1*), uma citocina que atrai progenitores de osteoblastos (TROEN, 2003) e facilita a ação do Cbfa1/Runx-2, estimulando a expressão de osteocalcina e mineralização da matriz orgânica (PONOMAVERA et al., 2002). O preenchimento completo das lacunas de reabsorção com o osso depositado pelos osteoblastos e a completa restituição da área recém remodelada ocorre num período de 3 a 9 meses. Ao final deste processo, os osteoblastos que não foram aprisionados nas lacunas sofrem apoptose e liberam fosfatase

alcalina sobre a nova matriz óssea concluindo o processo de reparação do tecido ósseo (WHITEFIELD e ROSEMBERG, 2005).

1.3 CONSOLIDAÇÃO DAS FRATURAS

Em certas condições de instabilidade a consolidação das fraturas é caracterizada pela formação de um calo intermediário à formação óssea. Esse reparo ósseo é chamado de consolidação secundária e pode ser dividido em três fases que ocorrem simultaneamente: inflamação, reparo e remodelamento (GRIFFON, 2005). Cabe ressaltar que a formação óssea ocorre somente em condições mínimas de mobilidade entre os fragmentos ósseos, que não deve ultrapassar 2% (SCHILLER, 1988).

A fase inflamatória começa imediatamente após a fratura e o estabelecimento da ausência de continuidade óssea e de tecidos adjacentes, e persiste até o início da formação de cartilagem ou osso. Essa fase dura em torno de 3 a 4 dias e o final desta fase, pode ser caracterizado clinicamente, pela diminuição do edema e dor local (GRIFFON, 2005).

Inevitavelmente as fraturas causam dilaceração dos vasos sanguíneos medulares, com subsequente extravasamento de sangue. Trombose e contração destes vasos sanguíneos minimizam a perda sanguínea, mas ao mesmo tempo promovem isquemia e consequente necrose óssea, observada pela presença de lacunas vazias na histopatologia. Forma-se então, no espaço interfragmentar, um hematoma rico em fibrina que apesar de não oferecer nenhum suporte mecânico a fratura, marca o início da consolidação óssea, através da liberação de fatores de crescimento que estimulam a angiogênese e osteogênese. Formação óssea endocondral ectópica foi observada após o transplante de coágulo interfragmentar, demonstrando assim o potencial osteoindutor dos componentes deste hematoma (STREET et al., 2000). Possivelmente, as plaquetas seriam o primeiro tipo celular a alcançar o foco de fratura e além de fatores de coagulação, elas contribuíram também com fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e TGF- β 1, estimulando a formação óssea (LIEBERMAN et al., 2002).

As propriedades angiogênicas presentes no hematoma interfragmentar são mediadas pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fatores como acidez local e citoquinas contidas no exudato da região traumatizada (STREET et al., 2000). Mediadores inflamatórios como as prostaglandinas E1 e E2 também estimulam a angiogênese e ainda são responsáveis pela sinalização e ativação de osteoclastos e o início da reabsorção óssea

(MILLIS, 1999). Finalmente, mastócitos contendo substâncias vasoativas contribuem para a formação de novos capilares (MCLAUGHLIN, 1991). Em questão de horas, a área necrótica é invadida por novos vasos sanguíneos oriundos dos tecidos moles adjacentes (GRIFFON, 2005).

Células mononucleares, com potencial fagocitário auxiliam na remoção de osso necrótico, e macrófagos, através da liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), estimulam a produção de tecido fibroso, assim como a formação óssea (LIEBERMAN et al., 2002). Com o restabelecimento da vascularização intramedular, a vascularização extra óssea regride. Em condições normais, o hematoma é reabsorvido no final da primeira semana pós-trauma (SHILLER, 1988).

O restabelecimento da vascularização permite a disseminação de fibroblastos e células mononucleares que transformam o hematoma em tecido de granulação. Isso promove um leve grau de estabilidade ao foco de fratura, em torno de $0.1\text{Mn}/\text{mm}^2$. Com a maturação do tecido de granulação, fibras de colágeno se tornam mais abundantes, principalmente colágeno tipo I, permitindo uma resistência ainda maior no foco de fratura, de até $60\text{Nm}/\text{mm}^2$. Baixa tensão de oxigênio, vascularização precária, fatores de crescimento e forças mecânicas atuando na região interfragmentar influenciam na formação do calo cartilaginoso (REMEDIOS, 1999).

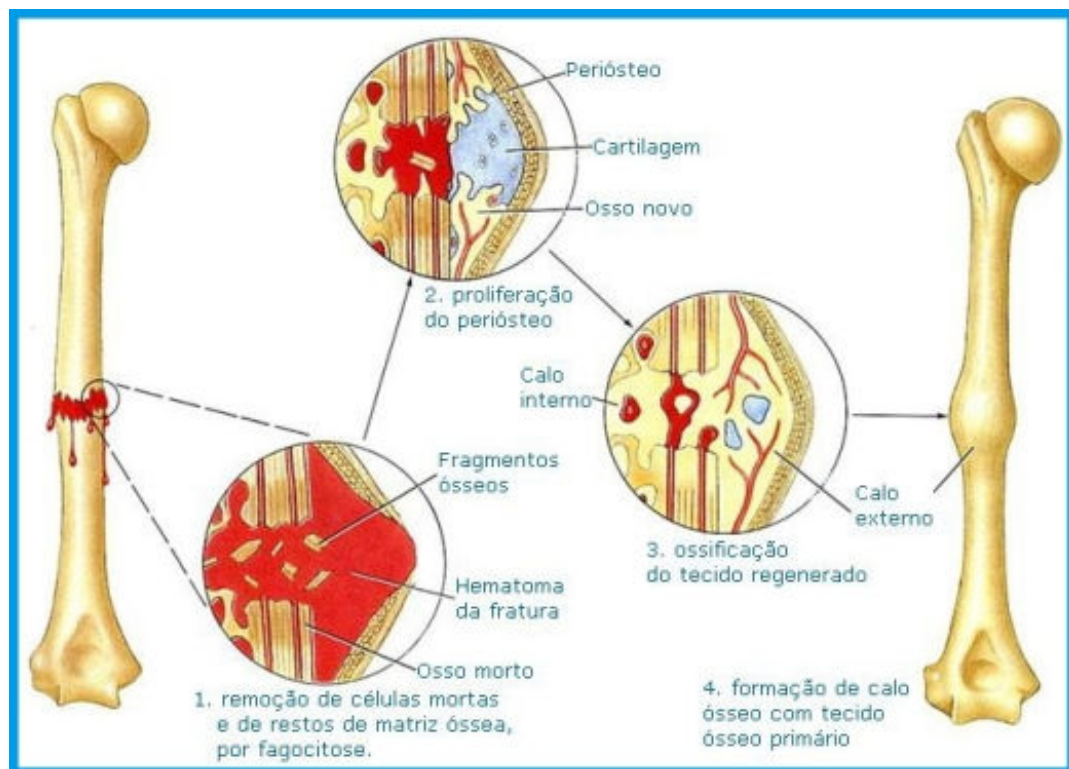
As células mesenquimais que se encontram no periósteo, endósteo, medula óssea e tecidos moles adjacentes, começam a se proliferar durante a fase inflamatória e se diferenciar durante a fase de reparo. Fatores de crescimento como TGF- β e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) coordenam a quimiotaxia, proliferação e diferenciação das células progenitoras em condroblastos e osteoblastos (HEPPENSTALL, 1980). O periósteo que circunda a região fraturada aumenta de diâmetro, produzindo assim, um calo ósseo externo, inteiramente irrigado por vasos extra-ósseos. Um calo interno, confinado a cavidade medular, se desenvolve a partir do endósteo e é vascularizado a partir das arteríolas medulares (HEPPENSTALL, 1980). Esse calo cartilaginoso, que é formado durante as primeiras 3 semanas após o trauma, apresenta uma resistência a forças mecânicas similar a do tecido fibroso (MANN e PAYNE, 1989).

Um achado comum em fraturas instáveis e bem vascularizadas é uma calo exuberante. Esse aumento de diâmetro do osso promove um ganho na resistência contra as forças de torção permitindo assim a formação de osso compacto. A mineralização do calo fibrocartilaginoso progride das extremidades dos fragmentos ósseos, para o centro do espaço interfragmentar, através da formação de focos de mineralização controlados por condrócitos

(GRIFFON, 2005). O exato mecanismo de mineralização é ainda incerto, entretanto, estudos apontam para uma atividade mitocondrial muito similar a que ocorre nas placas de crescimento (KETENJIAN e ARSENIS, 1975). A mitocôndria acumularia grânulos de cálcio e fosfato de cálcio que seriam liberados na matrix extracelular e em uma condição de hipóxia, estimulariam o depósito de micro-cristais de apatita. A invasão vascular ocorre no tecido fibrocartilaginoso a partir da degradação de compartimentos de matrix não mineralizada por macrófagos, seguidos do estabelecimento das trabéculas por células osteoprogenitoras. Com suporte mecânico adequado e vascularização restabelecida, o tecido fibroso interfragmentar sofre ossificação intramembranosa e gradativamente vai sendo substituído por osso compacto, que apresenta uma resistência mecânica de 160 Nm/mm^2 (RAHN, 2002). A **Figura 2** é a representação esquemática do processo de formação do calo ósseo.

Figura 2 – Representação esquemática do processo de formação do calo ósseo.

Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/sustentacao2.php>



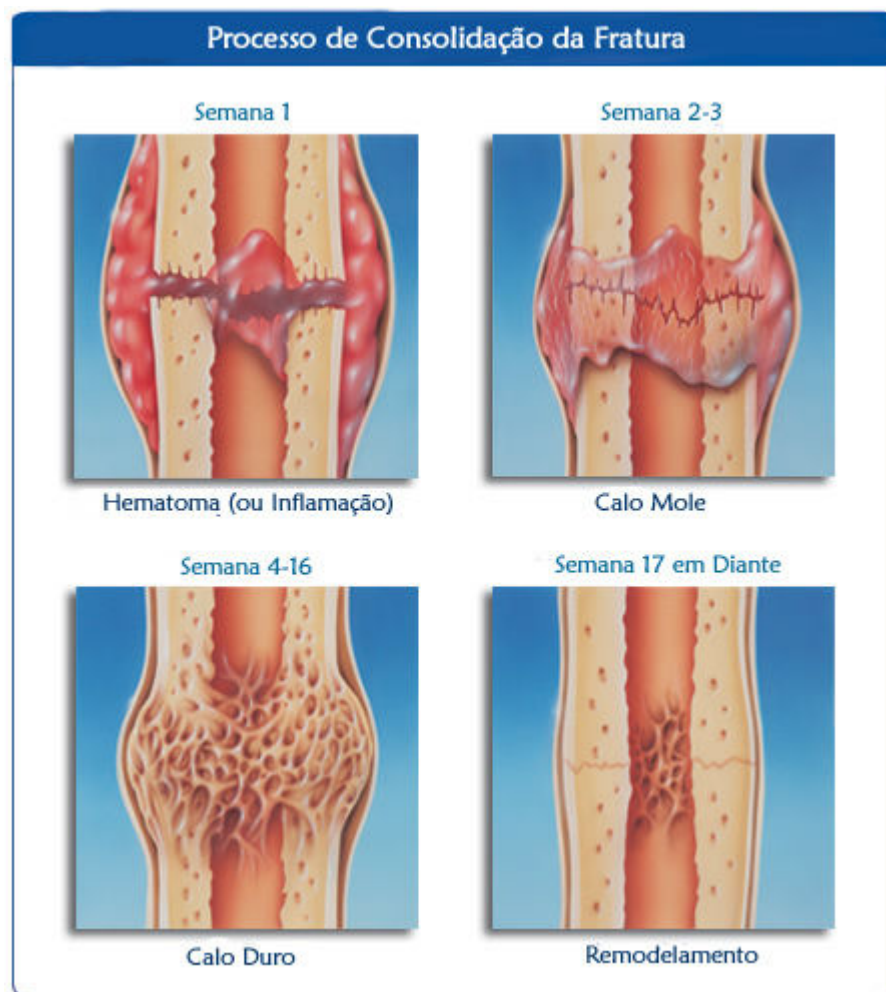
No fim da fase de reparo, a união óssea é alcançada, mas a estrutura da região previamente fraturada difere da morfologia óssea original e por isso, a fase de remodelamento se inicia. Essa fase final da consolidação óssea é caracterizada pela adaptação morfológica até alcançar estrutura, resistência e função originais. A fase de reparo ósseo é um processo lento

que em humanos leva entre 6 e 9 meses e representa 70% do total de tempo de consolidação de uma fratura (REMEDIOS, 1999).

O equilíbrio das ações osteoclástica e osteoblástica é regido pela lei de Wolff. A carga axial exercida sobre o osso cria uma superfície convexa eletropositiva, onde reabsorção óssea predomina e uma superfície côncava, eletronegativa onde deposição óssea ocorre. O calo ósseo vai gradativamente desaparecendo e o espaço medular na diáfise do osso se restabelece (REMEDIOS, 1999). O processo de consolidação da fratura é demonstrado na **Figura 3**.

Insuficiente vascularização e excessiva mobilidade no foco de fratura contribuem para o estabelecimento da não-união (GRIFFON, 2005).

Figura 3 – Representação esquemática do processo de consolidação da fratura. Fonte: <http://brazilianphysiotherapist.blogspot.com/>



1.4 MEDULA ÓSSEA

A medula óssea é um órgão que se estabelece na fase final do desenvolvimento embrionário, como resultado do processo de ossificação endocondral. Com o envelhecimento do indivíduo, a medula óssea, que inicialmente é predominantemente vermelha, composta por elementos hematopoéticos, se torna amarela devido à substituição por células adiposas, perdendo gradativamente sua função hematopoética (KUZNETSOV et al., 2004).

Na vida adulta, a medula óssea hematopoética está restrita à cavidade medular da clavícula, vértebras, esterno, pélvis, e extremidades dos ossos longos, entre as trabéculas ósseas. Por muito tempo, a hematopoese foi considerada a única função da medula óssea pós-natal. A partir da descrição da presença de células estromais, com potencial de pluripotencialidade na medula óssea pós-natal, esta passou a ter um papel mais amplo além do local de formação e diferenciação de células hematopoéticas (ROBEY, 2000).

1.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

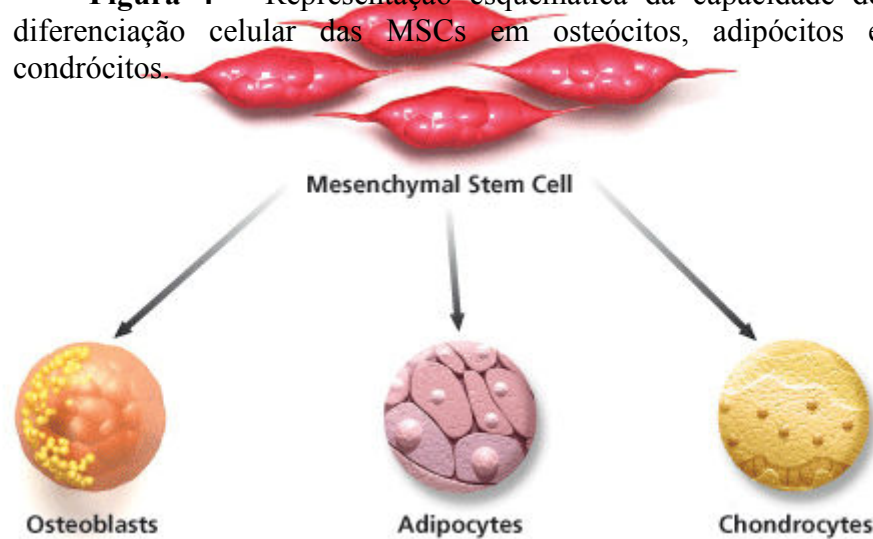
Poucos anos após a descoberta das células-tronco hematopoéticas, os estudos de FRIEDESTEIN et al. (1966) e mais tarde de OWEN e FRIEDESTEIN (1988), revelaram a existência de progenitores mesenquimais multipotentes na medula óssea pós-natal, com potencial para dar origem a distintos tecidos mesodermis. A partir dessas descobertas, reconheceu-se a existência de dois sistemas tronco distintos na medula óssea – o sistema hematopoético e o sistema estromal, este último precursor das linhagens osteogênica, condrogênica, adipogênica, e reticulares, a partir de um progenitor comum (BIANCO e ROBEY, 2004).

Muitos termos têm sido utilizados para designar essas células de origem não hematopoética, tais como precursor de mecanócitos, empregado por FRIEDESTEIN (1976) ou células-tronco estromais da medula óssea (OWEN & FRIEDESTEIN, 1988). Outro termo muito utilizado é célula-tronco mesenquimais (MSC), apesar de essas células não terem a capacidade de originar múltiplos tecidos mesodermis, propriedade exclusiva de células embrionárias (BIANCO et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) se caracterizam pela capacidade de aderência após o plaqueamento da medula óssea. Essas células aderentes apresentam potencial clonogênico, investigado através de ensaios denominados CFU-F (*colony forming unit-*

fibroblasts). Após a expansão *in vitro*, elas são capazes de originar osteoblastos, células reticulares (FRIEDESTEIN, 1968; KREBSBACH, 1997), condrócitos e células acumuladoras de gordura (FRIEDESTEIN, 1970; ASHTON, 1980), conforme ilustrado na **Figura 4**. Até o presente momento, o fenótipo descrito das MSCs humanas é CD34⁻, CD45⁻, CD14⁻, CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD49a⁺, CD63⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁺, CD146⁺, CD166⁺ (ZANNETTINO et al, 2003; BIANCO e ROBEY, 2004).

Figura 4 – Representação esquemática da capacidade de diferenciação celular das MSCs em osteócitos, adipócitos e condrócitos.



As MSCs apresentam três propriedades: clonogenicidade, multipotencialidade e capacidade de auto-renovação, (BIANCO et al., 2006; SACCHETTI et al., 2007). As células de medula óssea em cultura expressam fator de transcrição Runx2/CBFA1, que é o gene para o comprometimento osteogênico (DUNCY et al., 1997; KOMORI et al., 1997). Entretanto, ainda há pouca evidência dessa expressão *in vivo* (BIANCO et al, 2006). Outros fatores de transcrição como Osterix, que caracteriza diferenciação osteogênica (NAKASHIMA et al., 2002) e Sox9, que determina diferenciação condrogênica (AKIYAMA et al., 2002) são levemente detectados em amostras de estroma de medula óssea (BIANCO et al., 2006). Fatores de transcrição que controlam a adipogênese (C/EBP α e PPAR γ são expressos, em

baixos níveis, mesmo sem adição de indutores adipogênicos na cultura (GUIMBLE et al., 1996; KUZNETSOV et al., 2001).

1.6 NÃO-UNIÃO DE FRATURAS

A não-união de fraturas ocorre quando o processo de reparo biológico num foco de fratura é interrompido por motivo ainda não esclarecido, acarretando em não consolidação do tecido ósseo. Nestas situações, a consolidação só ocorrerá se for instituído um tratamento direcionado para este objetivo, em sua maioria associando tratamento cirúrgico. Sob o ponto de vista temporal, a não união é diagnosticada quando uma fratura, não apresenta sinais radiográficos de consolidação três meses após sua ocorrência (LA VELLE, 1998).

Diversos fatores podem contribuir para a interrupção ou retardo da consolidação óssea. Dentre estes fatores, os que estão mais diretamente relacionados com uma das duas condições é o grau inicial de desvio da fratura, perda óssea, traumas de alta energia (HARRIS et al., 2006) associados a lesão extensa de partes moles, cominuição e infecção (LERNER et al., 2006). Em pequenos animais, assim como na medicina humana, situações como redução e fixação inadequadas, instabilidade entre os fragmentos ósseos e local da fratura representam também importantes fatores para o estabelecimento desta patologia (AUDIGE et al., 2005; PIERMATEI et. al., 2006). PITTENGER et al. (1999) relata que a patogenia da não-união é relacionada à limitação nas funções e/ou número de MSCs.

A não-união pode acarretar problemas relacionados com a função do membro afetado, como atrofia muscular por desuso, redução da amplitude do movimento articular e rigidez relacionada à contração de tecido cicatricial, disfunção neuromuscular e angulação e/ou encurtamento do membro (MILLIS e JACKSON, 2003).

A fisiopatologia da não-união de fraturas é caracterizada inicialmente pelo surgimento do tecido de granulação no espaço interfragmentar que confere alguma estabilidade, sem impedir a sua mobilidade. Gradativamente, cartilagem e osso preenchem o foco de fratura conferindo estabilidade ao mesmo. Porém, se houver mobilidade além da tolerada por esses tecidos, haverá comprometimento da angiogênese e consequente retardo do reparo ósseo, com possibilidade de estabelecimento de uma não-união (NUNAMAKER et. al., 1985). BOYAN

et. al. (1999) identificaram a presença de poucas células mesenquimais comprometidas ou diferenciadas na linhagem osteoblástica no foco de fratura de um modelo experimental canino de não-união, sugerindo que a diferenciação dessas células seja inibida não não-união crônica.

O tecido interfragmentar persistente nas não-uniões consiste prioritariamente de uma zona uniforme de fibrocartilagem. Estruturas vasculares e evidência de reciclagem ativa do tecido ósseo estão presentes nas extremidades dos fragmentos, mas os canais vasculares não são capazes de penetrar na fibrocartilagem não-mineralizada. No estágio crônico da não-união, pode haver o desenvolvimento de pseudoartrose no defeito ósseo, caracterizada pela formação de membrana e líquido sinovial em torno de um falso espaço articular na extremidade de cada fragmento que constitui o foco da fratura (WOODARD e RISER, 1991).

Baseado nas suas características biológicas e tradução radiográfica, as não-uniões são classificadas em viáveis ou inviáveis (WEBER & CECH, 1974).

As não-uniões viáveis ou hipertróficas ou “em pata de elefante” possuem calo ósseo abundante hipervascularizado e, frequentemente, estão relacionadas com fraturas que foram desestabilizadas pela remoção prematura ou afrouxamento do aparelho de fixação esquelética. As não-uniões viáveis levemente hipertróficas ou “em casco de cavalo” possuem quantidade inadequada de calo e se caracterizam por leve esclerose das extremidades dos fragmentos. Estas não-uniões ocorrem em casos de instabilidade rotacional moderada. As não-uniões viáveis oligotróficas não possuem calo visível, mas ainda são capazes de resposta biológica. Caracterizam-se pela presença de tecido fibroso vascularizado entre os fragmentos, que tem extremidades arredondadas e sofrem reabsorção progressiva. Estas não-uniões ocorrem diante de grande deslocamento ou distração dos fragmentos fraturados.

As não-uniões inviáveis distróficas possuem fragmentos intermediários que consolidaram em relação a apenas um fragmento principal. O fragmento intermediário, com deficiência de vascularização, é incapaz de estimular resposta osteogênica suficiente para que ocorra união com o segundo fragmento. As não-uniões inviáveis necrosadas estão associadas a fraturas cominutivas, nas quais grandes fragmentos estão avascularizados ou deficientemente vascularizados, progredindo para necrose tecidual. Os fragmentos necrosados não são incorporados aos calos de fratura. As não-uniões inviáveis de defeito resultam da perda de segmento significativo do osso no local fraturado. Por ocasião da lesão, grandes fragmentos podem ter sido perdidos através das feridas abertas. Os defeitos também podem resultar da reabsorção de fragmentos necrosados ou da remoção ou excisão de fragmentos durante a cirurgia. As não-uniões inviáveis atróficas são sequelas dos outros três tipos de não-

união inviável. Há reabsorção óssea significativa nas extremidades dos fragmentos, perda da vascularização, ausência de atividade osteogênica e osteoporose caracterizam estas não-uniões.

Em um estudo retrospectivo, ATIOLA e SUMNER (1984) observaram que 3,4% de 2.825 fraturas em cães evoluíram para não-união, sendo o rádio e a ulna os ossos mais afetados (40,6%), seguidos pelo fêmur (38,5%), úmero (12,5%) e tibia (4,2%). A prevalência de não-união foi maior em cães entre 2-7 anos de idade (49%) e cães que pesavam entre 7-14kg.

Cães das raças *toy* e miniatura podem apresentar variantes anatômicas da vascularização óssea constituída por pequena densidade vascular na junção diafisária-metáfisária distal do rádio, (WELCH et al., 1997). Adicionalmente, a cobertura tecidual nesta região, por ser muito pequena, fica susceptível a lesões mais extensas após traumas (NUNAMAKER, 1985).

No exame clínico das não-uniões evidencia-se ampla mobilidade no local fraturado sem dor à palpação ou apenas leve desconforto (MILLIS & JACKSON, 2003). A atrofia muscular e a rigidez articular são provavelmente sequelas de desuso do membro, pois na maioria dos casos, o membro afetado não sustenta o peso do animal (MILLIS e JACKSON, 2003).

O diagnóstico da não-união deve ser baseado nos achados radiográficos, característicos de cada tipo de não-união e na não progressão da consolidação óssea durante pelo menos três meses, com persistência da linha de fratura entre os fragmentos ósseos (LA VELLE, 1998). As características radiográficas mais frequentes são formação variável de calo periosteal e endosteal, linha de radiotransparência interfragmentar, esclerose e arredondamento das extremidades dos fragmentos fraturados, tecido mineralizado ocluindo a cavidade medular e pseudoartrose. Estes achados podem ser confirmados por exames complementares tais como cintigrafia e DEXA (*dual energy xray absorptiometry*) (MILLIS e JACKSON, 2003).

1.7 TRATAMENTO DA NÃO-UNIÃO ÓSSEA

Durante os últimos 20 anos foram desenvolvidas diversas técnicas para o tratamento das não-uniões, incluindo procedimentos invasivos (fixação interna e enxertia com osso ou com substitutos ósseos) e procedimentos não invasivos (ultra-som e aplicação de pulsos

eletromagnéticos) (HERNIGOU et al., 2005). Entretanto, o passo inicial no tratamento das não-uniões e a avaliação das condições biológicas e mecânicas envolvidas na instalação da lesão. Em seres humanos a definição da estratégia terapêutica deve levar em consideração a localização configuração e tipo (quando exposta) da fratura, infecção ou manipulação cirúrgica prévias, alinhamento, condição neuro-vascular do membro afetado e eventual perda óssea (HERNIGOU et al., 2005).

A remoção do tecido fibroso através de curetagem, remoção de tecido ósseo esclerótico das bordas dos fragmentos ósseos, abertura do canal medular obstruído, estimulação da osteogênese e fixação estável da fratura constitui o tratamento cirúrgico de escolha para as não-uniões inviáveis (RODRIGUEZ-MERCHAN e FORRIOL, 2004; PIERMATEI et al., 2006).

Diversos tipos de enxertos ósseos podem ser utilizados no tratamento das pseudoartroses em humanos a fim de estimular a osteogênese. O enxerto de osso esponjoso autógeno é considerado o padrão-ouro neste tipo de abordagem e, por isso, e comumente utilizado em medicina humana e veterinária (GOULET et al., 1997; MCLAUGHLIN, 1998; JOHNSON, 2002; BRAWLEY e SIMPSON, 2006). Mesmo sendo clinicamente eficaz, o tempo cirúrgico e anestésico adicional à coleta do enxerto, o aumento da morbidade pós-operatória e escassez de osso esponjoso, principalmente observada em pacientes pequenos, tem encorajado a pesquisa em busca de substitutos para enxertos ósseos (GRIFFON, 1996; OONISH, 1997). A dificuldade da coleta de enxerto ósseo autógeno em quantidades satisfatórias e frequente em cães de raças miniatura e toy e felinos, muitas vezes requerem a exposição cirúrgica de múltiplas áreas de coleta (DOREA et al. 2005).

O uso de enxerto alógeno elimina a morbidade associada com a coleta do enxerto autógeno e reduz o tempo cirúrgico e anestésico. Em cães, o enxerto de osso esponjoso alógeno congelado é efetivamente incorporado quando usado no reparo de fraturas e em artrodeses, aumentando a taxa de consolidação óssea por meio das propriedades de osteoindução e osteocondução (KERWIN et al., 1996). Entretanto, reação imunológica e transferência de doenças do doador para o paciente recipiente são algumas das desvantagens que podem ser observadas com o uso deste material (KERWIN et al., 1996; MCLAUGHLIN e ROUSH, 1998).

Diversos enxertos ósseos sintéticos surgiram com a proposta de eliminar a coleta de enxerto autógeno e evitar complicações associadas com o uso de enxerto ósseo alógeno. Muitos materiais tem sido investigados tanto em homens como em animais, mas até o

presente momento não há nenhuma evidência de que enxertos ósseos sintéticos contribuam com fatores osteoindutores ou osteogênicos. Ademais, o fato destes materiais apresentarem somente osteocondução, torna-os menos eficientes na promoção da consolidação óssea, quando comparados com enxertos alógenos e principalmente com os enxertos autógenos (OONISHI, 1988; WILSON, 1999; WHELLER, 2000; DOREA et al., 2005).

Ainda com o intuito de evitar a morbidade associada a coleta do enxerto de osso autógeno e de superar as limitações observadas com o emprego dos enxertos de osso alógeno e sintético, procedimentos minimamente invasivos como aplicação de concentrado de plaquetas no foco de fratura (SLATER et al., 1995), uso de proteínas morfogenéticas do osso (JONHSON et al., 1990; ZIMMERMANN et al., 2006) e injeção percutânea de medula óssea total (CONNOLLY et al., 1989; GOEL et al. 2005), começam a ser considerados.

Atualmente, a comunidade científica tem mostrado um grande interesse sobre a utilização de terapia celular em ortopedia, dando grande ênfase para o uso de células provenientes da medula óssea com o objetivo de acelerar ou promover o reparo ósseo (HERNIGOU e BEAUJEAN, 2002).

1.8 USO TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA

Há alguns anos a medula óssea total vem sendo usada como coadjuvante no reparo ósseo a fim de acelerar este processo. Adicionada a enxertos sintéticos (COLNOT et al., 2006), enxertos ósseos alógenos (ASPENBERG et al., 1987) ou ainda injetada por via percutânea no foco de fratura (JEAN et al., 1997; COLNOT et al., 2006) a medula óssea introduz principalmente os componentes osteogênicos e osteoindutores que promoverão a formação óssea, como demonstrado na **Figura 5**.

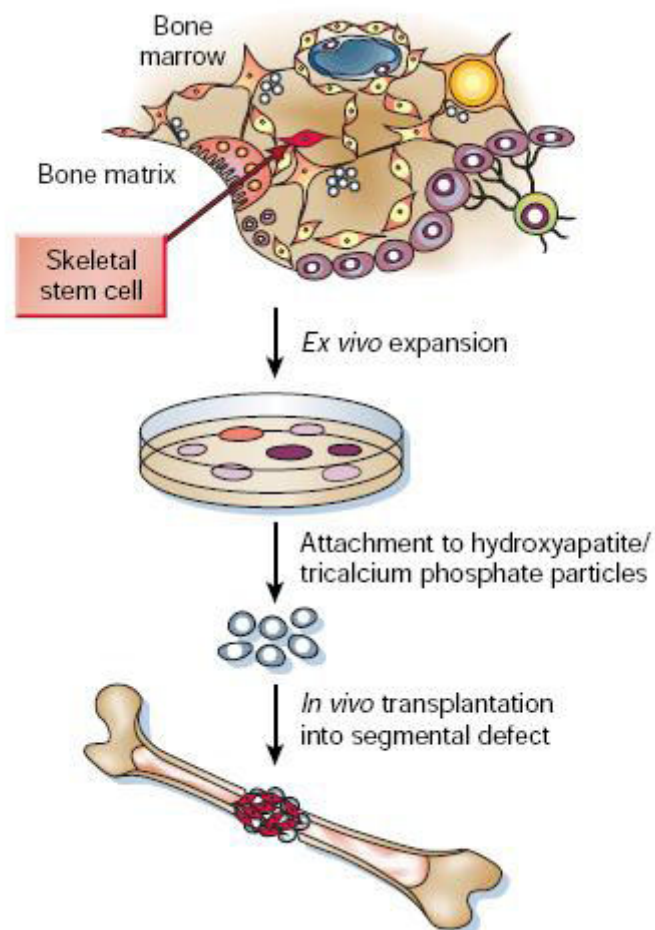
Mais recentemente, pesquisas tem ressaltado a importância da concentração de células da medula óssea para a eficácia da terapia. HERNIGOU et al. (2005), tratou 60 pacientes que apresentavam não-união na diáfise da tíbia com células mononucleares autólogas da medula óssea, injetando-as por via percutânea no tecido fibroso interfragmentar, no foco de não-união. O número de progenitores foi avaliado através do ensaio de CFU-Fs. Os autores observaram reversão da não-união e consolidação óssea em 53 casos, onde foi injetado mais de 54.000 células progenitoras. Nos sete pacientes que não responderam ao tratamento foram

injetados em média 634 progenitores/cm³ e 19 CFU-Fs. Os autores atribuem a falta de resposta destes pacientes ao baixo número de progenitores presentes na medula óssea.

HERNIGOU e BEAUJEAN (2002) utilizaram a mesma abordagem terapêutica para tratar osteonecrose de cabeça femoral e observaram redução significativa da necessidade de artroplastia total de quadril dez anos após o tratamento.

O conjunto das características das células mesenquimais pluripotentes, em especial a facilidade com que podem ser isoladas da medula óssea (PITTENGER et al., 1999), a possibilidade de se obter, por expansão *in vitro*, um número elevado de células a partir de volumes relativamente pequenos de medula óssea (JIANG et al., 2002), a sua capacidade de diferenciação em tecidos musculoesqueléticos (SESHI et al., 2000), fazem com que o uso destas células seja promissor para aplicações em bioengenharia ortopédica.

Figura 5 – Representação esquemática demonstrando a associação de componentes osteogênicos e osteoindutores da medula óssea à hidroxiapatita para promover nova formação óssea em defeitos segmentares (ARINZEH et. al., 2003).



Segundo GRANERO-MOLTÓ et al. (2009) as MSCs iniciam o processo de reparo da fratura levando à formação de calo ósseo que é então substituído por neo-formação óssea, que repara o espaço interfragmentar.

A utilização terapêutica das MSCs expandidas *in vitro* está sendo explorada no reparo ou na regeneração de tecidos mesenquimais lesionados e na consolidação de fraturas ósseas (MOUTSATSOS et al., 2001), lesões tendinosas (AWAD et al., 1999) e cartilaginosas (KADIYALA et al., 1997; QUINTAVALLA et al., 2002). Outra forma de explorar o potencial biológico destas células é através da associação com biomateriais reabsorvíveis de origem sintética. Utilizando-se esta estratégia, que constitui a base da bioengenharia, lesões consideradas intratáveis passam a ser passíveis de abordagem terapêutica (BIANCO & ROBEY, 2001; CANCEDDA et al., 2003; ROBEY & BIANCO, 2004).

2 RELATO DE CASO

Neste caso clínico, células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea autóloga e expandidas *in vitro* foram injetadas por via percutânea para tratar uma não-união de fratura em um cão. A hipótese foi avaliar se, ao prover o foco de fratura com elementos celulares adicionais, estes seriam capazes de promover ou acelerar a formação óssea.

Foi atendido em clínica veterinária particular na cidade de Porto Alegre, um cão macho, poodle, com um ano e dois meses de idade, pesando 3,5kg, com diagnóstico de não-união óssea de rádio e ulna comprovada clínica e radiograficamente. O consentimento do proprietário foi obtido antes do tratamento do animal, através de um termo de autorização para coleta de medula óssea (**ANEXO A**) e injeção da suspensão celular (**ANEXO B**). O diagnóstico de não-união foi feito baseado na ausência de sinais radiográficos de progressão de consolidação óssea e persistência do espaço interfragmentar após duas tentativas de osteossíntese ao longo de 6 meses. Considerando-se que a próxima etapa, segundo decisão do proprietário, seria a amputação do membro afetado, optou-se pela tentativa da injeção percutânea de células-tronco mesenquimais no foco de fratura, com a finalidade de estimular a consolidação óssea.

O paciente utilizava fixador externo, inserido durante a última realização de procedimento cirúrgico, porém os pinos da estabilização estavam frouxos, motivo que levou à

decisão da troca da estabilização para colocação de placa antes da realização da coleta e injeção de células-tronco mesenquimais no foco de fratura.

A região do tubérculo maior do úmero, contralateral a lesão óssea, foi preparada para um procedimento cirúrgico asséptico. Com o paciente sob efeito de anestesia geral (propofol 6mg/kg) foi feita uma incisão da pele para introdução de broca, através da cortical, até atingir o osso esponjoso da metáfise. Foi inserida agulha hipodérmica e a aspiração da medula foi feita lentamente em um total de 7mL de sangue coletado, em 2 alíquotas individuais de 3,5mL rinsadas com solução de heparina na concentração de 1000 UI/mL. A cada troca de seringa, a agulha era reposicionada na metáfise para reduzir a diluição do aspirado com sangue. Foram coletados 2mL/kg de medula óssea, do paciente, baseado no valor de referência para humanos (HERNIGOU et al., 2005). As amostras foram armazenadas a 4°C e encaminhadas imediatamente para o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Após a retirada da agulha com movimentos circulares, foi feita a síntese da incisão de pele com material de sutura não absorvível em padrão interrompido simples. O paciente recebeu medicação antiinflamatória (cetoprofeno 1mg/kg/dia) e antibiótico (cefalexina 10mg/kg, 12/12h) durante 5 e 7 dias, respectivamente.

O paciente não apresentava apoio do membro fraturado, manifestava dor moderada à palpação local e não tinha edema local.

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O aspirado de medula foi transferido para tubos tipo Falcon de 15mL. Foi adicionado Phosphate Buffered Saline (PBS), no mesmo volume do aspirado de medula e centrifugado a 800g, em temperatura ambiente por 5 minutos.

As células autólogas foram ressuspensas em 10mL de PBS, e o processo de centrifugação foi repetido por mais duas vezes, até que se obtivesse um sobrenadante translúcido.

No final da terceira lavagem, as células autólogas foram ressuspensas em 10mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Sigma) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de penicilina e estreptomicina e 1% de L-glutamina.

Em seguida foi realizada a contagem de células viáveis pelo método de Azul de Trypan em câmara de Neubauer.

As células foram plaqueadas na concentração de 10^7 células por garrafa de cultivo modelo T25. Foram adicionados 5mL de DMEM completo, contendo 15% de SFB. As garrafas de cultivo foram colocadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, permanecendo assim por 72 horas.

O meio foi substituído após esse período e a cada dois dias. Após observação em microscópio invertido de contraste de fase, era feita a troca de meio e as células não aderentes eram removidas através da lavagem sucessiva das culturas com solução tampão PBS.

Ao atingirem confluência de cerca de 80%, 16 dias após a coleta, as células autólogas foram tripsinizadas, centrifugadas e quantificadas. Após centrifugação elas foram ressuspensas em 0,5mL de DMEM na concentração de $1,8 \times 10^7$ células. A suspensão celular foi acondicionada em criotubo e preservada a 4°C até o momento do uso, que ocorreu em, no máximo, três horas. As células obtidas na passagem 0 foram replaqueadas e as obtidas na passagem 1 foram utilizadas na terapia celular.

Diferenciações em linhagens osteogênicas e adipogênicas foram realizadas para a caracterização das células como MSCs.

Para a realização desse procedimento, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços, em duplicata, utilizando-se um total de 4 poços. Quando atingiram confluência de cerca de 30%, o meio foi trocado para meio de indução de diferenciação.

Para diferenciação osteogênica, os reagentes β -glicerolfosfato, SFB, ácido ascórbico e dexametasona foram adicionado ao D-MEM. Enquanto que dexametasona, insulina e indometacina foram os reagentes acrescidos ao mesmo meio para a realização da diferenciação adipogênica.

Os meios de indução de diferenciação foram trocados a cada 4 dias por 3 semanas, quando as células foram fixadas e coradas. Para evidenciar as diferenciações osteogênica e adipogênica foi utilizado corante Vermelho de Alizarina e Oil red, respectivamente. A primeira substância cora a matriz extracelular rica em cálcio e a segunda cora de marrom-alaranjado as gotículas de gordura.

Com o paciente sob efeito de anestesia geral, o membro acometido pela lesão óssea foi preparado para procedimento asséptico. O protocolo anestésico foi o mesmo utilizado para a coleta do aspirado de medula óssea. Após o preparo do campo cirúrgico, foi inserida uma agulha hipodérmica (18x24) entre os fragmentos da fratura. Antes da injeção, a suspensão de

células foi homogenizada através de agitação manual, o conteúdo do tubo foi transferido para uma seringa de 5mL e injetado na fibrose contida no espaço interfragmentar da fratura, em diversos ângulos para tentar preencher todo o perímetro do defeito ósseo. O paciente recebeu antiinflamatório (Cetoprofeno 1mg/kg, dia) e antibiótico (Cefaxina 10mg/kg, 12/12horas) durante 5 e 15 dias respectivamente.

O reparo do tecido ósseo foi avaliado antes da aplicação, 30 e 60 dias após a injeção celular.

O exame clínico do membro afetado foi feito no dia da injeção das células-tronco mesenquimais de medula óssea, diariamente durante os cinco primeiros dias após a injeção e 30 e 60 dias após a terapia celular. Foram avaliados parâmetros como dor à palpação, presença de edema da região tratada e grau de atividade e retorno das funções do membro.

Para a avaliação da claudicação, foi utilizado o sistema de HAZEWINDEL E MEUTSTEGE (1990) onde: ausência de claudicação = zero; locomoção discretamente alterada = 1; locomoção alterada, mas ainda mantendo apoio no membro = 2; claudicação com apoio intermitente do membro = 3; ausência de apoio no membro = 4.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, diversos procedimentos foram desenvolvidos para tratar não-união de fraturas. Esses procedimentos incluem técnicas invasivas, como fixação interna com enxertia de osso ou de material sintético e técnicas minimamente invasivas, como injeção percutânea de fatores de crescimento derivados de plaquetas (MARICONDA et al., 2008) ou de medula óssea total (GARG et al., 1993), ultrassom (KRISTIANSEN et al., 1997) e pulso eletromagnético (HERNIGOU et al., 2005). A opção por utilizar neste caso clínico a injeção percutânea de células-tronco mesenquimais, isoladas de aspirados de medula óssea autóloga e expandidas *in vitro*, deve-se ao fato de ser uma alternativa com elevado potencial osteogênico e, ao mesmo tempo, minimamente invasiva.

O cão, apresentando não-união óssea, foi tratado com células-tronco mesenquimais autólogas de medula óssea expandidas *in vitro*. O paciente apresentava maturidade esquelética, sendo classificado como adulto jovem, com idade superior a um ano. Os relatos de não-união, se excluídas causas metabólicas ou nutricionais, ocorrem preferencialmente em animais adultos (ATILOLA e SUMNER, 1984; KUMAR et al., 2007).

Os ossos acometidos pela não-união e reabsorção óssea foram rádio e ulna e a lesão apresentava evolução superior a seis meses. O local da lesão relatado nesse paciente concorda com estudo realizado por ATILOLA e SUMNER (1984) que observaram 2.825 cães com fraturas e uma incidência de 3,4% de não-união. Os ossos mais acometidos foram o rádio e ulna (40,6%), seguidos pelo fêmur (38,5%), úmero (12,5%) e tibia (4,2%).

Além da localização anatômica, o tipo de estabilização influencia no estabelecimento da não-união, cuja base do tratamento é a fixação dos fragmentos ósseos, com o objetivo de reduzir a mobilidade no foco de fratura (RODRIGUEZ-MERCHAN e FORRIOL, 2004). Neste caso, o paciente apresentava mobilidade no foco de fratura devido à falência das fixações realizadas anteriormente, porém antes de ser submetido à injeção da suspensão celular foi submetido a novo procedimento cirúrgico e a instabilidade no local foi retirada.

Em humanos e em outras espécies animais, incluindo cães, aspirados de medula óssea são obtidos classicamente da crista ilíaca. Neste caso, entretanto, foi seguido o protocolo desenvolvido por MANKIANI et al. (2006) e MARTIN et al. (2002), utilizando as metáfises proximais do úmero como fonte de obtenção dos aspirados de medula óssea. A técnica preconizada por estes dois grupos foi de simples execução pela facilidade em reposicionar a agulha em toda a extensão do osso metafisário.

Nenhuma complicação anestésica ou clínica foi observada durante ou após a coleta de medula óssea, com recuperação satisfatória do animal no pós-operatório imediato. A sutura no local da punção foi removida dez dias após o procedimento e o cão não apresentou infecção ou dor local. Ele manteve-se ativo e sem limitações aparentes das atividades habituais.

A quantificação das células foi feita em câmara de Neubauer pelo método de lise de hemácias através da adição de ácido acético 2% e evidenciou para aplicação $1,8 \times 10^7$ células (primeira passagem).

A extensa área disponível para punção aliada a possibilidade de sucessivas alterações na angulação da agulha permitiu reduzir consideravelmente a diluição do aspirado com sangue periférico.

A alta concentração celular obtida nas amostras de medula óssea total (de até 10^7 células nucleadas) confirma a qualidade do aspirado sob o ponto de vista celular.

A expansão celular nesse caso clínico foi feita a partir do plaqueamento de 10^7 células por 25cm^2 . Essa alta densidade celular inicial, possibilitou que as culturas alcançassem rápida

confluência em relação aos achados descritos na literatura (DIGIRALAMO et al., 1999). Uma das justificativas para se utilizar este número elevado de células no plaqueamento inicial foi baseada nos resultados de DIGIRALAMO et al. (1999). Com maior densidade de plaqueamento inicial, as células passam por menos ciclos de divisão celular até atingirem confluência, preservando seu potencial expansivo. Além disso, SEKIYA et al. (2002) demonstraram que a velocidade de expansão e a capacidade multipotencial são inversamente proporcionais à densidade celular e ao tempo de incubação por passagem, respectivamente. Dessa forma, quanto maior a densidade celular, menor será a quantidade de divisões celulares de cada progenitor, e quanto menor o tempo de incubação para atingir a confluência a cada passagem, maior será a capacidade multipotencial das células obtidas. Tomando por base estes relatos e por considerar que a obtenção de um produto celular final com alto potencial de ação biológica no microambiente ósseo, poderia ser um diferencial na resposta ao tratamento, optou-se pelo isolamento inicial de osteoprogenitores a partir de uma suspensão com alta densidade celular.

MUSCHELER et al. (2001) mostraram em humanos, que a medula óssea normal possui cerca de 32 milhões/mL de células nucleadas e apenas uma dentre 18.000 células nucleadas tem características fenotípicas de célula-tronco mesenquimal. Esta quantidade pode ser facilmente ampliada através da expansão *in vitro*. Nesse caso clínico foram injetadas na lesão 18 milhões de células-tronco mesenquimais ($1,8 \times 10^7$) em um volume de 0,5mL. Considera-se como uma vantagem adicional desse protocolo a possibilidade de obter este elevado número de células a partir de um volume inicial de medula óssea relativamente pequeno (7mL). A utilização de concentrado de células mononucleares, com o mesmo objetivo terapêutico em humanos, requer a aspiração de volumes consideravelmente maiores (300mL) para a obtenção de um número mínimo de osteoprogenitores com potencial suficiente para estimular resposta osteogênica (HERNIGOU et al., 2005).

HERNIGOU et al. (2005) mostraram que em mulheres o número de CFU-Fs declina com a idade. CAPLAN (1994) e GALOTTO et al. (1997) demonstraram que a quantidade de progenitores mesenquimais declina com a idade. Em recém natos existe 1 CFU-F para cada 10.000 células mononucleadas, proporção esta que em indivíduos com mais de 80 anos diminui para um progenitor para cada 2.000.000 células nucleadas. Hernigou e colaboradores, observaram em seu estudo com 60 pacientes humanos, portadores de não-união, que a média de CFU-F por milhão de células nucleadas era de 33.

Até o presente momento, o tratamento de escolha para não-união de fraturas em cães é baseado na remoção do tecido fibroso, estabilização mecânica e adição de um componente osteogênico, o que acarreta em grande morbidade para o paciente (JOHNSON, 1987). No protocolo descrito nesse caso clínico, o tecido fibroso foi removido e realizada nova estabilização mecânica, além da adição das células-tronco mesenquimais.

Embora a sua ocorrência não tenha sido descrita em humanos, HERNIGOU et al. (2005) mencionam que uma das preocupações com a aplicação de concentrado de medula óssea por via percutânea em focos de não-união é o potencial risco de embolia. Esta complicação pode ser evitada ou eliminada, através da filtração tanto da medula óssea total como do concentrado de células mononucleares antes da sua injeção. No protocolo utilizado nesse caso, o risco de embolia gordurosa ou de medula óssea pode ser praticamente descartado uma vez que utilizou-se apenas células-tronco mesenquimais expandidas *in vitro* ressuspendidas em um pequeno volume de meio líquido.

A ausência de resposta clínica ao tratamento com a injeção da suspensão celular pode ser explicada por algumas particularidades da lesão ou da biologia do paciente. As sucessivas cirurgias podem ter acarretado redução da vascularização local pelo processo de reparo e, conseqüentemente, comprometimento da sobrevivência celular.

ZAMPROGNO (2007) realizou experimento semelhante ao relato de caso descrito. Com a aplicação de células-tronco esqueléticas em não-união de fraturas de seis cães, observou consolidação em todos os pacientes.

GRANERO-MOLTÓ et al., (2009) relata que MSCs injetadas sistemicamente, pela veia da cauda, em camundongos com fraturas recentes de tíbia, são localizadas nos pulmões após o primeiro dia de injeção e se deslocam para o local de fratura após o terceiro dia, local onde há o aumento progressivo do número de células até o sétimo dia após a injeção. Talvez o fato de o paciente descrito nesse caso clínico já ter um processo com evolução superior a 6 meses, demonstre a necessidade de mais aplicações da suspensão celular, após 7 e 14 dias, em casos crônicos, apesar de a via de aplicação ainda ser outro fator a ser explorado. Ainda segundo o mesmo autor o transplante de MSCs melhora o processo de consolidação de fraturas, expressando BMP-2 e modulando o prejuízo da resposta inflamatória.

Até o presente momento, o uso de células-tronco mesenquimais provenientes de medula óssea, expandidas *in vitro* e aplicadas em foco de não-união de fraturas, ainda é pouco

realizado. Essa técnica permite que somente células progenitoras, em altas concentrações, sejam injetadas, em pequenos volumes, no foco da doença óssea.

4 CONCLUSÕES

As terapias com células-tronco estão em fase experimental, mas têm sido representadas na mídia como a panacéia que propiciaria a cura de todas as doenças.

Estudos recentes, publicados em revistas com boa qualificação pela Capes, demonstram o quanto promissora se mostra essa nova área de terapia celular. Apesar de, no caso clínico relatado em questão, não ter ocorrido a consolidação óssea do membro afetado, o alto potencial terapêutico osteoindutor e anti-inflamatório tem sido constatado na fase experimental de pesquisas com células-tronco.

Entretanto o único tratamento comprovado que utiliza terapia celular é o transplante de medula óssea para doenças hematológicas. Portanto, é necessária maior atenção com a aprovação dos protocolos utilizando células-tronco em projetos de pesquisa no país. Deve-se buscar os fundamentos das argumentações e a relação com a organização do campo científico a fim de que sejam realizadas pesquisas sérias e não apenas tentativas de sucesso, independente do quadro clínico do paciente. O fato de, na clínica médica, não estarmos trabalhando com animais isogênicos, aumenta a probabilidade do desvio celular para qualquer processo inflamatório existente no corpo do paciente, devido ao tropismo inflamatório que as MSCs possuem. Nesse contexto, exames laboratoriais prévios, são fundamentais no descarte de doenças concomitantes.

Além disso, o fato de não haver um protocolo estabelecido para a realização do cultivo celular, faz com que cada laboratório atue com suas particularidades e isso impede uma padronização da técnica a ser aplicada, aumenta os riscos para o paciente e retarda o processo de análise de resultados englobando vários grupos de pesquisa e não apenas um.

O próximo passo de pesquisas realizadas em humanos, são estudos randomizados para se averiguar o real potencial dessas terapias em casos clínicos, já que em muitas situações sua benéfica comprovação terapêutica já foi testada experimentalmente.

Seria interessante começar a ter esse tipo de mentalidade, promovendo estudos mais sérios e padronizados sobre terapia celular também em medicina veterinária, não somente visando modelos experimentais para a solução de enfermidades humanas, mas também,

buscando a solução de problemas para pacientes veterinários, antes da desistência de uma resolução por não haver outro tipo de tratamento disponível.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA H, CHABOISSIER MC, MARTIN JF, SCHEDL A, DE CROMBRUGGHE B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. **Genes Dev.** 16: 2813–2828, 2002.

APLEY, A. GRAHAM, SOLOMON, LOUIS. Ortopedia e Fraturas em Medicina e Reabilitação. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996. Disponível em <http://brazilianphysiotherapist.blogspot.com/>. Acesso em: 3 de dez. 2011.

ARINZEH, T.L.; PETER, S.J.; ARCHAMBAULT, M.P.; VAN DEN BOS, C.; GORDON, S.; KRAUS, K.; SMITH, A.; KADIYALA, S.; Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Regenerate Bone in a Critical-Sized Canine Segmental Defect. **The Journal of Bone & Joint Surgery.** v.85-A, n.10, p. 1927-1935. October, 2003.

ASHTON BA, ALLEN TD, HOWLETT CR, EAGLESOM CC, HATTORI A, OWEN M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. **Clin. Orthop.** 151: 294–307, 1980.

ASPENBERG P, WITTBGER J, THORNGREN KG. Bone matrix and marrow versus cancellous bone in rabbit radial defects. **Arch Orthop Trauma Surg.** 106(6):335-40, 1987.

ATILOLA MAO, SUMNER SG. Nonunion fractures in dogs. **J Vet Orthop** 3:21-26, 1984.

AUDIGE L, GRIFFIN D, BHANDARI M, KELLAM J, RUEDI TP. Path analysis of factors for delayed healing and union in 416 operatively treated tibial shaft fractures. **Clin Orthop Relat Res** 438: 221-232, 2005.

AWAD HA, BUTLER DL, BOIVIN GP, SMITH FN, MALAVIYA P, HUIBREGTSE B, CAPLAN AI. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. **Tissue Eng.** 5(3): 267-77, 1999.

BIANCO P, KUZNETSOV SA, RIMINUCCI M, ROBEY PG. Postnatal skeletal stem cells. **Methods of Enzymology** 419: 117-148, 2006.

BIANCO P, ROBEY PG. Stem cells in tissue engineering. **Nature** 414: 118–121, 2001.

BIANCO P, ROBEY PG. Skeletal stem cells. In: Lanza RP (ed.): Handbook of Adult and Fetal Stem Cells. Academic Press, San Diego, CA, 2004, pp. 415–424.

BLAIR HC. How the osteoclast degrades bone. **BioEssays** 20: 837-846, 1998.

BOYAN BD, CAPLAN AI, HECKMAN JD, LENNON DP, EHLER W, SCHWARTZ Z. Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions. **J Orthop Res** 17: 246-255, 1999.

BRAWLEY SC, SIMPSON RB. Results of an alternative autogenous iliac crest bone graft harvest method. **Orthopedics**, 29: 342-346, 2006.

CANCEDDA R, DOZIN B, GIANNONI P, QUARTO R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biol.** 22(1): 81-91, 2003.

CAPLAN AI. The mesengenic process. **Clin Plast Surg** 21:429-35, 1994.

COLNOT C, HUANG S, HELMS J. Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. **Biochem Biophys Res Commun.** 24; 350(3): 557-61, 2006.

CONNOLLY, J.F., GUSE, R., TIEDEMAN, J., DEHNE, R. Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report. **Journal of Orthopaedic Trauma** 3: 276-282, 1989.

CASTRO, M. L.; Biologia. Ed. Belo Horizonte: Educacional, 2009. Disponível em: <<http://marciolcastro.blogspot.com/2009/02/tecido-osseo.html>>. Acesso em: 3 de dez. 2011.

DIGIROLAMO CM, STOKES D, COLTER D, PHINNEY DG, CLASS R, PROCKOP DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **British Journal of Hematology** 107: 275-281, 1999.

DOREA, HC, MCLAUGHLIN RM, CANTWELL HD, READ R., ARMBRUST L, POOL R, ROUSH JK, BOYLE C. Evaluation of healing in feline femoral defects filled with cancellous autograft, cancellous allograft and bioglass. **Veterinary Comparative Orthopaedic Traumatology** 18(3): 157-68, 2005.

DUCY P, ZHANG R, GEOFFROY V, RIDALL A, KARSENTY G. *Osf2 Cbfa-1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell** 89: 747-754, 1997.

FRIEDENSTEIN AJ. Precursor cells of mechanocytes. **Int. Rev. Cytol.** 47: 327-359, 1976.

FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA KV, KUROLESOVA AI, FROLOVA GP. Heterotropic Transplant os Bone Marrow Cells. *Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematogenic Tissues.* **Transplantation** 6:230-247, 1968.

FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN R.K, LALYKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell tissue Knetics** 3: 393-403, 1970.

FRIEDENSTEIN AJ, PIATETZKY-SHAPIRO II, PETRAKOVA KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 16: 381-390, 1966.

GALOTTO M, BERISSO G, DELFINO L, PODESTA M, OTTAGGIO L, DALLORSO S, DUFOUR C, FERRARA GB, ABBONDANDOLO A, DINI G, BACIGALUPO A,

- CANCEDDA R, QUARTO R. . Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. **Exp Hematol** 27: 1460–1466, 1997.
- GARG NK, GAUR S, SHARMA S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 29 cases of ununited fracture. **Acta Orthop Scand**. 64: 671–672, 1993.
- GRANERO-MOLTÓ, F.; WEIS, J. A.; MIGA, M. I.; LANDIS, B.; MYERS, T. J.; O'REAR, L.; LONGOBARDI, L.; JANSEN, E. D.; MORTLOCK, D. P.; SPAGNOLI, A. Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing. **Stem Cells**. 27: 1887 – 1898, 2009.
- GRIFFON DJ. Fracture Healing. In: Jonhson AL, Houlton JEF, Vannini R. (eds): *AO Principles of Fracture Management in the Dog and the Cat*, ed. AO Publishing, Switzerland, 2005, pp 73-98.
- GRIFFON D, MCLAUGHLIN RM, HOSKINSON JJ. Effects of a boneinducing agent derived from a cultured human osteosarcoma cell line after orthotopic and heterotopic implantation in the dog. **Vet Comp Ortho Trauma** 9: 22-28, 1996.
- GIMBLE JM, ROBINSON CE, WU X, KELLY KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. **Bone** 19: 421–428, 1996.
- GOEL A, SANGWAN SS, SIWACH RC, ALI AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. **Injury** 36, 203-206, 2005.
- GOULET JA, SENUNAS LE, De SILVA GL, GREENFIELD ML. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. **Clin Orthop Relat Res** 339: 76-81, 1997.
- HARRIS AM, PATTERSON BM, SONTICH JK, VALLIER HA. Results and outcomes after operative treatment of high-energy tibial plafond fractures. **Foot Ankle Int**. 27(4): 256-65, 2006.
- HAZEWINKEL HAW, MEUTSTEGE FJ. Locomotor system. In: Rijnberk A and de Vries HW. (eds). *Medical history and physical examination in companion animals*. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, 1990, pp. 175–201.
- HEPPENSTALL RB. Fracture Healing. In: Heppenstall RB (ed). *Fracture Treatment and healing*. WB Saunders, Philadelphia, 1980, pp 35-64.
- HERNIGOU P, BEAUJEAN F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. **Clin Orthop Relat Res**. 405: 14-23, 2002.
- HERNIGOU PH, POIGNARD A, BEAUJEAN F, ROUARD H. Percutaneous autologous bone marrow grafting for nonunions – Influence of number and concentration of progenitor cells. **The Journal of Bone and Joint Surgery** 87: 1430-1437, 2005.
- HOLMBECK K, BIANCO P, PIDOUX I, INOUE S, BILLINGHURST RC, WU W, CHRYSOVERGIS K, YAMADA S, BIRKEDAL-HANSEN H, POOLE AR. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. **Journal of Cell Science** 118(1): 147-156, 2005.

- JEAN JL, WANG SJ, AU MK. Treatment of a large segmental bone defect with allograft and autogenous bone marrow graft. **J Formos Med Assoc.** 96(7): 553-7, 1997.
- JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND T, BLACKSTAD M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature.** 4;418(6893): 41-9, 2002.
- JOHNSON KD. Management of malunion and nonunion of the tibia. **Orthop Clin North Am** 18: 157-171, 1987.
- JOHNSON AL, HULSE DA. Fracture fixation systems in Small Animal Surgery, 2nd edition Mosby Inc, 2002, pp 893-899.
- JOHNSON EE, URIST MR, FINERMAN GA. Distal metaphyseal tibial nonunion. Deformity and bone loss treated by open reduction, internal fixation, and human bone morphogenetic protein (hBMP). **Clin Orthop Rel Res** 250: 234-240, 1990.
- KADIYALA S, YOUNG RG, THIEDE MA, BRUDER SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplant.** 6(2): 125-34, 1997.
- KERWIN SC, LEWIS DD, ELKINS AD, OLIVER J, PECHMAN R, MCCARTHY RJ, HOSGOOD G. Deep-Frozen allogenic cancellous bone grafts in 10 dogs: a case series. **Veterinary Surgery** 25: 18-28, 1996.
- KETENJIAN AY, ARSENIS C. Morphological and biomechanical studies during differentiation and calcification and calcification of fracture callus cartilage. **Clin Ortho.** (107): 266-273, 1975.
- KIERSZENBAUM AL. Connective Tissue. In: Kierszenbaum, AL. (ed): Histology and Cell Biology. Ed, Mosby, Missouri, 2002, pp 118-145.
- KLEIN-NULENT J, NIJWEIDE PJ. Osteocyte and bone structure. **Curr Osteoporosis Rep.** 1: 5-10, 2003.
- KNOTHE-TATE M. Interstitial fluid flow. In: Cowin SC. Bone Mechanics Handbook. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, 2001, pp22-29.
- KOMORI T, YAGI H, NOMURA S, YAMAGUCHI A, SASAKI K, DEGUCHI K, SHIMIZU Y, BRONSON RT, GAO YH, INADA M, SATO M, OKAMOTO R, KITAMURA Y, YOSHIKI S, KISHIMOTO T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell** 89: 755-764, 1997.
- KREBSBACH PH, KUZNETSOV SA, SATOMURA K, EMMONS RV, ROWE DW, ROBEY PG. Bone formation in vivo: Comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. **Transplantation** 63: 1059-1069, 1997.

KRISTIANSEN TK, RYABY JP, MCCABE J, ET AL. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low intensity ultrasound. **J Bone Joint Surg.** 79A: 961–973, 1997.

KUMAR K, MOGHA IV, AITHAL HP, KINJAVDEKAR P; AMARPAL, SINGH GR, PAWDE AM, KUSHWAHA RB. Occurrence and pattern of long bone fractures in growing dogs with normal and osteopenic bones. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.** 54(9): 484–90, 2007.

KUZNETSOV SA, MANKANI MH, GRONTHOS S, SATOMURA K, BIANCO P, ROBEY PG. Circulating skeletal stem cells. **J. Cell Biol.** 153: 1133–1140, 2001.

KUZNETSOV SA, RIMINUCCI M, ZIRAN N, TSUTSUI TW, CORSI A, CALVI L, KRONENBERG HM, SCHIPANI E, ROBEY PG, BIANCO P. The interplay of osteogenesis and hematopoiesis: expression of a constitutively active PTH/PTHrP receptor in osteogenic cells perturbs the establishment of hematopoiesis in bone and of skeletal stem cells in the bone marrow. **The Journal of Cell Biology** 167(6): 1113–1122, 2004.

LA VELLE DG. Delayed union and nonunion of fractures. In: Canale TS, editor. *Campbell's operative orthopaedics*. 9th ed. St. Louis: Mosby;1998. p 2579-2629.

LERNER A, FODOR L, SOUDRY M. Is staged external fixation a valuable strategy for war injuries to the limbs? **Clin Orthop Relat Res.** 448: 217-24, 2006.

LIEBERMAN JR, DALUISKI A, EINHORN TA. The role of growth factors in the repair of bone. **J Bone Joint Surg [Am]** 84(6): 1032-1044, 2002.

MANN FA, PAYNE JT. Bone healing. **Semin Vet Med Surg (Small Anim).** 4(4): 312-321, 1989.

MANKIANI MH, KUZNETSOV SA, SHANNON B, NALLA RK, RITCHIE RO, QIN Y, ROBEY PG. Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells. **Am J Pathol.** 168(2): 542-50, 2006.

MARICONDA M, COZZOLINO F, COZZOLINO A, D'AGOSTINO E, BOVE A, MILANO C. Platelet Gel Supplementation in Long Bone Nonunions Treated by External Fixation. **J Orthop Trauma** 22: 342–345, 2008.

MARTIN DR, COX NR, HATHCOCK TL, NIEMEYER GP, BAKER HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology** 30: 879–886, 2002.

MCLAUGHLIN RM. The evolution of the understanding of bone healing. **Vet Comp Orthop Traumatol** 4:16-20, 1991.

MCLAUGHLIN RM, ROUSH JK. Autogenous cancellous and corticocancellous bone grafting. **Vet Medicine** 93(12): 1071-1074, 1998.

MILLIS DL. Bone and non-bone derived growth factors and effects on bone healing. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 29(5): 1221-1246, 1999.

MILLIS DL, JACKSON AM. Delayed Unions, Nonunions, and Malunions. In: D. Slatter (ed): Textbook of Small Animal Surgery (3rd edition). Saunders, Philadelphia, 2003, pp 1849-1861.

MOUSATSOS IK, TURGEMAN G, ZHOU S, KURKALLI BG, PELLED G, TZUR L, KELLEY P, STUMM N, MI S, MULLER R, ZILBERMAN Y, GAZIT D. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. **Mol Ther.** 3(4): 449-61, 2001.

MUSCHLER GF, NITTO H, BOEHM CA, EASLEY KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. **J Orthop Res** 19:117-125, 2001.

NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, ZHANG Z, DENG JM, BEHRINGER RR, DE CROMBRUGGHE B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell** 108: 17-29, 2002.

NUNAMAKER DM, RHINELANDER FW, HEPPENSTALL. Delayed Union, Nonunion and Malunion. In: CD. Newton, DM. Nunamaker (Eds): Textbook of Small Animal Orthopaedics Ithaca, International Veterinary Information Service, 1985.

OONISHI H, KUSHITANI S, YASUKAWA E, IWAKI H, HENCH LL, WILSON J, TSUJI E, SUGIHARA T. Particulate Bioglass compared with Hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 334: 316-325, 1997.

OWEN M, FRIEDENSTEIN AJ. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Found. Symp.** 136: 42-60, 1988.

PIERMATEI DL, FLO GL, DECAMP CE. Delayed Union and Nonunion. In: Piermtei DL, Flo GL. DeCamp CE. (eds): Handbook of Small Animal Orthopaedics and Fracture Repair, 4rd ed. Saunders, Philadelphia, 2006, pp 168-176.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science** 284(5411): 143-147, 1999.

PONOMAREVA LV, WANG W, AND KOSZEWSKI NJ. Mim-1, an osteoclast secreted chemokine, stimulates differentiation, matrix mineralization and increased Vitamin D receptor binding at the VDRE of osteoblastic precursor cells. **J Bone Miner Res** 17: S155, 2002.

QUINTAVALLA J, UZIEL-FUSI S, YIN J, BOEHNLEIN E, PASTOR G, BLANCUZZI V, SINGH HN, KRAUS KH, O'BYRNE E, PELLAS TC. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. **Biomaterials.** 23(1): 109-19, 2002.

RAHN BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Sumner-Smith G (ed). Bone in Clinical Orthopaedics. WB Saunders, Philadelphia, 2002, pp. 335-386.

REMEDIOS A. Bone and bone healing. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** 29(5):1029-1044, 1999.

RINGUETTE M, DAMJANOVSKI S, WHEELER D. Expression of SPARC/osteonectin in tissues of bony and cartilaginous vertebrates. **Biochem Cell Biol.** 69(4): 245-50, 1991.

ROBEY PG. Stem cells near the century mark. **J. Clin. Invest.**, 105(11): 1489-1491, 2000.

RODRIGUEZ-MERCHAN EC, FORRIOL F. Nonunion: general principles and experimental data. **Clin Orthop Relat Res.** 419: 4-12, 2004.

SACCHETTI B, FUNARI A, MICHIEZI S, DI CESARE S, PIERSANTI S, SAGGIO I, TAGLIAFICO E, FERRARI S, ROBEY PG, RIMINUCCI M, BIANCO P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. **Cell** 131: 324-336, 2007.

SEKYIA I, LARSON BL, SMITH JR, POCHAMPALLY R, CUI JG, PROCKOP DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. **Stem Cells** 20: 530-541, 2002.

SESHI B, KUMAR S, SELLERS D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. **Blood Cells Mol Dis.** 26(3): 234-46, 2000.

SLATER M, PATAVA J, KINGHAM K, MASON RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. **J Orthop Res** 13: 655-663, 1995.

STREET J, WINTER D, WANG JH, WAKAI A, MCGUINNESS A, REDMOND HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? **Clin Orth Rel Res.** (378): 224-237, 2000.

TROEN BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Exp Gerontol** 38: 605-614, 2003.

WANG PS, SOLOMON DH, MOGUN H. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. **JAMA.** 283: 3211-3216, 2000.

WEBER & CECH. **J Bone Joint Surg [Am]** 56: 1223-1227, 1974.

WELCH JA, BOUDRIEAU RJ, DEJARDIN LM, SPODNICK GJ. The intraosseous blood supply of canine radius: Implications for healing of distal fractures in small dogs. **Veterinary Surgery** 26(1): 57-61, 1997.

WHEELER DL, ESCHBACH EJ, HOELLRICH RG, MONTFORT MJ, CHAMBERLAND DL. Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. **Journal of Orthopaedic Research** 18 (1): 140-48, 2000.

WHITEFIELD J. F., ROSEMBERG L. BMUS – The microcrack fixers. In: Growing Bone. Austin, TX, Landes Bioscience Company, 2005, pp 4 – 31.

WILSON J, YU LT, BEALE BS. Bone augmentation using Bioglass particulate in dogs: Pilot study. **Bioceramics** 5: 139-46, 1999.

WOODARD JC, RISER WH. Morphology of fracture nonunion and osteomyelitis. **Vet Clin North Am Small Anim Practice**. 21: 813, 1991.

ZANNETTINO AC, HARRISON K, JOYNER C.J, TRIFFITT JT, SIMMONS PJ. Molecular cloning of the cell surface antigen identified by the osteoprogenitor-specific monoclonal antibody, HOP-26. **J. Cell. Biochem**. 89: 56–66, 2003.

ZIMMERMANN G, MOGHADDAM A, WAGNER C, VOCK B, WENTZENSEN A. Clinical experience with bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) in non unions of long bones. **Unfallchirurg** 109: 528-537, 2006.

Remodelação óssea, Só Biologia; Disponível em: <<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/sustentacao2.php>>. Acesso em: 3 de dez. 2011.

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE COLETA

Eu, _____, proprietário (a) do paciente _____ da espécie _____, raça _____, do sexo _____, pelagem _____ autorizo a realização do procedimento de coleta de biópsia para obtenção de células para Terapia Celular autóloga do paciente acima caracterizado.

A biópsia será realizada através da punção de medula óssea, que é realizada sob anestesia. Este procedimento tem como riscos associados a dor no pós-procedimento, processos inflamatórios e infecciosos.

A realização deste procedimento pode não garantir a obtenção da quantidade de células adequadas à realização da Terapia Celular.

Autorizo a realização da biópsia de medula óssea a ser realizada pelo Médico Veterinário _____, CRMV-RS _____.

Porto Alegre, _____ de _____ de 200__.

Assinatura do Proprietário

Termo obtido por: _____

Nome e assinatura

ANEXO B

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE PROCEDIMENTO

Eu, _____,
 proprietário do paciente _____ da espécie _____, raça _____, do
 sexo _____, pelagem _____ autorizo a realização do procedimento
 Terapia Celular autóloga no paciente acima caracterizado.

Este procedimento é ainda considerado como sendo experimental, que significa que
 ainda não se dispõe de conhecimentos necessários para ser considerado um procedimento
 assistencial. Desta forma, existem riscos ainda não caracterizados para este procedimento. Os
 riscos conhecidos são: ineficiência da técnica, reações inflamatórias e infecções oportunistas.

Autorizo a realização da Terapia Celular autóloga a ser realizada pelo Médico
 Veterinário _____, CRMV-RS _____.

Porto Alegre, _____ de _____ de 200__.

 Assinatura do Proprietário

Termo obtido por: _____

Nome e assinatura