



UNIVERSIDADE PARANAENSE

**CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DA MEDULA
ÓSSEA COMO ADJUVANTE NO REPARO DE TENDÃO
CALCANEAR COMUM EM COELHOS, ASSOCIADAS À
XENOIMPLANTE DE ARTÉRIA CARÓTIDA DE CÃES
PRESERVADA EM GLICERINA.**

ROBSON JOSÉ GOMES DE MELO

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UMUARAMA, 2010.



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
Mestrado em Ciência Animal

**CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DA MEDULA
ÓSSEA COMO ADJUVANTE NO REPARO DE TENDÃO
CALCANEAR COMUM EM COELHOS, ASSOCIADAS À
XENOIMPLANTE DE ARTÉRIA CARÓTIDA DE CÃES
PRESERVADA EM GLICERINA.**

ROBSON JOSÉ GOMES DE MELO

ORIENTADOR: PROF. DR. GENTIL FERREIRA GONÇALVES.

Dissertação apresentada à Universidade Paranaense como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

UMUARAMA – PR

FEVEREIRO DE 2010

FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIPAR
PARA A DISSERTAÇÃO (A ser impressa no verso da folha de rosto)

S232n Melo, Robson José Gomes de

Células Mononucleares Autólogas da Medula Óssea como Adjuvante no Reparo de
Tendão Calcâneo Comum em Coelhos Associadas a Xenoinplantes de Arteria
Carótida de Cães Preservada em Glicerina / *Robson José Gomes de Melo.* –

Umuarama :

Universidade Paranaense – UNIPAR, 2010.

28f.

Orientador: Prof. Dr. Gentil Ferreira Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Paranaense -UNIPAR.

1. Coelhos. 2. Tendão. 3. Célula Tronco. 4. Enxertos. 5.Arteria Carótida.

I. Universidade Paranaense – UNIPAR. II. Título.

Elaborado pela Bibliotecária

Inês Gemeli

CRB 9/966

UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Mestrado em Ciência Animal

ROBSON JOSÉ GOMES DE MELO

**CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DA MEDULA ÓSSEA COMO ADJUVANTE
NO REPARO DE TENDÃO CALCANEAR COMUM EM COELHOS, ASSOCIADAS À
XENOIMPLANTE DE ARTÉRIA CARÓTIDA DE CÃES PRESERVADA EM GLICERINA.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. GENTIL FERREIRA GONÇALVES.

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Gentil Ferreira Gonçalves – Presidente

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo

Prof. Dr. Luiz Rômulo Alberton

Umuarama, 13 de Março de 2010.

AGRADECIMENTOS

Chegou à hora de agradecer àquelas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Pessoas que me incentivaram de diferentes maneiras. A todos vocês o meu sincero “MUITO OBRIGADO!”.

A DEUS POR ESTAR SEMPRE PRESENTE EM MINHA VIDA.

Aos professores da UNIPAR, Professor Eduardo e o Professor Aristeu pelo conhecimento e ajuda.

Ao orientador Gentil Ferreira Gonçalves, pelo apoio, conhecimento passado e, principalmente, pela amizade durante esses meses.

A co-orientadora Ana Paula Inoe Tomazini, pelo incentivo, conhecimento e exemplo.

Ao Professores Marshal Costa Leme e o Professor Celso Gontijo Cunha amigos, que sempre me receberam de braços abertos. Em especial ao Hélio, pela amizade e ajuda, principalmente, quando cheguei aqui. Estou muito feliz de trabalhar com vocês!

A minha mãe pelo amor, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao meu pai Roberto (in memorian) pois mesmo com sua breve passagem em minha vida, ensinou-me a ser um homem digno.

Aos meus irmãos Roberto, Rogério e Suzana, pelo carinho, amor, preocupação e incentivo, sem os quais eu nunca teria chegado até aqui.

Impossível expressar em palavras meu amor e gratidão por vocês!

Cada um de vocês contribuiu de uma forma especial para esse trabalho.

“Contrate e promova primeiro com base na integridade; segundo, na motivação; terceiro, na capacidade; quarto, na compreensão; quinto, no conhecimento; e, por último, como fator menos importante, na experiência. Sem integridade, a motivação é perigosa; sem motivação, a capacidade é impotente; sem capacidade, a compreensão é limitada; sem compreensão, o conhecimento é insignificante; sem conhecimento, a experiência é cega. Uma pessoa com todas as outras qualidades, adquire facilmente e coloca rapidamente em prática a experiência.” (Dee Hock)



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
Mestrado em Ciência Animal

MELO, ROBSON JOSÉ GOMES DE. CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DA MEDULA ÓSSEA COMO ADJUVANTE NO REPARO DE TENDÃO CALCANEAR COMUM EM COELHOS ASSOCIADAS A XENOIMPLANTE DE ARTÉRIA CARÓTIDA DE CÃES PRESERVADA EM GLICERINA. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL. UNIVERSIDADE PARANAENSE, 2010, 28p.

RESUMO

O calcâneo é um dos tendões que sofrem traumatismos com maior frequência. Independente da causa, se a lesão não for tratada, pode evoluir comprometendo permanentemente sua função. Quando houver significativa perda de segmento, o tratamento pode tornar-se um dilema para o cirurgião. Propõem-se uma nova estratégia na tentativa de reparar ou diminuir os danos causados ao tendão, trata-se do transplante de células de medula óssea, obtidas do próprio indivíduo a ser tratado. Com objetivo de se verificar o uso de implante conservado em glicerina associado a células tronco utilizou-se 15 coelhos, adultos, hígidos, que foram submetidos à tenectomia do tendão calcanear comum com posterior implante de artéria carótida de cães preservada em glicerina PA 98%. No membro pélvico direito a injeção intra-implantes de células mononucleares hematopoiéticas autólogas (CMAs) e para controle utilizou-se a mesma técnica cirúrgica no membro contralateral sem as células mononucleares hematopoiéticas autólogas. Os animais foram observados diariamente através de avaliação clínica e deambulatória e os enxertos foram analisados histologicamente em intervalos de coleta 15, 30 e 60 dias de PO, através de coloração de fragmentos das amostras por H.E. e AZAN. Os resultados mostraram uma ação regenerativa das CMAs quando colocadas nas lesões do tendão calcanear comum, através de melhor desempenho físico dos membros direitos dos animais quando comparados aos contralaterais, em todos os tempos de observação. Histologicamente os tendões que receberam as CMAs apresentaram

quantitativamente maior número de fibras colágenas, fibroblastos e linfócitos, e maior neovascularização em todos os tempos observados. Dessa forma, a adjuvância das CMAs nos xenoenxertos tendíneos é recomendada como promessa de melhores resultados morfológicos e funcionais.

Palavras-chave: tendão, cirurgia, células tronco adultas.



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
Mestrado em Ciência Animal

MELO, ROBSON JOSÉ GOMES DE. AUTOLOGOUS BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS ASSOCIATED TO THE XENO-IMPLANT OF GLYCERINE-PRESERVED DOG CAROTID ARTERY AS AN ADJUVANT TO THE REPAIR OF CALCANEAL TENDON IN RABBITS. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL. UNIVERSIDADE PARANAENSE, 2010, 28p.

ABSTRACT

The calcaneus is one of the mostly injured tendons. Despite of its cause, if the lesion is not treated, it may evolve permanently compromising its function. Whenever there is significant segment loss, treatment may become a dilemma for the surgeon. A new strategy arose as an attempt to either repair or decrease the damage caused to the tendons.: the transplantation of the individual's own bone marrow. Fifteen, healthy, adult rabbits underwent tendon injury with further implantation of (PA 98%) glycerine-preserved dog carotid artery together with the injection of intra autologous hematopoietic mononuclear cell (HMC) implants into the right limb whereas the same surgical technique without HMC was used on the collateral limb for the controls. Animals were daily observed through deambulatory and clinical evaluation. Grafts were histologically analyzed on days 15, 30, and 60 of the PO by undertaking HE and AZAN staining of sample fragments. Results showed regenerative action of the HMCs when placed onto common calcaneal tendon lesions through the better physical performance of the right limbs of the animals when compared to the collateral throughout all times of observation. Histologically, the tendons receiving HMCs presented quantitative higher number of collagen fibers, fibroblasts and lymphocytes, as well as higher neovascularization at all times of observation. Therefore, the adjuvancy of the HMCs on tendon xenografts is recommended as a promise for better functional and morphological outcomes.

Key words: tendon, surgery, adult stem cells.



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
Mestrado em Ciência Animal

MELO, ROBSON JOSÉ GOMES DE. CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DA MEDULA ÓSSEA COMO ADJUVANTE NO REPARO DE TENDÃO CALCANEAR COMUM EM COELHOS, ASSOCIADAS A XENOIMPLANTES DE ARTÉRIA CARÓTIDA DE CÃES PRESERVADA EM GLICERINA. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL. UNIVERSIDADE PARANAENSE, 2010, 28p.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	21
FIGURA 2	22
FIGURA 3	22
FIGURA 4	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	24
----------------	----

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

Células Mononucleares Autólogas da Medula Óssea como Adjuvante no Reparo de Tendão Calcanear Comum em Coelhos Associadas a Xenoinplantes de Artéria Carótida de Cães Preservada em Glicerina¹

Autologous bone marrow mononuclear cells associated to the xeno-implant of glycerine-preserved dog carotid artery as an adjuvant to the repair of calcaneal tendon in rabbits.

Robson José Gomes de Melo², Gentil Ferreira Gonçalves³, Eduardo José de Almeida Araújo³, Ana Paula Inoe Tomazini⁴, Marshal Costa Leme⁵, Celso Gontijo Cunha⁵, Campo Amor Vieira da Cunha Neto⁶, Felliipe Roncholeta dos Santos⁶ Cláudio Vieira De Araújo⁷,

Resumo

O calcâneo é um dos tendões que sofrem traumatismos com maior frequência. Independente da causa, se a lesão não for tratada, pode evoluir comprometendo permanentemente sua função. Quando houver significativa perda de segmento, o tratamento pode tornar-se um dilema para o cirurgião. Propõe-se uma nova estratégia na tentativa de reparar ou diminuir os danos causados ao tendão de pacientes com lesões crônicas, isto é, o transplante de células de medula óssea, obtidas do próprio indivíduo a ser tratado. Com objetivo de se verificar o uso de implante conservado em glicerina associado a células mononucleares autólogas da medula óssea (CMA) utilizou-se 15 coelhos, adultos, hípidos que foram submetidos à tenectomia e implantes de artéria carótida de cães, preservadas em glicerina, em ambos os membros, sendo que no membro direito recebeu injeção intra-implante de CMA. Os animais foram observados diariamente através de avaliação física e deambulatória, os enxertos foram analisados histologicamente em intervalos de 15, 30 e 60 dias de PO, através de coloração de fragmentos das amostras com H.E e AZAN. Os resultados mostraram uma ação regenerativa das CMAs quando colocadas junto aos enxertos no tendão calcanear comum, através de melhor desempenho físico dos membros pélvicos direitos dos animais quando comparados aos

¹ Projeto Financiado pela Coordenação de Pesquisa e Iniciação Científica (COPIC) da Diretoria Executiva de Gestão da Pesquisa e da Pós-graduação (DEGPP) da Universidade Paranaense (UNIPAR).

² Médico Veterinário. Mestrando do Curso de Mestrado em Ciência Animal. UNIPAR. End. Rua Fortaleza, 4031. Jardim América. Umuarama. PR.87502-300. robson.gm@uol.com.br. Autor para correspondência.

³ Professor Titular do Curso de Mestrado em Ciência Animal. UNIPAR.

⁴ Médica Veterinária, Mestre, Doutora. Professora Adjunta Universidade Federal do Mato Grosso – Campus Sinop.

⁵ Professor do Curso de Medicina Veterinária. UNIPAR

⁶ Acadêmico de Medicina Veterinária, Bolsista do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica. COPIC. DEGPP.

⁷ Professor da Universidade Federal de Mato Grosso. UFMT

contralaterais, em todos os tempos de observação. Histologicamente os tendões que receberam as CMAs apresentaram quantitativamente maior número de fibras colágenas,

fibroblastos e linfócitos, e maior neovascularização em todos os tempos observados. Dessa forma, a adjuvância das CMAs nos xenoenxertos tendíneos é recomendada como promessa de melhores resultados morfológicos e funcionais.

Palavras-chave: tendão, células tronco adultas, cirurgia.

ABSTRACT

The calcaneus is one of the mostly injured tendons. Despite of its cause, if the lesion is not treated, it may evolve permanently compromising its function. Whenever there is significant segment loss, treatment may become a dilemma for the surgeon. A new strategy arose as an attempt to either repair or decrease the damage caused to the tendons: the transplantation of the individual's own bone marrow. Fifteen, healthy, adult rabbits underwent tendon injury with further implantation of (PA 98%) glycerine-preserved dog carotid artery, together with the injection of intra HMC implants into the right limb, whereas the same surgical technique without autologous hematopoietic mononuclear cells was used on the collateral limb for the controls. Animals were daily observed through deambulatory and clinical evaluation. Grafts were histologically analyzed on days 15, 30, and 60 of the PO by undertaking HE and AZAN staining of sample fragments. Results showed regenerative action of the HMCs when placed onto common calcaneal tendon lesions through the better physical performance of the right limbs of the animals when compared to the collateral throughout all times of observation. Histologically, the tendons receiving HMCs presented quantitative higher number of collagen fibers, fibroblasts and lymphocytes, as well as higher neovascularization at all times of observation. Therefore, the adjuvancy of the HMCs on tendon xenografts is recommended as a promise for better functional and morphological outcomes.

Key words: tendon, surgery, adult stem cells.

Introdução

A constante preocupação em tentar minimizar os danos decorrentes das injúrias tendíneas tem levado ao desenvolvimento de inúmeras pesquisas com o intuito de encontrar um material adequado à sua cicatrização, com resistência suficiente, sem alterar seu comprimento e manter a capacidade de deslizamento, principalmente em situações em que há

perda de substância com conseqüente não união das extremidades. A ruptura do tendão calcâneo comum, que figura como uma das mais freqüentes injúrias tendíneas observadas no cão, geralmente, apresenta esse tipo de problema (BUTLER, 1985; KILLINGSWORTH, 1993).

A função primária dos tendões é transmitir a energia mecânica produzida por intermédio da contração muscular ao esqueleto para gerar movimento, uma ação que deve ser acompanhada de mínimo dispêndio de força. Todos os tendões têm as características físicas básicas de alta resistência à tensão, densidade e superfície lisa, entretanto, podem variar em espessura, comprimento e forma (BUTLER, 1985). As características próprias do tendão requerem especial cuidado do cirurgião, pois a reduzida vascularização e predomínio de tenócitos no tendão maduro, requerem proliferação neovascular e fibroblástica, basicamente, dos tecidos adjacentes. Assim, é necessário contrabalancear uma adequada aproximação com os tecidos periféricos, quando da reparação, com a minimização de aderências que podem restringir a função deslizante do tendão (RAISER, 2001).

As células mononucleares autólogas da medula óssea (CMAs) são células indiferenciadas que podem se renovar e reproduzir indefinidamente e, sob certos estímulos, se transformar em células especializadas de diferentes tecidos ou órgãos. Com isso pesquisadores começaram a considerar a possibilidade do seu transplante para recomporem tecidos destruídos por doenças, por traumas ou por terapias agressivas. Já se tem usado CMA em regeneração e recuperação funcional de tecido nervoso periférico em ratos (BRAGA-SILVA et al., 2006), úlcera de córnea experimental em cães (TOGNOLI et al., 2009), tratamento da cardiopatia chagásica crônica em humanos (SANTOS et al., 2004), associadas a enxerto osteocondral alógeno no reparo do sulco troclear de coelhos (SOUZA, 2009), regeneração do conjunto de células produtoras de insulina do pâncreas (VOLTARELLI, 2009). Rossi et al. (2009) relatam em suas pesquisas o uso de CTA no tratamento de cardiopatias relacionadas à isquemia do miocárdio pós-infarto em humanos. Também já está em andamento o primeiro estudo em humanos utilizando células-tronco de medula óssea para o tratamento da epilepsia (CARRION et al., 2009).

Young et al. (1998), utilizando coelhos, provocaram um defeito em tendão calcâneo comum e semearam CMAs, com o auxílio de um enxerto biodegradável de colágeno e malha de vicryl, observando que após 12 semanas houve reparação do tecido tendíneo com formação de fibroblastos, porém com intensa reação inflamatória. Já Awad et al. (1999), utilizando modelo animal similar, investigou o uso de CMAs em tendão patelar e observaram reparação,

obtendo um melhor aspecto histológico (incluindo mais fibroblastos e fibras colágenas maduras) além de propriedades biomecânicas do mesmo.

Solução de glicerina PA 98% é um meio conhecido para a conservação de diferentes tecidos, incluindo duramater (PIGOSSI et al., 1964; 1971; INATOMI et al., 1980); peritônio (DALECK et al., 1988; DALECK et al., 1992; COSTA NETO et al., 1999); pericárdio (ALVARENGA, 1977; RAHAL et al., 1996); centro frênico (PIGATTO et al., 1997; SARTORI FILHO et al., 1997); cartilagem conchal (CONTESINI et al., 1994; PIGATTO et al., 1998); membrana amniótica (OLIVEIRA & ALVARENGA, 1998); cápsula renal (ANDRADE et al., 1998); artéria (RAISER et al., 1978, RAISER et al., 2001; RAISER et al., 2000); bexiga (OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999); e tendão (RAISER, 2000). Entre outras particularidades, a glicerina mantém as características do tecido conservado, possui propriedades desidratantes, anti-sépticas e anti-imunogênicas (PIGOSSI et al., 1971; ALVARENGA, 1977; ALVARENGA, 1992), constitui-se em um método de conservação simples e pouco oneroso.

As lesões tendíneas são uma constante que produzem certo desafio aos cirurgiões, pois sua reparação é sempre problemática e na maioria dos casos frustrante. A existência de tal problema justifica a tentativa em acelerar processos reparadores e regenerativos do tendão calcâneo comum, assim como, buscar alternativas para perdas teciduais através de enxertos para manutenção de sua morfologia e função.

O presente experimento teve como objetivo verificar a eficiência funcional e morfológica do xenoenxerto de artérias carótidas de cães preservadas em glicerina em tendão calcâneo comum de coelhos, associado ou não a células mononucleares autólogas da medula óssea (CMA).

Materiais e Métodos

O estudo conduzido foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA), da Universidade Paranaense, sob o protocolo número 15517/2009.

As artérias carótidas de cães foram obtidas de animais submetidos à eutanásia e encaminhados ao laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da UNIPAR, Campus Umuarama. As artérias foram dissecadas em sua extensão total com auxílio de tesoura e pinça anatômica. Após a sua coleta as artérias passaram por lavagens em água

corrente e na seqüência solução salina isotônica e solução de PVPI a 1%. Feito isso às mesmas foram imersas em glicerina PA 98%, por um período mínimo de 30 dias. Para sua utilização elas foram reidratadas 20 minutos antes do procedimento cirúrgico por imersão em solução de NaCl 0,9% e PVPI 1%.

Foram utilizados 15 coelhos, Nova Zelândia, com idade variando de 10 a 16 meses, machos, pesando em média 2,8 Kg, mantidos no Hospital Veterinário da Universidade Paranaense, Campus Umuarama. Todos os animais foram adquiridos do biotério da Universidade Estadual de Maringá, permanecendo durante o período do experimento em recintos individuais, recebendo água e ração *ad libitum*, e submetidos a temperatura ambiente.

Para serem incorporados ao experimento, os coelhos foram examinados fisicamente, através de aferição de temperatura retal, por inserção longitudinal de termômetro digital, avaliação cardíaca e pulmonar através de ausculta com estetoscópio cardiológico, palpação abdominal e avaliação do tempo de preenchimento capilar. Somente os animais considerados sadios foram inclusos no experimento.

Em todos os animais foi realizada a tenectomia do tendão calcâneo comum no membro pélvico direito (MPD) e esquerdo (MPE). No MPD foi utilizado o implante conservado em glicerina associado a CMAs, e no MPE o implante conservado em glicerina sem tal associação, para servir como controle para o membro contralateral.

A colheita da medula óssea foi realizada sob anestesia dissociativa, utilizando-se cloridrato de xilazina⁸ associado à cloridrato de cetamina⁹ e cloridrato de fentanila,¹⁰ nas doses de 2mg/kg, 20mg/kg e 0,005mg/kg respectivamente, administrados por via intramuscular. Após tricotomia e anti-sepsia da região do trocanter maior do osso fêmur, a medula foi aspirada utilizando-se uma agulha hipodérmica 40x16 a partir da fossa intertrocantérica, com uma seringa de 20 ml contendo 0,1 ml de heparina¹¹. As CMAs foram diluídas em solução tampão fosfato plus¹² 2% de soro bovino fetal¹³ (PBS + 2% FBS). Uma camada de medula óssea diluída foi acomodada sobre o Ficoll-Hypaque¹⁴ com cuidado para minimizar a mistura. A solução foi centrifugada a temperatura ambiente (15 - 25 ° C) por 30 minutos a 400G com freio ao largo. Foi removido e eliminado o plasma, que compunha a camada superior, sem

⁸ Sedazine® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Sao Paulo, SP.

⁹ Cetamin® - 10% - Rhobifarma Industria Farmacêutica Ltda. Hortolândia, SP.

¹⁰ Fentanil® - Janssen Cilag Farmacêutica Ltda. São José dos Campos, SP.

¹¹ Liquemine® - Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A. Rio de Janeiro, RJ.

¹² Solucao tampao salina de fosfato® - Invitrogen Brasil Ltda. São Paulo, SP.

¹³ SFB® - Invitrogen Brasil Ltda. São Paulo, SP.

¹⁴ Ficoll-Hypaque Plus® - Amersham Biosciences do Brasil Ltda. R. São Paulo, SP.

alterar a interface plasma-Ficoll. As CMAs foram retiradas e retidas na camada de células mononucleares formadas pelo anel plasma-Ficoll sem perturbar as hemácias/granulócitos que compunham o sedimento. As CMAs foram lavadas duas vezes com 1ml de DBPS por meio de centrifugação por 15 minutos a 400G. Finalmente, as células foram ressuspensas a uma densidade média de 6×10^9 células por ml de DBPS¹⁵, em um volume total de 0,5ml.

A viabilidade celular foi determinada pela técnica de exclusão vital, ou seja, das células não coradas por azul de Tripán, como anteriormente descrito por FRESHNEY (2001). A viabilidade celular foi determinada em porcentagem, aplicou-se a equação matemática: $V \times 100/NT$, onde NT = número total de células (viáveis e não viáveis) contadas na câmara de Neubauer.

Foi retirada deste volume, uma alíquota de 10 μ l e adicionada a 10 μ l do corante azul de Tripán em um tubo de Eppendorf para contagem das células em câmara de Neubauer. A contagem de células viáveis e não viáveis foi realizada sob microscopia de luz, e o cálculo do número de células por mililitro foi determinado pela seguinte fórmula: $V \times FN \times FT/\#Q$, onde

V = número de células viáveis contadas; FN = fator da câmara de Neubauer; FT = fator de diluição do Azul de Tripán e #Q = número de quadrantes da câmara utilizados para a contagem.

Após serem submetidos à colheita da medula óssea os animais foram mantidos sob anestesia e foi realizada venóclise da veia marginal da orelha, para manutenção de acesso venoso e administração de Ringer lactato¹⁶ no volume de infusão de 10ml/kg/hora, durante todo o procedimento cirúrgico. Atingido o plano anestésico adequado, os coelhos foram posicionados em decúbito lateral, procedeu-se a tricotomia da área da articulação do calcâneo de forma circunferencial, a anti-sepsia foi efetuada pelo esquema álcool-iodo-álcool e a área operatória delimitada por panos de campo estereis.

Após o preparo da região, a pele na região lateral da tíbia direita foi incisada, para a dissecação e exposição do tendão calcâneo comum. Posteriormente, uma incisão de aproximadamente 1,0 cm foi realizada no paratendão, expondo-se assim os tendões do músculo gastrocnêmio, do músculo flexor digital superficial e as fibras musculares do músculo grácil, semitendíneo e bíceps femoral.

Com o tendão calcâneo comum exposto, um ponto simples separado, envolvendo todos seus componentes foi realizado a 0,5cm distal à junção músculo-tendínea e a 0,5cm da

¹⁵ Dulbecco's - Invitrogen Brasil Ltda. São Paulo, SP.

¹⁶ Solução de Ringer com Lactato – Indústria Farmacêutica Texon Ltda. Viamão, RS.

junção cranial ósteo-tendínea, com fio de mononáilon¹⁷ 4-0. Em seguida, o tendão foi seccionado, retirando-se um fragmento de aproximadamente 1,0 cm. Foi realizada a fixação de um segmento de artéria carótida de cão, preservado em glicerina, respeitando-se o sentido transversal das fibras formando um tubo, onde foram depositadas as CMA's na luz do enxerto, feita a anastomose de suas extremidades com sutura simples separada, com fio mononáilon 4-0. O paratendão foi localizado e suturado com fio mononáilon 4-0 com ponto simples contínuo. A pele recebeu uma sutura simples separada com fio mononáilon¹⁸ 5-0. O tendão calcâneo esquerdo foi submetido a mesma técnica porém sem a aplicação das CMA(s).

No pós-operatório (PO), foi administrado, enrofloxacina¹⁹ (5mg/kg, SC), durante sete dias. Aplicou-se uma bandagem não-aderente e não-compressiva, estendendo-se desde a articulação fêmuro-tíbio-patelar até a extremidade do membro operado. Os pontos de sutura de pele foram retirados decorridos sete dias de PO.

Todos os animais foram avaliados clinicamente aos 7, 15, 30, 45 e 60 dias, quanto à adaptação da deambulação e sensibilidade dolorosa, mediante quatro graus: grau I – animal não usa nem apóia o membro; grau II – uso não freqüente do membro durante estação e ao caminhar, não sustentando o peso no membro afetado; grau III – uso claudicante do membro na estação e ao caminhar, sustentando parcialmente o peso; grau IV – caminha sem claudicar e posiciona-se normalmente em estação, já para sensibilidade dolorosa foi realizado exame clínico, o qual constava de palpação digital, e movimentos de extensão e flexão dos membros pélvicos.

Os coelhos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de cinco animais tendo como diferencial o tempo de PO até a eutanásia: grupo 1 (G1) – 15° dias ; grupo 2 (G2) – 30° dias; grupo 3 (G3) – 60 dias de PO. Decorridos os períodos pré-determinados os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia utilizando uma dose de 50mg/kg de tiopental sódico²⁰, por via intravenosa. A coleta dos fragmentos tendíneos para análise histológica foi realizada através do mesmo acesso cirúrgico descrito anteriormente. Os cotos proximais coletados tiveram sua espessura mensurada com o auxílio de paquímetro.

As amostras foram fixadas em formalina tamponada 10%, desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para formação de

¹⁷ Nylon 4-0® - Polysuture Indústria e Comércio. São Sebastião do Paraíso, MG.

¹⁸ Nylon 5-0® - Polysuture Indústria e Comércio. São Sebastião do Paraíso, MG.

¹⁹ Baytril® Injetável 10% - Bayer S/A. São Paulo, SP.

²⁰ Tiopental sódico 2,5%. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Campinas, SP. Brasil.

blocos, que foram cortados com micrótomo e adaptadas a lâminas. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e AZAN e analisados com microscópio de luz para avaliação morfológica. Nos cortes histológicos quantificou-se o número de linfócitos, fibroblastos, macrófago, células mononucleares e neovascularização. As fibras colágenas foram quantificadas em uma escala de 0 a 4, onde 0: ausente, 1: pouco, 2: mediano, 3: muito e 4: exacerbado. Para quantificação celular marcou-se o centro do corte histológico e a partir daí contou-se 10 campos no centro e cinco campos na periferia superior e cinco campos na periferia inferior do tendão com aumento de 40X. Para cada corte foram feitas duas contagens para cada tipo celular, sendo a contagem de fibras colágenas, nos cortes em AZAN e a contagem celular nos corte em HE.

Para análise estatística foi computada a diferença entre MPD e MPE, e comparadas essas diferenças entre os grupos pelo teste Kruskal Wallis. Para comparação entre MPD e MPE em cada grupo, foi utilizado o teste de Wilcoxon, para ambos os testes, foi adotado o nível de significância de 0,05.

Resultados e Discussão

A técnica utilizada para coleta da medula óssea no trocanter maior do osso fêmur foi de fácil execução. O protocolo com utilização de Ficoll-Hypaque para o isolamento celular foi eficaz apresentando viabilidade celular média de 93,79% e concentração média de $6,80 \times 10^6$ CMAs viáveis, sendo a viabilidade e concentração de células mononucleares maiores do que os valores relatados por SOUZA (2009).

A administração intra-enxerto de CMAs, estimulam a formação de fibroblastos e colágenos com integração do implante aos cotos tendíneos de coelhos quando associadas aos xenoimplantes de artéria carótida de cães preservada em glicerina a 98%, tendo resultados semelhantes quando comparados a utilização de enxertos osteocondrais (SOUZA, 2009).

O tempo de conservação, em glicerina a 98%, das artérias carótidas implantadas, foi de 30 dias a 6 meses, portanto, dentro do período recomendado por Pigossi (1967), Inatomi, et al. (1980), Sartori Filho, et al. (1997) e Costa Neto (1999), e foi suficiente para prevenir a reação de rejeição, a qual não foi presenciada em nenhum dos coelhos. Assim, o período mínimo de preservação é que tem maior importância, pois segundo Daleck, et al. (1992), são necessários ao menos 30 dias de conservação na glicerina para que o implante perca sua

capacidade de estimulação imunológica. A manutenção do implante em solução contendo iodo 1% e NaCl 0,9% em diluição 1:50, por 20 minutos, teve por finalidade obter hidratação do mesmo e controle de possíveis agentes infectantes, resistentes à glicerina. A preocupação com a infecção é procedente, pois Pigossi (1964 e 1967) já citou que, embora fosse um poderoso anti-séptico, a glicerina não atuou sobre microorganismos esporulados. Pesquisas de Deijkers, et al. (1997) demonstraram que tendões calcaneares comuns, coletados de cadáveres humanos, sofreram contaminação exógena por bactérias resistentes aos antibióticos, comumente utilizados na rinçagem de enxertos e os de Coronado, et al. (1998) indicaram a presença do vírus da leucemia felina, em ossos conservados em glicerina. Em nenhuma das fases observadas, foi constatada reação inflamatória com presença de células polimorfonucleares que caracterizasse infecção. Esses dados, associados ao tipo de proliferação tecidual encontrado, predominantemente tecido conjuntivo reparador, demonstraram que o implante, o procedimento cirúrgico e a evolução pós-operatória ocorreram de forma asséptica e a reação tecidual foi do tipo regeneradora.

Todos os coelhos recuperaram progressivamente a deambulação após os dois dias de PO e com sete dias de PO todos se locomoviam sem claudicação. Apesar de Lindholm (1959), Turco e Spinella (1988), Costa Neto, et al. (1999) e Raiser (2000), indicarem imobilização do membro em outras espécies, nesse experimento não se verificou tal necessidade, o que pode ser explicado pela forma de deambulação e exigência do membro nessa espécie.

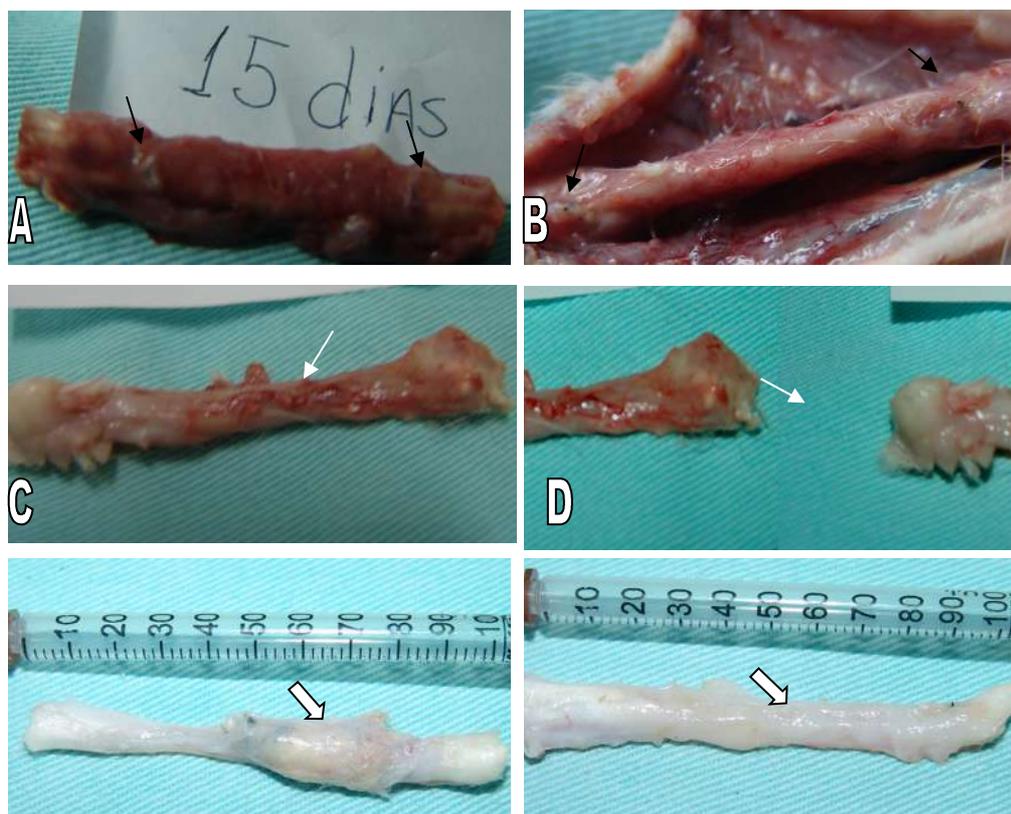
Aos sete dias de PO um animal apresentou sensibilidade dolorosa e claudicação no MPD e um animal no MPE. Já aos 15 dias de PO nenhum animal apresentou mais sensibilidade dolorosa, tão pouca claudicação em nenhum dos membros. Os animais foram avaliados também, nestes mesmos intervalos de tempo, quanto a presença de edema, cicatrização da ferida, deiscência dos pontos e contaminação. Na primeira semana apenas um animal apresentou edema no MPE, dois apresentavam deiscência de parte da sutura de pele no MPE, mas apenas um apresentava alguma contaminação e todos estavam com a ferida cirúrgica em processo de cicatrização. Aos 15 dias de PO todos os animais estavam com a ferida cirúrgica completamente cicatrizada, sendo possível retirar o restante de suturas de pele remanescentes, nenhum animal apresentava mais edema ou qualquer sinal de reação inflamatória exacerbada.

As avaliações macroscópicas para presença de aderência peritendínea, neovascularização, fibrose e presença do fio de sutura deram-se imediatamente após a

eutanásia nos tempos pré-determinados de PO (Figura 1). No G1, um animal apresentou aderência no MPD, e três no MPE, um animal apresentou neovascularização no MPD e três no MPE, três animais estavam com fibrose no MPD e dois no MPE, todos apresentavam os fios de sutura na região de contato entre enxerto e tendão.

No G2, dois animais apresentavam aderência no MPD e três no MPE, em três animais notou-se neovascularização no MPD e dois no MPE, em todos os animais constatou-se fibrose em ambos os membros e apenas um animal não estava com os fios de sutura na área enxertada.

Já no G3 todos os animais apresentavam aderência e neovascularização em ambos os membros, fibrose e fio de sutura no MPE, dois animais apresentavam fibrose e fio de sutura no MPD. Quanto maior a aderência, mais difícil foi a dissecação das estruturas e o isolamento do tendão calcâneo comum, o que não comprometeu a obtenção do material. Macroscopicamente pode-se notar proliferação de tecido cicatricial em todos os cotos tendíneos. Os cotos tendíneos foram mensurados com paquímetro e as dimensões médias dos segmentos foram 4,8 mm e 5,12 mm nos MPE e MPD, respectivamente.



E

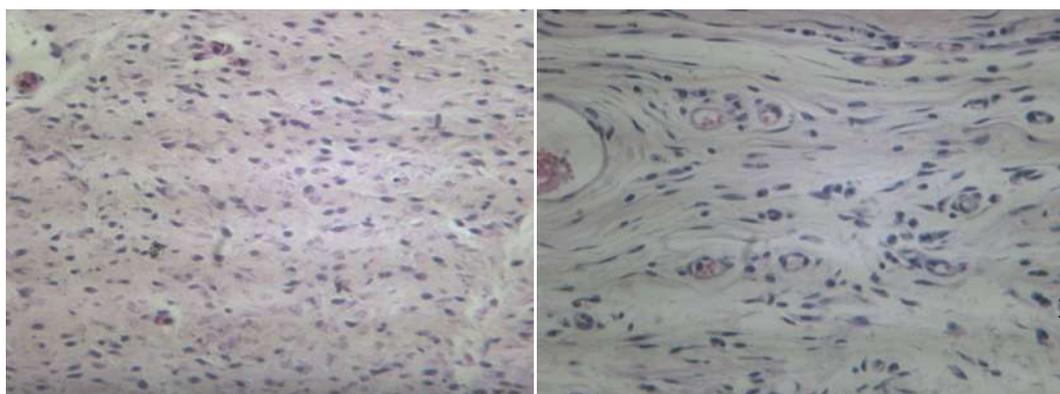
F

Figura 1. Imagens fotográficas de tendão calcanear comum de coelhos coletados, após eutanásia, com 15 dias (A e B), 30 dias (C e D) e 60 dias de PO (E e F). Imagem A, C e E pertencem aos MPE que receberam o enxerto de artéria carótida de cão conservada em glicerina e B, D e F MPD que receberam mesmo enxerto associado a células mononucleares autólogas. Notar em A e B que o enxerto apresenta-se visível e suturado aos cotos tendíneos (setas pretas); em C e D neovascularização evidente e menor reação inflamatória (Seta Branca). Já em E e F, tendões com 60 dias de PO, notar que em E (MPE) ocorreu fibrose mais intensa que em F, onde o tecido neoformado apresenta-se com características mais anatômicas (seta larga) Umuarama, 2010.

Os tendões que receberam enxerto de artéria carótida associada as CMAs, com 60 dias de PO (Figura 1F) mostraram-se resistentes o suficiente para que os animais mantivessem perfeita deambulação, este fato vem a concordar com Zhao, et al. (2009) que em estudos *ex vivo*, utilizou células de medula óssea na cicatrização de tendão e constatou, através de testes biomecânicos que estas células tem potencial reparador em tendões sugerindo testes *in vivo*.

Baltzer, et al. (2009), utilizando retalho de músculo semitendinoso em reparação de tendão calcanear de cães ressaltam a importância do suprimento sanguíneo antecipado no processo de reparação tendínea. Concordando com este ultimo, notou-se que o suprimento sanguíneo dos animais deste experimento não foi prejudicado, tratando-se de tendão, pois aos 30 dias, em ambos os membros, era bem claro, a neovascularização abundante, porém no MPD, de uma forma mais organizada que no MPE.

Os achados histológicos, aos 15 dias (Figura 2) de evolução, mostram o processo inicial de reparação caracterizado por inflamação, predominando células mononucleares e neoformação vascular rodeando os implantes ou entre esses e o tendão receptor nas anastomoses. Aos 30 dias (Figura 3), o processo inflamatório ainda mostrava vasos invadindo os implantes, seguidos por fibroblastos de conformação mais arredondada. Esses achados caracterizam um processo em que o implante começa a ser incorporado ao tecido fibroso neoformado, o qual era exuberante ao redor do mesmo, corroborando com os achados de Costa Neto, et al. (1999).



A **B**

Figura 2. Fotomicrografia de tendão calcanear comum de coelhos do G1 com 15 dias de PO submetidos a eutanásia. Em A imagem de MPE, o qual recebeu apenas o enxerto de artéria carótida de cão conservada em glicerina, em B imagem do MPD, o qual recebeu igual enxerto associado as células mononucleares autólogas. Notar que em B observa-se uma maior neovascularização e início de organização celular em feixes, enquanto que em A a organização apresenta-se mais difusa. Umuarama, 2010.

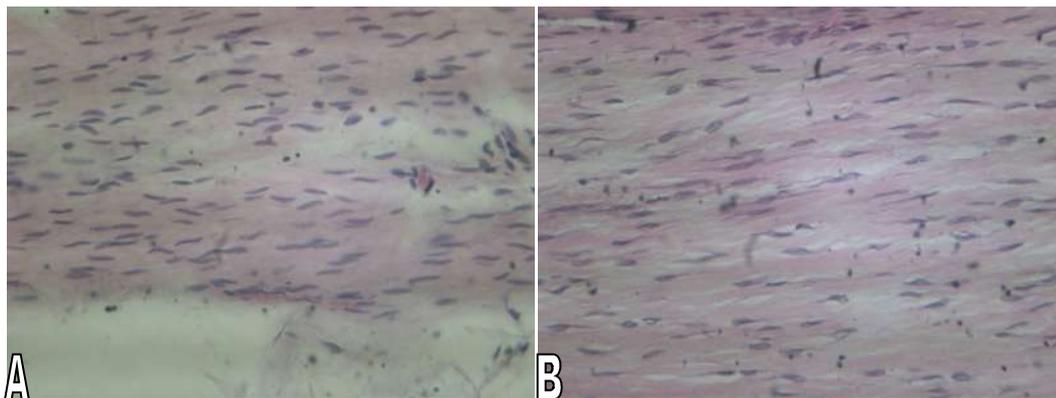
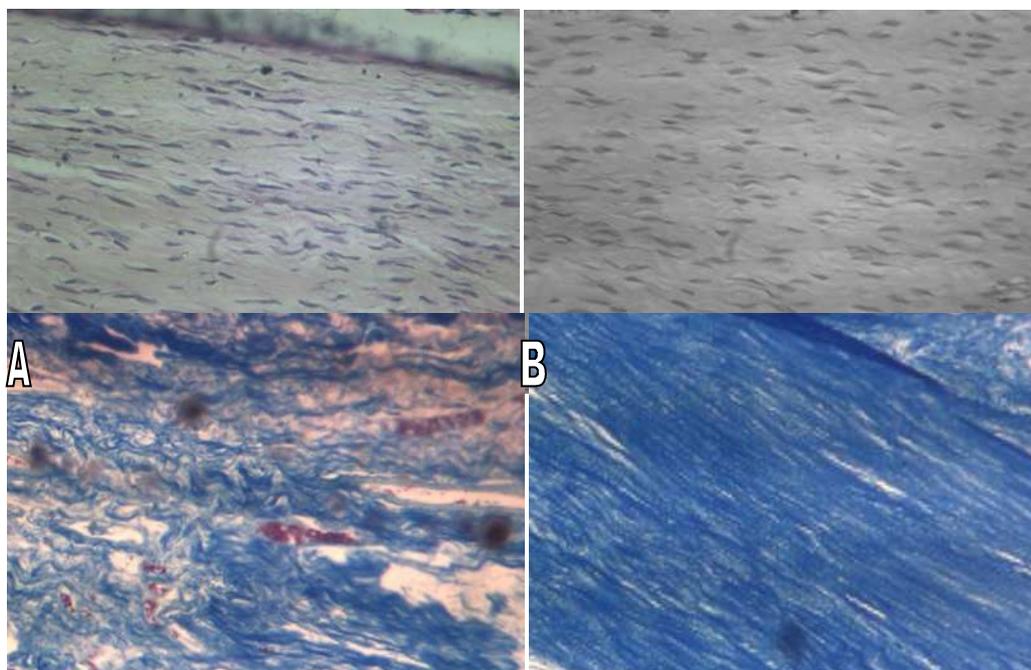


Figura 3. Fotomicrografias de tendão calcanear de coelhos do G2 com 30 dias de PO submetidos a eutanásia, em A MPE e em B MPD. Notar em B maior organização celular. Umuarama, 2010.

A análise histológica revelou a presença de estruturas semelhantes a tendão em formação em todos os cotos tendíneos submetidos ao implante de artéria carótida conservada em glicerina, associado a CMAs (MPD), enquanto os cotos submetidos à implante sem a associação de células tronco (MPE) não demonstraram tais estruturas. Esses tendões em formação consistiam em fibroblastos e colágeno evidente e delgado; Aos 60 dias (Figura 4), embora os tendões já mostrassem feixes de fibras bem alinhadas e fibroblastos fusiformes que, segundo Payne e Tomlinsom (1993), é característico do tendão maduro, ainda se verificou amostras com atividade celular e fibras desorganizadas.



C

D

Figura 4. Fotomicrografia de tendão calcâneo comum de coelhos do G3 submetidos a eutanásia aos 60 dias de PO. A e B coloração em HE e C e D coloração em AZAN. Em B ocorreu maior organização de fibroblastos em relação a A e em D ocorreu maior síntese e organização de fibras colágenas em relação a C. Umuarama, 2010.

Os resultados obtidos nesse experimento estão dentro do cronograma evolutivo, pois, de acordo com Autefage (1999), que efetuou estudo sobre a reparação tendínea e de ligamentos, em cães, a cicatrização não se completa antes de um ano de evolução.

Considera-se que o xenoinplante de artéria carótida, conservada em glicerina a 98% associado a CMAs, atende às qualidades requisitadas por Vámhidy, et al., (1990) de ser facilmente armazenado e implantável. Pode-se acrescentar, também, a vantagem de evitar trauma incisional na área doadora de medula óssea, que é coletada através de punção.

Tabela 1 – Médias de contagens de fibroblastos, macrófagos, polimorfonucleares e neovascularização dos cortes histológicos obtidos de enxerto de artéria carótida de cão conservada em glicerina no tendão calcâneo comum de coelhos no membro pélvico esquerdo (MPE) e o mesmo enxerto associado a células mononucleares autólogas da medula óssea no membro pélvico direito (MPD). De acordo com os tempos de PO: G1- 15 dias, G2- 30 dias e G3- 60 dias. Umuarama, 2010.

Variável		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
Fibroblasto	MPD	3123,80a	197,94	3345,00a	175,85	3401,80a	176,00
	MPE	2127,40b	91,41	2245,00b	84,10	2231,60b	65,92
	Diferença	996,40A	166,13	1100,00A	187,33	1170,20A	228,41
Macrofágo	MPD	44,80a	4,49	41,00a	8,46	43,00a	8,86
	MPE	45,20a	4,76	39,60a	9,29	35,40a	5,90
	Diferença	-0,40A	7,50	1,40A	10,35	7,60A	4,82
Polimorfos	MPD	26,80a	4,60	27,60a	5,03	31,20a	4,87
	MPE	17,20b	3,03	24,80a	4,97	28,80a	7,56
	Diferença	9,60A	4,39	2,80A	7,35	2,40A	6,82
Neovascularização	MPD	41,20a	10,52	51,80a	10,23	51,80a	4,60
	MPE	22,60b	5,85	35,00b	7,14	42,80 ^a	9,26
	Diferença	18,60A	5,50	16,80A	3,56	9,00A	9,87

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna por variável, não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon para o nível de significância de 0,05.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha por variável, não diferem entre si pelo teste de kruskal wallis para o nível de significância de 0,05.

A contagem e quantificação dos fibroblastos demonstrou, diferenças significativas entre os enxertos nos membros direito e esquerdo em cada um dos grupos estudados ($p < 0,05$), sendo que o MPD de todos os animais, em todos os períodos, apresentaram maior quantidade de fibroblastos (Tabela1). As células mononucleares autólogas administradas intra-enxerto aumentaram a quantidade de fibroblastos e aceleraram a síntese de colágeno no tendão tenectomizado corroborando os achados de Young, et al. (1998) e Awad, et al. (1999) .

A contagem histológica de macrófagos, não se verificou diferenças significativas entre os enxertos no MPD e MPE em nenhum dos grupos (Tabela 1). Sendo os macrófagos células fagocíticas, pode-se atribuir a isto que não houve fagocitose do enxerto e sim incorporação do mesmo ao tecido neoformado.

A contagem e análise estatística de células polimorfonucleares demonstrou que só houve diferença significativa entre MPD e MPE no G1, sendo que no MPD houve maior proliferação de polimorfonucleares. É possível que o trans-operatório, neste grupo, não tenha sido totalmente adequado. Porém, aos 15 dias de PO é a fase mais intensa do processo inflamatório, e com a administração de uma colônia de células indiferenciadas no local, parte destas se diferenciaram em polimorfonucleares, justificando esta diferença. O processo inflamatório neste experimento foi menos intenso que nos trabalhos de Young, et al. (1998) em função de o enxerto ser biológico, enquanto que estes utilizaram enxerto sintético.

A neovascularização apresentou diferenças significativas na sua contagem entre MPD e MPE nos grupos 1 e 2, no grupo 3 não verificou-se diferenças, pois até os 30 dias (G1 e G2) estava ocorrendo a fase inflamatória e proliferativa e já aos 60 dias de PO (G3) o tendão já se encontrava em fase reparadora (Tabela1). Tal fato provavelmente deveu-se a administração intra-enxerto de CMAs. As células estimularam o processo de vascularização no interior do enxerto assim como acelerou a formação de tecido tendíneo neoformado. Souza (2009) encontrou resultado similar utilizando CMAs em enxerto osteocondral alógeno em reparo de sulco troclear de coelhos.

CONCLUSÃO

Na vigência dos resultados obtidos no presente experimento, é pertinente concluir que a utilização de CMAs da medula óssea como adjuvante no reparo de tendão calcâneo comum em coelhos associadas a xenoimplantes de artéria carótida de cães preservada em glicerina a 98%, se prestou satisfatoriamente, tanto para suporte às células mononucleares, como para direcionamento do tecido tendineo neoformado. Prestando-se assim ao uso na reparação funcional e morfológica de tendões na espécie estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, J. **Substituição de segmento de colédoco de cão por preparado de pericárdio homólogo conservado em glicerina**. São Paulo, SP. 1977. 108 p. Tese (Livro Docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C.R., BAPTISTA, L.C., MUKAI, L.S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal, FUNESP-UNESP, 1992. Cap.2. p.33-42.

ANDRADE, A.L.; EUGÊNIO, F.R.; VASCONCELOS, R.O.; et al. Aspectos clínicos do emprego experimental da cápsula renal de equino, preservada em glicerina, no reparo de lesões lamelares da esclera de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 1998. Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 1998, 161 p. p. 54.

AUTEFAGE, A. La cicatrizzazione dei tendini e dei ligamenti. **Summa**, Italia, v.16, n.1, p.29-34, 1999.

Awad, H.A. et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. **Tissue Eng.** 5, 267–277, 1999.

BALTZER, W.I. RIST, P. Achilles Tendon Repair in Dogs Using the Semitendinosus Muscle: Surgical Technique and Short-Term Outcome in Five Dogs. **Vet Surg**, v.38, p-770-779, 2009.

BRAGA-SILVA, J. et al . Efeitos das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. **Acta ortop. bras.**, São Paulo, v. 14, n. 5, 2006 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-78522006000500009&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 29 jul. 2009. doi: 10.1590/S1413-78522006000500009.

BUTLER, H.C. Surgery of tendinous injuries and muscle injuries. In: NEWTON, C.D., NUNAMAKER, D.M. (Eds.). **Textbook of small animal orthopaedics**. Philadelphia : Lippincott, 1985. cap.68. p.835-842.

CARRION, M. J. M.;et al. Potencial terapêutico das células-tronco de medula óssea no tratamento da epilepsia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php ?script=sci_arttext&pid =S1516-84842009000700018&lng=pt&nrm=iso>. acesso em: 29 jul. 2009. Epub 08-Maio-2009. doi: 10.1590/S1516-84842009005000023

CONTESINI, E.A. et al. O uso da cartilagem conchal conservada em glicerina como enxerto homólogo em forma de retalho na traqueoplastia cervical em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 1994. Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba: COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 1994, 122 p. p. 56.

CORONADO Jr, et al. Virucidal and osteogenic effects of 98% glycerol and ethylene oxide preservation of bone allograft in the cat. In: ANNUAL CONFERENCE OF VETERINARY ORTHOPEDIC SOCIETY, 25, 1998, Snowmass, Colorado, USA. **Proceedings...** Veterinary Orthopedic Society, 1998. p.31.

COSTA NETO, J.M, *et al.* Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciê. Rural**, Santa Maria, v.29, n.4, p.697-703, 1999.

DALECK, C.R,et al. Esofagoplastia cervical em cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina – “estudo experimental”. **Ars. Veterinária**, v.3, n.2, p. 195-202, 1987.

DALECK, C.R, et al. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. **Ars Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 53-61, 1988.

DALECK, C.R, et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciê. Rural**, Santa Maria, v.22, n.2, p.179-183, 1992.

DEIJKERS,R.L.M., et al. Contamination of bone allografts. Analysis of incidence and predisposing factors. **J Bone Joint Surg**, (Br), London, v.79-B, n.1, p.161-166, 1997.

FRESHNEY, RI. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd. Ed. New York: Wiley-Liss, 2001.

INATOMI, L.S, et al. Implante de dura-máter heteróloga em cães. **Rev Centro Ciências Rurais**, Santa Maria, v.10, n.3, p.291-297, 1980.

KILLINGSWORTH, C.R. Repair of injured peripheral nerves, tendons and muscles. In: HARARI, J. (Ed.). **Surgical complications and wound healing in the small animal practice**. Philadelphia : Saunders, 1993. cap.7. p.169-202

LINDHOLM, A. A new method of operation in subcutaneous rupture of the achilles tendon, Acta Chir Scand 117: 261, 1959. In: **Cirurgia ortopédica de Campbell**. São Paulo: Manole, 1996. p. 2039-2050.

OLIVEIRA, V.A., ALVARENGA, J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de equinos. **Ciê. Rural**, v. 28, n. 4, p. 623-628, 1998.

OLIVEIRA, ALVARENGA, Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de equinos. **Ciê. Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 4, dez. 1998 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781998000400014&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 01 mar. 2010. doi: 10.1590/S0103-84781998000400014.

PAYNE, J.T., TOMLINSOM, J.L. Composition, structure, and function of muscle, tendon and ligament. In: BOJRAB, M.J. (Ed.). **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.95. p.656-662.

PIGATTO, J.A.T, et al. Enxerto homólogo de centro frênico, preservado em glicerina, na reconstrução parcial de parede esofágica cervical em caninos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 25, n.2, p. 116-124, 1997.

PIGATTO, J.A.T.; et al. Esofagoplastia cervical em caninos com enxerto homólogo de cartilagem conchal preservada em glicerina. **Ciê. Rural**, v. 28, n. 4, p. 617-621, 1998

PIGOSSI, N. **Implantação de dura-mater homogêna conservada em glicerina**. São Paulo, 1964. 41 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, 1964.

PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter**. São Paulo, SP. 1967. 36p. Tese (Livre-Docência) Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo.

PIGOSSI, N,et al. Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-mater homogêna conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 17, n. 8, p. 263-278, 1971.

RAHAL, S.C, et al. Implantação intraorbital, após a enucleação transpalpebral, de resina acrílica ou pericárdio em coelhos. **Ciê. Rural**, v. 26, n. 2, p. 229-233, 1996.

RAISER, A.G.; PEREIRA, S.N.; CARDOSO, G. Revascularização periférica com artéria conservada em glicerina. **Rev. Centro Ciências Rurais**, v.8, n.3, p.251- 255, 1978.

RAISER, A.G. Reparação do tendão calcâneo em cães. **Cien. Rural** [online]. 2001, vol.31, n.2, pp. 351-359. ISSN 0103-8478. doi: 10.1590/S0103-84782001000200027.

RAISER, A.G. **Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo comum, preservado em glicerina a 98%, e tratado com radiação laser Arseneto de Gálio, sob dois métodos de imobilização em cães.** Santa Maria, 2000. 88p. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2000.

ROSSI, M. I. D.; BOROJEVIC, R. Terapias celulares do miocárdio com células da medula óssea: critérios de qualidade e perspectivas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000700013&lng=pt&nrm=iso>. acessos em: 29 jul. 2009. Epub 29-Maio-2009. doi: 10.1590/S1516-84842009005000033.

SANTOS, R. R., et al. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 37, n. 6, dez. 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822004000600012&lng=pt&nrm=iso>. acesso em: 29 jul. 2009. doi: 10.1590/S0037-86822004000600012.

SARTORI FILHO, R., et al.. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Vet e Zoot**, São Paulo, v.9, p.69-77, 1997.

SOUZA, L. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos.** 67 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia Faculdade de Medicina Veterinária, 2009.

TOGNOLI, G. K. et al . Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Cien. Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, fev. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000100023&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 29 jul. 2009. Epub 06-Ago-2008. doi: 10.1590/S0103-84782008005000039.

TURCO, V.; et al. Peroneus brevis transfer for achilles tendon rupture in athletes, *Orthop Rev* 17:822, 1988. In **Cirurgia ortopédica de Campbell**. São Paulo: Manole, 1996. p. 2039-2050.

VOLTARELLI, J. C. et al . Terapia celular no diabetes mellitus. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000700022&lng=pt&nrm=iso>. acessos em: 29 jul. 2009. Epub 05-Jun-2009. doi: 10.1590/S1516-84842009005000036.

VÁMHIDY, L.; et al. Preserved tendon grafts in reconstructive hand surgery: a reiew. **Acta Chir Hung, Budapest**, v. 31, n. 3, p. 209-215,1990

Young, R.G. et al. (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. **J. Orthop. Res.** 16, 406–413.

ZHAO, C., et al. The effects of bone marrow stromal cell transplants on tendon healing in vitro. Med Eng Phys (2009), doi:[10.1016/j.medengphy.2009.08.004](https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2009.08.004)

ANEXOS



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC

DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "CÉLULAS TRONCO AUTÓLOGAS COMO ADJUVANTE NO REPARO DE TENDÃO CALCANEAR COMUM EM COELHOS ASSOCIADAS A XENOIMPLANTE DE ARTERIA CARÓTIDA DE CÃES PRESERVADA EM GLICERINA", protocolo 15517/2009, sob a responsabilidade de GENTIL FERREIRA GONCALVES, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) em reunião realizada em 18/09/2008. Este certificado expira em 18/09/2009.

We certify that the project "CÉLULAS TRONCO AUTÓLOGAS COMO ADJUVANTE NO REPARO DE TENDÃO CALCANEAR COMUM EM COELHOS ASSOCIADAS A XENOIMPLANTE DE ARTERIA CARÓTIDA DE CÃES PRESERVADA EM GLICERINA", protocol 15517/2009, in the responsibility of GENTIL FERREIRA GONCALVES, is in agreement with the Ethical Principles in Animal adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) in 09/18/2008. Expiration date: 09/18/2009.

UMUARAMA - PR, 28/02/2010.

Prof.ª Msc. Juliana Silveira do Valle
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº: 15517

Dayane Aparecida Fagundes Paschoal da Silva
Secretária CEPEEA/UNIPAR

UNIVERSIDADE PARANAENSE
DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

DISSERTAÇÃO

Normas para elaboração e apresentação

Colegiado de Curso

Umuarama - PR

2008

1 INTRODUÇÃO

A dissertação representa o trabalho final para a conclusão do curso de mestrado. Ela encerra o planejamento, a execução e as conclusões de um trabalho científico desenvolvido ao longo do processo de formação do pesquisador. Como coroamento do esforço despendido durante esse período, é necessário que ela contemple um trabalho de alto nível, retratando da forma mais fiel possível não só sua efetiva contribuição para a sociedade, como também o aprendizado de como pesquisar. Considera-se dissertação de mestrado o trabalho orientado que demonstre capacidade de sistematização da literatura existente sobre o tema tratado e capacidade de utilização dos métodos e técnicas de investigação científica, trazendo contribuição para a Ciência Animal. As dissertações do Curso de Mestrado do Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da UNIPAR deverão ser apresentadas na forma de **pelo menos um artigo científico original**, relativo ao projeto de pesquisa desenvolvido pelo acadêmico, podendo haver outros artigos científicos, seja na forma de artigos originais, *short communications* e artigos de revisão de literatura, desde que também relacionados ao projeto de pesquisa desenvolvido pelo acadêmico. Entretanto, não serão aceitos resumos de congressos, nacionais ou internacionais, resenhas, notas técnicas, editoriais ou relatos de caso, mesmo que publicados em revistas indexadas. Os artigos já publicados devem ter no máximo um ano de publicação, no momento de entrega da dissertação para defesa, e integrarem a mesma linha de pesquisa.

Para a defesa da dissertação deverá ser comprovado que pelo menos um dos artigos científicos foi publicado, aceito ou submetido a um periódico científico classificado como Qualis A ou B (Nacional ou Internacional) na área de Conhecimento de Medicina Veterinária no ano da defesa.

2 Os artigos científicos deverão ter como primeiro autor o aluno de mestrado e como co-autores o orientador e outros colaboradores que efetivamente tenham participado do estudo. A dissertação deverá ser encaminhada com carta do orientador apresentando anuência a sua apresentação para defesa.

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A estrutura do documento deve compreender três partes, assim constituídas:

1. Pré-texto – capa, folha de rosto, folha de homologação, dedicatória (opcional), agradecimentos (opcional), epígrafe (opcional), resumo, abstract, sumário.

2. Texto – artigo(s) científico(s).

3. Pós-texto – cópia das instruções para autores e comprovação da indexação dos periódicos; cópia do certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Experimentação Animal e da carta de aceite ou submissão do artigo. Os itens constituintes do pré- e pós-textos devem seguir as recomendações do Manual de Normas e Padrões para Elaboração de Documentos Científicos da Unipar¹. Na parte referente ao Texto, serão apresentados os artigos, cada um constituindo um capítulo, os quais deverão conter, obrigatoriamente, título, resumo, *abstract*, palavras-chave, *key words*, introdução, material e métodos, resultados e discussão (apresentados juntos ou em separado), conclusões, ¹ GEMELI, I.; WESCHENFELDER, S. **Manual de Normas e Padrões para Elaboração de Documentos Científicos da Unipar**. Umuarama, 2005.

3 seguindo rigorosamente as normas de publicação determinadas pelos periódicos selecionados em todos os seus aspectos (dimensão, citações, referências bibliográficas e formatação). Quando os artigos científicos estiverem redigidos em língua diferente da língua portuguesa deverão estar acompanhados de uma cópia em língua portuguesa.

ROTINAS DE ENCAMINHAMENTO

Uma vez concluída a Dissertação, revisada e aprovada pelo orientador, o mesmo encaminhará para homologação pelo Colegiado de Curso, juntamente com a sugestão de composição de Banca Examinadora, data e horário da defesa. A formação da Banca Examinadora, assim como os prazos de encaminhamento devem seguir o determinado pelo Regulamento do Curso de Mestrado em Ciência Animal da UNIPAR, e pelo Regulamento da Pósgraduação *Stricto Sensu*.

Submissão

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)