

**Universidade de Uberaba**  
**Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos**  
**(PPGSPAT) – Mestrado**

**FRAÇÃO ESTROMAL DO TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DE**  
**DEFEITOS OSTEOCONDRAIS EM COELHOS**

**Mestranda: Ariane Barboza de Oliveira**  
**Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves**

**Uberaba – MG**  
**2019**



**Ariane Barboza de Oliveira**

**FRAÇÃO ESTROMAL DO TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DE  
DEFEITOS OSTEOCONDRAIS EM COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade de Produção Animal nos Trópicos como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

**Uberaba – MG  
2019**

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

O4f Oliveira, Ariane Barboza de.  
Fração estromal do tecido adiposo no tratamento de defeitos osteocondrais em coelhos / Ariane Barboza de Oliveira. – Uberaba, 2019.  
71 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.  
Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.

1. Coelho. 2. Coelho – Articulações. 3. Medicina Veterinária. I. Alves, Endrigo Gabellini Leonel. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 636.9322

ARIANE BARBOZA DE OLIVEIRA

FRAÇÃO ESTROMAL DO TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DE DEFEITOS  
OSTEOCONDRAIS EM COELHOS.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 13/09/2019

BANCA EXAMINADORA:



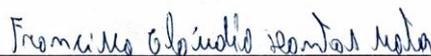
---

Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves - Orientador  
Universidade de Uberaba



---

Prof. Dr. Renato Linhares Sampaio  
Universidade de Uberaba



---

Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota  
Universidade Federal de Uberlândia



Dedico este trabalho á minha família, especialmente à minha mãe Maria das Graças, ao meu padrasto Antônio Carvalho, aos meus irmãos Euda e Eudmar, aos meus sobrinhos Gabriel, Alana e Clara e ao meu namorado David, por todo carinho, apoio e paciência.



## AGRADECIMENTOS

Querido Deus, desta vez não quero pedir! Quero somente agradecer pela paciência e perseverança em me manter erguida durante esta etapa.

Ao meu orientador Prof. Endrigo Gabellini Leonel Alves, por sua dedicação, amizade e pelo inestimável conhecimento transmitido.

Ao meu Prof. Rodrigo Supranzetti Rezende, pela ajuda, colaboração e ensinamentos nesse estudo.

À professora Joely Figueiredo Bittar, pela boa vontade e prontidão em ajudar sempre que solicitada.

À professora Isabel Rodrigues Rosado, pela participação durante o experimento anestesiando os coelhos e cuidando deles com muito carinho durante a cirurgia.

À Camilla Beatriz da Silva, amiga e colaboradora do setor de pesquisa e análise laboratoriais da Universidade de Uberaba no auxílio, paciência e companheirismo.

À aluna de iniciação científica Suzilaine Alves de Oliveira Macedo pela amizade e apoio durante o experimento cuidando com carinho dos coelhos.

Aos funcionários do Hospital Veterinário de Uberaba que sempre estiveram dispostos a ajudar quando solicitados.

Aos técnicos do setor de imagem do hospital pelo auxílio, paciência e carinho no momento dos exames dos coelhos.

Aos colegas veterinários do hospital que sempre auxiliaram e orientaram a pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À UNIUBE e PROPEPE, pelo financiamento do experimento.

À UNIUBE, pela oportunidade de ingressar no programa de pós-graduação.

Aos coelhos, animais usados no experimento pela doçura mesmo em momentos desconfortáveis, vou lembrar sempre de cada um desses animais com muito carinho e gratidão.



## LISTA DE ABREVIACÕES

C- – Controle negativo

C+ - Controle positivo

CT – Culas-tronco

CTA – Culas-tronco adultas

CTE – Culas-tronco embrionárias

CTM – Culas-tronco mesenquimais

CTM-AD – Culas-tronco mesenquimais do tecido adiposo

CTM-MO – Culas-tronco mesenquimais da medula sea

DAD – Doença articular degenerativa

FETA – Fração estromal do tecido adiposo

FTP - Articulação fmur-tbio-patelar

GAGS – Glicosaminoglicanos

MEC – Matriz extracelular



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Classificação da deambulação de ratos, segundo o grau e critérios de utilização.....	34
<b>Tabela 2.</b>	Número de células por mL extraídas de 5 mL de tecido adiposo subcutâneo de coelho, submetidas á digestão enzimática com colagenase tipo I durante 30, 40 e 50 minutos. ....	39
<b>Tabela 3.</b>	Média e desvio padrão do escore de claudicação de coelhos com defeitos osteocondrais na articulação femorotibiopatelar, não tratados (C-) ou tratados com fração estromal do tecido adiposo (FETA) ou enxerto osteocondral autógeno (C+). Avaliação realizada ao longo de 85 dias. ....	40
<b>Tabela 4.</b>	Média e desvio padrão da área de neoformação óssea obtida por avaliação radiográfica de defeitos osteocondrais criados na articulação femorotibiopatelar, não tratados (C-) ou tratados com fração estromal do tecido adiposo (FETA) ou enxerto osteocondral autógeno (C+) avaliação realizada ao longo de 90 dias.....	41
<b>Tabela 5.</b>	Média e desvio padrão do escore de parâmetros de avaliação macroscópica da articulação femorotibiopatelar de coelhos com defeitos osteocondrais, não tratados (C-) ou tratados com fração estromal do tecido adiposo (FETA) ou enxerto osteocondral autógeno (C+) avaliação realizada ao longo de 45 e 90 dias.....	42



## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo I.</b>	<b>Revisão de literatura</b>	
<b>Figura 1.</b>	Camadas estruturais da cartilagem articular. Kelc et al (2013) .....	15
<b>Figura 2.</b>	Defeitos da cartilagem articular de espessura parcial e total da cartilagem articular. Kelc et al (2013) .....	16
<b>Capítulo II.</b>	<b>O efeito da fração estromal do tecido adiposo no tratamento de defeitos osteocondrais em coelhos.</b>	
<b>Figura 1.</b>	Imagem do defeito osteocondral criado no sulco troclear de coelhos (A) para avaliação do efeito terapêutico da fração estromal do tecido adiposo (FETA) (B). Na imagem C e possível observar o defeito preenchido com o macerado de osso autógeno (controle +) .....	33
<b>Figura 2.</b>	Imagem esquemática para ilustrar a quantificação do osso neoformado em cada tempo de avaliação. A área de osso neoformado foi obtida pela diferença entre a área de radiolucência no pós imediato (área contornada em vermelho na imagem A) e a área de radiolucência em cada tempo de avaliação (área contornada em azul na imagem B) .....	35
<b>Figura 3.</b>	Esquema para ilustração das áreas do defeito osteocondral avaliadas histologicamente. ....	37
<b>Figura 4.</b>	Imagens macroscópicas das superfícies trocleares com defeitos osteocondrais não tratados “C-” (A e D) e tratados com fração estromal do tecido adiposo “FETA” (B e E) ou com enxerto osteocondral macerado “C+” (C e F – grupo C+) aos 45 (A, B e C) e 90 (D, E e F) dias de avaliação pós-operatória. ....	43
<b>Figura 5.</b>	Micrografia da superfície (A, D e G), centro (B, E e H) e periferia (C, F e I) de defeitos osteocondrais criados em trôcleas femorais de coelhos, não tratados “C-” (A, B e C) e tratados com fração estromal de tecido adiposo “FETA” (D, E e F) ou com enxerto osteocondral macerado “C+” (G, H e I), 45 dias após a cirurgia. Hematoxilina eosina. ....	45
<b>Figura 6.</b>	Micrografia da superfície (A, D e G), centro (B, E e H) e periferia (C, F e I) de defeitos osteocondrais criados em trôcleas femorais de coelhos, não tratados “C-” (A, B e C) e tratados com fração estromal de tecido adiposo “FETA” (D, E e F) ou com enxerto osteocondral macerado “C+” (G, H e I), 45 dias após a cirurgia. Hematoxilina eosina.....	46



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>CAPITULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>1- A CARTILAGEM.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 - REPARAÇÃO E REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR. ....</b>	<b>15</b>
<b>2- CÈLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO.....</b>	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>21</b>
<b>CAPITULO II - O EFEITO DA FRAÇÃO ESTROMAL DO TECIDO ADIPOSO NO TRATAMENTO DE DEFEITOS OSTEOCONTRAIS EM COELHOS. ....</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIAL E METODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO I - COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>56</b>



## INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios na ortopedia veterinária e humana é o tratamento das lesões articulares que, se não tratadas de forma eficiente, podem levar à doença articular degenerativa (DAD). A DAD é uma alteração degenerativa, progressiva e potencialmente debilitante, sendo a alteração articular mais frequente tanto nos seres humanos quanto nos animais de companhia (Zak *et al.*, 2014).

Não existe um tratamento eficaz para reverter as alterações da DAD, portanto a melhor alternativa é a prevenção que consiste no tratamento adequado das lesões osteocondrais (Rodríguez-Merchán, 2012). Para o adequado tratamento dos defeitos osteocondrais, devem ser consideradas a extensão, a profundidade, o grau de acometimento dos tecidos adjacente, as estruturas articulares envolvidas e a deposição de carga na área lesionada. Com tantas variáveis a serem consideradas, o tratamento das lesões osteocondrais ainda é um desafio tanto do ponto de vista cirúrgico e farmacológico, quanto do desenvolvimento de substitutos para o tecido lesionado (Richter *et al.*, 2015).

A capacidade reparadora da cartilagem articular é limitada por ser um tecido desprovido de vascularização, sendo que sua nutrição depende do líquido sinovial e da difusão de nutrientes do osso subcondral (Moreira-Teixeira *et al.*, 2011). Quando a cartilagem é gravemente lesionada, ocorre um desequilíbrio no metabolismo tecidual, predominado os processos catabólicos em detrimento de anabólicos. Vários fatores estão envolvidos nesse processo, sendo os mais relevantes: o aumento da expressão de enzimas degradativas (metaloproteinases) e a redução da expressão de seus inibidores (Carballo *et al.*, 2017).

Os condrócitos, células responsáveis pela manutenção e reparação da matriz extracelular do tecido cartilaginoso, têm elevada atividade metabólica, requerendo nutrições adequadas para secretar matriz extracelular e reparar áreas lesionadas (Buckwalter, 1998). A função dos condrócitos na reparação da cartilagem é limitada, fazendo com que sua proliferação ocorra principalmente nas bordas da lesão, ou seja, a reparação do centro da lesão ocorre por outros tipos celulares, gerando um tecido fibroso ou fibrocartilaginoso (Costa *et al.*, 2001; Inouye *et al.*, 2002; Velosa *et al.*, 2003).

Devido às limitações supracitadas, vários métodos de tratamentos têm sido propostos como: microperfurações, enxerto de tecido osteocondral autólogo como: mosaicoplastia, transplante de tecido osteocondral e entre outras (Richter *et al.*, 2015), terapias celulares com condrócitos e/ou células tronco (Iamaguti *et al.*, 2012; Iamaguti *et al.*, 2013), terapias com fatores de crescimento (Silva *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013), uso de biomateriais (Alves *et al.*, 2015 ab; Pires *et al.*, 2015) e fármacos como glicosaminoglicanos, hidrolisados de colágeno, ácidos graxos ômega 3 e seus derivados ácido hialurônico (Miller & Clegg, 2011; Eleotério *et al.*, 2012). Entretanto, todas as terapias estudadas ainda apresentam inconvenientes.

O objetivo do presente trabalho é apresentar uma revisão de literatura sobre o tema e avaliar o efeito da fração estromal do tecido adiposo no tratamento de defeitos osteocondrais em joelho de coelhos.

## CAPITULO I - REVISÃO DE LITERATURA

### 1- A CARTILAGEM

O tecido cartilaginoso é uma forma especializada de tecido conjuntivo rígido. A função da cartilagem é dar sustentação para tecidos moles, envolver extremidades ósseas e promover melhor contato entre ossos adjacentes, reduzindo atritos e proporcionando superfícies deslizantes para as articulações. A cartilagem é fundamental para formação e crescimento dos ossos longos, além disso, é um tecido avascular e desprovido de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos próprios. Sendo assim, a cartilagem é nutrida por tecidos adjacentes ou pelo líquido sinovial no interior da cápsula articular (Samuelson, 2007; Junqueira, 2013).

As articulações sinoviais são recobertas por um tipo de cartilagem hialina, que está presente nas placas de crescimento epifisárias. Macroscopicamente tem aparência branca-azulada e consistência firme (Moreira-Teixeira *et al.*, 2011). Sua função principal é promover uma superfície lisa e lubrificada para a articulação e facilitar a transmissão de cargas com baixo coeficiente de fricção, entre as superfícies ósseas que formam a articulação (Buckwalter, 1998; Fox *et al.*, 2009).

A cartilagem é constituída por várias células, uma delas é o condrócito, responsável pela síntese de matriz extracelular (MEC), que proporciona alta resistência ao tecido. Essa célula, na forma jovem, é denominada condroblasto, possui mais organelas em relação ao condrócito em fase madura e maior capacidade mitótica. Em geral, os condrócitos são arredondados com bordas irregulares, apresentam-se isoladas ou agrupadas. O pericôndrio está presente nas cartilagens, exceto nas articulares e fibrosas, onde desempenha papel de envolver, nutrir e oxigenar o tecido cartilaginoso (Samuelson, 2007).

A matriz cartilaginosa é constituída por colágeno e macromoléculas de proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGS), ácido hialurônico e sulfatos de condroitina. Além disso, de acordo com a composição da matriz, as cartilagens se diferenciam em três tipos: hialina, elástica e fibrosa (Ross e Pawlina, 2012).

A cartilagem articular é composta por matriz extracelular e tipos celulares altamente especializados, um deles é o condrócito que representa 10% do tecido. A MEC é composta de água (60-80%), de fibras colágenas tipo II (10-20%), de

proteoglicanos (10-15%), de outras proteínas e de glicoproteínas não colágenas em quantidades menores (Buckwalter *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2009). O fluido sinovial desempenha um papel importante, reduzindo a fricção e o desgaste da articulação, sendo composto por moléculas de hialuronano, proteoglicano 4 e fosfolipídios tensoativos que são responsáveis pela parte biomecânica da cartilagem articular (Schmidt *et al.*, 2007; Carballo *et al.*, 2017). As concentrações dos componentes do fluido sinovial são variáveis de acordo com a condição articular (fisiológicas ou patológicas). Portanto, podem ser utilizados como biomarcadores em processos degenerativos e inflamatórios (Schmidt *et al.*, 2007).

A água é componente abundante na cartilagem articular e contribui em até 80% do peso úmido. Os íons inorgânicos, como o sódio, cálcio, cloreto e potássio, também são encontradas juntos com essa parte fluida, oferecendo transporte de nutrientes para condrócitos e lubrificação para o tecido (Bhosale e Richardson, 2008; Fox *et al.*, 2009).

O colágeno tipo II é a fibra mais abundante na cartilagem articular (90-95%); porém, outras fibras de colágeno do tipo III, VI, IX, X, XI e XIII, podem estar presentes. O colágeno tipo II é o principal elemento estrutural que confere resistência ao tecido. Sabe-se que, além da função de suporte, ele participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular, exercendo, também, atividade antigênica (Velosa *et al.*, 2003; Buckwalter *et al.*, 2005).

Os GAGs são carboidratos constituídos por unidades de dissacarídeos repetidos, resultando em 6 sub-unidades principais na cartilagem articular: sulfato de condroitina 4 e 6, sulfato de queratina, sulfato dermatan, sulfato heparan e ácido hialurônico (Carballo *et al.*, 2017). O proteoglicano é uma proteína polissacarídea com característica hidrofílica, além de manter o equilíbrio dos fluidos, eletrólitos e proporcionar resistência ao tecido articular. Os proteoglicanos encontrados na cartilagem articular podem se ligar a moléculas de colágeno tipo II formando grandes agregados que são denominados agregans. Pequenas moléculas de adesão e regulação celular com decorina, biglicano e fibromodulina também compõem o MEC. Todas sintetizadas no interior dos condrócitos e secretadas para o MEC (Bhosale e Richardson, 2008).

O condrócito que é a célula mais importante da cartilagem é originado de células tronco mesenquimais e o grande responsável pelo desenvolvimento, manutenção

e reparação de lesões por meio dos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (Alford e Cole, 2005). Qualquer lesão ou processo degenerativo altera a MEC e o processo de replicação dos condrócitos, faz com que diminua a capacidade de reparação do tecido articular. Sendo assim, o microambiente desta célula depende de um ótimo fator químico e mecânico para manter a homeostase do tecido cartilaginoso (Fox *et al.*, 2009; Carballo *et al.*, 2017).

Ross e Pawlina (2012) descreveram que a cartilagem articular é subdividida em 4 zonas:

**Zona superficial:** é uma região resistente à tração e ao cisalhamento entre as superfícies articulares é a camada delgada, composta por condrócitos de formato achatado e alongado, sendo circundada por fibras colágenas tipo I que estão dispostas paralelamente à superfície articular.

**Zona intermediária (transição):** situa-se abaixo da zona superficial e contém condrócitos esferoides. As fibras colágenas são espessas e distribuídas de forma menos organizadas na direção oblíqua à superfície articular, resistindo às forças de compressão e cisalhamento.

**Zona profunda (radial):** uma camada caracterizada por pequenos condrócitos esferoides que estão direcionados perpendicularmente à superfície articular. As fibras colágenas estão posicionadas paralelamente ao eixo longo do osso.

**Zona calcificada:** é caracterizada por ser o limite entre o tecido cartilaginoso, propriamente dito, e o osso subcondral, sendo denominada marca-d'água. Sua matriz calcificada, com presença de pequenos condrócitos, auxilia no crescimento intersticial de novas células que migram dessa região para a superfície articular no processo de reparação.

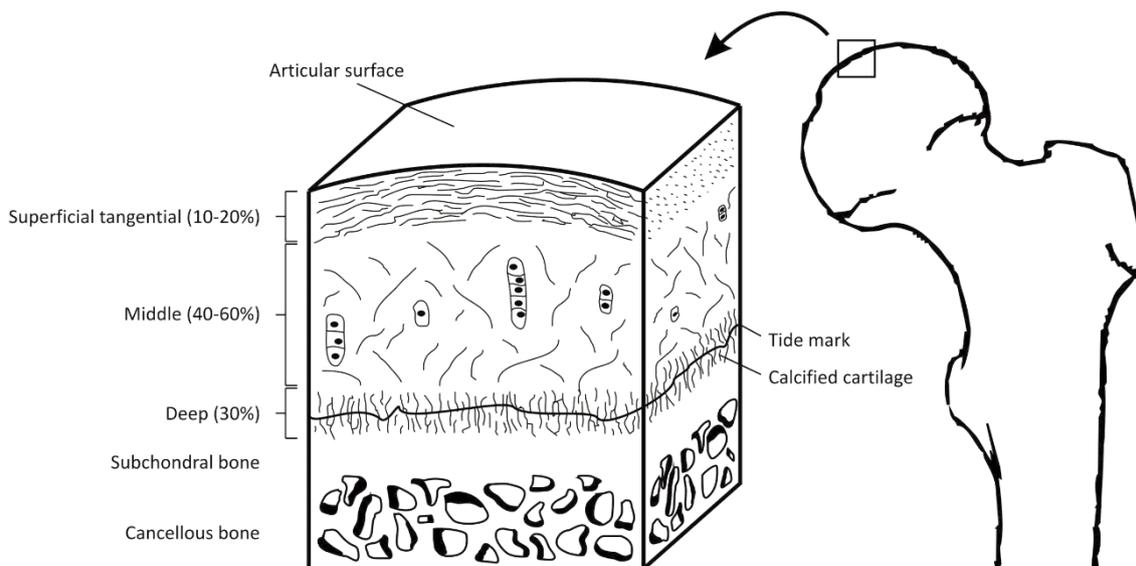


Figura 1. Camadas estruturais da cartilagem articular. Kelc et al (2013).

## 1.2 - REPARAÇÃO E REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR.

A reparação de uma lesão na cartilagem articular pode ocorrer por substituição de tecido lesado por um tecido semelhante à cartilagem (fibrocartilagem), em um processo denominado reparação, ou pela formação de tecido igual à cartilagem articular nativa no sítio da lesão, processo denominado regeneração (Bhosale e Richardson, 2008).

As lesões profundas da cartilagem articular, com perda de osso subcondral, são denominados “defeitos osteocondrais” e são um grande desafio para médicos ortopedistas. Tratar esta lesão é bastante complicado, pois envolve dois tecidos diferentes, com capacidade reparadora limitada, sendo um deles a cartilagem. A reparação dessas lesões, na maioria das vezes, ocorre por substituição da superfície articular, por tecido fibroso ou fibrocartilaginoso (Ynouye *et al.*, 2002; Iamaguti *et al.*, 2013).

As lesões da cartilagem articular se diferenciam em duas categorias: defeitos de espessura parcial, que não penetram no osso subcondral e não se reparam espontaneamente, e os defeitos de espessura total (defeito osteocondral) que penetram no osso subcondral (Cavalcanti *et al.*, 2012; Kelc *et al.*, 2013). O primeiro não possui capacidade de reparação espontânea, devido à ausência de vascularização; já os defeitos de espessura total, podem se reparar parcialmente de forma espontânea, por ser um

defeito que se prolonga até osso subcondral e proporciona acesso a células vindas dos vasos sanguíneos e medula óssea que, teoricamente, resulta em maior capacidade de reparo, dependendo do tamanho e localização. (Alford e Cole, 2005; Fitzgerald, 2017).

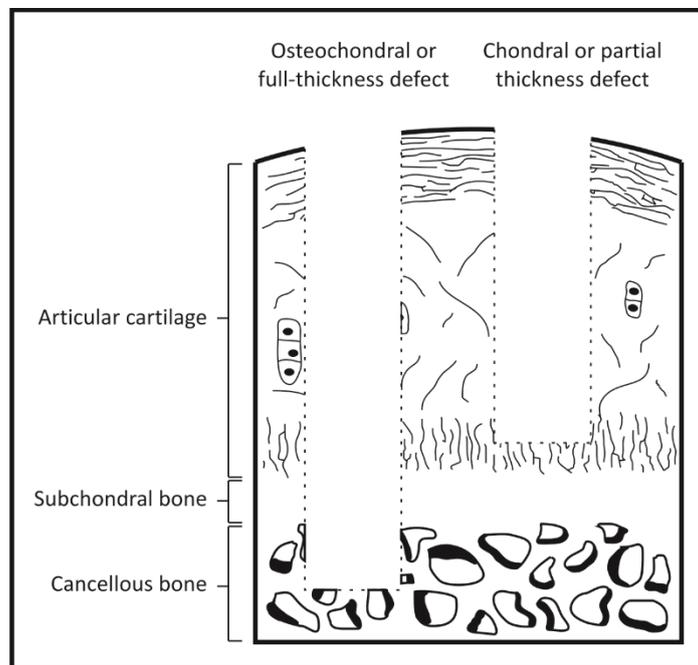


Figura 2. Defeitos da cartilagem articular de espessura parcial e total da cartilagem articular. Kelc et al (2013).

A reparação de uma lesão, quando se limita à linha da cartilagem articular hialina, é denominada defeito condral. Sendo assim, ela não obedece inteiramente às três fases de cicatrização que são a inflamatória, a proliferativa e de remodelamento por ser um tecido avascular, por outro lado, quando a lesão atinge o osso subcondral, ele obedece às três fases de cicatrização. O osso subcondral é um tecido vascularizado, colaborando para migração de células da medula óssea, estimulando os condrócitos a sintetizar matriz extracelular no sítio da lesão, portanto auxiliando no processo de reparação (Ribeiro *et al.*, 2004; Carballo *et al.*, 2017). A extensão e a profundidade influenciam na remodelação da lesão, assim pequenos defeitos osteocondrais têm maior chance de cicatrizar do que grandes defeitos osteocondrais. O tecido reparador (fibrocartilagem) que substituí a cartilagem hialina tem sua biomecânica e características bioquímicas inferiores ao tecido original da cartilagem articular (Alford e Cole, 2005; Khan *et al.*, 2008; Mirza e Oussedik, 2017).

O mecanismo da lesão acontece com sangramento localizado iniciando uma cascata hemostática e, assim, formando um hematoma no foco da lesão, havendo migração de células mesenquimais provenientes da medula óssea, que mais tarde se diferenciam em condroblastos, havendo assim síntese de colágeno tipo I, e sendo substituído por fibrocartilagem ao invés da cartilagem hialina nativa produzida pelos condrócitos (Alford e Cole, 2005; Minas, 2012; Kelc *et al.*, 2013).

O metabolismo do tecido cartilaginoso está associado a uma série de mediadores inflamatórios e citocinas responsáveis pela boa funcionalidade e manutenção do tecido. O condrócito influenciado por essas moléculas tem capacidade reguladora para degradar e sintetizar constituintes da MEC. Algumas são responsáveis pela inibição da síntese proteica e degradação da MEC, entre elas destacam-se as metaloproteinases (MMPs), enzimas que digerem as macromoléculas da matriz e as citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ). Outras proteínas são anabolizantes, estimulam formação de MEC e promovem atividade anabólica dos condrócitos para a manutenção da mesma. Dentre essas enzimas, destacam-se o fator de crescimento tumoral beta (TNF- $\beta$ ), o fator de crescimento da insulina (IGF-1), a proteína morfogênica óssea (BMP) e o fator de crescimento do fibroblasto (FGF) (Velosa *et al.*, 2003; Kelc *et al.*, 2013; Carballo *et al.*, 2017).

Há uma variedade de estudos que investigaram formas de tratar lesões articulares, entre eles alguns propuseram técnicas cirúrgicas para o tratamento como condroplastia, debridamento, perfuração, microfratura, implantação autógena de condrócitos [IAC], transferência de autoenxerto osteocondral [TAO], sempre tentando o melhor resultado para que proporcione reparação ou regeneração da cartilagem articular (Richter *et al.*, 2015). No entanto, até o presente momento, não se descobriu um tratamento ideal e vários estudos têm sido conduzidos na expectativa de melhorar os resultados. Dentre eles estão estudos utilizando fatores de crescimento, biomateriais e célula-tronco.

## **2- CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO.**

As células-tronco (CT) são uma das esperanças mundiais para o tratamento de doenças em que terapias convencionais não são eficientes. As CT podem ser encontradas em todos os tipos de tecido em maior ou menor quantidade (Stefanutto *et al.*, 2013), mas os tecidos mais utilizados como fonte de células-tronco adultas são a medula óssea e o tecido adiposo (Alves *et al.*, 2017ab). As CT são células indiferenciadas, com alta capacidade de multiplicação e diferenciação em outros tipos celulares se estimuladas adequadamente. Elas podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação como: células totipotentes, que podem se diferenciar em qualquer tipo de célula do organismo adulto; células pluripotentes, capazes de se diferenciarem em todos os tipos de tecido, exceto da placenta e anexos fetais; células multipotentes, possuem capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares e podem ser extraídas de um indivíduo adulto; células oligopotentes, que possuem capacidade de se diferenciarem em poucos tipos celulares e células unipotentes, que se diferenciam em apenas um único tipo de células especializada (Wagers e Weisman, 2004). As CT também podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTE) quando obtidas na fase de blastocisto ou em células-tronco adultas (CTA), quando obtidas após a fase embrionária, podendo ser colhidas de indivíduos jovens, adultos ou geriátricos. As CTE podem ser totipotentes ou pluripotentes, já as CTAs, podem ser multipotentes ou unipotentes (Martins *et al.*, 2014).

As CTAs mais estudadas são as células-tronco mesenquimais (CTM), que são indiferenciadas e possuem um elevado potencial de diferenciação e autorrenovação. As CTMs podem ser facilmente obtidas de um indivíduo adulto a partir de vários tecidos, como tecido adiposo, medula óssea, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos (Murray *et al.*, 2014; Mirza e Oussedik, 2017). As CTM podem ser colhidas do próprio paciente, expandidas *in vitro* e reintroduzidas no sítio da lesão, não havendo risco de rejeição. Entretanto, o uso de CTMs autógenas também pode apresentar limitações com a diminuição do número nos tecidos e redução do potencial proliferativo e de diferenciação com o avançar da idade do paciente (Heng *et al.*, 2004; Kraus e Kirker-Head, 2006). A terapia com CTMs alógenas é uma alternativa para esses

casos, uma vez que elas possuem capacidade de imunomodulação, reduzindo as chances de resposta imunológica no indivíduo que as recebe (Niermeyer *et al.*, 2007).

Acredita-se que as CTMs sejam o tipo celular responsável pela manutenção de vários dos tecidos do organismo. *In vitro*, as CTMs podem se diferenciar em qualquer célula de origem mesenquimal como osteoblastos, condroblasto, tenócitos, mioblastos e adipócitos, o que é promissor para o tratamento de doenças degenerativas (Caplan, 2015). As CTMs derivadas da medula óssea e do tecido adiposo são as mais estudadas por ter maior facilidade na coleta, isolamento e expansão *in vitro*.

Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*The International Society for Cellular Therapy*) padronizou critérios mínimos para classificar uma célula como CTM. Estabeleceu-se que as CTMs devem apresentar morfologia semelhante à de fibroblastos, possuir capacidade de aderência ao plástico e de se diferenciar em pelo menos três tipos celulares: adipócitos, osteoblastos e condrócitos. Além disso, as CTM devem apresentar um perfil de expressão de proteínas de superfície positivo para CD105, CD73 e CD90 e negativo para CD 45 e CD34 (Dominici *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos com células troncos mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-AD) foram realizados por Zuk *et al.*, (2001) e, desde então, esse tipo celular tem sido amplamente estudado em outras espécies como ratos, camundongos, coelhos, cães e suínos (Vieira *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2017b). As CTM-AD apresentam muitas vantagens como maior facilidade na coleta e isolamento e sofrem menos influência de fatores como idade (Kim *et al.*, 2012), doença coexistentes (Veronesi *et al.*, 2011), uso de fármacos, etc. (Muller *et al.*, 2011). Além disso, o tecido adiposo é abundante no organismo, podendo ser encontrado em várias estruturas intra-abdominais, no subcutâneo e em outros locais. Sua coleta pode ser realizada pelas técnicas de lipoaspiração ou biópsia. Para isolamento da CTM-AD, o tecido adiposo deve ser processado. Após a coleta, o tecido adiposo é mecanicamente fragmentado e submetido à digestão enzimática (colagenases) para liberação das células. Após essa etapa, procede-se à centrifugação, separando o material em três fases. As fases superiores são compostas por adipócitos, lipídeos e solução aquosa, componentes sem utilidade terapêutica. A fase inferior (fração vaso-estromal) é composta por células vasculares e estromais, dentre as quais estão as CTMs, que devem ser isoladas durante

os processos seguintes de cultivo e expansão *in vitro* (Zuk *et al.*, 2001; Mizuno, 2009; Alves *et al.*, 2017ab).

Os efeitos terapêuticos das CTMs podem ser exercidos pela sua diferenciação nas células lesionadas e reparação do tecido ou pode ocorrer por intermédio de fatores de ação parácrina secretados pelas CTM em resposta a estímulos do microambiente da lesão (Rasmussom, 2006; Bifari *et al.*, 2008). Quando as CTM estão em um microambiente rico em citocinas pró-inflamatórias, elas adquirem um perfil de secreção anti-inflamatório, inibindo mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas-10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Yi e Song, 2012; Lee e Song, 2018). Conseqüentemente, há redução do número de células T-reguladoras e T-citotóxicas, diminuído a secreção do interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Outras ações incluem a secreção de mediadores que estimulam a diferenciação, mitose e angiogênese no tecido lesado (Caplan e Dennis, 2006; Franck *et al.*, 2017). Entretanto, não se sabe ao certo o mecanismo de reparação que as CTMs têm sobre as lesões da cartilagem articular, mas é claro que seus efeitos parácrinos e condrogênicos contribuem para essa reparação (Mirza e Oussedik, 2017; Kristjánsson e Honsawek, 2017).

Tanto as CTM-AD quanto as células tronco de origem medular (CTM-MO) já foram testadas como terapia para doenças da cartilagem, e os resultados são promissores. Em um estudo em que as CTM-AD foram utilizadas para tratamento de osteoartrites (OA) através de aplicações intra-articulares, houve significativa redução da dor e melhora da função do membro nesses pacientes humanos (Koh e Choi, 2012). Outro estudo mostrou que altas concentrações de CTM-AD são capazes de promover não só a redução da dor, mas também de melhorar a qualidade da cartilagem articular em pacientes com OA (Jo *et al.*, 2014). O efeito imunomodulador das CTM-AD também já foi estudado e mostrou-se eficiente no tratamento de lesões articulares localizadas e evitando a degeneração articular (Riordan *et al.*, 2009).

Parte dos estudos com células troncos é voltado para o desenvolvimento de técnicas de isolamento e utilização clínica que sejam simples e baratas, visando a disponibilização desse tipo de terapia para um número maior de pacientes com doenças articulares. Assim protocolos têm sido revistos e simplificados (Alves *et al.*, 2017b).

## REFERÊNCIAS

- ALFORD, J.W.; COLE B.J. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med.* v. 33, n. 2, p. 295-306, 2005.
- ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; BOELONI, J.N. et al. Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 36, p.21-32, 2017a.
- ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; ROSADO, I.R. et al. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. *Ciênc. anim. bras.*, v. 18, p. 1-14, 2017b.
- ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; ROSADO, I.R.; et al. Efeito do produto iônico do biovidro 60S na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 67, n. 4, p. 969-978, 2015a.
- ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; ROSADO, I.R.; et al. Matriz porosa do BV60S no tratamento de defeitos ósseos críticos em raios de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 67, n. 4, p. 993-1002, 2015b.
- BHOSALE A.M, RICHARDSON J.B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin.*, v. 87, ed .1, p. 77–95, 2008.
- BIFARI, F.; LISI, V.; MIMIOLA, E.; PASINI, A. et al. Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells., *Transfus Med Hemother.*,v. 35, p. 194–204, 2008.
- BUCKWALTER, J.A. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.*, v. 28, p. 192-202, 1998.
- BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J.; GRODZINSKY, A.J. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.*, v. 54, cp. 45, p. 465-480, 2005.
- CAPLAN, A. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int.*, v.2015, p. 628-767, 2015.
- CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.*, v.98, n. 5, p. 1076-84, 2006.
- CARBALLO, C.B.; NAKAGAWA, Y.; SEKIYA, I.; RODEO, S.A. Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in Sports Medicine.*, v. 36, n. 3, p. 413-425, 2017.

- CAVALCANTI FILHO, M.M.C.; DOCA, D.; COHEN, M. et al. Atualização no diagnóstico e tratamento das lesões condrais do joelho. *Rev Bras Ortop.*, v. 47, n.1, p.12-20, 2012.
- COSTA, A.; OLIVEIRA, C.; LEOPIZZI, N.; AMATUZZI, M. The use of demineralized bone matrix in the repair of osteochondral lesions. Experimental study in rabbits. *Acta Ortop Bras.*, v.9, p.27–38, 2001.
- DOMINICI, M.L.; Le BLANC, K.; MUELLER, I.; et al. Minimal criteria for defining multipotencial mesenquimal stromal cells. *The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy.* v. 8, p.315-317, 2006.
- ELEOTÉRIO, R.B.; BORGES, A.P.B.; PONTES, K.C.S.; FERNANDES, N.A. et al. Glucosamine and chondroitin sulfate in the repair of osteochondral defects in dogs – clinical-radiographic analysis. *Rev. Ceres*, v. 59, n. 5, p. 587-596, 2012.
- FITZGERALD, J. Enhanced cartilage repair in ‘healer’ mice—New leads in the search for better clinical options for cartilage repair. *Semin Cell Dev Biol.* v. 62, p. 78-85, 2017.
- FOX, S.A.J.; BEDI, A.; RODEO, S.A. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health.*, v. 1(6), p. 461-468, 2009.
- FRANCK, C.L.; RIBAS-FILHO, M.J.; SENEGAGLIA, A.C.; GRAF, M.R. et al. The complexity of burn healing and the possibility of adipose tissue-derived stem cell therapy: review. *Rev Bras Queimaduras.*, v.16, n.2, p.111-116, 2017.
- HENG, B.C.; CAO, T.; LEE, E.H. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells.*, v. 22, p. 1152-1167, 2004.
- IAMAGUTI, L.S.; BRANDÃO, C.V.S.; MOTA, L.S.L.S.; SERENO, M.G. et al. Reparação de defeitos osteocondrais de cães com implante de cultura de condrócitos homólogos e membrana biossintética de celulose: avaliação, clínica, ultrassonográfica e macroscópica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 64, n. 6, p. 1483-1490, 2012.
- INOUE, C. M.; FAGUNDES, D. J.; FALOPPA, F, NOVO, N. F. et al. Estudo morfológico da articulação do joelho de coelhos após a reparação de um efeito osteocondral. *Acta Cir Bras.*, v.17, n.1, p. 403-9, 2002.
- IAMAGUTI, L.S.; BRANDÃO, C.V.S.; MOTA, L.S.L.S.; RANZANI, J.J.T. et al. Implante de condrócitos homólogos em defeitos osteocondrais de cães: padronização da técnica e avaliação histopatológica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 65, n. 1, p. 82-90, 2013.

- JO, C.H.; LEE, Y.G.; SHIN, W.H. et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells.*, v.32, p. 1254–1266, 2014.
- JUNQUEIRA, L.C.U. *Histologia básica: texto/atlas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., Ed. 12, p. 538, 2013.
- KELC, R.; NARANDA, J.; KUHTA, M.; VOGRIN, M. The Physiology of Sports Injuries and Repair Processes. In *Current Issues in Sports and Exercise Medicine*, 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/current-issues-in-sports-and-exercise-medicine/the-physiology-of-sports-injuries-and-repair-processes>. Acessado em: 19 dez.2017.
- KHAN, I.M.; GILBERT, S.J.; SINGHRAO, S.K., et al. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair, a review. *Eur Cell Mater.*, v. 16, p. 26-39, 2008.
- KIM, M.; KIM, C.W.; CHOI, Y.S.; et al. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech Ageing Dev.*, v.133, p.215-225, 2012.
- KOH, Y.G.; CHOI, Y.J. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee.*, v.19, p.902–907, 2012.
- KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD. C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.*, v. 35, p. 232-242, 2006.
- KRISTJÁNSSON, B.; HONSAWEK, S. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *World J Orthop.*, v.8, n.9, p. 674-680, 2017.
- LEE, D.K.; SONG, S.U. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cellular Immunology.*, v. 326, p. 68-76, 2018.
- MARTINS, G.R.; TEIXEIRA, M.F.S.; BZERRA JUNIOR, R.Q. et al. Células-tronco mesenquimais: características, cultivo e uso na Medicina Veterinária. *Rev Bra Hig e San Animal.*, v. 8, n. 2, p. 181-202, 2014.
- MILLER, K.L.; CLEGG, D.O. Glucosamine and Chondroitin Sulfate. *Rheum Dis Clin North Am.*v. 37, n. 1,p. 103-118, 2011.
- MINAS, T. A primer in cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br.*, v.94b, n. 11 p. 141–146,2012.

- MIRZA, Y.H.; OUSSEDIK, S. Is there a role for stem cells in treating articular injury. *Br J Hosp Med (Lond)*, v. 78, n. 7, p.372-377, 2017.
- MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.*, v.76, n.2, p.56-66, 2009.
- MOREIRA-TEIXEIRA, L.S.; GEORGI N.; LEIJTEN, J.; WU, L.; KAPERIEN, M. Cartilage tissue engineering. *Endocr Dev.*, v. 21, p. 102–15, 2011.
- MULLER, M.; RAABE, O.; ADDICKS, K. et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.*, v.35, p.235-248, 2011.
- MURRAY, I.R.; CORSELLI, M.; PETRIGLIANO, F.A. et al. Recent insights into the identity of mesenchymal stem cells. *Bone Joint J.*, v. 96, p.291–298, 2014.
- NIERMEYER, P.; KORNACKER, H.; MEHLHORN, A. et al. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng.*, v. 13, p. 111-121, 2007.
- RASMUSSOM, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.*, v. 312, n. 12, p. 2169-2179, 2006.
- RIBEIRO, J.L.; CAMANHO, G.L.; TAKITA, L.C. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. *Acta Ortop Bras.*, v. 12, p. 16-21, 2004.
- RICHTER, D.L.;SCHENCK, R.C.; WASCHER, D.C. et al. Knee articular cartilage repair and restoration techniques: a review of the literature. *Sports Health.*, v. 20, n.10, 2015.
- RIORDAN, N.H.; ICHIM, T.E.; MIN,W-P. et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med.*, v. 7, p. 29, 2009.
- RODRÍGUEZ-MERCHÁN, E. C. The treatment of cartilage defects in the knee joint: microfracture, mosaicoplasty, and autologous chondrocyte implantation. *Am. J. Orthop.*, v. 41, n. 5, p. 236-239, 2012.
- ROSS, M.H.; PAWLINA, W. *Histologia: texto e atlas: em correlação com biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 6. ed, p. 987, 2012.
- SAMUELSON, D.A. *Tratado de histologia veterinária*. Rio de Janeiro. Elsevier., p. 527, 2007.

SCHMIDT, T.A.; GASTELUM, N.S.; NGUYEN, Q.T. et al. Boundary Lubrication of Articular Cartilage: Role of Synovial Fluid Constituents. *Arthritis & rheumatism.*, v. 56, n. 3, p. 882-891, 2007.

SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. Intra-articular injections of autologous platelet concentrates in dogs with surgical reparation of cranial cruciate ligament rupture. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology.*, v. 26, p. 285-290, 2013.

STEFANUTTO, J.C.; DAL MOLIN, M.M.; EMANUELLI, I.P. Técnicas Para Isolamento de Células Tronco Mesenquimais Extraídas de Tecido Adiposo. In: VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, 2013. Disponível em:[http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2013/oit\\_mostra/Jessica\\_Cristina\\_Stefanutto\\_02.pdf](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2013/oit_mostra/Jessica_Cristina_Stefanutto_02.pdf).

HIN, T. S. ENGINEERING MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. *Singapore: World Scientific.*, p. 1-15, 2004.

VELOSA, A.P.P.; TEODORO, W.R.; YOSHINARI, N.H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. *Revista Brasileira Reumatologia*, v. 43, n.3, p. 160-166, 2003.

VERONESI, F.; TORRICELLI, P.; BORSARI, V.; et al. Mesenchymal stem cells in the aging and osteoporotic population. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, v.21, p.363-377, 2011.

VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; et al. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.*, v.19, p.279-289, 2010.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v.116, p.639-648, 2004.

YI, T.; SONG, S.U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.*, v. 35, n. 2, p. 213-221, 2012.

ZAK, L.; KRUSCHE-MANDL, I.; ALDRIAN, S. et al. Clinical and MRI evaluation of 420 medium- to long-term results after autologous osteochondral transplantation (OCT) in the knee joint. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, v. 22, n. 6, p. 1288-1297, 2014.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

ZHANG, N.; WU, Y.P.; QIAN, S.J.; TENG, C.; CHEN, S.; LI, H. Research progress in the mechanism of effect of PRP in bone deficiency healing. *The Scientific World Journal*, p.1-7, 2013.

## **CAPITULO II - O EFEITO DA FRAÇÃO ESTROMAL DO TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DE DEFEITOS OSTEOCONTRAIS EM COELHOS.**

*[The effect of stromal fractionation of adipose tissue on the treatment of osteochondral debris in rabbits.*

Oliveira. A.O<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Universidade de Uberaba - Uberaba, MG

### **RESUMO**

Um grande desafio encontrado por profissionais da ortopedia tanto da medicina veterinária quanto humana, é o tratamento de forma eficaz das lesões articulares, que podem, posteriormente, evoluir para doença articular degenerativa (DAD). A utilização de células tronco (CT) traz consigo esperança para o tratamento de diversas patologias, podendo ser extraídas de diferentes tecidos, mas principalmente, medula óssea e o tecido adiposo. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da eficiência da fração estromal derivada do tecido adiposo no tratamento de defeitos osteocondrais em coelhos. Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia de coloração branca, onde realizamos um defeito osteocondral no sulco troclear nas articulações desses animais e outros 12 animais onde foram coletados o tecido adiposo na região panículo adiposo para a realização da digestão do tecido e obter a fração estromal do tecido adiposo, posteriormente, divididas em três tempo de digestão 30, 40 e 50 minutos. Os grupos que realizaram o defeito nas articulações, foram divididos em controle negativo (C-), fração estromal do tecido adiposo (FETA) e controle positivo (C+) com enxerto autógeno osteocondral. Os resultados dos tempos de digestão do tecido adiposo não mostraram diferença significativa entre os tempos. As avaliações clínicas, radiográficas, macroscópicas e histopatológica mostraram que os efeitos terapêuticos da fração estromal do tecido adiposo, mostrou minimizar os sinais degenerativos da cartilagem articular no tratamento defeitos osteocondrais em coelhos.

**Palavras-chaves:** Coelho, células mesenquimais, articulação.

## ABSTRACT

*A major challenge encountered by orthopedic professionals in both veterinary and human medicine is the effective treatment of joint injuries, which may later develop into degenerative joint disease (DAD). The use of stem cells (TC) brings hope for the treatment of various pathologies, which can be extracted from different tissues, but especially bone marrow and adipose tissue. The present work aimed to evaluate the efficiency of adipose-derived stromal fraction in the treatment of osteochondral defects in rabbits. Twenty-four white New Zealand rabbits were used, where we performed an osteochondral defect in the trochlear groove in the joints of these animals and 12 other animals where adipose tissue was collected in the adipose panicle region to perform tissue digestion and to obtain the stromal fraction. of the adipose tissue, subsequently divided into three digestion times 30, 40 and 50 minutes. The groups that performed the joint defect were divided into negative control (C-), stromal adipose tissue fraction (FETA) and positive control (C +) with osteochondral autogenous graft. Results of adipose tissue digestion times showed no significant difference between times. Clinical, radiographic, macroscopic and histopathological evaluations showed that the therapeutic effects of adipose tissue stromal fraction showed to minimize the degenerative signs of articular cartilage in the treatment of osteochondral defects in rabbits.*

*Keywords: Rabbit, mesenchymal cells, joint.*

## INTRODUÇÃO

As células tronco (CT) são uma das esperanças mundiais para o tratamento de doenças que terapias convencionais não são eficientes. As CT podem ser encontradas em todos os tipos de tecidos em maior ou menor quantidade (Stefanutto *et al.*, 2013), sendo assim o tecido mais utilizados como fonte de células tronco mesenquimais (CTM) são a medula óssea e o tecido adiposo (Alves *et al.*, 2017ab). As CTM são células indiferenciadas, com alta capacidade de multiplicação e diferenciação em outros tipos celulares como osteócitos, condrócitos, tenócitos, miócitos e adipócitos, se estimuladas adequadamente. Elas também possuem um elevado potencial de autorrenovação que se torna promissor para o tratamento de doenças degenerativas (Murray *et al.*, 2014; Caplan, 2015; Mirza e Oussedik, 2017).

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-AD) apresentam muitas vantagens como a facilidade de colheita e isolamento, menor influência de fatores idade (idoso) (Kim *et al.*, 2012), doença coexistentes (Veronesi *et al.*, 2011) e outros fatores externos como o uso de fármacos (Muller *et al.*, 2011). Além da possibilidade de diferenciação das CTM-AD no tecido lesado, elas também apresentam um efeito imunomodulador, sendo que é de fácil extração e utilização as CTM-AD no tratamento de doenças articulares degenerativas (Rasmusson, 2006; Bifari *et al.*, 2008; Lee e Song, 2017).

Alguns tecidos como a cartilagem articular possuem capacidade de reparação limitada por ser desprovida de vascularização, sua nutrição depende do líquido sinovial e da difusão de nutrientes do osso subcondral (Buckwalter, 1998; Buckwalter *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2009; Moreita-Teixeira *et al.*, 2011). Além disso, a composição e arquitetura da matriz extracelular são complexos o que dificulta ainda mais o processo de reparação ou regeneração (Bhosale e Richardson, 2008).

Assim sendo, um dos grandes desafios na ortopedia veterinária e humana é o tratamento das lesões osteoarticulares. A maior complicação das lesões articulares é o desenvolvimento de doença articular degenerativa (DAD), que é uma alteração irreversível, progressiva e potencialmente debilitante sendo a alteração articular mais frequente tanto nos seres humanos quanto nos animais de companhia (Zak *et al.*, 2014). O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da fração estromal derivada do tecido adiposo no tratamento de defeitos osteocondrais em coelhos.

## **MATERIAL E METODOS**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba – CEEA/UNIUBE, sob o protocolo do nº 033/2014. O projeto utilizou as bases físicas e a infraestrutura do Centro de Pesquisa em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Hospital Veterinário de Uberaba UNIUBE.

### **Animais**

Foram utilizados trinta e seis coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, machos, de 3 a 4 meses de idade, com massa corporal média de 2,5 Kg provenientes de uma cunicultura comercial do município de Uberaba. Os animais foram mantidos no Hospital Veterinário de Uberaba, alojados em gaiolas individuais com 60x60x37 cm próprias para criação de coelhos onde receberam ração comercial para coelhos (Presence coelhos, Presence, Brasil) e água *ad libitum*. Durante o período de quarentena os animais foram vermifugados com ivermectina 0,4mg/kg, SC (Ivomec 1%, injetável, Merial, Brasil), receberam medicação ectoparasiticida tópica (Frontline Spray, Merial, Brasil).

Para padronização do protocolo de obtenção da fração estromal de tecido adiposo foram utilizados 12 coelhos.

Para avaliação da fração estromal do tecido adiposo no tratamento de defeitos osteocondrais foram utilizados 24 coelhos, totalizando 48 articulações femorotibiopatellares (FTP). As articulações direitas foram aleatoriamente divididas em dois grupos experimentais com 12 articulações cada. Um grupo foi tratado com fração estromal do tecido adiposo (FETA) e outro com enxerto osteocondral autógeno constituindo o controle positivo (C+). Os defeitos osteocondrais das articulações FTPs esquerdas não foram tratados constituindo o controle negativo (C-).

### **Padronização da obtenção da Fração Estromal de Tecido Adiposo em coelhos.**

Para coleta do tecido adiposo do panículo adiposo os animais foram anestesiados com xilazina (Xilazin<sup>®</sup>, Syntec, Brasil) 5mg/kg IM e cetamina (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec, Brasil) 40mg/kg IM. A região interescapular foi submetida à tricotomia e a

antisepsia foi feita com solução clorexidine degermante (Riohex 2%<sup>®</sup>, Rio química, Brasil) e alcoólica (Riohex 0,5%<sup>®</sup>, Rio química, Brasil). O campo operatório foi preparado de forma asséptica. Realizou-se uma incisão de pele com cerca de 3 cm na linha média dorsal na região interescapular, o subcutâneo foi divulsionado e foram colhidos 5 mL de tecido adiposo da bolsa adiposa interescapular. O tecido subcutâneo foi suturado em padrão simples contínuo com fio 3-0 (Mononylon<sup>®</sup>, Ethicon, Brasil) e dermorráfia em padrão simples separado com fio 3-0 (Mononylon<sup>®</sup>, Ethicon, Brasil).

As amostras de tecido adiposo foram acondicionadas em tubo falcon de 50 mL estéril contendo 25 mL de solução fisiológica 0,9% e, imediatamente, encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos para o processamento. Toda a manipulação das amostras foi realizada de forma asséptica em capela de fluxo laminar. Inicialmente as amostras foram agitadas para retirada de restos de sangue e debris celulares e transferidas para um novo tubo falcon de 50 mL contendo 20 mL da solução de colagenase tipo I 0,1% (Roche<sup>®</sup>, Germany) diluída em PBS 0,015M. Com auxílio de uma tesoura o tecido foi fragmentado, gerando partículas com cerca 3 mm. Em seguida, as amostras foram divididas em 3 tempos de digestão, permanecendo em estufa a 37,5°C durante 30, 40 e 50 minutos. Durante a digestão as amostras foram agitadas vigorosamente com intervalos de 5 minutos. Transcorridos os tempos de digestão, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1400rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo a fração estromal foi ressuspenso em 20 mL PBS 0,015 M para lavagem e retirada dos resíduos de colagenase. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1400rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi avaliado quanto à viabilidade celular pelo azul de *Tripan*. As células obtidas da fração estromal do tecido adiposo foram colocadas em microcubos tipo *ependorf*, diluídas 1:50 em PBS 0,015M e coradas pelo azul de *Tripan*. As células viáveis (não coradas) e inviáveis (azuis) foram quantificadas em uma câmara de Neubauer para determinação do número de células viáveis. O número de células viáveis de cada tempo de digestão foi submetido à análise de variância (Anova), ao teste de Kolmogorov-Smirnov e as médias comparadas pelo teste T não pareado com 5% de significância.

### **Criação dos defeitos osteocondrais e tratamentos**

As cirurgias foram realizadas no centro cirúrgico do Hospital Veterinário de Uberaba. Os animais foram anestesiados com xilazina 5mg/kg, IM (Xilazin<sup>®</sup>, Syntec, Brasil) e cetamina 40mg/kg, IM (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec, Brasil), seguido de bloqueio peridural lombossacral com bupivacaína 0,5% 0,22mL/Kg (Neocaína<sup>®</sup>, Cristália, Brasil) e Morfina 0,1mg/kg (Dimorf<sup>®</sup>, Cristália, Brasil). Estabeleceu-se um acesso vascular na veia cefálica para infusão de Ringer com lactato 3 ml/kg/h. Os membros pélvicos foram submetidos á tricotomia da região da pélvica até os tarsos e foram administrados ceftriaxona sódica 40 mg/kg, IM (Eurofarma, Brasil) e meloxicam 0,1mg/kg, IM (Maxicam<sup>®</sup> 0,2%, Ouro Fino, Brasil).

Os coelhos foram posicionados em decúbito dorsal, o campo cirúrgico foi preparado para cirurgia asséptica com clorexidine degermante (Riohex<sup>®</sup>2%, Rio química, Brasil) e alcoólica (Riohex<sup>®</sup> 0,5%, Rio química, Brasil), seguindo-se á colocação dos panos de campo. Realizou-se o acesso craniolateral à articulação femorotibiopatelar direita e, afastando-se medialmente a patela, localizou-se o terço médio do sulco troclear, local eleito para criação do defeito osteocondral (Kawamoto *et al.*, 2018). Com o auxílio de uma broca e um limitador de perfuração, foi realizado um orifício com 5 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade no local eleito (Figura 1). Os defeitos (orifícios osteocondrais) das articulações direitas dos animais do grupo FETA e C+ foram preenchidos, respectivamente, com 0,3mL da fração estromal do tecido adiposo (FETA) (Figura 1) e com enxerto osteocondral macerado, que retiramos no momento em que inserimos a broca para realização do orifício (defeito osteocondral) no sulco troclear e recolocando o tecido macerado novamente no orifício. Os defeitos das articulações esquerdas não foram preenchidos, constituindo o controle negativo. A síntese tecidual foi realizada em três planos. Inicialmente realizou-se a sutura da cápsula articular em padrão simples separado, depois a redução do subcutâneo com simples contínuo e, finalmente, a dermorrafia em simples separado, o fio utilizado em todos os planos foi o náilon 3-0 (Mononylon<sup>®</sup>, Ethicon, Brasil). Após a cirurgia, os animais receberam morfina 5mg/kg, SC a cada 6 horas nas primeiras 24 horas. No segundo e terceiro dia, após a cirurgia, os animais receberam tramadol 5 mg/kg, SC (Tramadon, Cristália, Brasil) a cada 12 horas.

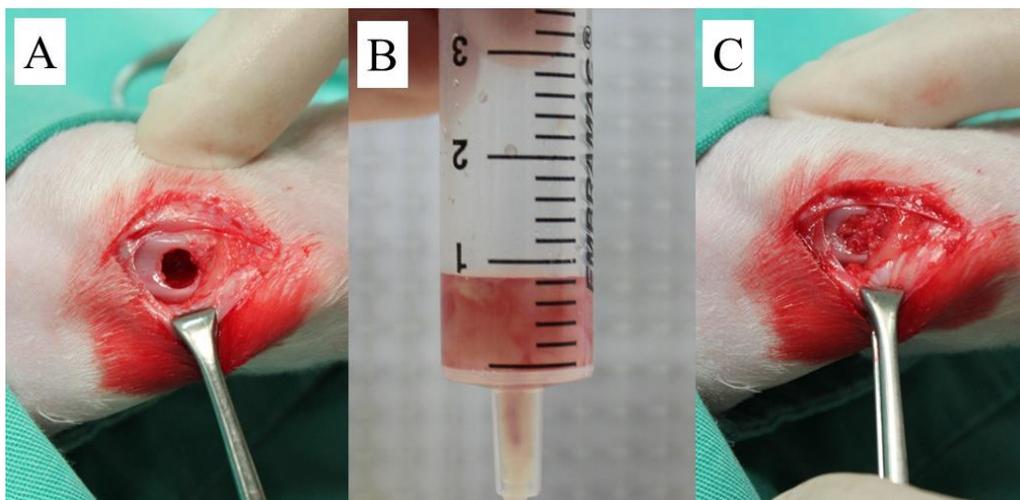


Figura 1. Imagem do defeito osteocondral criado no sulco troclear de coelhos (A) para avaliação do efeito terapêutico da fração estromal do tecido adiposo (FETA) (B). Na imagem C é possível observar o defeito preenchido com o macerado de osso autógeno (controle +)

#### **Avaliação clínica e radiográfica**

Foi realizada avaliação clínica da locomoção dos animais diariamente durante os 15 primeiros dias de pós-operatório e, após esse período, a cada 7 dias até o 43º dia em metade dos animais e até o 85º dia, no restante dos animais. Os animais foram avaliados em estação, ao caminhar e ao correr, em um campo aberto com 1,5m de diâmetro e foram atribuídos escores de claudicação: Ausência claudicação (0), claudicação discreta (1), claudicação moderada (2) e claudicação grave (3) de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Classificação da deambulação de ratos segundo o grau e critérios de utilização

<b>Escore</b>	<b>Critério de classificação</b>
<b>0</b>	Claudicação ausente; apoio completo de membro com o animal em estação ou durante a atividade física.
<b>1</b>	Claudicação esporádica ao caminhar ou correr, com alívio de peso sobre o membro operado, inclusive em estação.
<b>2</b>	Claudicação constante ao caminhar e não apoio do membro ao correr, apoio incompleto em posição ortostática.
<b>3</b>	Apoio incompleto ou ausente durante a locomoção ou em estação.

Fonte: Brandão *et al.*, 2013.

Foram realizadas avaliações radiográficas no pós-operatório imediato e aos 15, 30, 45 em todos os animais e aos 60, 75 e 90 dias em metade dos animais de cada grupo. Foram realizadas duas exposições radiográficas nas projeções médio-lateral e crânio-caudal. Para obtenção da área de neoformação óssea aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias foram utilizadas as projeções médio-laterais. Mensurou-se a área de radiolucência (não preenchida) no defeito osteocondral e a área de neoformação óssea foi obtida pela diferença entre a área de radiolucência no pós-imediato menos a área de radiolucência de cada tempo de avaliação.

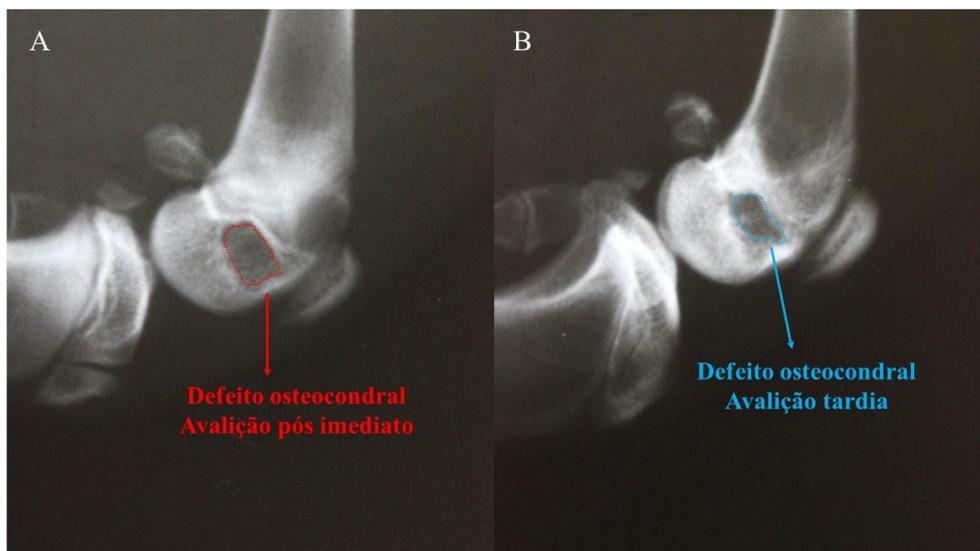


Figura 2. Imagem esquemática para ilustrar a quantificação do osso neoformado em cada tempo de avaliação. A área de osso neoformado foi obtida pela diferença entre a área de radiolucência no pós-imediato (área contornada em vermelho na imagem A) e a área de radiolucência em cada tempo de avaliação (área contornada em azul na imagem B).

### **Avaliação macroscópica e histopatológica**

A avaliação macroscópica das articulações femorotibiopatelares foi realizada após eutanásia utilizou os escores detalhados a seguir. Seis animais de cada grupo foram avaliados aos 45, e outros seis, aos 90 dias de pós-operatório. Para realização da eutanásia, os animais foram anestesiados com xilazina 15mg/kg, IM (Xilazin<sup>®</sup>, Syntec, Brasil) e cetamina 40mg/kg, IM (Cetamin<sup>®</sup>, Syntec, Brasil). A veia cefálica foi cateterizada e aplicou-se tiopental sódico 100mg/kg, IV (Thiopentax<sup>®</sup>, Critália, Brasil) seguido de 20 mL de cloreto de potássio 19,10% (Isofarma<sup>®</sup>, Brasil).

Os escores utilizados para a avaliação macroscópica foram baseados nos seguintes critérios: contraturas; efusões; aderências intra-articulares; sinovite; osteófitos; coloração do tecido reparador; superfície do tecido reparador; integração com a cartilagem adjacente e preenchimento do defeito. Essa avaliação foi realizada logo após a colheita das articulações. Realizou-se o registro fotográfico e a avaliação macroscópica da área do defeito, articulação e adjacências, utilizando-se um sistema de pontuação inversa adaptado por Kawamoto *et al.*, (2018) (Quadro 1).

Quadro 1. Sistema de pontuação para avaliação macroscópica da articulação submetida à enxertia osteocondral

<b>Categoria</b>	<b>Pontuação</b>	<b>Categoria</b>	<b>Pontuação</b>
<b>1. Contratura</b>		<b>6. coloração do tecido reparador</b>	
Não	<b>0</b>	Normal	<b>0</b>
Sim	<b>1</b>	Translúcido	<b>1</b>
<b>2. Efusão</b>		Escuro	<b>2</b>
Não	<b>0</b>	<b>7. Superfície do tecido reparador</b>	
Sim	<b>1</b>	Liso	<b>0</b>
<b>3. Aderências intra-articulares</b>		Fibrilado	<b>1</b>
Não	<b>0</b>	Degenerado	<b>2</b>
Sim	<b>1</b>	<b>8. Integração com a cartilagem adjacente</b>	
<b>4. Sinovite</b>		Completa integração	<b>0</b>
Não	<b>0</b>	Bordas demarcadas	<b>1</b>
Sim	<b>1</b>	<b>9. Preenchimento do defeito</b>	
<b>5. Osteófitos</b>		Nivelado com a cartilagem adjacente (total)	<b>0</b>
Não	<b>0</b>	50% da reparação da profundidade do defeito (parcial)	<b>1</b>
Sim	<b>1</b>	0% da reparação da profundidade do defeito	<b>2</b>

Fonte: adaptado de Kawamoto *et al.*, (2018)

As avaliações microscópicas foram realizadas com seis articulações de cada grupo aos 45, e outras seis, aos 90 dias de pós-operatório. Essas avaliações foram feitas utilizando apenas a região articular. Após coleta, foi fixada em formalina tamponada 10%. As avaliações histológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia da Universidade de Uberaba. As articulações foram submetidas ao protocolo de desmineralização com solução aquosa de ácido fórmico 10% v/v e citrato de sódio 9% v/v por 180 dias, sendo trocados a cada três dias. Após esse período os ossos foram seccionados transversalmente e as metades foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Foram obtidos dois cortes histológicos de 5µm de cada bloco. Os cortes foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina e avaliados descritivamente por microscopia óptica, foram avaliados o tipo e característica do tecido de preenchimento observado na periferia, centro e superfície do defeito osteocondral (Fig. 3).



Figura 3. Esquema para ilustração das áreas do defeito osteocondral avaliadas histologicamente.

### Avaliação estatística

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado. Os dados paramétricos (contagem de células e área de neoformação óssea) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias de contagem de células foram comparadas pelo teste T pareado e de área de neoformação óssea pelo teste T não pareado. Os dados não paramétricos (escores) foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn utilizando o programa Graphpad InStat 3 (GraphPad Software Inc., Estados Unidos) Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção do tecido adiposo da região interescapular no panículo adiposo (bolsa adiposa) foi de fácil execução e forneceu quantidade suficiente de tecido para a produção da fração estromal do tecido adiposo (FETA), além de não desenvolver complicações pós-operatórias. Em sua revisão, Mizuno (2009) já havia mostrado diversos estudo que validam a eficácia da técnica de produção da fração estromal e o local de coleta, mas não era claro se a quantidade de tecido adiposos na bolsa seria suficiente para a produção de quantidade suficiente de FETA para uso terapêutico direto sem necessidade de cultivo e expansão. Outros autores, como Souza *et al.*, (2012) optaram por obter CTMs a partir da aspiração da medula óssea, técnica que tem a vantagem de ser mais simples; no entanto tem desvantagens como a redução drástica do

número de células com o avançar da idade (Kim *et al.*, 2012). Além disso, CTM da medula óssea sofrerem mais influências de fatores externos como doenças (Veronesi *et al.*, 2011) e uso de fármacos (Muller *et al.*, 2011). Alves *et al.*, (2017ab), observaram melhores resultado com a técnica de extração de células-tronco mesenquimais na região subcutânea glútea (tecido adiposo) em cães em relação a extração na medula óssea de platô tibial.

Os três tempos de digestão foram eficientes na obtenção de células da fração estromal do tecido adiposo e não foi observada diferença significativa na quantidade de células isoladas. Foram obtidas, em média,  $1,23 \times 10^8$ ,  $1,96 \times 10^8$  e  $1,63 \times 10^8$  células nos tempos de digestão de 30, 40 e 50 minutos, respectivamente (Tab. 2). Dai a escolha por se trabalhar com o menor tempo (30 minutos). Outros estudos que trabalharam com processamento de tecido adiposo para obtenção da fração estromal em ratos (Oliveira *et al.*, 2010) e gatos (Maciel, 2010) também utilizaram o tempo de digestão de 30 minutos. Outras metodologias com coleta por lipoaspiração e digestão por 60 minutos já foram utilizadas com sucesso em coelhos, mas com menor rendimento de células ( $5 \times 10^6$ ) (Torres, *et al.*, 2009). Os tempos de digestão podem variar de acordo com o tipo de colagenase utilizado e com a concentração da mesma, daí a necessidade de padronização da técnica quando se estuda espécies diferentes ou se altera o tipo da colagenase. A colagenase tem como função fazer a digestão do tecido adiposo, permitindo a separação das diferentes células. Colagenases tipo I (Spencer, *et al.*, 2012), tipo II (Martinello, *et al.*, 2011), tipo IA (Chung, *et al.*, 2012) e tipo B (Alves, *et al.*, 2017a) já foram utilizadas com sucesso para esse fim. No atual trabalho, optou-se pela utilização da colagenase tipo I a 0,1%, que se mostrou eficaz na digestão do tecido adiposo, ocorrendo liberação das células viáveis.

Tabela 2. Número de células extraídas de 5 mL tecido adiposo subcutâneo de coelho submetidas à digestão enzimática com colagenase tipo I durante 30, 40 e 50 minutos.

<b>Tempo de digestão</b>	<b>30 minutos</b>	<b>40 minutos</b>	<b>50 minutos</b>
	1,9 x 10 <sup>8</sup>	3,3 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>
	1,4 x 10 <sup>8</sup>	9,5 x 10 <sup>7</sup>	1,9 x 10 <sup>8</sup>
	6,9 x 10 <sup>7</sup>	8,9 x 10 <sup>7</sup>	8,4 x 10 <sup>7</sup>
	9,1 x 10 <sup>7</sup>	2,7 x 10 <sup>7</sup>	9,6 x 10 <sup>7</sup>
<b>Média</b>	1,23x10 <sup>8a</sup>	1,96x10 <sup>8a</sup>	1,63x10 <sup>8a</sup>
<b>Desvio padrão</b>	5,39x10 <sup>7</sup>	1,23x10 <sup>8</sup>	9,16x10 <sup>7</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem, entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de SNK.

O teste de azul de *Trypan* mostrou uma média de 95% de células viáveis em todos os tempos estudados (30, 40 e 50 minutos), semelhante a outros estudos com coelhos (Souza *et al.*, 2012) e gatos (Maciel, 2010) que mostraram viabilidade de 90%. Oliveira *et al.*, (2010) consideraram que a viabilidade superior a 70% é adequada para isolamento e expansão de CTM.

A fração estromal do tecido adiposo apresenta diferentes tipos celulares como CTM, fibroblastos e células endoteliais. As células de maior interesse terapêutico são a CTM, que têm grande capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares (Riordan *et al.*, 2009; Gentile *et al.*, 2012; Zuttion *et al.*, 2013), justificando a escolha da fração estromal no tratamento dos defeitos osteocondrais.

O presente protocolo apresenta vantagens em relação às técnicas de isolamento de CTM do tecido adiposo, por ser de fácil execução em ambientes sem muitos equipamentos ou materiais. Além disso, permite o uso imediato das células para o tratamento precoce de doenças e conseqüentemente melhor resultado terapêutico. Já foi descrito que as CTMs podem exercer seu efeito por meio de secreção de citocinas e outras moléculas, com efeito, parácrino. Sabe-se que o perfil de secreção das CTM é alterado pelo microambiente onde estão colocadas, de forma que CTM expostas a ambientes ricos em mediadores pró-inflamatórios, desenvolvem um perfil de secreção anti-inflamatório. Em contrapartida, se as CTM foram expostas a um microambiente rico em citocinas e outras moléculas anti-inflamatórias, elas adquirem um perfil de secreção predominantemente pró-inflamatório. O tratamento precoce aumenta as chances de exposição das CTM a ambiente pro-inflamatório, melhorando o resultado terapêutico (Glenn e Whartenby, 2014; Whang *et al.*, 2014, Lee e Song, 2017).

Não foram observadas diferenças no escore de claudicação entre os grupos (C-, FETA, C+) na maioria dos tempos de avaliação, a exceção do 43º dia quando foi verificada diferença entre os grupos FETA e o controle positivo, sendo observado um melhor resultado no grupo controle positivo (tabela 3). A escolha do enxerto osteocondral autôgeno como controle positivo justifica esse resultado uma vez que é considerado “padrão ouro”, para tratamentos de defeitos osteocondrais (Marmotti *et al.*, 2012; Kawamoto *et al.*, 2018).

Tabela 3. Média e desvio padrão do escore de claudicação de coelhos com defeitos osteocondrais na articulação femorotibiopatelar, não tratados (C-) ou tratados com fração estromal do tecido adiposo (FETA) ou enxerto osteocondral autôgeno (C+) avaliação realizada ao longo de 85 dias.

Dias de avaliação \ Grupos	C-	FETA	C+
1	1,53(0,70) <sup>a</sup>	1,67(0,49) <sup>a</sup>	1,33(0,68) <sup>a</sup>
2	1,50(0,70) <sup>a</sup>	1,50(0,52) <sup>a</sup>	1,31(0,62) <sup>a</sup>
3	1,42(0,65) <sup>a</sup>	1,50(0,52) <sup>a</sup>	1,33(0,63) <sup>a</sup>
4	1,56(0,62) <sup>a</sup>	1,50(0,52) <sup>a</sup>	1,50(0,71) <sup>a</sup>
5	1,50(0,62) <sup>a</sup>	1,42(0,51) <sup>a</sup>	1,50(0,79) <sup>a</sup>
6	1,50(0,62) <sup>a</sup>	1,33(0,49) <sup>a</sup>	1,33(0,59) <sup>a</sup>
7	1,28(0,67) <sup>a</sup>	1,17(0,39) <sup>a</sup>	1,17(0,62) <sup>a</sup>
8	1,28(0,67) <sup>a</sup>	1,00(0,60) <sup>a</sup>	0,89(0,76) <sup>a</sup>
9	1,33(0,91) <sup>a</sup>	1,08(0,51) <sup>a</sup>	0,89(0,76) <sup>a</sup>
10	1,17(0,79) <sup>a</sup>	1,00(0,60) <sup>a</sup>	0,83(0,79) <sup>a</sup>
11	1,00(0,77) <sup>a</sup>	0,92(0,52) <sup>a</sup>	0,83(0,79) <sup>a</sup>
12	1,00(0,77) <sup>a</sup>	0,92(0,52) <sup>a</sup>	0,83(0,79) <sup>a</sup>
13	1,00(0,84) <sup>a</sup>	1,00(0,43) <sup>a</sup>	0,78(0,81) <sup>a</sup>
14	0,94(0,80) <sup>a</sup>	1,00(0,43) <sup>a</sup>	0,78(0,81) <sup>a</sup>
15	0,89(0,83) <sup>a</sup>	0,92(0,51) <sup>a</sup>	0,78(0,81) <sup>a</sup>
22	0,50(0,62) <sup>a</sup>	0,83(0,58) <sup>a</sup>	0,67(0,77) <sup>a</sup>
29	0,33(0,59) <sup>a</sup>	0,75(0,45) <sup>a</sup>	0,78(0,81) <sup>a</sup>
36	0,22(0,43) <sup>a</sup>	0,67(0,65) <sup>a</sup>	0,47(0,62) <sup>a</sup>
43	0,35(0,49) <sup>ab</sup>	0,72(0,65) <sup>a</sup>	0,27(0,8) <sup>b</sup>
50	0,29(0,49) <sup>a</sup>	0,60(0,55) <sup>a</sup>	0,60(1,34) <sup>a</sup>
57	0,25(0,46) <sup>a</sup>	0,60(0,55) <sup>a</sup>	0,14(0,38) <sup>a</sup>
64	0,29(0,49) <sup>a</sup>	0,80(0,45) <sup>a</sup>	0,14(0,38) <sup>a</sup>
71	0,29(0,49) <sup>a</sup>	0,80(0,45) <sup>a</sup>	0,14(0,38) <sup>a</sup>
78	0,17(0,41) <sup>a</sup>	0,80(0,45) <sup>a</sup>	0,14(0,38) <sup>a</sup>
85	0,29(0,49) <sup>a</sup>	0,80(0,45) <sup>a</sup>	0,14(0,38) <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem, entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Krukal Wallis seguido do teste de Dunn.

No presente estudo os resultados obtidos através do escore de claudicação mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos. Acredita-se que a biomecânica de locomoção do coelho por saltitamento e postura plantígrada dos coelhos dificulte a avaliação de claudicação, o que limita a identificação de pequenos diferenças entre os tratamentos (Trindade *et al.*, 2011).

Estudos randomizados duplo-cegos em cães com osteoartrite nas articulações coxofemoral (Black *et al.*,2007) e úmero-radial-ulnar (Black *et al.*,2008) tratados com injeções intra-articulares de CTM-AD mostraram melhora significativa na claudicação quando comparada com animais que receberam apenas o placebo. Esses estudos já mostraram a eficácia terapêutica de culturas puras de CTM-AD no tratamento de doenças articulares.

A avaliação radiográfica mostrou um preenchimento progressivo dos defeitos ao longo do tempo, em todos os grupos estudados. O grupo tratado com fração estromal do tecido adiposo (FETA) mostrou área de neoformação óssea superior ao grupo não tratado (C-) aos 60, 75 e 90 dias de pós-operatório. O controle positivo mostrou maior área de neoformação óssea em relação ao grupo C- em todos os tempos de avaliação e não diferiu do grupo FETA aos 45, 60, 75 e 90 dias de pós-operatório (Tab. 4)

Tabela 4. Média e desvio padrão da área de neoformação óssea obtida por avaliação radiográfica de defeitos osteocondrais criados na articulação femorotibiopatelar, não tratados (C-) ou tratados com fração estromal do tecido adiposo (FETA) ou enxerto osteocondral autógeno (C+) avaliação realizada ao longo de 90 dias.

<b>Tempos de avaliação</b>	<b>15 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>45 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>75 dias</b>	<b>90 dias</b>
<b>C-</b>	1,58 (1,34) <sup>a</sup>	3,21(1,85) <sup>a</sup>	4,57(1,70) <sup>a</sup>	5,2(0,84) <sup>a</sup>	5,8(1,10) <sup>a</sup>	8,0(1,58) <sup>a</sup>
<b>FETA</b>	1,67(2,30) <sup>a</sup>	3,5(1,00) <sup>a</sup>	5,50(2,36) <sup>ab</sup>	6,8(0,84) <sup>b</sup>	7,8(1,30) <sup>b</sup>	9,8(0,84) <sup>b</sup>
<b>C+</b>	3,93 (1,50) <sup>b</sup>	5,29(2,70) <sup>b</sup>	6,46(1,81) <sup>b</sup>	7,6(1,52) <sup>b</sup>	8,8(1,30) <sup>b</sup>	11,6(0,74) <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem, entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de SNK.

A maior área de neoformação óssea observada no grupo FETA em relação ao grupo controle negativo observada aos 45, 60, 75 e 90 dias mostra que a fração estromal

do tecido adiposo é capaz de potencializar a regeneração do tecido ósseo melhorando a reparação de defeitos osteocondrais.

Embora o enxerto osteocondral autógeno (C+) tenha mostrado maior área de neofomação óssea aos 15 e 30 dias, nos demais tempos de avaliação nenhuma diferença significativa entre os grupos C+ e FETA foram observados mostrando que a fração estromal é uma alternativa eficiente para o tratamento de defeitos osteocondrais.

A avaliação macroscópica realizada aos 45 dias de pós-operatório mostrou menores aderências intra-articulares no grupo FETA em relação aos C+ e C-. Já aos 90 dias de avaliação, o grupo C- manteve-se com maior aderência em relação ao grupo C+ e FETA, que não diferiram entre si. Não foram observadas diferenças significativas nos escores de sinovites entre os grupos aos 45 dias, mas aos 90 dias, os grupos FETA e C+ mostraram escores de sinovite semelhantes e significativamente melhores que o grupo C-. Não foi observada diferença no escore de coloração do tecido reparador entre todos os grupos aos 45 dias. Aos 90 dias, o grupo FETA apresentou escore de coloração dos tecidos reparados significativamente menor que o grupo C-, mas superior ao grupo C+. Os escores de superfície do tecido reparador foram semelhantes entre os grupos FETA e C+, e significativamente melhores que o grupo C- nos tempos de avaliação. Observou-se preenchimento nivelado e completa integração com cartilagem adjacente nos defeitos de todos os grupos tanto nos 45 e 90 dias de avaliação (Tab. 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão dos escores de parâmetros de avaliação macroscópica da articulação femorotibio Patelar de coelhos com defeitos osteocondrais, não tratados (C-) ou tratados com fração estromal do tecido adiposo (FETA) ou enxerto osteocondral autógeno (C+) avaliação realizada ao longo de 45 e 90 dias.

Categoria	45 dias			90 dias		
	C-	FETA	C+	C-	FETA	C+
<b>Contratura</b>	0,33(0,50) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>a</sup>	0,25(0,46)	0,17(0,41)	0,13(0,35)
<b>Efusão</b>	0,00(0,00) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>a</sup>
<b>Aderências</b>	1,00(0,00) <sup>a</sup>	0,16(0,41) <sup>b</sup>	1,00(0,00) <sup>a</sup>	1,00(0,00) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>b</sup>	0,13(0,35) <sup>b</sup>
<b>Sinovite</b>	0,33(0,50) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>a</sup>	0,11(0,33) <sup>a</sup>	0,75(0,46) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>b</sup>	0,00(0,00) <sup>b</sup>
<b>Osteófitos</b>	0,89(0,33) <sup>a</sup>	0,50(0,55) <sup>a</sup>	0,89(0,33) <sup>a</sup>	0,88(0,35) <sup>a</sup>	0,33(0,52) <sup>a</sup>	0,50(0,53) <sup>a</sup>
<b>Coloração</b>	1,22(0,97) <sup>a</sup>	1,00(0,63) <sup>a</sup>	0,78(0,97) <sup>a</sup>	1,50(0,93) <sup>a</sup>	0,50(0,55) <sup>ab</sup>	0,38(0,74) <sup>b</sup>
<b>Superfície</b>	1,33(0,71) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>ab</sup>	0,56(0,88) <sup>b</sup>	1,75(0,46) <sup>a</sup>	0,00(0,00) <sup>b</sup>	0,38(0,74) <sup>b</sup>
<b>Integração</b>	0,89(0,33) <sup>a</sup>	0,83(0,41) <sup>a</sup>	0,78(0,44) <sup>a</sup>	0,88(0,35) <sup>a</sup>	0,50(0,55) <sup>a</sup>	0,50(0,53) <sup>a</sup>
<b>Preenchimento</b>	0,89(0,60) <sup>a</sup>	0,83(0,41) <sup>a</sup>	0,89(0,60) <sup>a</sup>	0,88(0,35) <sup>a</sup>	0,83(0,41) <sup>a</sup>	0,63(0,52) <sup>a</sup>
<b>Total</b>	6,75(2,71) <sup>a</sup>	3,33(1,36) <sup>a</sup>	4,44(2,69) <sup>a</sup>	7,87(1,64) <sup>a</sup>	2,33(1,03) <sup>b</sup>	2,62(1,99) <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem, entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

Macroscopicamente os efeitos da fração estromal do tecido adiposo foram benéficos para o tratamento de defeitos osteocondrais, hoje visto que tanto nos tempos de 45 e 90 dias, houve preenchimento total em todos os grupos (Fig.4). Não foram observadas alterações degenerativas no grupo tratado com FETA e nem no controle positivo, como, efusão, sinovite, osteófitos e contraturas, sinais evidentes em doença articular degenerativa. Qualquer terapia que mostre resultados semelhantes ou iguais ao autoenxerto osteocondral pode ser considerado um tratamento eficiente e com grande potencial para utilização prática no tratamento de doenças articulares (Kawamoto *et al.*, 2018).



Figura 4. Imagens macroscópicas das superfícies trocleares com defeitos osteocondrais não tratados “C-” (A e D) e tratados com fração estromal do tecido adiposo “FETA” (B e E) ou com enxerto osteocondral macerado “C+” (C e F – grupo C+) aos 45 (A, B e C) e 90 (D, E e F) dias de avaliação pós-operatória.

A avaliação histológica do grupo controle negativo (C-) mostrou preenchimento da periferia do defeito com tecido ósseo esponjoso composto por trabéculas delgadas e, da região central, por tecido conjuntivo fibroso, em 100% (6/6) dos animais, em ambos os tempos de avaliação. A superfície do defeito foi preenchida por tecido conjuntivo fibroso em 33,33% (2/6) dos animais, aos 45 dias, e 50% (3/6)

dos animais, aos 90 dias; ou por tecido fibrocartilagioso em 66,66% (4/6) dos animais, aos 45 dias e 50% (3/6) dos animais, aos 90 dias (Fig. 5 e 6).

Na avaliação histológica realizada aos 45 dias, 50% (3/6) dos animais tratados com fração estromal do tecido adiposo (FETA), apresentaram preenchimento da periferia do defeito com tecido ósseo esponjoso composto por trabéculas de espessura intermediária e, da região central, por tecido conjuntivo fibroso e intensa neovascularização. Nos outros 50% (3/6) foi observado preenchimento da periferia do defeito com tecido ósseo esponjoso composto por trabéculas espessas, da região central, por tecido fibrocartilaginoso. A superfície do defeito foi preenchida por tecido conjuntivo fibroso em 50% (3/6) dos animais e por tecido fibrocartilagioso em 50% (3/6) dos animais, aos 45 dias. Aos 90 dias observou-se preenchimento completo do defeito com tecido ósseo esponjoso composto por trabéculas espessas em 100% (6/6) dos animais. A superfície do defeito foi preenchida por tecido conjuntivo fibrocartilaginoso em 50% (3/6) dos animais e por tecido cartilaginoso em 50% (3/6) dos animais. No entanto a superfície era irregular e com algumas áreas de fissura (Fig. 5 e 6).

A avaliação histológica do grupo controle positiva (C+) mostrou preenchimento completo do defeito com tecido ósseo esponjoso composto por trabéculas espessas em 100% (6/6) dos animais, em ambos os tempos de avaliação, sendo observadas pequenas áreas de ossificação endocondral, aos 45 dias. A superfície do defeito foi preenchida por tecido fibrocartilaginoso em 100% (6/6) dos animais. Aos 90 dias, observou-se preenchimento da superfície do defeito por tecido fibrocartilaginoso em 16,66% (1/6) dos animais e por tecido cartilaginoso em 83,33% (5/6) dos animais (Fig. 5 e 6).

## 45 dias de avaliação pós-operatória

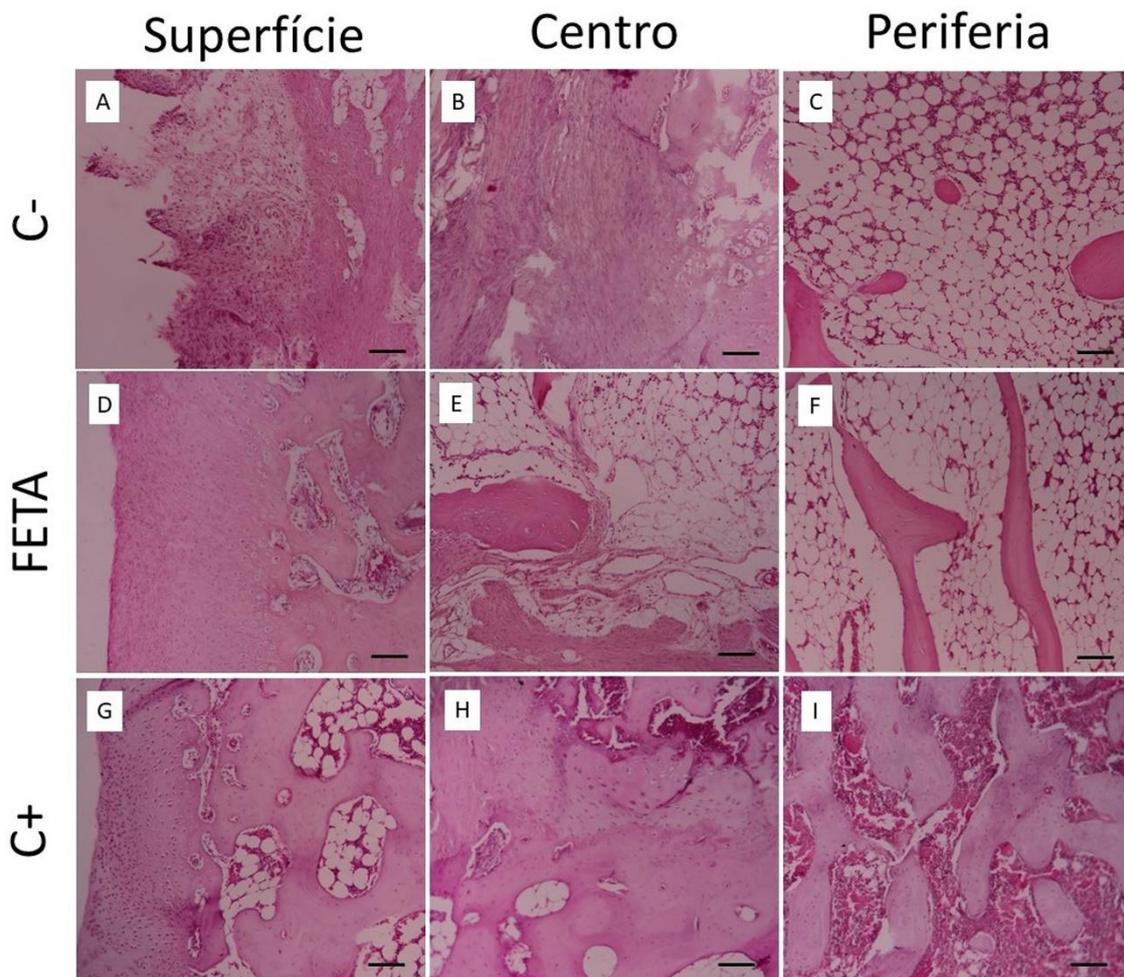


Figura 5. Micrografia da superfície (A, D e G), centro (B, E e H) e periferia (C, F e I) de defeitos osteocondrais criados em trôcleas femorais de coelhos, não tratados “C-” (A, B e C) e tratados com fração estromal de tecido adiposo “FETA” (D, E e F) ou com enxerto osteocondral macerado “C+” (G, H e I), 45 dias após a cirurgia. Hematoxilina eosina. Barra = 100 $\mu$ m.

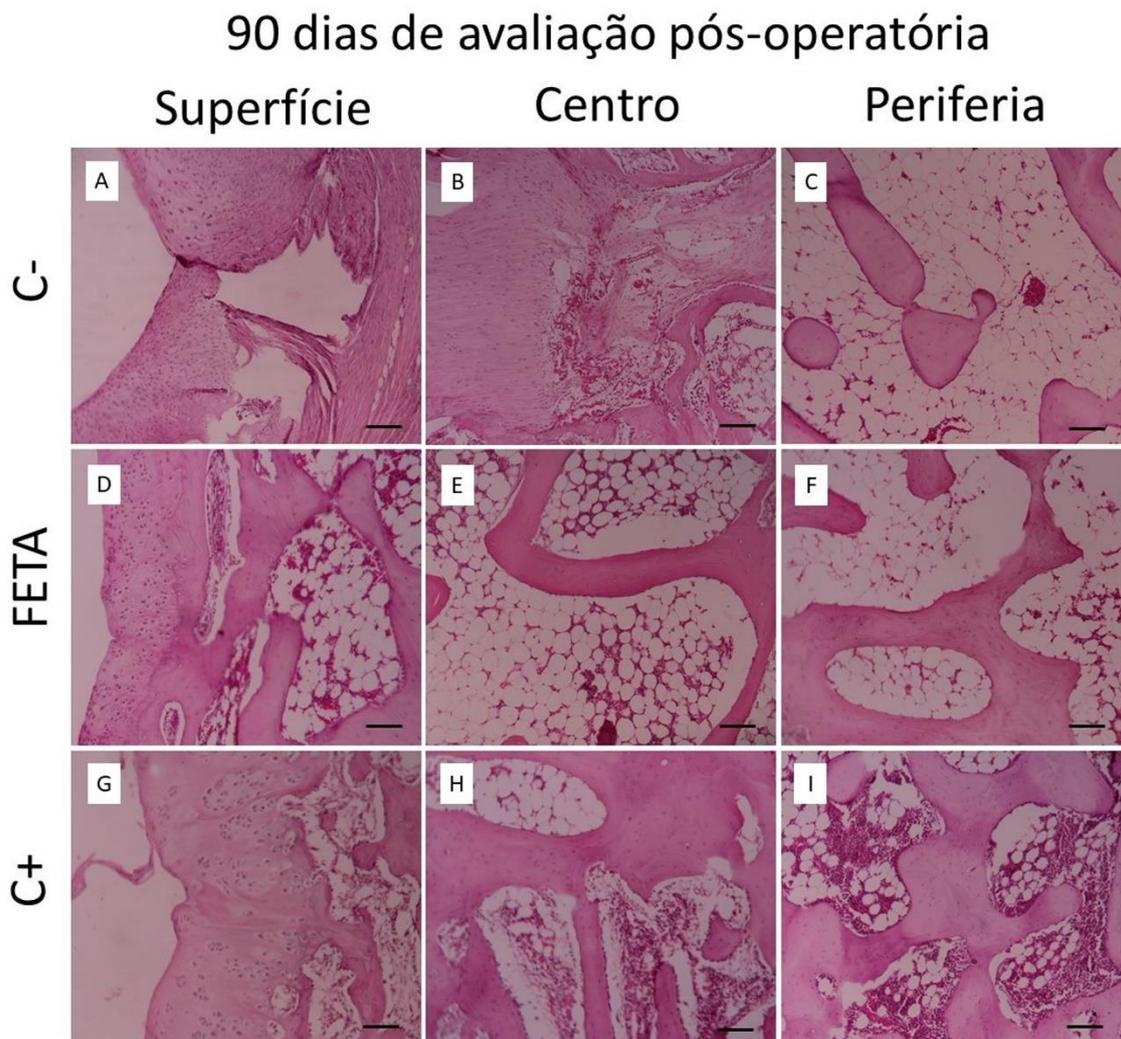


Figura 6. Micrografia da superfície (A, D e G), centro (B, E e H) e periferia (C, F e I) de defeitos osteocondrais criados em trôcleas femorais de coelhos, não tratados “C-” (A, B e C) e tratados com fração estromal de tecido adiposo “FETA” (D, E e F) ou com enxerto osteocondral macerado “C+” (G, H e I), 45 dias após a cirurgia. Hematoxilina eosina. Barra = 100 $\mu$ m

As avaliações radiográfica, macroscópica e histológica mostraram que houve um padrão de reparação óssea semelhante entre os grupos FETA e controle +, com preenchimento gradual do defeito da periferia para o centro da lesão com osso esponjoso composto predominantemente por trabéculas espessas e osteoblastos ativos em lacunas alargadas. Já a reparação óssea do grupo C- ocorreu de forma mais lenta e com predominância de trabéculas delgadas na periferia da lesão e de tecido fibroso no centro da lesão. A reparação da lesão condral também foi semelhante entre os grupos FETA e C+ mostrando uma reparação com predominância de tecido fibrocartilagenoso e

cartilaginosa enquanto no grupo C- houve predominância de tecido fibroso na superfície articular.

A matriz extracelular da cartilagem articular tem uma composição e arquitetura molecular complexa, formada principalmente por colágeno II e proteoglicanos, arranjados em agregados que permite a função articular com perfeita distribuição de cargas para o osso subcondral sem o desgaste da cartilagem articular (Bhosale e Richardson, 2008). Dependendo do grau da lesão e da capacidade regenerativa do tecido, a cartilagem articular pode se reparar completamente voltando à forma normal ou se reparar de forma menos eficiente, formando fibrocartilagem ou, na pior das hipóteses, tecido fibroso. O tecido fibrocartilaginosa e fibroso não tem a mesma capacidade de suportar carga, alterando a biomecânica articular que, tardiamente, leva ao processo de degeneração articular.

Embora estudos tenham mostrado efeitos terapêuticos benéficos do uso de células tronco mesenquimais no tratamento de lesões osteocondrais (Im, 2017; Numata *et al.*, 2019), essa ainda é uma técnica cara que necessita de infraestrutura para isolamento e cultivo celular, o que a torna pouco disponível para a maioria dos pacientes. O uso da fração estromal do tecido adiposo como fonte de CTM possibilita o tratamento de lesões osteocondrais com mínima infraestrutura laboratorial e a um baixo custo, possibilitando o tratamento de um maior número de pacientes e de forma imediata.

Estudos já mostraram que CTM-AD possuem efeitos imunomodulador e anti-inflamatório e que se injetadas em articulações osteoartrosicas humanas são capazes de diminuir os sinais degenerativos (Riordan *et al.*, 2009; Ter Huurne *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2012; Jo *et al.*, 2014). Esses mesmos estudos mostraram que o efeito é dose dependente, sendo que quanto maior a quantidade de CTM-AD injetada na articulação melhores os resultados.

O uso de CTM-MO também mostrou resultados favoráveis no tratamento de doenças articulares. Singh *et al.*, (2014) induziram a osteoartrose em coelhos pela da ressecção do ligamento cruzado cranial e trataram com CTM-MO. Os resultados da avaliação macroscópica mostraram características evidentes de doença articular como fibração, erosões e formação de osteófitos nos cndilos femorais no grupo controle. Já

o grupo tratado com CTM-MO apresentou uma boa aparência articular com características semelhantes à cartilagem articular normal.

Um estudo recente mostrou melhores resultados no tratamento de defeitos osteocondrais com culturas mistas de células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea e do tecido sinovial quando comparado com o efeito das culturas puras de mesma origem (Mahmoud et al., 2019). Isso levanta a hipótese de que culturas puras podem não ser a melhor opção de tratamento para defeitos osteocondrais.

## **CONCLUSÃO**

Com base os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- O tempo de digestão do tecido adiposo de 30 minutos é a melhor opção para a obtenção da fração estromal do tecido adiposo de coelhos, uma vez que tempos maiores não melhoraram o rendimento de células por volume de tecido.
- A FETA pode ser rapidamente obtida e aplicada no local da lesão sem nenhuma intercorrência imunológica, por serem células autólogas.
- A FETA é uma alternativa para o tratamento de defeitos osteocondrais e apresenta resultado terapêutico semelhante ao do autoenxerto osteocondral.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; ROSADO, I.R. et al. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. *Ciênc. anim. bras.*, v. 18, p. 1-14, 2017a.
- ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; ROSADO, I.R.; et al. Osteoprogenitor cells can enhance early bone formation in critical bone defects in dogs. *Cienc. Rural*, v.47, p.1-8, 2017b.
- BHOSALE A.M, RICHARDSON J.B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin.*, v. 87, ed .1, p. 77–95, 2008.
- BIFARI, F.; LISI, V.; MIMIOLA, E.; PASINI, A. et al. Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells., *Transfus Med Hemother.*,v. 35, p. 194–204, 2008.
- BLACK, L.L.; GAYNOR, J.; ADAMS, C.; DHUPA, S. et al. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Veterinary Therapeutics.*, v.9, p.192–200, 2008.
- BLACK, L.L.; GAYNOR, J.; GAHRING, D.; ADAMS, C. et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics.*, v.8, p. 272–84, 2007.
- BRANDÃO, C.V.S.; ANTUNES, P.A.U.M.; ESTANESLAU, C.A.; MAMPRIM, M.J. et al. Cinta de náilon como cerclagem óssea- estudo experimental em coelhos e ratos. *Ciências Agrárias.*, v. 34, p. 2903-2914, 2013.
- BUCKWALTER, J.A. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.*, v. 28, p. 192-202, 1998.
- BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J.; GRODZINSKY, A.J. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.*, v. 54, cp. 45, p. 465-480, 2005.
- CAPLAN, A. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int.*, v.2015, p. 628-767, 2015.
- CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.*, v.98, n. 5, p. 1076-84, 2006.

CHUNG, D.; HAYASHI, K.; TOUPADAKIS, C.A.; WONG, A. et al. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Res Vet Sci.*, v. 92, n.1, p.66-75, 2012.

FOX, S.A.J.; BEDI, A.; RODEO, S.A. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health.*, v. 1(6), p. 461-468, 2009.

GENTILE, P.; ORLANDI, A.; SCIOLI, M.G.; DI PASQUALI, C.; BOCCHINI, I.; CERVELLI, V. Concise review: Adipose derived stromal vascular fraction cells and platelet rich plasma: Basic and clinical implication for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Translational Medicine.* v.1, p.230-236, 2012.

GLENN, J.D.; WHARTENBY, K.A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells.*, v.6, n.5, p. 526-539, 2014.

IM, G.I. Clinical use of stem cells in orthopaedics. *Eur Cell Mater.*, v.33, p.183–196, 2017.

INOUYE, C. M.; FAGUNDES, D. J.; FALOPPA, F, NOVO, N. F. et al. Estudo morfológico da articulação do joelho de coelhos após a reparação de um efeito osteocondral. *Acta Cir Bras.*, v.17, n.1, p. 403-9, 2002.

JO, C.H.; LEE, Y.G.; SHIN, W.H. et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells.*, v.32, p. 1254–1266, 2014.

KAWAMOTO, F.Y.K.; MUZZI, L.A.L.; LACRETA JUNIOR, A.C.C. et al. Enxerto osteocondral autógeno associado ao IGF-1 em lesão induzida na cartilagem articular de coelhos. *Acta Scientiae Veterinariae.*, v.46, pub. 1588, 2018.

KIM, M.; KIM, C.W.; CHOI, Y.S.; et al. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech Ageing Dev.*, v.133, p.215-225, 2012.

- KOH, Y.G.; CHOI, Y.J. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee.*, v.19, p.902–907, 2012.
- KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.*, v. 35, p. 232-242, 2006.
- KRISTJÁNSSON, B.; HONSAWEK, S. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *World J Orthop.*, v.8, n.9, p. 674-680, 2017.
- LEE, D.K.; SONG, S.U. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cellular Immunology.*, v. 326, p. 68-76, 2017.
- MACIEL, B.B. Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
- MAHMOUD, E.E.; ADACHI, N.; MAWAS, A.S.; et al. Coculturing of mesenchymal stem cells of different sources improved regenerative capability of osteochondral defect in the mature rabbit: An in vivo study. *J Orthop Surg.*, v.27, n.2, p.1-8, 2019.
- MARMOTTI, A.; BRUZZONE, M.; BONASIA, D.E. et al. One-Step osteochondral repair with cartilage fragments in a composite scaffold. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, v. 20, n. 12, p. 2590-2601, 2012.
- MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; MOLLO, A. et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci.*, v.91, n.1, p.18-24, 2011.
- MARTINS, G.R.; TEIXEIRA, M.F.S.; BZERRA JUNIOR, R.Q. et al. Células-tronco mesenquimais: características, cultivo e uso na Medicina Veterinária. *Rev Bra Hig e San Animal.*, v. 8, n. 2, p. 181-202, 2014.
- MIRZA, Y.H.; OUSSEDIK, S. Is there a role for stem cells in treating articular injury. *Br J Hosp Med (Lond).*, v. 78, n. 7, p.372-377, 2017.
- MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.*, v.76, n.2, p.56-66, 2009.

MOREIRA-TEIXEIRA, L.S.; GEORGI N.; LEIJTEN, J.; WU, L.; KARPERIEN, M. Cartilage tissue engineering. *Endocr Dev.*, v. 21, p. 102–15, 2011.

MULLER, M.; RAABE, O.; ADDICKS, K. et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.*, v.35, p.235-248, 2011.

MURRAY, I.R.; CORSELLI, M.; PETRIGLIANO, F.A. et al. Recent insights into the identity of mesenchymal stem cells. *Bone Joint J.*, v. 96, p.291–298, 2014.

NIERMEYER, P.; KORNACKER, H.; MEHLHORN, A. et al. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng.*, v. 13, p. 111-121, 2007.

NUMATA, H.; NAKASE, J.; OSHIMA, T.; et al. Effectiveness of Adhering Adipose-Derived Stem Cells to Defective Cartilage in Promoting Cartilage Regeneration in a Rabbit Model. *Arthroscopy.*, In press, 2019.

OLIVEIRA, G.K.; RAISER, A.G.; OLSSON. D.; SALBEGO, F.Z. et al. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. *Arq Bras Med Vet Zootec.*,v. 62, n.1.p.72-79, 2010.

ORTH, P.; KAUL, G.; CUCCHIARINI, M. et al. Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surg.Sports Traumatol. Arthrosc.*, v. 19, n. 12, p. 2119-2130, 2011.

PINTO FILHO, S.T.L.; TREICHEL, T.L.E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J.S.; ROSA, M.B. et al. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. *Vet. e Zootec.*, v. 20, p.49-59, 2013.

RASMUSSOM, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.*, v. 312, n. 12, p. 2169-2179, 2006.

RICHTER, D.L.; SCHENCK, R.C.; WASCHER, D.C. et al. Knee articular cartilage repair and restoration techniques: a review of the literature. *Sports Health.*, v. 20, n.10, 2015.

RIORDAN, N.H.; ICHIM, T.E.; MIN, W.-P. et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med.*, v. 7, p. 29, 2009.

SCHMIDT, T.A.; GASTELUM, N.S.; NGUYEN, Q.T. et al. Boundary Lubrication of Articular Cartilage: Role of Synovial Fluid Constituents. *Arthritis & rheumatism.*, v. 56, n. 3, p. 882-891, 2007.

SINGH, A.; GOEL, S.C.; GUPTA, K.K. et al. The role of stem cells in osteoarthritis: An experimental study in rabbits. *Bone Joint Res.* 2014;3(2):32-7, 2014.

SOUZA, L.A.; SILVA, L.A.; OLIVEIRA, B.J.N.A.; LIMA, A.P. et al. Células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelhos: isolamento, cultivo *in vitro* e perspectivas de utilização em lesões tendíneas [tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2012.

SPENCER, N.D.; CHUN, R.; VIDAL, M.A.; GIMBLE J.M. et al. In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Vet J.*, v.191, n.2, p.231-9, 2012.

STEFANUTTO, J.C.; DAL MOLIN, M.M.; EMANUELLI, I.P. Técnicas Para Isolamento de Células Tronco Mesenquimais Extraídas de Tecido Adiposo. In: VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, 2013. Disponível em: [http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2013/oit\\_mostra/Jessica\\_Cristina\\_Stefanutto\\_02.pdf](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2013/oit_mostra/Jessica_Cristina_Stefanutto_02.pdf).

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEP/MVZ, p.211, 1998.

TER HUURNE, M.; SCHELBERGEN, R.; BLATTES, R. et al, Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, v.64, p. 3604–3613, 2012.

TORRES, F.C. Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

TRINDADE, A. B.; ELIZEIRE, M. B.; SILVA, P. G, CONTESINI, E. A. et al. Influência da fração mononuclear autóloga de medula óssea na evolução da marcha de coelhos submetidos a neurorrafia. *Medvep – Rev. Cien. Med.Vet – Peq. Ani e Ani. Est.* v.9, n. 1, p. 576-578, 2011.

VERONESI, F.; TORRICELLI, P.; BORSARI, V.; et al. Mesenchymal stem cells in the aging and osteoporotic population. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, v.21, p.363-377, 2011.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v. 116, p. 639-648, 2004.

WANG, Y.; CHEN, X.; CAO, W.; SHI, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature immunology.*, v.15, n. 11, p. 1009-1016, 2014.

YI, T.; SONG, S.U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.*, v. 35, n. 2, p. 213-221, 2012.

ZAK, L.; KRUSCHE-MANDL, I.; ALDRIAN, S. et al. Clinical and MRI evaluation of 420 medium- to long-term results after autologous osteochondral transplantation (OCT) in the knee joint. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, v. 22, n. 6, p. 1288-1297, 2014.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

ZUTTON, M.S.S.R.; WENCESLEU, C.V.; LEMOS, P.A.; TAKIMURA, C. et al. Células-tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica. *Rev Bras Cardiol Invasiva.*, v.21, n.3, p.281-287, 2013.

## ANEXO I - Comitê de ética



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-091/2014

Lberaba, 1 de dezembro de 2014

Ílmo. Prof.

**Endrigo Gabellini Leonel Alves**

**Assunto:** Encaminha parecer do processo nº 033/2014, sobre o protocolo de Pesquisa "*Fração estromal do tecido adiposo, associada ao biovidro 60S e ao concentrado autólogo de plaquetas no tratamento de defeitos ósseos críticos em coelhos*"

Prezado(a) Professor(a),

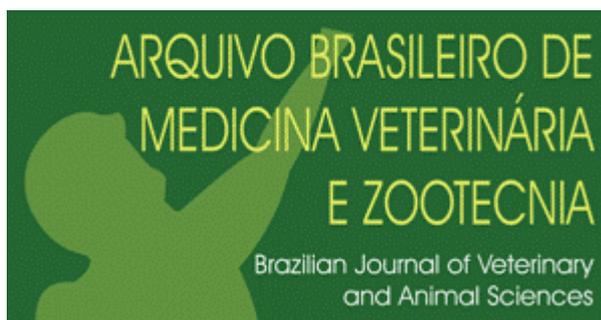
Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 25/11/2014, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

*Prof. Goely F. Figueiredo Bittor*

Coordenadora do CEEA-UNIUBE

## ANEXO II



### **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

#### **Política editorial**

O **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (ISSN 1678-4162 (online)) é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388 / 0001-24, e destina-se à publicação de publicações científicas. artigos sobre temas de medicina veterinária, pecuária, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquicultura e áreas afins.

Os artigos enviados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com auxílio de especialistas da área (relatores). Os artigos que precisam de revisão ou correção serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação passam a ser propriedade do Arq **uivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** , citado como *Arq. Bras. Med. Veterinario. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações contidos nos artigos. É obrigatório que sejam originais, únicos e destinados exclusivamente à **ABMVZ** .

#### **Reprodução de artigos publicados**

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja propriedade referenciada. Os resultados não podem ser utilizados comercialmente.

A submissão e protocolo dos artigos é feito exclusivamente on-line, no endereço < <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> > .

Cópias não serão fornecidas. Os artigos estão disponíveis no seguinte endereço: [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz)

## Diretrizes Gerais

- Todo o protocolo de artigos é realizado exclusivamente pelo sistema de publicação Scielo online - ScholarOne, em <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>, e é necessário se registrar no site.
- Leia " [PASSO A PASSO - SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS ATRAVÉS DO ESCOLARONE](#) "
- Toda comunicação entre os vários autores no processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente em formato eletrônico, através do Sistema, e o autor é automaticamente informado, por e-mail, de qualquer alteração no status do artigo.
- Imagens, figuras e desenhos devem ser inseridos no texto e, quando solicitados pela equipe editorial, devem ser enviados separadamente, em um arquivo jpg em alta resolução (pelo menos 300 dpi), zipados, inseridos em "Figura ou Imagem" (passo 2).
- É de responsabilidade exclusiva de quem submete o artigo certificar que os autores estão cientes e concordam com a inclusão de seus nomes na submissão.
- **A ABMVZ** se comunicará eletronicamente com o autor do ensino sobre sua participação no artigo. Se pelo menos um autor não concordar com sua participação como autor, o artigo será considerado uma renúncia por um autor e o protocolo será encerrado.

## Comite de Ética

É obrigatório anexar uma cópia em pdf do Certificado de aprovação do projeto de pesquisa que originou o artigo, emitido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) em sua instituição, de acordo com a Lei 11794 / 2008. O documento deve ser anexado ao "Comitê de Ética" (etapa 2). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação deve ser mencionado na seção Material e Métodos.

## Tipos de artigos aceitos para publicação

### **Artigo científico**

Este é um relatório completo de um trabalho experimental. É baseado na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (Português e Inglês), Autores e Afiliação (apenas na "Página do Título - etapa 2), Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando aplicável) e referências.

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

O número de referências não deve exceder 30.

### **Relato de caso**

Principalmente contemplando as áreas médicas em que o resultado precede o interesse em sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções de texto: Título (Português e Inglês), Autores e Afiliação (apenas na etapa 2 da "Página de Título"), Resumo, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinente), Agradecimentos (quando aplicável) e Referências.

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

O número de referências não deve exceder 12.

### **Comunicação**

Um breve relato de resultados parciais de um trabalho experimental, digno de publicação, embora insuficiente ou não consistente o suficiente para constituir um artigo científico.

O texto, com título em português e inglês, Autores e Afiliação (apenas na "Página de rosto", etapa 2) deve ser compacto, sem distinção de seções de texto especificadas para "artigo científico", embora deva seguir essa ordem. Quando a comunicação é escrita em português, deve conter um "Resumo" e, quando escrita em inglês, deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder 8, incluindo

tabelas e figuras.

O número de referências não deve exceder 12.

### **Preparação de textos para publicação**

Os artigos devem ser escritos em português ou inglês, de maneira impessoal.

### **Formatação de texto**

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma seção e deve ser apresentado no Microsoft Word e anexado como um "Documento Principal" (etapa 2), em formato A4, com margem de 3 cm (superior, inferior, esquerda e direita), em Fonte Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento 1,5 em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não use notas de rodapé. As referências a empresas e produtos, por exemplo, devem aparecer entre parênteses no corpo do texto, na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

### **Seções de um artigo**

**Título** . Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não exceder 50 palavras.

**Autores e Afiliação** . **Autores e Afiliação** . Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com o número ORCID e com a identificação da instituição a que pertencem. O autor correspondente e seu e-mail devem ser indicados com e asterisco, apenas na "Página de título" (etapa 2) no Word.

**Resumo e Resumo**. Deve ser o mesmo apresentado no registro, com até 200 palavras e um parágrafo. Não repita o texto e não adicione revisão de literatura. Inclua os principais resultados numéricos, mencionando-os sem explicação, quando aplicável. Cada frase deve conter uma informação completa.

**Palavras-chave e Palavras-chave** . Até cinco e pelo menos dois \*.

\* na submissão, use apenas a palavra-chave (etapa 3) e, no corpo do artigo, mencione a palavra-chave (inglês) e a palavra-chave (português), independentemente do idioma em que o artigo for enviado.

**Introdução** . Breve explicação na qual o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho são estabelecidos. Ele deve conter poucas referências, suficientes para defini-lo.

**Material e Métodos** . Mencione o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos utilizados ou faça referência correta aos métodos já publicados. No trabalho que envolve animais e / ou organismos geneticamente modificados , **deve haver o número do certificado de aprovação do CEUA** . (verifique o item do Comitê de Ética).

**Resultados** . Apresente os resultados encontrados de maneira clara e objetiva.

*Tabela* . Grupo de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Use linhas horizontais na separação de cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe a palavra Tabela, seguida de um número arábico e um período (ex .: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser chamada de tabulação, seguida por um período e um número de pedido (ex .: tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex: tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentado com espaçamento simples e uma fonte abaixo do tamanho 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da tabela deve conter apenas o indispensável para seu entendimento. As tabelas devem ser inseridas no corpo do texto, preferencialmente após a primeira citação.

*Figura* . Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, figura, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida pelo número e período arábicos (ex .: Figura 1.) e é referida na texto como Fig seguido de um ponto e o número do pedido (ex .: Fig.1), mesmo quando se referir a mais de uma figura (ex .: Fig. 1, 2 e 3). Além de serem inseridas no texto, as fotos e imagens devem ser enviadas em jpg de alta resolução, em um arquivo compactado, anexado no campo correto na tela de envio para o registro do artigo. As figuras devem ser inseridas no corpo do texto, de preferência após a primeira citação.

**Nota:** *Todas as tabelas e / ou figuras que já foram publicadas devem conter, abaixo da legenda, informações sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a*

*referência correspondente deve estar nas Referências.*

**Discussão** . Discuta apenas os resultados obtidos no trabalho. (Obs .: As seções Resultados e Discussão podem ser apresentadas de acordo com a preferência do autor, sem prejuízo das partes).

**Conclusões** . As conclusões devem ser corroboradas pelos resultados da pesquisa executada e apresentadas de maneira objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados ou especulação.

**Agradecimentos** . Opcional. Deve ser expresso brevemente.

**Referências**. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, preferindo artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, e indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o menos possível e somente quando indispensáveis. As normas gerais da ABNT são adotadas, **adaptadas** para a ABMVZ como os exemplos abaixo:

### **Como referenciar:**

#### **1. Citações no texto**

A indicação da fonte entre parênteses vem antes da citação para evitar interrupções na sequência do texto, como nos exemplos:

- Autor único: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário ..., 1987/88) ou Anuário ... (1987/88)
- Dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- Mais de dois autores: (Ferguson *et al.* , 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
- Mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.* , 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e em ordem alfabética dos artigos para artigos do mesmo ano.

*Citação de uma citação* . Todo esforço deve ser feito para consultar o documento original. Em situações excepcionais, a reprodução de informações já citadas por outros autores pode ser reproduzida. No texto, cite o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano da publicação, seguido da expressão **citada por** e o sobrenome do autor e o ano do documento consultado. Nas referências, apenas a fonte consultada

deve ser mencionada.

*Comunicação pessoal* . Estes não fazem parte das referências. A citação deve incluir o sobrenome do autor, a data da comunicação e o nome da instituição à qual o autor está vinculado.

**2. Publicações periódicas** (até 4 autores, cite todos eles. Mais de 4 autores, cite 3 autores e *outros* ):

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

FERGUSON, JA; REEVES, WC; HARDY, JL Estudos sobre imunidade a alfavírus em potros. *Sou. J. Vet. Res .*, V.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, JA; TAGLE, R .; WASERMAN, A. et al. Anestesia geral do cão. *Não. Med. Veterinario.* , n.1, p.13-20, 1984.

**3. Publicação única** (até 4 autores, cite todos eles. Mais de 4 autores, cite 3 autores e *outros* ):

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

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

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

Requisitos nutricionais dos suínos. 6.ed. Washington: Academia Nacional de Ciências, 1968. 69p.

SOUZA, CFA *Produtividade, qualidade e benefícios da carne e carne em bovinos de corte* . 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

**4. Documentos eletrônicos** (até 4 autores, citam todos. Mais de 4 autores, 3 autores e *outros* ):

Alimentos de QUALIDADE de animais para um mercado global. Washington: Associação da American Medical Veterinary College, 1995. Disponível em: < <http://>

[www.org/critca16.htm](http://www.org/critca16.htm) >. Acesso em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Os povos indígenas agora são mais cambiantes, organizados. Miami Herald, 1994. Disponível em: < [http://www.summit.fiu.edu/Artigos\\_relacionados\\_ao\\_MiamiHerld-Summit/](http://www.summit.fiu.edu/Artigos_relacionados_ao_MiamiHerld-Summit/) >. Acesso em: 5 dez. 1994.

## Taxas de envio e publicação

### SOMENTE PARA ARTIGOS NACIONAIS

- **Taxa de inscrição:** A taxa de inscrição é de R \$ 60,00 e deve ser paga através de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (é necessário concluir o registro). Apenas artigos com uma taxa de inscrição paga serão avaliados. Se a taxa não for paga em até 30 dias, será considerada renúncia do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação é de R \$ 150,00, página, após a prova final do artigo. A taxa de publicação deve ser paga através de boleto bancário e os dados serão informados quando o artigo for aprovado.  
**OBS .:** Quando as informações da fatura são diferentes das informações do autor do contato, um email deve ser enviado para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br) comunicando essa necessidade.

### SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Taxa de envio e publicação .** A taxa de publicação é de US \$ 50 (cinquenta dólares) por página e US \$ 50,00 (cinquenta dólares) pela submissão do manuscrito e será cobrada do autor correspondente na prova final do artigo . A taxa de publicação deve ser paga através de boleto bancário emitido pelo sistema de envio eletrônico de artigos. Ao solicitar o boleto, o autor informará os dados a serem incluídos na emissão da fatura.

## Recursos e diligências

- Se o autor enviar a resposta às diligências solicitadas pela ABMVZ, ou um documento de recurso, deverá ser anexado no Word, no item "Justificação" (etapa 2), e também deve ser enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br) .
- Se o artigo não for aceito, o autor poderá enviar um recurso, e isso deve ser feito por e-mail, no [enderecoabmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:enderecoabmvz.artigo@abmvz.org.br) .