

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO, ASSOCIADAS OU NÃO
À HIDROXIAPATITA, NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO
ÓSSEO EM RÁDIO DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

Guilherme Galhardo Franco

Médico Veterinário

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO, ASSOCIADAS OU NÃO
À HIDROXIAPATITA, NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO
ÓSSEO EM RÁDIO DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Guilherme Galhardo Franco

Orientador: Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre em Cirurgia
Veterinária**

2017

Franco, Guilherme Galhardo

F825c Células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo, associadas ou não à hidroxiapatita, na regeneração de defeito ósseo em rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Guilherme Galhardo Franco -- Jaboticabal, 2017
xvi, 72 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Bruno Watanabe Minto
Banca examinadora: Luís Gustavo Gonçalves Gosuen Dias, Sheila Canavese Rahal

Bibliografia

1. Consolidação. 2. Fraturas. 3. Transplante de células. I. Título. II.

Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617.3:636.92

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO, ASSOCIADAS OU NÃO À HIDROXIAPATITA, NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO EM RÂNIO DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

AUTOR: GUILHERME GALHARDO FRANCO

ORIENTADOR: BRUNO WATANABE MINTO

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


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


Profa. Dra. SHEILA CANEVESE RAHAL
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu / UNESP, SP


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

Jaboticabal, 17 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Guilherme Galhardo Franco, nascido em 2 de Abril de 1990, no município de São Paulo, estado de São Paulo. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Botucatu, em março de 2008. Nesta instituição, participou da diretoria e das atividades da Associação Atlética Acadêmica do curso de Medicina Veterinária e do Grupo de Estudos em Pequenos Animais (GEPA), tendo sido membro da diretoria por quatro anos. Realizou o Programa de Residência em Cirurgia de Pequenos Animais da FMVZ / Botucatu, entre 2013 e 2015. Ingressou no curso de mestrado em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, em março de 2015.

“Mestre não é aprende quem sempre ensina, mas quem de repente.”

Guimarães Rosa

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Agradeço pela imensa ajuda das residentes Carol, Mari e Tamara do serviço de Imagem do Hospital Veterinário Governador Laudo Bento Natel, pela ajuda na realização dos exames radiográficos.

Ao Professor João Ademir que me ajudou tão prontamente na análise estatística deste trabalho.

Ao professor Luís Gustavo Gosuen Gonçalves Dias, pela participação e ajuda neste trabalho.

À Professora Paola Castro Moraes, pela participação e ajuda neste trabalho.

Aos Professores Eduardo e Márcio da Universidade de Brasília, pela imensa ajuda nas avaliações histopatológicas.

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

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

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

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

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

Ao setor de Cunicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias que disponibilizou o local para manutenção dos animais deste experimento,

Ao Professor Carlos Augusto Araujo Valadão por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização dos procedimentos cirúrgicos.

Aos Animais deste experimento, com sua ingenuidade e pureza, permitiram a execução deste estudo e, assim contribuíram para o avanço da ciência.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação faz parte das obrigações para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – *Câmpus* de Jaboticabal – SP. O trabalho foi apresentado no formato de capítulos para melhor compreensão e apresentação dos resultados, no qual o capítulo 1 (um) representa as considerações gerais, contendo introdução, revisão de literatura, objetivos, hipóteses e o resumo da metodologia; o capítulo 2 (dois), por sua vez, é o artigo científico; e o capítulo 3 (três), corresponde às considerações finais.

SUMÁRIO

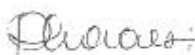
	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE QUADROS E TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	5
3.1. Objetivos gerais.....	5
3.2. Objetivos específicos.....	6
4. HIPÓTESES.....	6
5. RESUMO DA METODOLOGIA UTILIZADA.....	6
5.1. Instalações.....	7
5.2. Animais.....	7
5.3. Obtenção das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM-AD).....	7
5.4. Grupos experimentais	9
5.5. Aplicação das células-tronco mesenquimais.....	10
5.6. Avaliações pós-aplicação.....	14
5.7. Análise Estatística.....	17
6. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2 - Artigo científico nas normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	40

CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 3 – Considerações finais.....	50
1. Considerações metodológicas relevantes.....	50
2. Dificuldades encontradas.....	51
APÊNDICES.....	52
APÊNDICE A: Tabelas e Figuras suplementares dos resultados da avaliação clínica.....	53
APÊNDICE B: Tabelas e Figuras suplementares dos resultados da avaliação radiográfica.....	54
APÊNDICE C: Tabelas e Figuras complementares da avaliação histopatológica.	62
ANEXO 1 - Normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	65

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**unesp**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 7168/15 do trabalho de pesquisa intitulado "Utilização de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo na regeneração óssea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de maio de 2015.

Jaboticabal, 11 de maio de 2015.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO, ASSOCIADAS OU NÃO À HIDROXIAPATITA, NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO EM RÁDIO DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

RESUMO - Diante das necessidades médicas e potenciais propriedades biológicas, as células-tronco mesenquimais (CTM) têm emergido como ferramenta terapêutica no âmbito da medicina veterinária. Objetivou-se neste estudo, avaliar a utilização das células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo (CTM-AD), associadas ou não a hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91[®]), na regeneração óssea em coelhos. Para isso, foram utilizados 34 coelhos fêmeas, da raça Nova Zelândia Branco. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o preenchimento do defeito ósseo de 1 cm de extensão criado na diáfise distal do rádio, em: GCTM na qual utilizou-se 0,15 mL de solução salina 0,9% com 2 milhões de CTM-AD autólogas; GCTMH, hidroxiapatita associada aos 2 milhões de CTM-AD autólogas; e GC (grupo controle), 0,15 mL de solução salina 0,9%. Obtiveram-se radiografias no período pós-operatório imediato, e aos 15, 30, 45 e 90 dias. Realizou-se análise histológica de metade dos animais de cada grupo, 45 dias após a cirurgia, e o restante aos 90 dias. No período de acompanhamento não foram observadas fístulas ou secreções. O GCTM apresentou menor intensidade de edema comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). O GCTMH apresentou escore médio de avaliação radiográfica maior em relação aos demais para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea, em todos os momentos de avaliação ($p < 0,05$). Nas avaliações histológicas, o GCTM apresentou reparação óssea mais rápida e eficaz comparada ao GCTMH e ambos foram nitidamente superiores ao grupo controle. Portanto, conclui-se que as CTM-AD Autólogas, associadas ou não à hidroxiapatita, foram benéficas ao processo de regeneração óssea do defeito segmentar de tamanho crítico induzido experimentalmente, sendo que o GCTM apresentou resultados superiores comparados ao GCTMH.

Palavras-Chaves: consolidação, enxertia óssea, fraturas, transplante de células

AUTOLOGOUS ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS, WITH OR WITHOUT HYDROXYAPATITE, ON REGENERATION OF BONE DEFECT IN RADIUS OF RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)

ABSTRACT- Mesenchymal stem cells (MSCs) have been emerging as therapeutic tool in the Veterinary practice, specially due to their biological properties and medical needs. The aim of this study was to evaluate the use of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC), with or without absorbable synthetic hydroxyapatite (HAP-91), in bone regeneration in rabbits. Thirty four New Zealand White female rabbits were used. The experimental groups were divided according to the 1.0 cm- bone gap filling created in the distal radial diaphysis: GCTM, 0.15 mL of 0.9% saline solution with 2 million autologous AD-MSC; GCTMH, hydroxyapatite associated with 2 million autologous AD-MSC; and GC (control group), 0.15 mL of 0.9% saline solution. Radiographs were taken on the immediate postoperative period and at 15, 30, 45 and 90 days postoperatively. Histological analysis was performed on one half of the animals in each group 45 and 90 days after the procedure. Fistulas or secretions were not seen in any animal. The GCTM showed less edema compared to other groups ($p < 0.05$). The GCTMH showed a higher average score of radiographic evaluation compared to other groups for periosteal reaction parameters, the callus volume and bone bridge quality at all time points ($p < 0.05$). In the histological evaluations, GCTM presented faster and more efficient bone repair compared to GCTMH and both were significantly superior to the control group. Therefore, it was concluded that the autologous CTM-AD, associated or not with hydroxyapatite, were beneficial to the bone regeneration process of the experimentally induced critical size segmental defect, and the GCTM presented superior results compared to GCTMH.

Keywords: fracture healing, bone grafting, bone fractures, cell transplantation

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Capítulo 1	Página
Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro reação periosteal.....	15
Quadro 2. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro volume do calo ósseo.....	15
Quadro 3. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro qualidade da ponte óssea.....	16
 Capítulo 2	
Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro reação periosteal.....	28
Quadro 2. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro volume do calo ósseo.....	28
Quadro 3. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro qualidade da ponte óssea.....	29
 APÊNDICES	
Tabela 1A. Média e desvio padrão do escore de avaliação (1 - ausente, 2 - discreto, 3 - moderado e 4 - Intenso) em relação aos parâmetros clínicos avaliados no diferentes grupos (GC, GCTM, GCTMH) no 3º dia de pós-operatório.....	53
Tabela 1B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC,GCTM e GCTMH) no momento de avaliação pós-operatório.....	60

Tabela 2B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC,GCTM e GCTMH) no momento de avaliação 15 dias.....	60
Tabela 3B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC,GCTM e GCTMH) no momento de avaliação 30 dias.....	60
Tabela 4B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC,GCTM e GCTMH) no momento de avaliação 45 dias.....	61
Tabela 5B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC,GCTM e GCTMH) no momento de avaliação 90 dias.....	61
Tabela 1C. Graduação histológica utilizando escores de avaliação dos grupos GC, GCTM e GCTMH aos 45 e 90 dias de pós-operatório.....	64

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	Página
Figura 1. Imagens fotográficas do procedimento de colheita do tecido adiposo. A: Incisão de aproximadamente 2 cm na pele do coelho na linha média dorsal da região interescapular. B, C: Com o auxílio de material cirúrgico estéril foram colhidos aproximadamente 10 a 25 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa interescapular. D: Após lavagem, o tecido adiposo foi acondicionado em tubo de 50 mL contendo o meio de transporte.....	8
Figura 2. Imagens fotográficas do procedimento cirúrgico. A: Localização do local da falha óssea há 1,5 cm da articulação radiocárpica. B: Mensuração do tamanho do defeito ósseo a ser feito (1 cm). C: Realização da ostectomia com serra oscilatória e irrigação. D: Aspecto final da falha óssea (seta).....	12
Figura 3. Imagens fotográficas do procedimento cirúrgico. A: Aplicação percutânea das células-tronco na falha óssea. B: Botão celular formado após a centrifugação em meio de lavagem (seta amarela). C: Hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91) em grânulos. D: Falha óssea preenchida com Hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91) em grânulos.....	13
Capítulo 2	
Figura 1. Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação radiográfica do parâmetro reação periosteal ao longo dos momentos para os grupos GC, GCTM e GCTMH.....	31
Figura 2. Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação radiográfica do volume do calo ósseo ao longo dos momentos de avaliação para os grupos GC, GCTM e GCTMH.....	32
Figura 3. Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação radiográfica da qualidade da ponte óssea ao longo dos momentos de avaliação para os grupos GC, GCTM e GCTMH.....	33

Figura 4. Imagens radiográficas da evolução da regeneração da falha óssea na projeção craniocaudal do rádio e ulna do animal 10 do grupo controle (GC). 4A: Imagem radiográfica no pós-operatório imediato mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). 4B: Imagem radiográfica com 15 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). 4C: Imagem radiográfica com 30 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). 4D: Imagem radiográfica com 45 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). 4E: Imagem radiográfica com 90 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). Nota-se que o processo de reparação foi insuficiente ao longo das avaliações demonstrando a evolução para uma não união defeituosa.....

34

Figura 5. Imagens radiográficas da evolução da regeneração da falha óssea na projeção craniocaudal do rádio e ulna do animal 10 do grupo células-tronco mesenquimais (GCTM). 5A: Imagem radiográfica no pós-operatório imediato mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). 5B: Imagem radiográfica com 15 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio apresentando intensa reação periosteal (Seta). 5C: Imagem radiográfica com 30 dias de evolução, mostrando o preenchimento completo do defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio por calo ósseo (Seta). 5D: Imagem radiográfica com 45 dias de evolução, mostrando o preenchimento completo do defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio por calo ósseo (Seta) Nota-se a presença de intensa reação periosteal na extremidade do rádio adjacente à falha óssea.....

35

Figura 6. Imagens radiográficas da evolução da regeneração da falha óssea na projeção craniocaudal do rádio e ulna do animal 3 do grupo células-tronco mesenquimais e hidroxiapatita (GCTMH). 6A: Imagem radiográfica no pós-operatório imediato mostrando o defeito ósseo segmentar preenchido por hidroxiapatita na diáfise distal do rádio (Seta). 6B: Imagem radiográfica com 15 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do

rádio apresentando moderada reação periosteal (Seta). 6C: Imagem radiográfica com 30 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio apresentando intensa reação periosteal (Seta). 6D: Imagem radiográfica com 45 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio apresentando intensa reação periosteal e início da fase de remodelamento (Seta). 6E: Imagem radiográfica com 90 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio preenchido por calo ósseo (seta)..... 36

Figura 7. Avaliação histológica da região do defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio do coelho GC10. A- Coelho, rádio, grupo GC, 45 dias. Proliferação fibrosa proeminente e não união óssea (H&E, barra 400µm). B- Coelho, rádio, grupo GC, 90 dias. Proliferação óssea marcante e união óssea completa (H&E, barra 400µm)..... 38

Figura 8. Avaliação histológica da região do defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio do coelho GCTM10. A- Coelho, rádio, grupo CTM, 90 dias. Proliferação óssea acentuada e formação cartilaginosa hialina em área de calo ósseo com estabilização e união óssea (H&E, barra 400µm). B- Coelho, rádio, grupo CTM, 90 dias. Detalhe da formação cartilaginosa e óssea (H&E, barra 100µm)..... 39

Figura 9. Avaliação histológica da região do defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio do coelho GCTMH10. A- Coelho, rádio, grupo CTMH, 90 dias. Acentuada inflamação granulomatosa adjacente (seta) à área de formação de tecido ósseo trabecular (H&E, barra 400µm). B- Coelho, rádio, grupo CTMH, 90 dias. Depósitos de hidroxapatita (seta) circundados por acentuada inflamação granulomatosa contendo células gigantes multinucleadas (seta) (H&E, barra 100µm)..... 40

APÊNDICE

Figura 1A. Gráficos demonstrando a média do escore de avaliação clínica e o erro padrão da média dos grupos GC, GCTM e GCTMH para os parâmetros dor local, edema, secreções e claudicação no 3º dia de pós- operatório..... 53

Figura 1B. Gráficos mostrando a média do escore de avaliação radiográfica e o erro padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para o parâmetro reação periosteal.....	54
Figura 2B - Gráficos mostrando a média do escore de avaliação radiográfica e o erro padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para o parâmetro volume do calo ósseo.....	55
Figura 3B - Gráficos mostrando a média do escore de avaliação radiográfica e o erro padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para o parâmetro qualidade da ponte óssea.....	56
Figura 4B. Aspecto radiográfico final do processo de reparação do defeito ósseo segmentar no rádio dos coelhos do grupo controle (GC) no momento da eutanásia. A: Coelho GC3 , 45 dias; B: coelho GC4, 45 dias; C: coelho GC5 , 45 dias; D: coelho GC7, 90 dias; E: coelho GC8, 90 dias; F: coelho GC10, 90 dias; G: coelho GC11, 90 dias; H: coelho GC12, 45 dias; I: coelho GC2, 90 dias; J: coelho GC6, 90 dias.....	57
Figura 5B. Aspecto radiográfico final do processo de reparação do defeito ósseo segmentar no rádio dos coelhos do grupo células-tronco mesenquimais (GCTM) no momento da eutanásia. A: coelho GCTM13, 90 dias; B: coelho GCTM12, 90 dias; C: coelho GCTM11, 90 dias; D: coelho GCTM10, 45 dias; E: coelho GCTM9, 45 dias; F: coelho GCTM8, 90 dias; G: coelho GCTM7, 90 dias; H: coelho GCTM6, 90 dias; I: coelho GCTM5, 90 dias; J: coelho GCTM1, 45 dias.....	58
Figura 6B. Aspecto radiográfico final do processo de reparação do defeito ósseo segmentar no rádio dos coelhos do grupo células-tronco mesenquimais e hidroxiapatita (GCTMH) no momento da eutanásia. A: coelho GCTMH1, 90 dias; B: coelho GCTMH2, 90 dias; C: coelho GCTMH3, 90 dias; D: coelho GCTMH4, 90 dias; E: coelho GCTMH6, 45 dias; F: coelho GCTMH7, 45 dias; G: coelho GCTM8, 45 dias; H: coelho GCTMH9, 45 dias; I: coelho GCTMH10, 45 dias; J: coelho GCTM13, 90 dias.....	59

Figura 1C. Gráficos mostrando a média do escore de avaliação histopatológica e o desvio padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para os parâmetros formação de tecido ósseo, qualidade da união óssea, formação de ponte óssea.....	62
Figura 2C. Gráficos mostrando a média do escore de avaliação histopatológica e o desvio padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para os parâmetros neovascularização, infiltrado inflamatório, formação de tecido fibroso e formação de tecido cartilaginoso.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

cm – centímetros

CTM – célula-tronco mesenquimal

CTM-AD – célula-tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo

FGF - do inglês “*fibroblast growth factor*”

HGF - do inglês “*Hepatocyte growth factor/scatter factor*”

HLA-G - do inglês “*human leukocyte antigen*”

IDO - do inglês “*indoleamine 2,3-dioxygenase*”

IFN γ – *interferon gama*

IGF - do inglês “*Insulin-like growth factor*”

IL-1 – interleucina 1

IL-10 – interleucina 10

IL-2 – interleucina 2

IL-4 – interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

Kg - kilogramas

kV - Kilovoltagem

LIF - do inglês “*Leukemia inhibitory factor*”

mA - miliamperagem

mA s - miliamperagem por segundo

MHC-I - do inglês “*major histocompatibility complex*”

MHC-II - do inglês “*major histocompatibility complex*”

mL - mililitros

mm - milímetros

PDGF - do inglês “*platelet-derived growth factor*”

PGE2 – protaglandina E2

SVF – do inglês “*stromal vascular fraction*”

TGF-1 - do inglês “*transforming growth factor*”

TGF- β - do inglês “*transforming growth factor beta*”

TNF- α - do inglês “*tumoral necrosis fator alpha*”

VEGF - do inglês “*vascular endothelial growth factor*”

CAPÍTULO 1 — Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Na presença de ambientes biológico e mecânico apropriados, os processos naturais de reparação óssea são suficientes para restaurar de forma completa a integridade do esqueleto, para a maioria das fraturas (GIANNOUDIS, EINHORN, MARSH, 2007), independentemente do método de fixação (CHEN et al., 2009). No entanto, alguns cenários exigem intervenção apropriada para potencializar os mecanismos fisiológicos de reparação, no intuito de regenerar grandes quantidades de osso (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

Situações específicas, que possam exigir intervenções adicionais ou diferenciadas, incluem a perda substancial de osso hospedeiro por trauma ou ressecção de tumor, artrodese, fusão espinhal, não união ou união retardada, doença metabólica, artroplastia, e pacientes com potencial de reparação tecidual insuficiente devido à doença local, sistêmica ou idade avançada (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

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

Biomateriais e outras estratégias facilitadoras da regeneração são cada vez mais estudados e utilizados para potencializar os eventos da união óssea secundária e alcançar o resultado desejado (VENKATESAN et al., 2016). Nos últimos anos, as células-tronco mesenquimais (CTM) têm emergido como ferramenta terapêutica, devido às suas propriedades biológicas e às necessidades médicas (LEVI; LONGAKER, 2011). As razões para seu uso são inúmeras, e pode-se destacar: fácil isolamento e expansão em cultura, multipotencialidade, efeitos parácrinos, propriedades imunomodulatórias e capacidade de migração (PITTINGER et al., 1999).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado resultados promissores na potencialização da regeneração óssea utilizando a terapia celular associada aos biomateriais (VENKATESAN et al., 2016). Entretanto, mais estudos clínicos e *in vivo* são necessários para determinar o seu real potencial terapêutico na ortopedia veterinária.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Regeneração óssea

O tecido ósseo é embriologicamente formado por processo complexo envolvendo fatores celulares, humorais e mecânicos. O resultado é um esqueleto capaz de crescimento controlado, resposta estrutural ao estresse e lesão, promovendo reparo, sem cicatriz (OLSEN; REGINATO; WANG, 2000 e CHEN et al., 2009).

A regeneração óssea ocorre por processo bastante semelhante à formação embrionária do tecido ósseo (ISAKSSON, 2012) e, parece ser primariamente influenciada pela quantidade de movimento interfragmentar, causada pelo estresse aplicado sobre a fratura, e modulado pela estabilidade de sua fixação (GIANNOUDIS, EINHORN, MARSH, 2007).

As vias de regeneração óssea incluem reparação óssea indireta, na qual o osso é formado sobre precursor cartilaginoso; reparação óssea direta, na qual o osso é formado sem evidência de calo e, por fim, a formação óssea intramembranosa, na qual ocorre a diferenciação direta de células-tronco mesenquimais em osteoblastos, de modo que o osso forma-se sem precursor cartilaginoso (PONIATOWSKI et al., 2015).

A reparação de muitas fraturas, especialmente aquelas com movimento ou lacunas interfragmentares, ocorre por consolidação óssea secundária (ISAKSSON, 2012). Neste mecanismo complexo, as células-tronco mesenquimais presentes no tecido danificado diferenciam-se em fibroblastos, condroblastos, condrócitos e osteoblastos, os quais formam o calo ósseo da fratura (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

A consolidação óssea secundária ocorre em seis etapas subsequentes: hemorragia da área da fratura, formação de coágulo, inflamação e edema, proliferação de células mesenquimais pluripotentes, formação cartilaginosa e óssea e remodelamento do calo ao osso normal (GIANNOUDIS, EINHORN, MARSH, 2007).

Imediatamente após a fratura, a fase inflamatória da regeneração óssea é iniciada (EINHORN et al., 1995). O hematoma tem a função de sinalizar com moléculas as quais têm a capacidade de desencadear cascatas inflamatórias e promover respostas celulares críticas à reparação da fratura (MIZUNO et al., 1990). As células inflamatórias migram do sangue periférico e do compartimento intramedular ao foco de fratura (GIANNOUDIS, EINHORN, MARSH, 2007). Elas secretam citocinas, como a interleucina-1, interleucina-6 e o fator de necrose tumoral (TNF- α), as quais são importantes na regulação dos eventos prematuros relativos à regeneração das fraturas (EINHORN et al., 1995).

As citocinas secretadas no foco de fratura induzem a produção de fator de crescimento endotelial (VEGF) e outros fatores angiogênicos para promover a neoangiogênese (KERAMARIS et al., 2008). As plaquetas, provavelmente, são a primeira fonte do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e do fator de crescimento transformador (TGF-1), ambos reguladores importantes da proliferação e diferenciação celular (PONIATOWSKI et al., 2015).

Além disso, outras moléculas sinalizadoras como as prostaglandinas E1 e E2, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) são liberadas pelas células presentes no foco da fratura. Essas moléculas podem estimular a angiogênese e serem responsáveis pela sinalização do início da reabsorção óssea por osteoclastos. Adicionalmente, elas induzem a proliferação de células osteoprogenitoras (BOLANDER, 1992; EINHORN et al., 1995).

2.2. Células-tronco mesenquimais e a reparação óssea

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células multipotenciais capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos e tenócitos

(PITTENGER et al., 1999), sendo o ponto chave da formação e reparação óssea. Elas atuam produzindo efeitos parácrinos e autócrinos para restabelecer a função esquelética (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

São originadas da medula óssea e do perióstio embora outras fontes, tais como o músculo, gordura e sinóvia podem ser observadas, entretanto representando uma fonte limitada (LEVI; LONGAKER, 2011). A medula óssea e perióstio são as fontes mais ricas em animais jovens, com seus números diminuindo, mas ainda presente, em animais com idade avançada (PITTENGER et al., 1999). Em ossos metafisários o número dessas células são maiores contribuindo para consolidação óssea mais rápida nestes locais (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

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

As células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo (CTM-AD) também podem ser denominadas células multipotentes derivadas do tecido adiposo, pré-adipócitos, células mesenquimais derivadas do tecido adiposo, células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo, células estromais aderentes derivadas do tecido adiposo, células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e células estromais derivadas do tecido adiposo, sendo essa última nomenclatura definida como a mais adequada na “*Second Annual International Fat Applied Technology Society Meeting*” (LEVI; LONGAKER, 2011).

As CTM-AD foram primariamente isoladas e descritas em humanos, por Zuk et al. (2001), mas atualmente já foram isoladas de diversas espécies como ratos (ZAMINY et al., 2008), camundongos, coelhos, cães (NEUPANE et al., 2008; VIEIRA et al., 2010) e suínos (QU et al., 2007). As CTM-AD podem ser extraídas do tecido adiposo intra-abdominal ou subcutâneo (RADA et al., 2009). O primeiro artigo que descreveu a formação de tecido ósseo a partir de CTM-AD foi publicado por Hicok et

al. (2004), no qual cubos de hidroxiapatita foram semeados com CTM-AD humanas osteogenicamente induzidas e foram implantados no subcutâneo em camundongos. Houve a formação de matriz osteoide em 80% dos cubos semeados com CTM-AD demonstrando o potencial terapêutico na reparação e regeneração óssea.

2.3. Biomateriais e as células-tronco mesenquimais

Juntamente com a investigação do potencial terapêutico das CTM, os biomateriais são amplamente estudados e utilizados para potencializar a regeneração óssea. O termo biomaterial foi definido como qualquer substância de origem natural ou sintética que pode ser usada por qualquer período, como todo ou parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo (BRUCK, 1991). São exemplos de biomateriais frequentemente utilizados nas cirurgias médicas e odontológicas: os metais ou ligas metálicas (titânio, titânio-alumínio-vanádio, ferro-cromo-níquel), as cerâmicas (hidroxiapatita, trifosfato de cálcio), os polímeros (poliamida, polipropileno, polimetilmetacrilato) e os compósitos (amálgama) (CALIXTO, 2001).

O osso é composto de matriz orgânica rígida, grandemente fortalecida por depósitos de sais de cálcio (GIANNOUDIS, EINHORN, MARSH, 2007). Dentre os sais ósseos constituídos de fosfato de cálcio, os principais são denominados hidroxiapatita (VENKATESAN et al., 2016). A hidroxiapatita é o principal constituinte da porção mineral dos ossos e dos dentes e tem sido sintetizada e amplamente utilizada para preencher defeitos ósseos (VENKATESAN et al., 2016). A principal função da hidroxiapatita é a osteocondução, permitindo que os tecidos cresçam dentro de sua estrutura, devido à interconexão dos poros, o que aumenta a velocidade de crescimento do tecido ósseo (VENKATESAN et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar a utilização das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-AD) autólogas, isoladamente ou associada à hidroxiapatita, em defeito ósseo segmentar experimentalmente induzido na diáfise do rádio de coelhos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos clínicos, radiográficos, histopatológicos do tecido ósseo formado após a utilização de CTM-AD autólogas, em modelo de defeito ósseo de tamanho segmentar, induzido no rádio de coelhos da raça Nova Zelândia Brancos (*Oryctolagus cuniculus*).

- Avaliar se a aplicação isolada CTM-AD autólogas foi benéfica ao processo de regeneração óssea.

-Avaliar se a associação do biomaterial (*scaffold*) de grânulos de Hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91^{®1}) com as CTM-AD autólogas foi benéfica ao processo de regeneração óssea.

4. HIPÓTESES

A principal hipótese deste trabalho é que a utilização de CTM-AD no defeito ósseo segmentar potencialize o processo de regeneração óssea, tornando-o mais rápido e eficaz.

Adicionalmente, espera-se que as CTM-AD sejam benéficas isoladamente, entretanto, a sua associação com um “*scaffold*” de hidroxiapatita potencialize ainda mais o processo de regeneração óssea.

5. RESUMO DA METODOLOGIA UTILIZADA

Toda a metodologia prevista para o trabalho foi encaminhada para aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Jaboticabal (SP) e, somente foi realizada mediante tal aprovação².

¹ HAP-91[®] – Hidroxiapatita sintética absorvível – JHS biomateriais – Sabará-MG

² Protocolo número: 007168

5.1. Instalações

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados junto ao Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal. Os exames radiográficos foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV. As análises histológicas foram realizadas junto ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade de Brasília – UnB - DF.

5.2. Animais

Foram utilizados 36 animais, da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*) raça Nova Zelândia Branco, fêmeas, adultas jovens (160 a 170 dias de idade), com massa corpórea variando entre 3,5 e 4,5 kg. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração específica e água *à vontade*.

5.3. Obtenção das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM-AD)

As CTM-AD foram processadas e fornecidas pelo laboratório BIO CELL³. Após a anestesia do animal (citada posteriormente) foi realizada ampla tricotomia da região cervical e torácica dorsais, seguida de antissepsia com clorexidine degermante 2%⁴ e clorexidine alcoólico 0,5%⁵. Ato contínuo, realizou-se uma incisão de aproximadamente dois cm na pele da linha média dorsal da região interescapular. Com o auxílio de material cirúrgico estéril foi colhido aproximadamente 10 a 25 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa interescapular. O tecido adiposo foi acondicionado em um tubo de 50 mL contendo meio de lavagem estéril por 2 minutos. Após esse tempo, o tecido adiposo foi retirado do primeiro tubo de lavagem e acondicionado no segundo tubo de lavagem por 3 minutos. Posteriormente, o tecido adiposo foi acondicionado no tubo contendo o meio de transporte. O tubo foi

³ BIO CELL LTDA - SMPW Qd. 05 conj. 05 lote 01 - Casa C CEP 71735-505 Tel.: (61) 3382-7407 Distrito Federal Brasil

⁴ RIOHEX® 2% - Solução degermante - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA – São José do Rio Preto - SP

⁵ RIOHEX® 0,5% - Solução alcoólica - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA – São José do Rio Preto - SP

identificado com o número do animal e acondicionado na geladeira até o momento do envio do material (Figura 1).

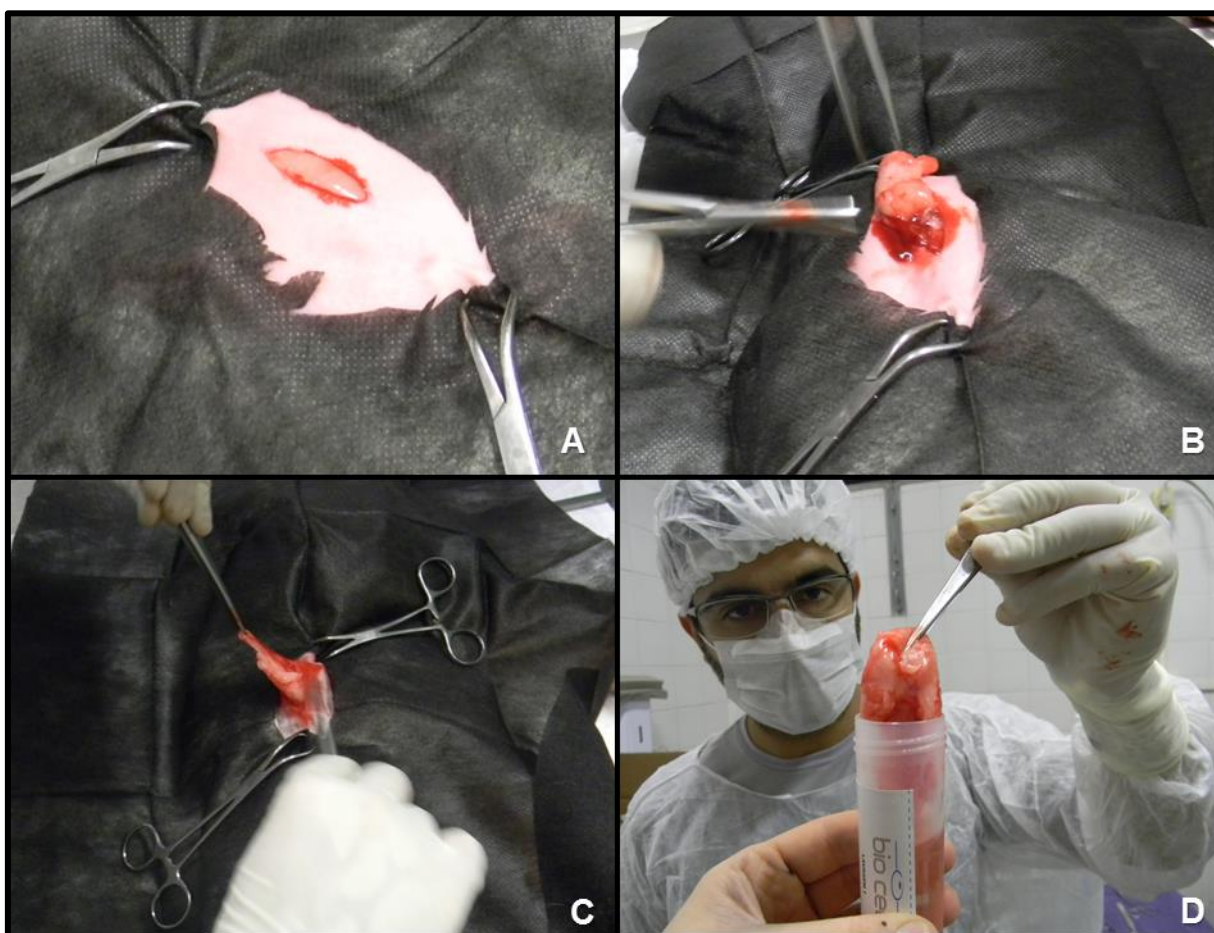


Figura 1. Imagens fotográficas do procedimento de colheita do tecido adiposo. A: Incisão de aproximadamente dois cm na pele do coelho na linha média dorsal da região interescapular. B, C: Com o auxílio de material cirúrgico estéril foram colhidos aproximadamente 10 a 25 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa interescapular. D: Após lavagem, o tecido adiposo foi acondicionado em tubo de 50 mL contendo o meio de transporte.

O tecido adiposo foi lavado várias vezes em solução tampão fosfato salina (PBS) para retirar restos celulares e excesso de sangue. Logo após, ele foi fragmentado em partículas pequenas e colocado em contato com a solução de collagenase e hialuronidase para que fosse realizada a digestão enzimática. A mistura foi centrifugada por 15 minutos e o botão celular foi ressuspenso. O mesmo procedimento foi repetido quatro vezes. Realizou-se o método de exclusão

“trypan blue”. Esse processo constituiu a preparação do SVF (“stromal vascular fraction”).

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

Após sete dias de cultivo, realizou-se o repique celular e iniciando um novo cultivo celular em uma garrafa de 75 cm³. Ao se obter 80% de confluência celular realizou-se a tripsinização. Parte das células permaneceu na garrafa de cultivo e cerca de 4 a 5 milhões de células foram acondicionadas em meio de transporte celular em seringas de cinco mL e encaminhadas para a utilização nos animais do experimento. Parte das células que permaneceram no laboratório foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo.

Aproximadamente dois milhões de células-tronco foram fixadas em solução de formaldeído e encaminhadas para os Estados Unidos da América no laboratório MOFA Global⁶ para ser realizada a caracterização celular. A outra parte das células que permaneceu no laboratório Biocell⁷ foi congelada e permaneceu em nitrogênio líquido.

5.4. Grupos experimentais

Os 36 coelhos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, de acordo com os tratamentos utilizados na falha óssea induzida experimentalmente:

GCTM - Grupo células-tronco mesenquimais autólogas derivadas do tecido adiposo. Preenchimento do defeito ósseo com 2 milhões de CTM-AD autólogas em 0,15 mL de solução salina 0,9%⁸ estéril por aplicação percutânea.

GCTMH – Grupo células-tronco mesenquimais autólogas derivadas do tecido adiposo associado ao carreador (*scaffold*) de grânulos de hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91)⁹. Completo preenchimento do defeito ósseo com hidroxiapatita e posterior aplicação percutânea de 2 milhões de CTM-AD autólogas diluídas em 0,15 mL de solução salina 0,9%⁷ estéril.

⁶ MOFA Global - Verona, Wisconsin 419 Venture Court

⁷ BIO CELL LTDA - SMPW Qd. 05 conj. 05 lote 01 - Casa C CEP 71735-505 Tel.: (61) 3382-7407 Distrito Federal Brasil

⁸ Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX® - Goiânia

⁹ HAP-91® – Hidroxiapatita sintética absorvível – JHS biomateriais – Sabará-MG

GC - Grupo Controle. Preenchimento do defeito ósseo com 0,15 mL de solução salina 0,9%⁷ estéril por aplicação percutânea.

No presente trabalho, utilizou-se HAP-91®¹⁰, que constitui forma granular de hidroxiapatita, composta por microporos intermoleculares. Sua síntese consistiu na precipitação da HAP-91® a partir da reação de H₃PO₄ com Ca(OH)². O precipitado foi submetido a um processo de filtração seguida de secagem por passagem de ar. Posteriormente, o produto foi aquecido a 900°C por uma hora (BICALHO et al., 2008).

Foram avaliados nos diferentes tratamentos os parâmetros clínicos, radiográficos, histopatológicos. Para avaliação histopatológica, metade dos animais de cada grupo foi submetida à eutanásia no 45º dia após o procedimento cirúrgico e a outra metade no 90º dia. Avaliações radiográficas foram realizadas no pós-operatório imediato, no 15º dia, no 30º dia, no 45º dia e no 90º dia.

Todos os animais que apresentaram resultado insatisfatório da criação do defeito ósseo segmentar (localização e tamanho inadequados) ou que apresentaram algum tipo de complicação pós-operatória grave (fratura da ulna) foram excluídos do estudo e não foram repostos, totalizando 34 animais avaliados.

5.5. Aplicação das células-tronco mesenquimais

5.5.1. Pré-operatório

Os coelhos foram submetidos a período de adaptação às gaiolas e desenvolvimento do sistema musculoesquelético de aproximadamente cinco meses. Não foram realizadas privações de água ou alimento previamente à cirurgia, de acordo com as recomendações de Harcourt-Brown (2002).

5.5.2. Anestesia

Todos os 36 coelhos foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. Os animais foram pré-medicados com midazolam¹¹ 2 mg/kg associado à morfina¹² 2

¹⁰ HAP-91® – Hidroxiapatita sintética absorvível – JHS biomateriais – Sabará-MG

¹¹ Dormonid® 5 mg/mL, Roche

¹² Dimorf® 10 mg/mL, Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA -Itapira - SP

mg/kg e cetamina¹³ 25 mg/kg por via intramuscular (IM). Após tricotomia da região e introdução de cateter 24G¹⁴ na veia safena lateral ou auricular, foi realizada a indução anestésica dos animais com Isoflurano¹⁵ 3V% por meio de máscara facial completamente vedada, e manutenção anestésica com isoflurano sem intubação orotraqueal. O plano anestésico foi monitorado por meio da frequência respiratória, objetivando-se 10 a 30 movimentos respiratórios por minuto, frequência cardíaca e saturação parcial de oxigênio entre 95 a 100%. Após quatro horas da medicação pré-anestésica, realizou-se resgate analgésico com morfina 2 mg/kg IM.

5.5.3. Procedimento Cirúrgico

O animal foi posicionado em decúbito lateral direito com o membro torácico esquerdo estendido caudalmente. Procedeu-se a tricotomia ampla de todo membro torácico direito e posterior antissepsia do campo cirúrgico utilizando clorexidine 2%¹⁶ e clorexidine alcoólico 0,5%¹⁷ e proteção da extremidade do membro com atadura¹⁸ coberta posteriormente com dedo de luva estéril¹⁹.

Realizou-se incisão de aproximadamente 2,5 cm sobre a pele, na região craniomedial do rádio, seguida de divulsão do tecido subcutâneo e musculatura, o que permitiu então a exposição da diáfise distal do rádio. Ato contínuo, foi feita osteotomia parcial de 1 cm de extensão na diáfise radial, há 1,5 cm da articulação radiocárpica, utilizando-se serra oscilatória²⁰ e especímetro para as mensurações (Figura 2). Para evitar a termo necrose óssea, utilizou-se irrigação do local de osteotomia com solução salina 0,9%²¹ estéril durante este procedimento. Removeu-se o segmento do rádio, juntamente com seu periósteo, obtendo-se desta forma, falha óssea de um centímetro de extensão.

¹³ Vetaset® 100 mg/mL, Zoetis

¹⁴ Cateter SAFELET® 24G – NIPRO – Miami, Florida, EUA

¹⁵ Isoforine® 100%, Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA -Itapira - SP

¹⁶ RIOHEX® 2% - Solução degermante - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA – São José do Rio Preto - SP

¹⁷ RIOHEX® 0,5% - Solução alcoólica - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA – São José do Rio Preto - SP

¹⁸ Atadura de crepom cysne- Cremer- Vila Olímpia, São Paulo -SP

¹⁹ Luva cirúrgica estéril SENSITEX®- Mucambo- Bahia, Brasil

²⁰ Serra Oscilatória Bojin – Campinas – SP.

²¹ Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX®- Goiânia

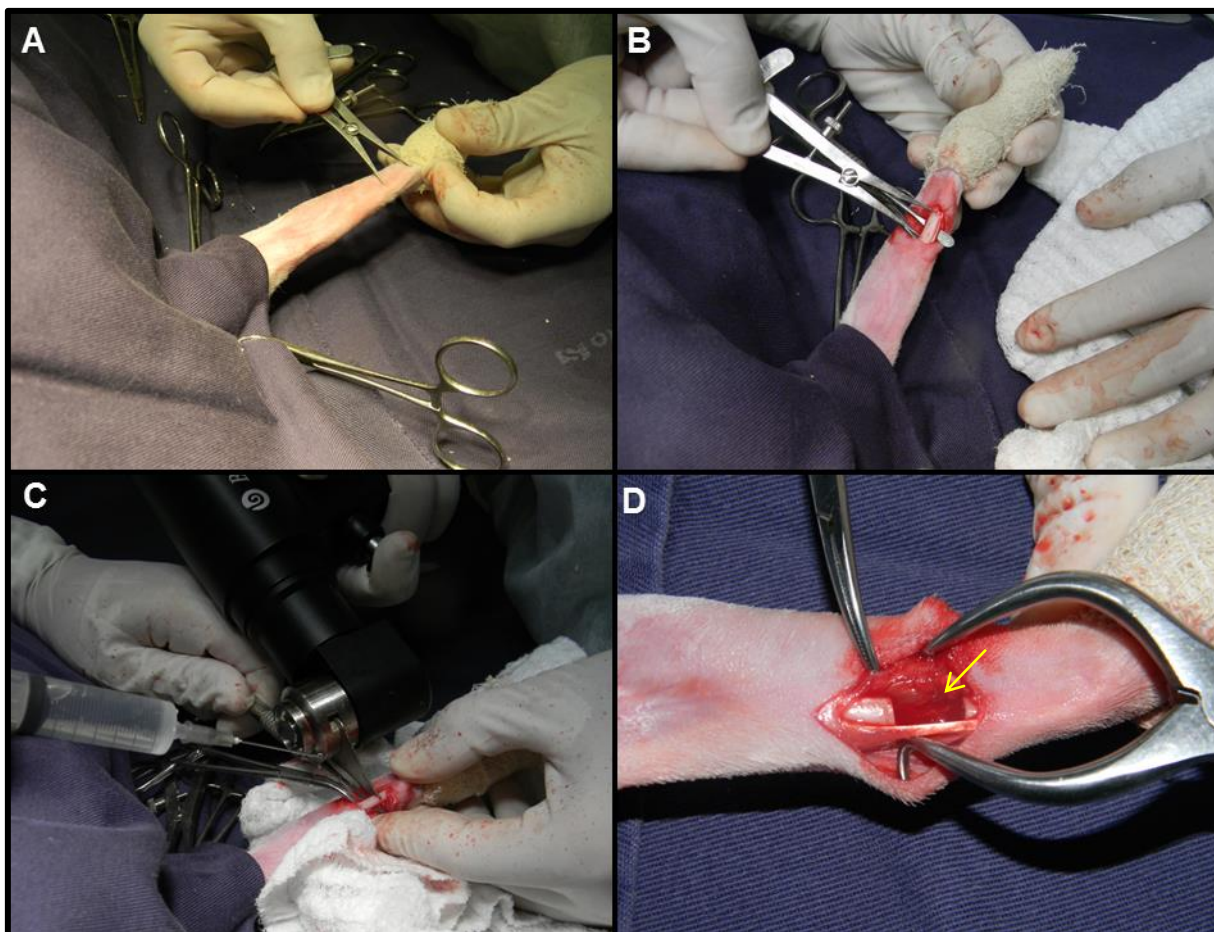


Figura 2. Imagens fotográficas do procedimento cirúrgico. A: Localização do local da falha óssea há 1,5 cm da articulação radiocárpica. B: Mensuração do tamanho do defeito ósseo a ser feito (1 cm). C: Realização da osteotomia com serra oscilatória e irrigação. D: Aspecto final da falha óssea (seta).

No grupo CTM, as células-tronco que estavam acondicionadas em 5 mL de meio de transporte foram submetidas à centrifugação a 1250 RPM durante 5 minutos até a formação do botão celular no fundo do tubo. Descartou-se o sobrenadante, logo após, o botão celular foi ressuscitado com 0,15 mL de solução salina 0,9%²² estéril e acondicionado em seringa²³ 1 mL. Realizou-se a aplicação percutânea das células-tronco no local da falha óssea criada. No grupo CTMH, a falha óssea foi preenchida por completo com grânulos de hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91) e foram aplicadas de forma percutânea as células-tronco ressuscitadas em 0,15 mL de solução salina 0,9%¹⁴ estéril conforme procedimento

²² Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX® - Goiânia

²³ Seringa 1 mL – BD

descrito anteriormente no grupo CTM. No grupo controle (GC) a falha óssea não foi preenchida, permanecendo vazia e foi aplicado de forma percutânea o mesmo volume de solução salina 0,9 %¹⁴ estéril isenta de células-tronco na falha óssea.

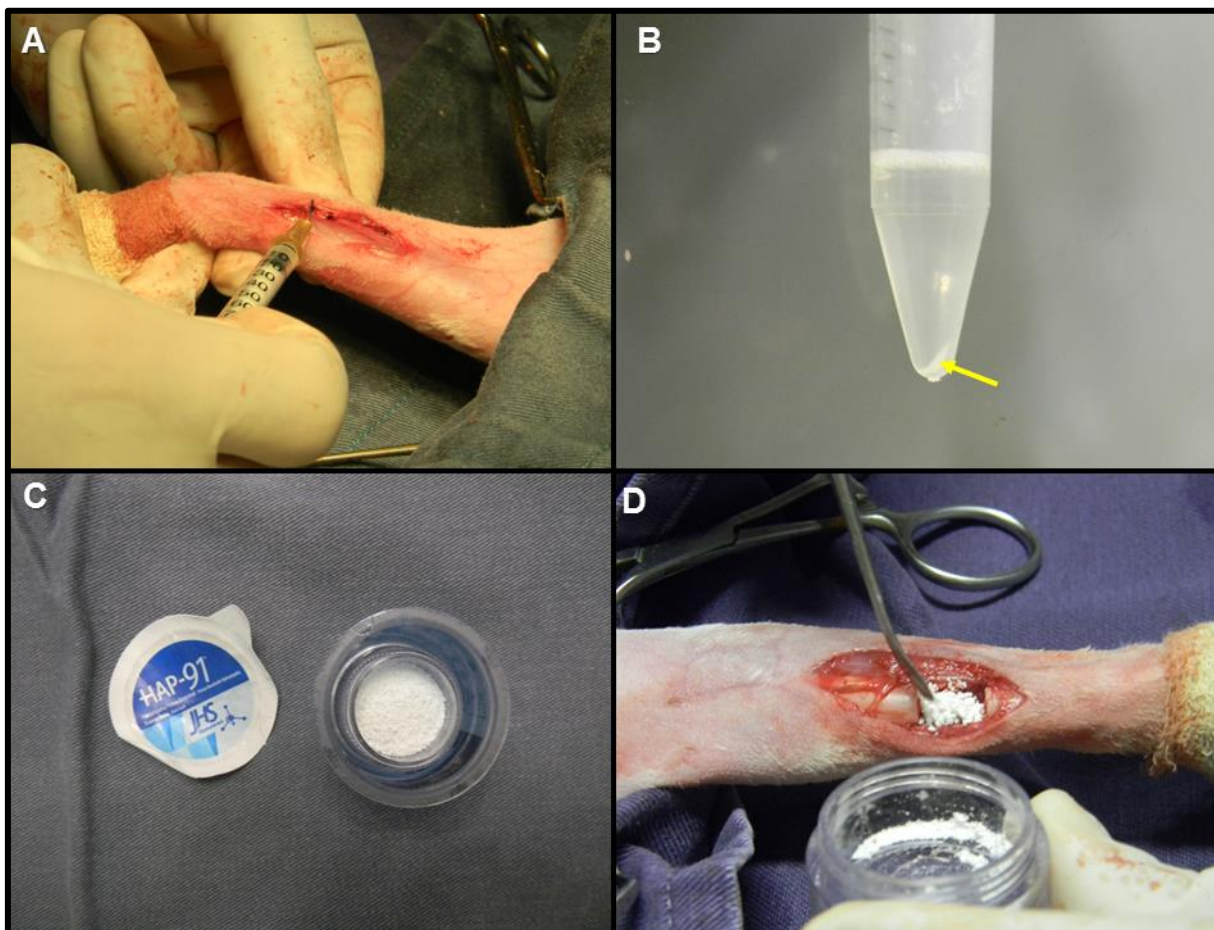


Figura 3. Imagens fotográficas do procedimento cirúrgico. A: Aplicação percutânea das células- tronco na falha óssea. B: Botão celular formado após a centrifugação em meio de lavagem (seta amarela). C: Hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91) em grânulos. D: Falha óssea preenchida com Hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91) em grânulos.

A presença de forte membrana interóssea unindo o rádio e a ulna faz com que esta funcione fixando o rádio, não permitindo que haja movimentação, dispensando, portanto, o uso de fixação interna (LACRETA JUNIOR et al., 2010).

Em todos os grupos (GCTM, GCTMH e GC), a sutura da musculatura e subcutâneo foi realizada com fio náilon²⁴ número 4-0, em padrão simples contínuo. Para a sutura de pele foi utilizado náilon cirúrgico²⁵ número 4-0 em padrão simples separado.

5.5.4. Pós-operatório

Durante o período de sete dias os animais foram submetidos à terapia antimicrobiana com enrofloxacin 2,5%²⁶ na dose de 5 mg/kg (diluído em 1mL de solução salina 0,9%²⁷), via subcutânea, a cada 24 horas. Para analgesia, utilizou-se cloridrato de tramadol²⁸ na dose de 5 mg/kg via subcutânea, a cada 8 horas nos primeiros três dias e a cada 12 horas durante dois dias subsequentes.

5.6. Avaliações pós-aplicação

5.6.1. Avaliação clínica

Os animais foram observados diariamente até o momento da eutanásia, a fim de verificar qualquer reação tecidual no membro operado. No 3º e no 7º dia pós-operatório os animais foram submetidos à palpação no local operado com intuito de verificar a presença ou ausência de reação que evidenciasse dor. Nestes mesmos dias, avaliou-se de forma minuciosa a presença de edema, secreções na ferida cirúrgica e a utilização do membro torácico operado. A avaliação foi realizada por um mesmo observador e foi utilizada um escore de 1 a 4 para cada item avaliado, sendo 1 (ausente), 2 (discreto), 3 (moderado) e 4 (intenso).

5.6.2. Avaliação radiográfica

Todos os animais tiveram seus membros torácicos direitos radiografados²⁹ no período pós-operatório imediato, aos 15, 30, 45 e 90 dias. Realizou-se a avaliação duplo cego das imagens radiográficas por três avaliadores distintos que

²⁴ Nylon SHALON® Fios Cirúrgicos LTDA - São Luis de Belos Montes - GO

²⁵ Nylon SHALON® Fios Cirúrgicos LTDA - São Luis de Belos Montes - GO

²⁶ Chemitril Injetável 2,5 %®/ Chemitec agroveterinária LTDA – São Paulo –SP

²⁷ Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX®- Goiânia

²⁸ Cloridrato de Tamadol 50 mg/mL ® Hipolabor - Sabará –MG.

²⁹ Aparelho de radiografia marca Siemens, modelo tridoros 812E com capacidade para 800mA, equipado com grade antidifusora Polter-Bucky.

desconheciam o tempo de realização do exame e o grupo experimental de cada animal. Com o auxílio de escore, qualificou-se a evolução do processo de consolidação óssea. Para a análise, utilizou-se a média dos valores registrados. Reação periosteal, volume de calo ósseo, qualidade de ponte óssea entre os fragmentos foram os parâmetros semiquantitativos usados para a avaliação (Quadros 1, 2 e 3) (AN et al., 1999; ÖZTÜRK et al., 2008).

Foram utilizadas as projeções mediolateral e craniocaudal. A técnica utilizada foi com mA= 100, KV= 40 e mAs = 3,2.

Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro reação periosteal. (Adaptado de AN et al., 1999; ÖZTÜRK et al., 2008)

Reação Periosteal	
Escore	Características radiográficas
1	Ausência de reação periosteal
2	Discreta reação periosteal
3	Moderada reação periosteal
4	Intensa reação periosteal

Quadro 2. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro volume do calo ósseo. (Adaptado de AN et al., 1999; ÖZTÜRK et al., 2008)

Volume do calo ósseo	
Escore	Características radiográficas
1	0 a 25% da falha óssea está preenchida com calo ósseo
2	25 a 50 % da falha óssea preenchida com calo ósseo
3	50 a 75 % da falha óssea preenchida com calo ósseo
4	75 a 100 % da falha óssea preenchida com calo ósseo

Quadro 3. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro qualidade da ponte óssea. (Adaptado de AN et al., 1999; ÖZTÜRK et al., 2008)

Qualidade da Ponte óssea	
Escore	Características radiográficas
1	Ausência de Ponte óssea entre os fragmentos do rádio
2	Formação de discreta Ponte óssea na região ventrolateral do radio (ligamento interósseo)
3	Formação de Ponte óssea de espessura inferior ao diâmetro da diáfise do rádio restabelecendo a coluna óssea
4	Formação de Ponte óssea de espessura igual ou superior ao diâmetro da diáfise do rádio restabelecendo a coluna óssea

5.6.3. Avaliação Histopatológica

Uma parcela dos animais (16/34) foi submetida à eutanásia em 45 dias e o restante (18/34) em 90 dias após o procedimento cirúrgico. Realizou-se primeiramente a sedação com cloridrato de xilazina³⁰ (2 mg/kg) por via intramuscular, seguida pela infusão intravenosa de Propofol³¹ suficiente para parada respiratória e, em seguida, infusão de cloreto de potássio³² intravenosa suficiente para parada cardíaca.

Imediatamente após a eutanásia, coletaram-se segmentos do membro torácico direito dos animais (rádio e ulna), sendo as osteotomias realizadas em aproximadamente 1 cm proximal e distal das interfaces da falha óssea.

O tecido ósseo foi preparado com a técnica de descalcificação, sendo inicialmente fixado em formol a 10% durante 48 horas, colocado em líquido descalcificador (solução de ácido nítrico 7%) com volume 100 vezes maior ao da peça, trocando-se o líquido diariamente, até que o tecido amoleça, em média de 2 a 3 dias.

³⁰ Xilazin®/ Syntec do Brasil LTDA- Horlândia- SP

³¹ Propovan®/ Cristália – Itapira-SP

³² Solução de cloreto de potássio 19,1% - - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX®- Goiânia

Foram então incluídos em parafina e cortados no micrótomo a 5 mm, sendo corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM) e observados ao microscópio óptico³³, visando acompanhar comparativamente a neoformação dos tecidos fibrosos, cartilagosos e osso jovem durante o processo de regeneração óssea.

As avaliações microscópicas foram quantificadas em escores de 1 a 4, sendo 1 ausência de lesões, 2 discreta quantidade, 3 moderada e 4 acentuada quantidade de lesões no local. As características microscópicas caracterizadas por esses escores foram: neovascularização, ausência ou presença de infiltrado inflamatório, formação de tecido fibroso, formação de tecido cartilaginoso, formação de tecido ósseo, qualidade da união e formação de ponte óssea. Foi também avaliado de forma descritiva organização da arquitetura e morfologia da neoformação óssea.

5.7. Análise Estatística

Para as variáveis categóricas (escore de avaliação clínica, de avaliação radiográfica e de avaliação histopatológica) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico), sendo que para valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($p < 0,05$), as diferenças entre as médias entre os grupos, tempos, grupos dentro de tempos e tempos dentro de grupos foram consideradas significativas. Para tanto, foi utilizado o programa estatístico Graphpad Prisma (versão 5.0, 2003).

6. REFERÊNCIAS³⁴

AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J.; DRAUGHN, R.A. Animal Models of Bone Fracture or Osteotomy. c.11 In: AN, Y.H. and FRIEDMAN, R.J. **Animal Models In Orthopaedic Research**. Boca Raton: CRC Press. p.197-217. 1999.

BICALHO, S. M. C. M. et al. **HAP-91® e COL. HAP-91® Casuísticas e Estudos Científicos**. 3 ed. Sabará: Sabará, 2008. 253 p.

³³ Microscópio modelo Axio Scope. A1 – Carl Zeiss

³⁴ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração*. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

BOLANDER, M.E. Regulation of fracture repair by growth factors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 200, p.165-170, 1992.

BRUCK, S.D. Biostability of materials and implants. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, n.89, p.106, 1991.

CALIXTO, R.F.E. **Implante de um floculado derivado de resina do óleo de mamona (*Ricinus communis*) em alvéolo de rato imediatamente após a extração dental. Avaliação histológica e histométrica da biocompatibilidade e da cronologia do reparo ósseo.** 2001.72f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade de São Paulo.

CHEN, J.H.; LIU, C.; YOU, L.; SIMMONS, C.A. Boning up on Wolff's law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. **Journal of Biomechanics**, v. 43, p.108-118, 2009.

CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; BITAR, G.; PEREIRA, S.L.B.; MOREIRA, M.; FREITAS Jr, S. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortopédica Brasileira**. v.11, n.4, 2003.

DROSSE, I.; VOLKMER, E.; SEITZ, S.; PENZKOFER, R.; ZAHN, K.; MATIS, U.; MUTSCHLER, W.; AUGAT, P.; SCHIEKER, M. Validation of femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: A biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. **Tissue Engineering**, v.14, p.79-88, 2008.

EINHORN, T.A.; MAJESKA, R.J.; RUSH, E.B.; LEVINE, P.M.; HOROWITZ, M.C. The expression of cytokine activity by fracture callus. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.10, p.1272-1281,1995.

GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T.A.; MARSH, D. Fracture healing: The diamond concept. **Injury**, v. 38 (4 SUPPL.), p. S3-S6, 2007.

HARCOURT-BROWN, F. **Textbook of rabbit medicine**. Oxford: Butterworth Heinemann, 2002. p. 122.

ISAKSSON, H. Recent advances in mechanobiological modeling of bone regeneration. **Mechanics Research Communications**, v. 42, p. 22-31, 2012.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.64, n.2, p. 295-312, 1997.

HICOK, K. C.; DU LANEY, T. V.; ZHOU Y. S.; HALVORSEN, Y.D.; HITT, D.C; COOPER, L.F; GIMBLE, J.M. Human adipose derived adult stem cells produce osteoid in vivo. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 3-4, p. 371-380, 2004.

KADIYALA, S.; YOUNG, R.G.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplantation**, v. 6, n. 2, p.125-134, 1997.

KERAMARIS, N. C.; CALORI, G. M.; NIKOLAOU V. S., SCHEMITSCH, E. H.; GIANNOUDIS P. V. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. **Injury**, v. 39 (Suppl 2), p.S45–S57, 2008.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. **Veterinary Surgery**, v.35, p.232–242, 2006.

LACRETA JUNIOR, A. C. C.; REGONATO, E.; COSSI, L. B.; CRUVINEL, C. A. T.; CANOLA, J. C. Modelo experimental de falha óssea por meio de ostectomia do rádio em coelhos. **Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 149–157, 2010.

LEVI, B.; LONGAKER, M.T. Adipose derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. **Stem Cells**, v.29, p.576-582, 2011.

MIZUNO, K.; MINEO, K.; TACHIBANA, T.; SUMI, M.; MATSUBARA, T.; HIROHATA, K. The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. **Journal of Bone and Joint Surgery Br**, v.72, p. 822–829, 1990.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering: Part A**, v.14, p.1007-1015, 2008.

OLSEN, B.; REGINATO, A.; WANG, W. Bone development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.16, p.191–220, 2000.

ÖZTÜRK, A.; ILMAN, A.A.; SAGLAM, H.; YALÇINKAYA, U.; AYKUT, S.; AKGOZ, S.; OZKAN, Y.; YANIK, K.; KIVÇAK, B.; YALÇIN, N.; OZDEMIR, R.M. The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery**. v.14, n.1, p.21-27. 2008.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p.143–147, 1999.

PONIATOWSKI, Ł. A.; WOJDASIEWICZ, P.; GASIK, R.; SZUKIEWICZ, D. Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. **Mediators of Inflammation**, 137823, 2015.

QU, C.Q.; ZHANG, G.H.; ZHANG, L.J.; YANG, G.S. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v.43, p.95-100, 2007.

RADA, T.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. **Tissue Engineering**., v.15, p.113-125, 2009.

VENKATESAN, J.; LOWE, B.; ANIL, S.; KIM, S.; SHIM, M. S. Combination of nano-hydroxyapatite with stem cells for bone tissue engineering. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v.16, p.8881-8894, 2016.

VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B.E; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**. v.19, p.279-289, 2010.

ZAMINY, A.; KASHANI, I.R.; BARBARESTANI, M.; HEDAYATPOUR, A.; MAHMOUDI, R.; FARZANEH, N.A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. **Iranian Biomedical Journal**, v.12, p.133-141, 2008.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, p.211–228, 2001.

CAPÍTULO 2 – Artigo científico nas normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia³⁵

Células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo, associadas ou não à hidroxiapatita, na regeneração de defeito ósseo em rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

*[Autologous adipose-derived mesenchymal stem cells, with or without hydroxyapatite, on regeneration of bone defect in radius of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)]*

RESUMO

Diante das necessidades médicas e potenciais propriedades biológicas, as células-tronco mesenquimais (CTM) têm emergido como ferramenta terapêutica no âmbito da medicina veterinária. Objetivou-se neste estudo, avaliar a utilização das células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo (CTM-AD), associadas ou não a hidroxiapatita sintética absorvível (HAP-91®), na regeneração óssea em coelhos. Para isso, foram utilizados 34 coelhos fêmeas, da raça Nova Zelândia Branco. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o preenchimento do defeito ósseo de 1 cm de extensão, criado na diáfise distal do rádio, em: GCTM, na qual se utilizou 0,15 mL de solução salina 0,9% com dois milhões de CTM-AD autólogas; GCTMH, hidroxiapatita associada aos dois milhões de CTM-AD autólogas; e GC (grupo controle), 0,15 mL de solução salina 0,9%. Obtiveram-se radiografias no período pós-operatório imediato, e aos 15, 30, 45 e 90 dias. Realizou-se análise histológica de metade dos animais de cada grupo, 45 dias após a cirurgia, e o restante aos 90 dias. No período de acompanhamento não foram observadas fístulas ou secreções. O GCTM apresentou menor intensidade de edema comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). O GCTMH apresentou escore médio de avaliação radiográfica maior em relação aos demais para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea, em todos os momentos de avaliação ($p < 0,05$). Nas avaliações histológicas, o GCTM apresentou reparação óssea mais rápida e eficaz comparada ao GCTMH e ambos foram nitidamente superiores ao grupo controle. Portanto, conclui-se que as CTM-AD autólogas, associadas ou não à hidroxiapatita, foram benéficas ao processo de regeneração óssea do defeito segmentar de tamanho crítico induzido experimentalmente, sendo que o GCTM apresentou resultados superiores comparados ao GCTMH.

Palavras-Chaves: coelhos, consolidação da fratura, fraturas ósseas, transplante de células

³⁵ Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, ISSN 1678-4162 versão online

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been emerging as therapeutic tool in the Veterinary practice, specially due to their biological properties and medical needs. The aim of this study was to evaluate the use of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC), with or without absorbable synthetic hydroxyapatite (HAP-91), in bone regeneration in rabbits. Thirty four New Zealand White female rabbits were used. The experimental groups were divided according to the 1.0 cm- bone gap filling created in the distal radial diaphysis: GCTM, 0.15 mL of 0.9% saline solution with 2 million autologous AD-MSC; GCTMH, hydroxyapatite associated with 2 million autologous AD-MSC; and GC (control group), 0.15 mL of 0.9% saline solution. Radiographs were taken on the immediate postoperative period ,and at 15, 30, 45 and 90 days postoperatively. Histological analysis was performed on one half of the animals in each group 45 and 90 days after the procedure. Fistulas or secretions were not seen in any animal. The GCTM showed less edema compared to other groups ($p < 0.05$). The GCTMH showed a higher average score of radiographic evaluation compared to other groups for periosteal reaction parameters, the callus volume and bone bridge quality at all time points ($p < 0.05$). In the histological evaluations, GCTM presented faster and more efficient bone repair compared to GCTMH and both were significantly superior to the control group. Therefore, it was concluded that the autologous CTM-AD, associated or not with hydroxyapatite, were beneficial to the bone regeneration process of the experimentally induced critical size segmental defect, and the GCTM presented superior results compared to GCTMH.

Key words: Cell Transplantation, bone fractures, fracture healing, rabbits

1 INTRODUÇÃO

2
3 Na presença de um ambiente biológico e mecânico apropriado, os processos naturais
4 de reparação óssea são suficientes para efetuar a restauração completa da integridade do
5 esqueleto para a maioria das fraturas (Giannoudis et al., 2007), independentemente do método
6 de fixação (Chen et al., 2009). No entanto, algumas situações exigem intervenção apropriada
7 para potencializar os mecanismos fisiológicos de reparação e regenerar grandes quantidades
8 de osso (Kraus e Kirker-Head, 2006).

9 Situações específicas, que possam exigir intervenções adicionais, incluem a perda
10 substancial de osso hospedeiro por trauma ou ressecção de tumor, artrodese, fusão espinhal,
11 não união ou união retardada, doença metabólica, artroplastia e pacientes com potencial de
12 reparação tecidual insuficiente devido à doença local, sistêmica ou idade avançada (Kraus e
13 Kirker-Head, 2006).

14 Estudos sobre a regeneração óssea ganham cada vez mais ênfase na ortopedia. O
15 principal desafio é a diminuição no tempo de consolidação e dos índices de complicações. Na
16 área da ortopedia veterinária, esta necessidade se torna ainda maior, devido a diversos fatores
17 desfavoráveis que podem levar a complicação no tratamento de fraturas (Crocì et al., 2003).
18 Dentre eles, podemos citar a dificuldade de instituir repouso pós-operatório e a particularidade
19 anatômica de algumas regiões dos ossos longos que contribuem para a falha do implante e não
20 união (Welch et al., 1997; Crocì et al., 2003).

21 O uso de biomateriais, entre outras estratégias facilitadoras da regeneração, é cada vez
22 mais estudado e aplicado, com o objetivo principal de potencializar os eventos da união óssea
23 e alcançar o resultado desejado (Venkatesan et al., 2016). Nos últimos anos, as células-tronco
24 mesenquimais (CTM) têm emergido como ferramenta terapêutica, devido às suas
25 propriedades biológicas e às necessidades médicas (Levi e Longaker, 2011). As razões para
26 seu uso são inúmeras, e pode-se destacar: fácil isolamento e expansão em cultura,
27 multipotencialidade, efeitos parácrinos, propriedades imunomodulatórias e capacidade de
28 migração (Pittenger et al., 1999).

29 Diversos estudos têm mostrado resultados promissores na potencialização da
30 regeneração óssea utilizando a terapia celular associada aos biomateriais (Venkatesan et al.,
31 2016). Entretanto, mais pesquisas clínicas aplicadas são necessárias para determinar o seu real
32 potencial terapêutico na ortopedia veterinária.

33 O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização das células mesenquimais autólogas
34 derivadas de tecido adiposo, isoladamente e associada à hidroxiapatita, na regeneração óssea
35 em coelhos.

36

37 **MATERIAL E MÉTODOS**

38 **Animais e ambiente de experimentação**

39 Este estudo foi realizado de acordo com as normas internacionais de bem-estar animal
40 após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências
41 Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Jaboticabal- SP
42 (Protocolo número 007168).

43 Foram utilizados 36 animais, da espécie leporina (*Oryctolagus cuniculus*) e raça Nova
44 Zelândia Branco, fêmeas, adultas jovens (160 a 170 dias de idade) e com peso corpóreo
45 variando entre 3,5 e 4,5 kg. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados
46 com ração específica e água à vontade.

47 Os 36 coelhos foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, de acordo com os
48 tratamentos utilizados. Criou-se, experimentalmente, defeito ósseo segmentar no rádio, que
49 fora tratado com: dois milhões de células-tronco mesenquimais autólogas derivadas do tecido
50 adiposo (Grupo **GCTM**), dois milhões células-tronco mesenquimais autólogas derivadas do
51 tecido adiposo associado ao carreador (*scaffold*) de grânulos de hidroxiapatita sintética
52 absorvível (HAP-91^{®36}) (Grupo **GCTMH**) e preenchimento do defeito ósseo com 0,15 mL de
53 solução salina 0,9% estéril por aplicação percutânea, sendo o Grupo Controle (**GC**).

54 **Obtenção das células-tronco mesenquimais**

55 A obtenção das células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo
56 utilizadas no presente projeto seguiu o protocolo postulado pelo laboratório BIO CELL³⁷.
57 Inicialmente, foi colhido aproximadamente 10 a 25 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa
58 interescapular, o qual foi acondicionado em um tubo de 50 mL contendo meio de lavagem
59 celular estéril por dois minutos. Em ato contínuo, a amostra foi retirada do primeiro tubo de
60 lavagem e acondicionada no segundo tubo de lavagem por três minutos, para então, ser

³⁶ HAP-91[®] – Hidroxiapatita sintética absorvível – JHS biomateriais – Sabará-MG

³⁷ BIO CELL LTDA - SMPW Qd. 05 conj. 05 lote 01 - Casa C CEP 71735-505 Tel.: (61) 3382-7407 Distrito Federal Brasil

61 transferido ao tubo contendo o meio de transporte. O tubo foi identificado com o número do
62 animal e acondicionado na geladeira até o momento do envio do material ao laboratório.

63 Em ambiente apropriado, o tecido adiposo foi lavado várias vezes em solução tampão
64 fosfato salina (PBS), para retirar debris celulares e excesso de sangue. Logo após, foi cortado
65 em partículas pequenas e colocado em contato com solução de colagenase e hialuronidase,
66 para que fosse realizada a digestão enzimática. Esta mistura foi centrifugada por 15 minutos e
67 o botão celular foi ressuspendido. O mesmo procedimento foi repetido quatro vezes.
68 Realizou-se o método de exclusão *trypan blue*. Esse processo constituiu a preparação do SVF
69 (*stromal vascular fraction*).

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

73 Após, sete dias de cultivo, foi realizado o repique celular e iniciado um novo cultivo
74 celular em garrafa de 75 cm³. Ao se obter 80% de confluência celular, realizou-se a
75 tripsinização. Parte das células permaneceu na garrafa de cultivo e, cerca de quatro a cinco
76 milhões de células foram acondicionadas em um meio de transporte celular em seringas de
77 cinco mL e, encaminhadas para a utilização nos animais do experimento. Parte das células
78 que permaneceram no laboratório foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo.
79 Aproximadamente dois milhões de células-tronco foram fixadas em solução de formaldeído e
80 encaminhadas para os Estados Unidos da América no laboratório MOFA Global³⁸ para ser
81 realizada a caracterização celular. A outra parte das células que permaneceu no laboratório
82 BIO CELL foi congelada e permaneceu em nitrogênio líquido.

83 **Procedimento cirúrgico, indução de defeito ósseo segmentar**

84 Para o procedimento cirúrgico o animal foi posicionado em decúbito lateral direito
85 com o membro torácico esquerdo estendido caudalmente. Procedeu-se a antisepsia do campo
86 cirúrgico, utilizando-se solução de clorexidine 2%³⁹ e clorexidine alcoólico 0,5%⁴⁰, e proteção
87 da extremidade do membro com atadura, coberta posteriormente com dedo de luva estéril⁴¹.
88 Para a realização da cirurgia, a contenção química dos coelhos foi feita com associação de

³⁸ MOFA Global - Verona, Wisconsin 419 Venture Court

³⁹ RIOHEX® 2% - Solução degermante - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA – São José do Rio Preto - SP

⁴⁰ RIOHEX® 0,5% - Solução alcoólica - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA – São José do Rio Preto - SP

⁴¹ Luva cirúrgica estéril SENSITEX® - Mucambo- Bahia, Brasil

89 morfina⁴² (2 mg/kg/IM), midazolam⁴³ (2 mg/kg/IM) e cetamina⁴⁴ (25 mg/kg/IM) seguida,
90 após 15 minutos, de indução e manutenção anestésica pela máscara com isoflurano⁴⁵ 3V%
91 em oxigênio 100%. Após atingir plano anestésico, foi realizada incisão de aproximadamente
92 2,5 cm sobre a pele, na região craniomedial do rádio, seguida de divulsão do tecido
93 subcutâneo e musculatura, o que permitiu então a exposição da diáfise do rádio. Em ato
94 contínuo, realizou-se ostectomia parcial de 1 cm de extensão na diáfise radial, há 1,5 cm da
95 articulação radiocárpica, utilizando-se serra oscilatória⁴⁶ e espcímetro para as mensurações.
96 Para evitar necrose óssea térmica, efetuou-se irrigação local com solução salina 0,9%⁴⁷,
97 durante este procedimento. O segmento do rádio foi removido juntamente com seu periósteo,
98 obtendo-se, desta forma, falha óssea de 1 centímetro de extensão.

99 No grupo GCTM, as células-tronco que estavam acondicionadas em 5 mL de meio de
100 transporte foram submetidas à centrifugação a 1250 rpm durante 5 minutos até a formação do
101 botão celular no fundo do tubo. Foi descartado o sobrenadante, o botão celular foi
102 ressuspendido com 0,15 mL de solução salina 0,9% estéril e acondicionado em seringa⁴⁸ 1
103 mL. Foi realizada a aplicação percutânea das células-tronco no local da falha óssea criada. No
104 grupo CTMH, a falha óssea foi preenchida por completo com grânulos de hidroxiapatita
105 sintética absorvível (HAP-91[®]) seguido de aplicação percutânea das células-tronco já
106 ressuspendidas em 0,15 mL de solução salina 0,9% estéril conforme procedimento descrito
107 anteriormente no grupo CTM. No grupo controle (GC) a falha óssea não foi preenchida,
108 permanecendo vazia e foi aplicado o mesmo volume de solução salina 0,9 % estéril isenta de
109 células-tronco na falha óssea.

110 A presença de forte membrana interóssea unindo o rádio e a ulna faz com que esta
111 funcione fixando o rádio, não permitindo que haja movimentação, dispensando, portanto, o
112 uso de fixação interna (Lacreta Junior et al., 2010).

113 Em todos os grupos (GCTM, GCTMH e GC), a sutura da musculatura e do tecido
114 subcutâneo foi realizada com fio de náilon⁴⁹ número 4-0, em padrão simples contínuo. Para a
115 sutura de pele foi utilizado náilon número 4-0 em padrão simples separado.

⁴² Dimorf[®] 10 mg/mL, Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA -Itapira - SP

⁴³ Dormonid[®] 5 mg/mL, Roche

⁴⁴ Vetaset[®] 100 mg/mL, Zoetis

⁴⁵ Isoforine[®] 100%, Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA -Itapira - SP

⁴⁶ Serra Oscilatória Bojin – Campinas – SP

⁴⁷ Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX[®]- Goiânia

⁴⁸ Seringa 1 mL – BD

⁴⁹ Nylon SHALON[®] Fios Cirúrgicos LTDA - São Luis de Belos Montes - GO

116 **Avaliação clínica, radiográfica e histológica**

117 Os animais foram observados diariamente até o momento final de avaliação, a fim de
 118 verificar qualquer reação tecidual na cicatriz cirúrgica. No 3° e no 7° dia do período pós-
 119 operatório os animais foram submetidos à palpação no local operado com intuito de verificar
 120 a presença ou ausência de reação, que evidenciasse dor. Nestes mesmos dias, foi avaliada, de
 121 forma minuciosa, a presença de edema, secreções na ferida cirúrgica e a utilização do membro
 122 torácico operado. A avaliação foi realizada por um mesmo observador, tendo sido utilizada
 123 escala de escores de 1 a 4 para cada item avaliado, sendo 1 (ausente), 2 (discreto), 3
 124 (moderado) e 4 (intenso).

125 Todos os animais foram radiografados, nas projeções mediolateral e craniocaudal
 126 (mA= 100, KV= 40 e mAs = 3,2), no período pós-operatório imediato e após 15, 30, 45 e 90
 127 dias. A avaliação radiográfica foi realizada por três avaliadores distintos e seguiu o padrão
 128 duplo cego. Com o auxílio de sistema de escores, foi qualificada a evolução do processo de
 129 consolidação óssea. Para a análise, foi utilizada a média dos valores registrados. Reação
 130 periosteal, volume de calo ósseo, qualidade de ponte óssea entre os fragmentos foram os
 131 parâmetros, semiquantitativos, utilizados (Quadros 1 , 2 e 3) (An et al., 1999; Öztürk et al.,
 132 2008).

133 Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro reação
 134 periosteal.

Reação Periosteal	
Escore	Características radiográficas
1	Ausência de reação periosteal
2	Discreta reação periosteal
3	Moderada reação periosteal
4	Intensa reação periosteal

135

136 Quadro 2. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro volume do
 137 calo ósseo.

Volume do calo ósseo	
Escore	Características radiográficas

1	0 a 25% da falha óssea está preenchida com calo ósseo
2	25 a 50 % da falha óssea preenchida com calo ósseo
3	50 a 75 % da falha óssea preenchida com calo ósseo
4	75 a 100 % da falha óssea preenchida com calo ósseo

138

139

140

Quadro 3. Escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para o parâmetro qualidade da ponte óssea.

Qualidade da Ponte óssea	
Escore	Características radiográficas
1	Ausência de Ponte óssea entre os fragmentos do rádio
2	Formação de discreta Ponte óssea na região ventrolateral do radio (ligamento interósseo)
3	Formação de Ponte óssea de espessura inferior ao diâmetro da diáfise do rádio restabelecendo a coluna óssea
4	Formação de Ponte óssea de espessura igual ou superior ao diâmetro da diáfise do rádio restabelecendo a coluna óssea

141

142

143

144

145

146

Uma parcela dos animais (16/34) foi submetida à eutanásia em 45 dias e o restante (18/34) em 90 dias após o procedimento cirúrgico. Imediatamente após a eutanásia, coletaram-se segmentos do membro torácico direito dos animais (rádio e ulna), sendo as osteotomias realizadas em aproximadamente 1 cm proximal e distal das interfaces da falha óssea.

147

148

149

150

O tecido ósseo foi preparado com a técnica de descalcificação, sendo inicialmente fixado em formol a 10% durante 48 horas, colocado em líquido descalcificador (solução de ácido nítrico 7%) com volume 100 vezes maior ao da peça, trocando-se o líquido diariamente, até que o tecido amoleça, em média de 2 a 3 dias.

151

152

153

154

Foram então incluídos em parafina e cortados no micrótomo a 5 mm, sendo corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM) e observados ao microscópio óptico, visando acompanhar comparativamente a neoformação dos tecidos fibrosos, cartilagosos e osso jovem durante o processo de regeneração óssea.

155 As avaliações microscópicas foram quantificadas em escores de 1 a 4, sendo 1
156 ausência de lesões, 2 discreta quantidade, 3 moderada e 4 acentuada quantidade de lesões no
157 local. As características microscópicas caracterizadas por esses escores foram:
158 neovascularização, ausência ou presença de infiltrado inflamatório, formação de tecido
159 fibroso, formação de tecido cartilaginoso, formação de tecido ósseo, qualidade da união e
160 formação de ponte óssea. Foi também avaliado de forma descritiva organização da
161 arquitetura e morfologia da neoformação óssea.

162 Para as variáveis categóricas (escore de avaliação clínica, de avaliação radiográfica e
163 de avaliação histopatológica) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico), sendo
164 que para valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($p < 0,05$), as diferenças entre as medianas
165 entre os grupos, tempos, grupos dentro de tempos e tempos dentro de grupos foram
166 consideradas significativas. Para tanto, foi utilizado o programa estatístico Graphpad Prisma
167 (versão 5.0, 2003).

168

169 **RESULTADOS**

170

171 Foram avaliados 34 animais, sendo 11 do grupo controle, 13 do grupo CTM e 10 do
172 grupo CTMH. Um coelho veio a óbito, por causa desconhecida, antes de ser realizado o
173 procedimento cirúrgico. Quatro animais (GC9, CTMH5, GCTMH11, GCTMH12)
174 apresentaram fratura da linha fisária distal da ulna nas primeiras 72 horas de pós-operatório e
175 foram excluídos do estudo.

176 Durante o período de acompanhamento clínico dos animais não foram observadas
177 fístulas, secreções ou reações inflamatórias intensas. Em relação à dor na manipulação e
178 claudicação do membro operado, o grupo CTM apresentou o menor escore médio (1,6 e 3,1,
179 respectivamente) no 3º dia de pós-operatório quando comparado aos grupos GC e GCTMH,
180 porém não foi observada diferença estatística ($p \geq 0,05$). Aos sete dias, todos os animais
181 apoiavam o membro operado normalmente.

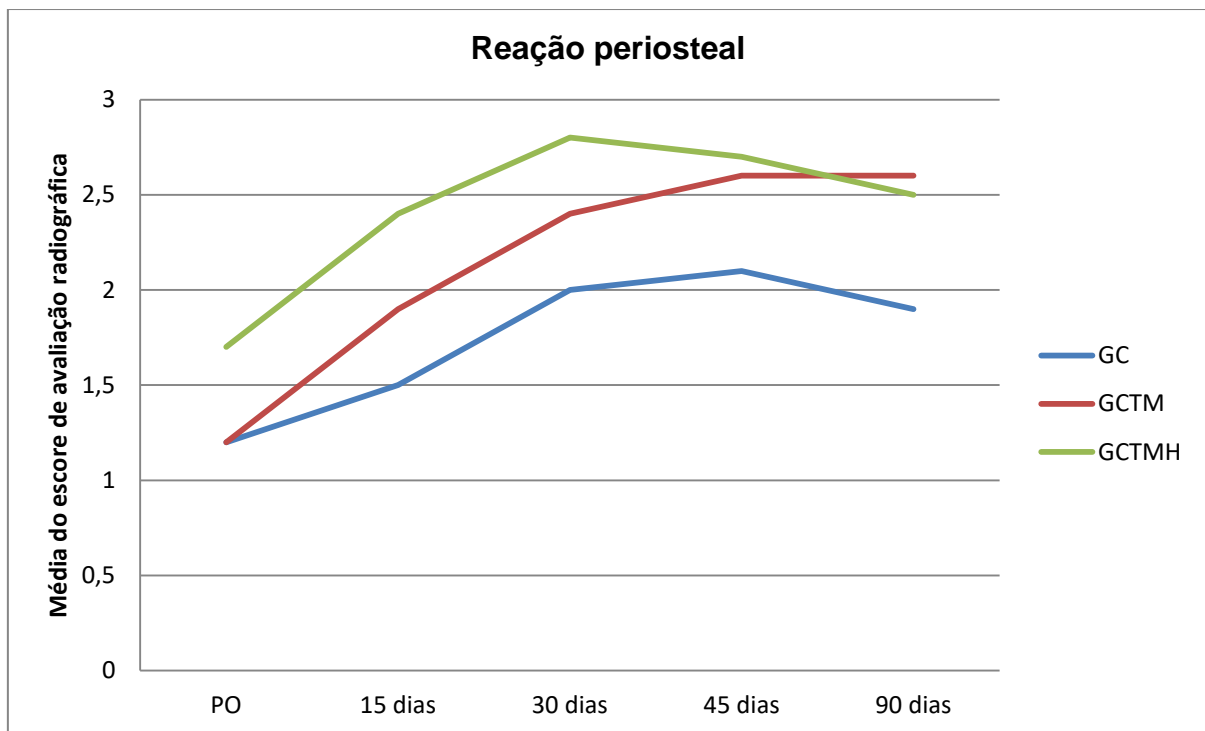
182 O grupo CTM apresentou média do escore de 1,7 no 3º dia de pós-operatório na
183 avaliação do edema do membro torácico, enquanto que o grupo controle apresentou 2,7, e o
184 grupo CTMH 2,5, mostrando diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$).

185 Em todos os animais, as osteotomias apresentaram tamanho e localização desejados e,
186 somente em dois animais do grupo controle, foi detectada a presença de um fragmento ósseo

187 remanescente no local da falha óssea. No GCTMH foi possível a observação do
 188 preenchimento total da falha óssea por grânulos de hidroxiapatita, com um aspecto
 189 radiográfico radiopaco e granuloso na avaliação pós-operatória imediata.

190 Para o parâmetro radiográfico reação periosteal foi avaliada e graduada a presença de
 191 estímulo de reação do periosteio do rádio e/ou da ulna adjacentes ou não à falha óssea. O
 192 GCTMH apresentou reação periosteal mais evidente comparada ao GC e ao GCTM aos 15, 30
 193 e 45 dias. Aos 90 dias o GCTMH apresentou escore de avaliação médio, estatisticamente
 194 semelhante ao GCTM e, superior ao GC com significância ($p < 0,05$).

195 O pico da reação periosteal foi aos 30 dias e nos momentos 45 e 90 dias o escore de
 196 avaliação médio diminuiu no GCTMH e aumentou discretamente no GCTM e GC (Fig. 1).



197

198 Figura 1. Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação radiográfica do
 199 parâmetro reação periosteal ao longo dos momentos para os grupos GC, GCTM e
 200 GCTMH.

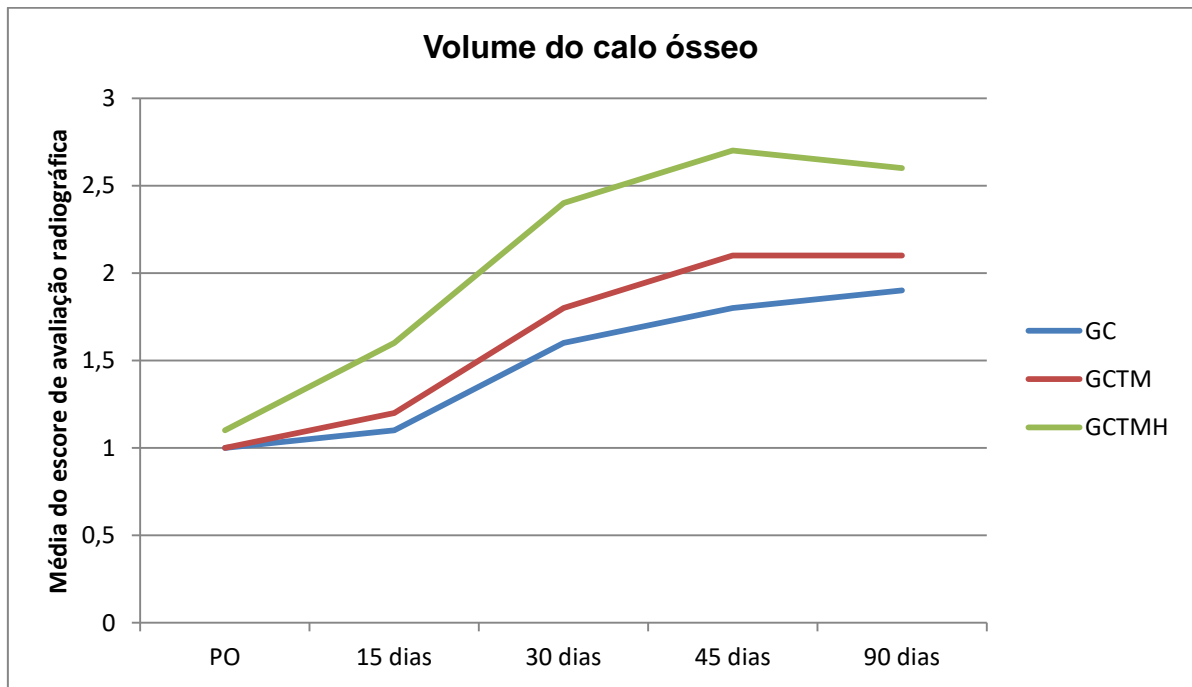
201 Para o parâmetro radiográfico volume do calo ósseo, foi realizada avaliação
 202 volumétrica da presença de tecido mineralizado (calo ósseo) na falha óssea do rádio e
 203 graduada segundo a porcentagem de preenchimento.

204 Aos 45 dias de pós-operatório, 10 animais dos 34 avaliados apresentaram
 205 preenchimento da falha por calo ósseo menor que 25% (escore de avaliação radiográfica < 2),
 206 sendo quatro do GC, cinco do GCTM e um do GCTMH. Aos 90 dias de pós-operatório,

207 quatro dos 18 animais avaliados neste momento apresentaram preenchimento da falha por
 208 calo ósseo menor que 25% (escore de avaliação radiográfica <2), sendo dois do GC e dois
 209 GCTM.

210 O GCTMH apresentou maior preenchimento de calo ósseo nos locais de ostectomia
 211 em todos os momentos de avaliação comparado ao GC e ao GCTM. Aos 15 dias, o GCTM
 212 apresentou escore de avaliação médio igual ao GC, entretanto nos momentos seguintes
 213 apresentou volume do calo ósseo superior, significante ($p < 0,05$) (Fig. 2).

214



215

216 Figura 2. Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação radiográfica do
 217 parâmetro volume do calo ósseo ao longo dos momentos de avaliação para os
 218 grupos GC, GCTM e GCTMH.

219 Para o parâmetro radiográfico qualidade da ponte óssea, foi avaliada a presença ou não
 220 de ponte entre os fragmentos ósseos adjacentes a falha e graduados quanto à qualidade da
 221 coluna óssea restabelecida.

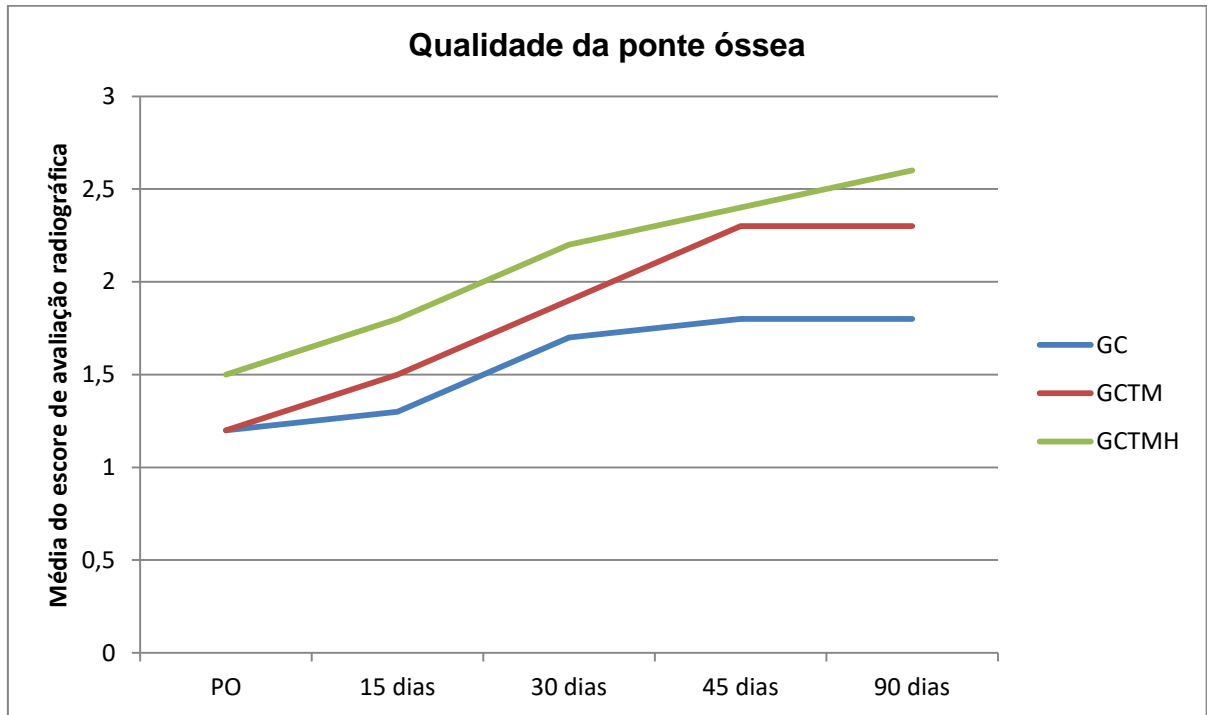
222 Aos 45 dias de pós-operatório, 11 animais apresentaram ausência de ponte óssea
 223 (escore de avaliação médio <2), sendo oito do GC e três do GCTM. Aos 90 dias de pós-
 224 operatório, três animais dos 18 avaliados neste momento apresentaram ausência de ponte
 225 óssea (escore de avaliação médio <2), sendo dois do GC e um do GCTM.

226 O GCTMH apresentou escore de avaliação radiográfica superior para a qualidade da
 227 ponte óssea em todos os momentos de avaliação quando comparada ao GC e GCTM (Fig. 3).

228 O GCTM apresentou escore de avaliação radiográfica superior para a qualidade da ponte
229 óssea em todos os momentos de avaliação em relação ao GC (Fig. 4, Fig.5 e Fig. 6).

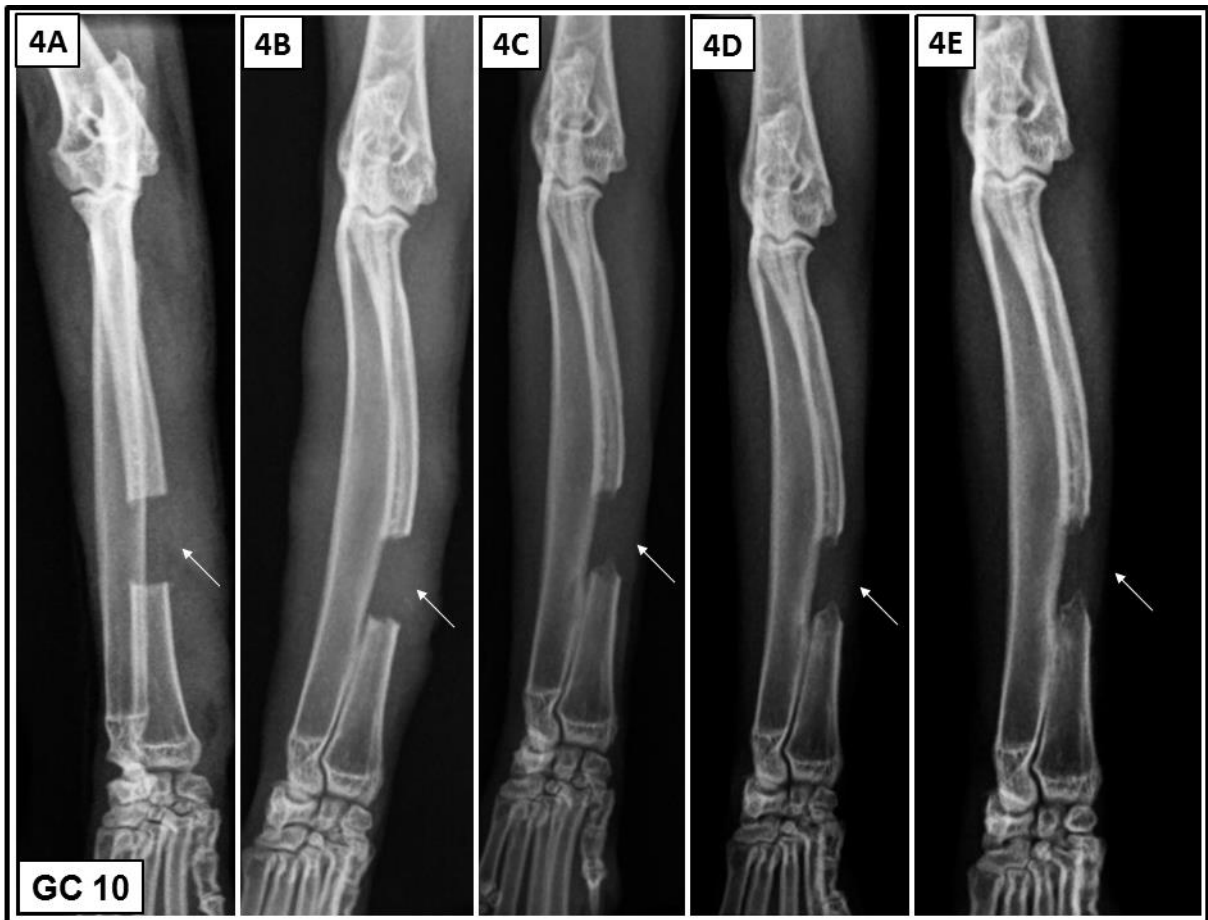
230 .

231



232

233 Figura 3. Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação radiográfica da
234 qualidade da ponte óssea ao longo dos momentos de avaliação para os grupos GC,
235 GCTM e GCTMH.

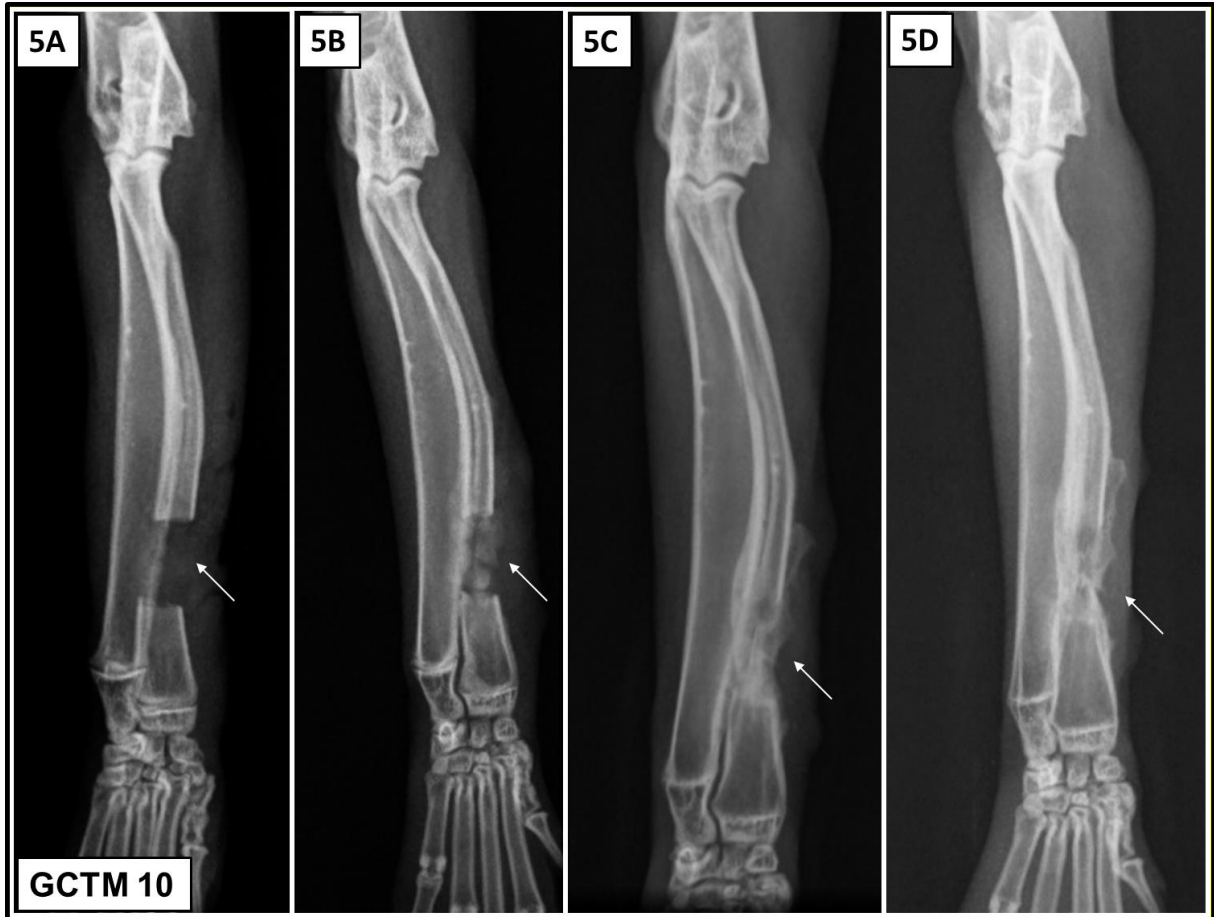


236

237 Figura 4. Imagens radiográficas da evolução da regeneração da falha óssea na projeção
 238 craniocaudal do rádio e ulna do animal 10 do grupo controle (GC). 4A: Imagem
 239 radiográfica no pós-operatório imediato mostrando o defeito ósseo segmentar na
 240 diáfise distal do rádio (Seta). 4B: Imagem radiográfica com 15 dias de evolução,
 241 mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). 4C: Imagem
 242 radiográfica na com 30 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na
 243 diáfise distal do rádio (Seta). 4D: Imagem radiográfica com 45 dias de evolução,
 244 mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). 4E: Imagem
 245 radiográfica com 90 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na
 246 diáfise distal do rádio (Seta). Nota-se que o processo de reparação foi insuficiente ao
 247 longo das avaliações demonstrando a evolução para uma não união defeituosa.

248

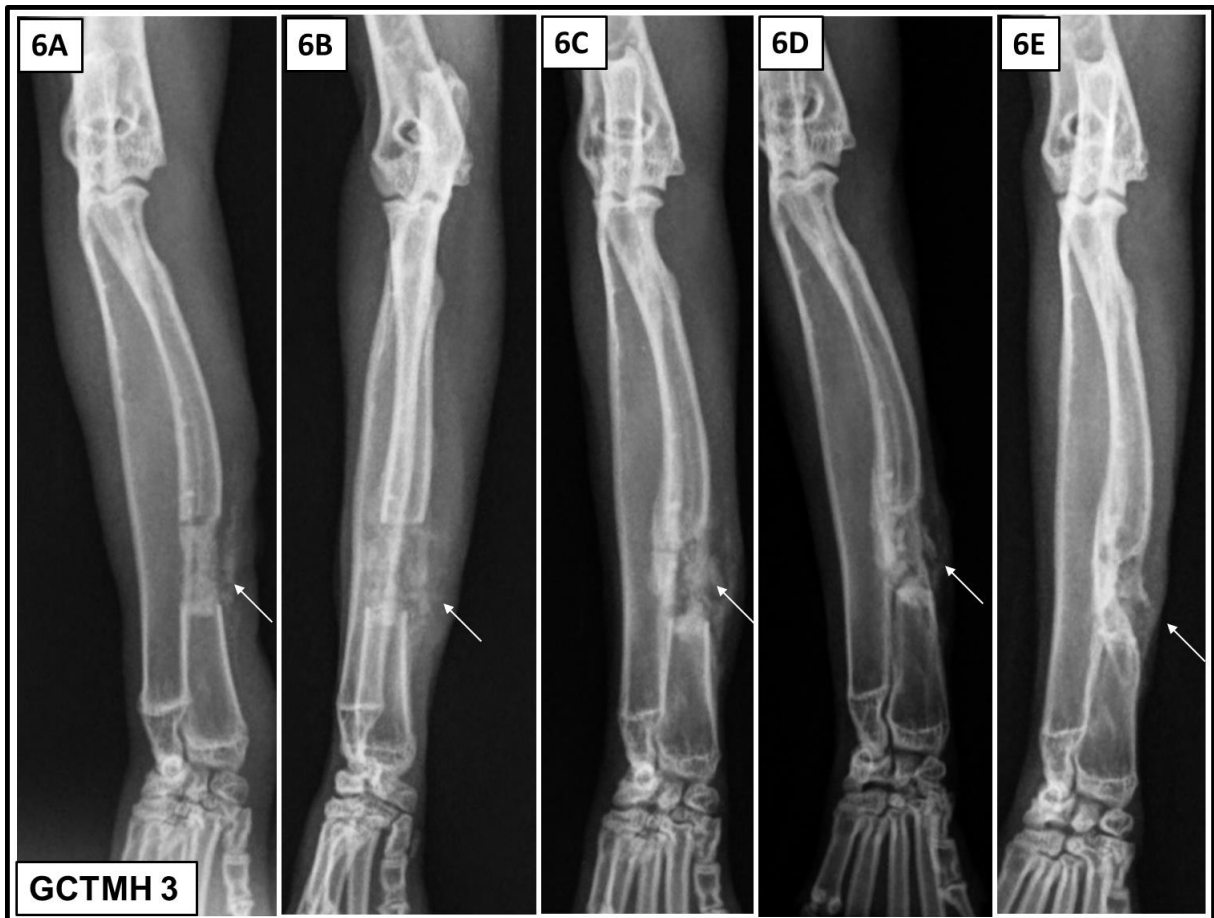
249



250

251 Figura 5. Imagens radiográficas da evolução da regeneração da falha óssea na projeção
 252 craniocaudal do rádio e ulna do animal 10 do grupo células-tronco mesenquimais
 253 (GCTM). 5A: Imagem radiográfica no pós-operatório imediato mostrando o defeito
 254 ósseo segmentar na diáfise distal do rádio (Seta). 5B: Imagem radiográfica com 15
 255 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio
 256 apresentando intensa reação periosteal (Seta). 5C: Imagem radiográfica com 30 dias
 257 de evolução, mostrando o preenchimento completo do defeito ósseo segmentar na
 258 diáfise distal do rádio por calo ósseo (Seta). 5D: Imagem radiográfica com 45 dias
 259 de evolução, mostrando o preenchimento completo do defeito ósseo segmentar na
 260 diáfise distal do rádio por calo ósseo (Seta). Nota-se a presença de intensa reação
 261 periosteal na extremidade do rádio adjacente à falha óssea.

262



263

264 Figura 6. Imagens radiográficas da evolução da regeneração da falha óssea na projeção
 265 craniocaudal do rádio e ulna do animal 3 do grupo células-tronco mesenquimais e
 266 hidroxiapatita (GCTMH). 6A: Imagem radiográfica no pós-operatório imediato
 267 mostrando o defeito ósseo segmentar preenchido por hidroxiapatita na diáfise distal
 268 do rádio (Seta). 6B: Imagem radiográfica com 15 dias de evolução, mostrando o
 269 defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio apresentando moderada reação
 270 periosteal (Seta). 6C: Imagem radiográfica com 30 dias de evolução, mostrando o
 271 defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio apresentando intensa reação
 272 periosteal (Seta). 6D: Imagem radiográfica com 45 dias de evolução, mostrando o
 273 defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio apresentando intensa reação
 274 periosteal e início da fase de remodelamento (Seta). 6E: Imagem radiográfica com
 275 90 dias de evolução, mostrando o defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio
 276 preenchido por calo ósseo (seta).

277

278 A análise histopatológica foi realizada em um total de 29 coelhos, sendo 14 aos 45
 279 dias de pós-operatório e 15 aos 90 dias de pós-operatório. Dos 14 coelhos que foram
 280 submetidos à eutanásia com 45 dias, quatro pertenciam ao grupo controle, cinco ao grupo
 281 GCTM e cinco ao grupo GCTMH. Dos 15 coelhos que foram submetidos à eutanásia com 90
 dias, cinco pertenciam ao grupo controle, sete pertenciam ao grupo GCTM e três pertenciam

282 ao grupo GCTMH. Os exames histológicos permitiram a identificação do defeito em processo
283 de regeneração óssea e a avaliação de parâmetros como neovascularização, infiltrado
284 inflamatório, formação de tecido fibroso, cartilaginoso e ósseo, bem como, a formação de
285 ponte óssea e a qualidade da união.

286 Aos 45 dias do período pós-operatório, três coelhos de um total de quatro do GC
287 (75%) apresentaram ausência de formação de ponte óssea entre as interfaces do defeito
288 criado, sendo a falha predominantemente preenchida por tecido fibroso, seguido por tecido
289 fibrocartilaginoso. Observou-se também, ausência de infiltrado inflamatório e discreta
290 neovascularização na região do defeito. Aos 90 dias, quatro coelhos de um total de cinco do
291 GC (80%) apresentaram não união defeituosa, com preenchimento da falha óssea por tecido
292 fibrocartilaginoso e afilamento e fechamento do canal medular das interfaces ósseas. Portanto,
293 somente dois coelhos de um total de nove neste grupo (22%) apresentaram regeneração óssea
294 completa e eficaz do defeito, promovendo união óssea.

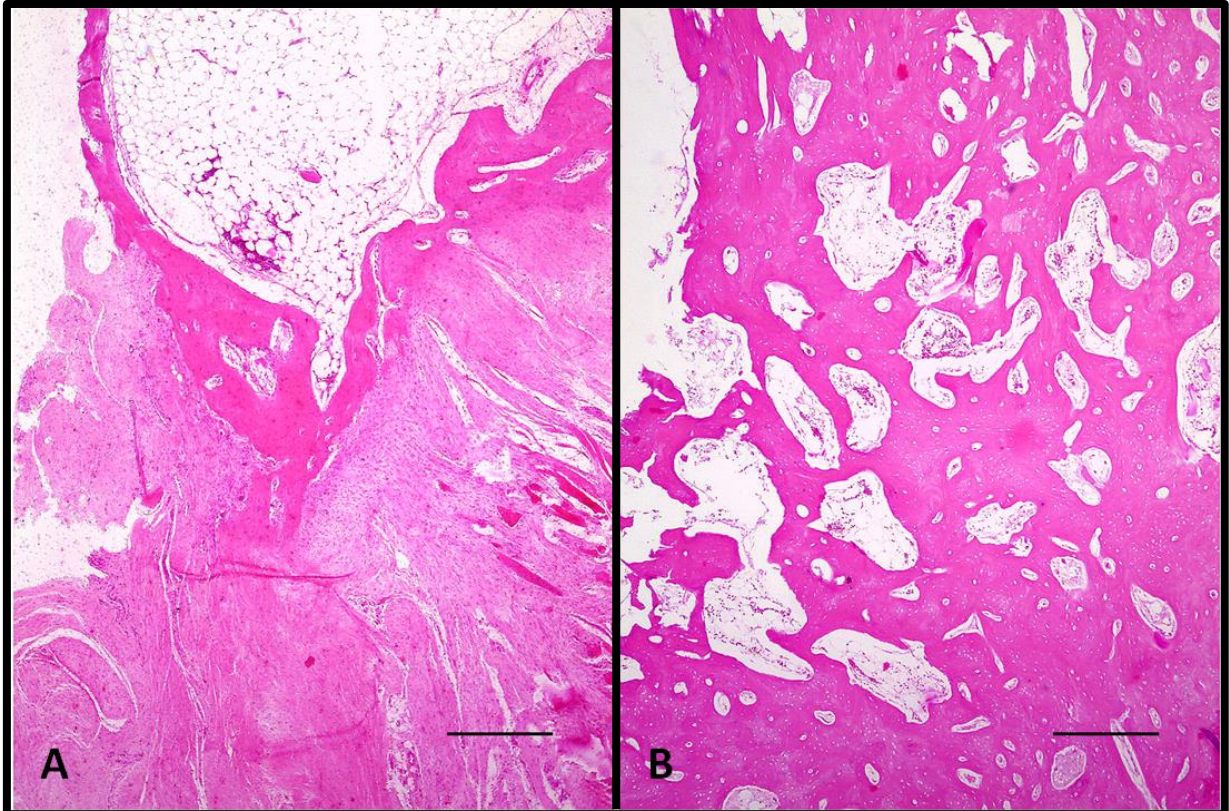
295 Todos os cinco coelhos do grupo GCTM (100%) apresentaram, aos 45 dias, união
296 óssea completa com formação de ponte óssea de qualidade com intensa formação de osso
297 trabecular periosteal, além de restabelecimento das corticais ósseas na região do defeito.
298 Neste mesmo grupo, porém aos 90 dias, cinco coelhos de um total de sete (71,4%)
299 apresentaram escore máximo de avaliação nos parâmetros formação de ponte óssea e
300 qualidade da união (Fig. 8). Não foi observado infiltrado inflamatório em todos os coelhos
301 deste grupo, e a presença de neovascularização foi discreta.

302 No grupo GCTMH, 60% dos coelhos (três de um total de cinco) apresentaram escore
303 máximo na formação de ponte óssea e qualidade da união aos 45 dias. Já aos 90 dias, 100%
304 apresentaram escore máximo (três coelhos de um total de três). Foi observada intensa reação
305 inflamatória granulomatosa periosteal e endosteal com grande número de macrófagos e
306 células gigantes circundando os depósitos da HAP- 91 (Fig. 9). Houve formação de tecido
307 fibroso de moderada a intensa em todos os coelhos deste grupo, sendo estatisticamente
308 significativo quando comparado com GC e GCTM.

309 Os grupos tratados (GCTMH e GCTM) obtiveram melhor reparação do defeito ósseo
310 quando comparado ao grupo controle (GC), apresentando médias do escore de avaliação
311 histológicas superiores nos parâmetros formação de tecido ósseo, qualidade da união óssea e
312 formação de ponte óssea e remodelamento aos 45 e 90 dias (Fig. 7). Apesar de o GCTMH ter
313 apresentado maior escore médio de formação de tecido ósseo preenchendo a falha aos 45 e 90

314 dias, comparado aos demais grupos ($p < 0,05$), o GCTM apresentou melhor e mais efetiva
315 formação de ponte óssea e melhor qualidade da união aos 45 dias ($p < 0,05$). Foi observada,
316 nos coelhos deste grupo, intensa formação de tecido ósseo trabecular periosteal, baixa
317 formação de tecido cartilaginoso e organização estrutural e morfológica melhor aos 45 dias
318 comparado aos coelhos do GCTMH.

319

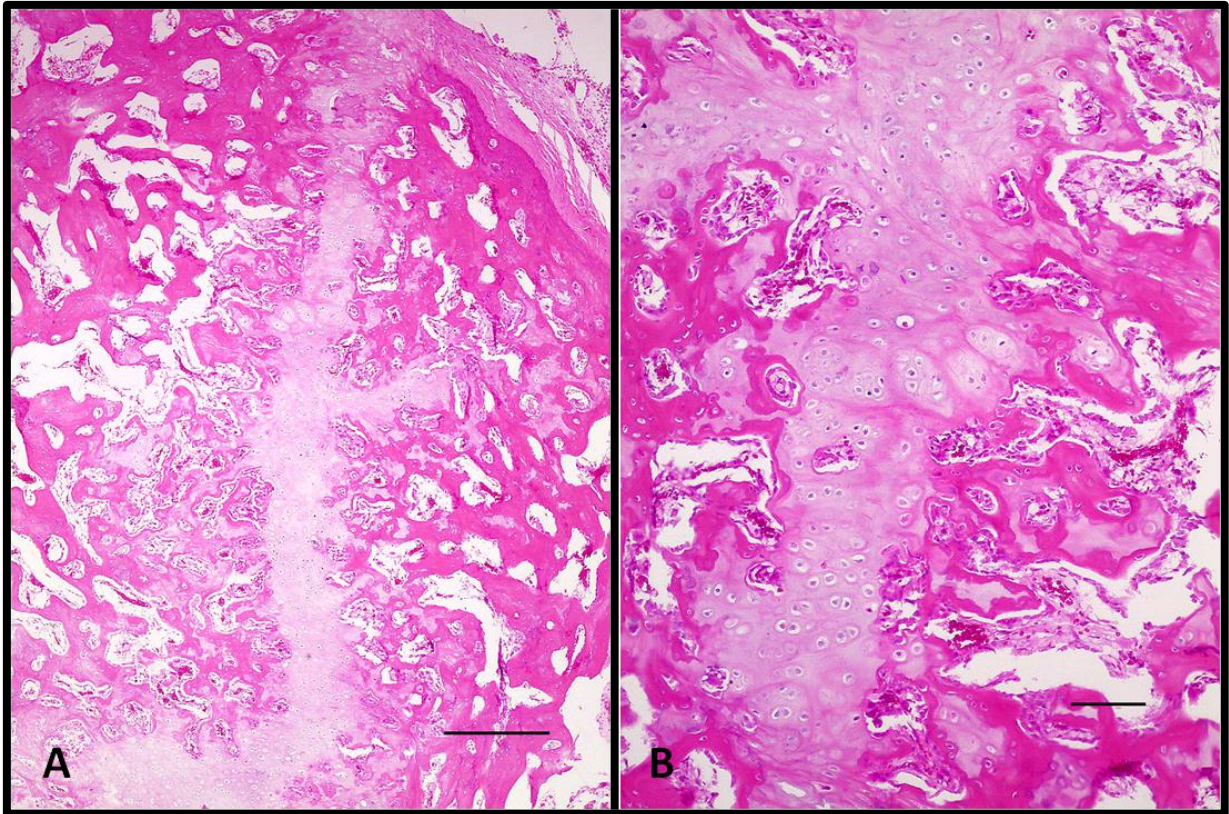


320

321 Figura 7. Avaliação histológica da região do defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio
322 do coelho GC10. A- Coelho, rádio, grupo GC, 45 dias. Proliferação fibrosa
323 proeminente e não união óssea (H&E, barra 400 μ m). B- Coelho, rádio, grupo GC, 90
324 dias. Proliferação óssea marcante e união óssea completa (H&E, barra 400 μ m).

325

326

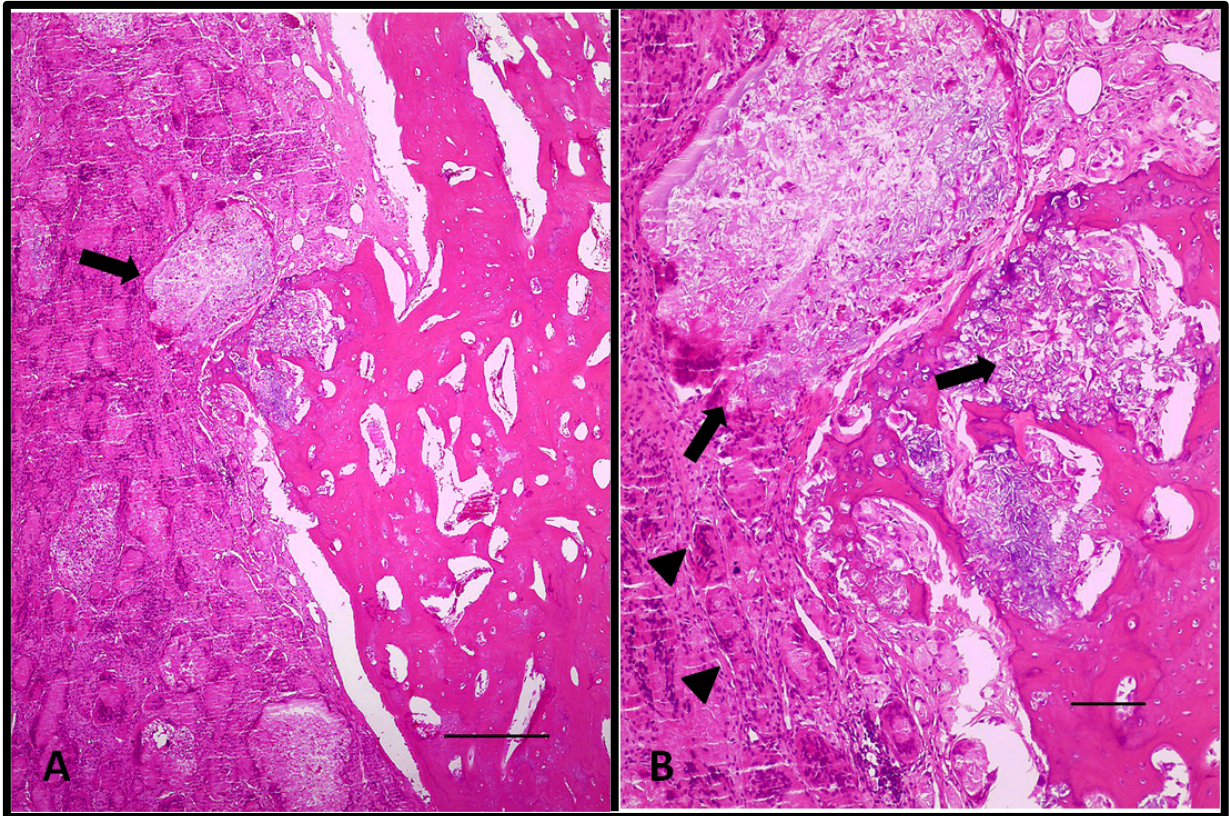


327

328 Figura 8. Avaliação histológica da região do defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio
329 do coelho GCTM10. A- Coelho, rádio, grupo GCTM, 90 dias. Proliferação óssea
330 acentuada e formação cartilaginosa hialina em área de calo ósseo com estabilização
331 e união óssea (H&E, barra 400µm). B- Coelho, rádio, grupo CTM, 90 dias. Detalhe
332 da formação cartilaginosa e óssea (H&E, barra 100µm).

333

334



335

336 Figura 9. Avaliação histológica da região do defeito ósseo segmentar na diáfise distal do rádio
 337 do coelho GCTMH10. A- Coelho, rádio, grupo GCTMH, 90 dias. Acentuada
 338 inflamação granulomatosa adjacente (seta) à área de formação de tecido ósseo
 339 trabecular (H&E, barra 400 μ m). B- Coelho, rádio, grupo CTMH, 90 dias. Depósitos
 340 de hidroxiapatita (seta) circundados por acentuada inflamação granulomatosa
 341 contendo células gigantes multinucleadas (seta) (H&E, barra 100 μ m).

342

343 DISCUSSÃO

344 O coelho é modelo experimental amplamente utilizado em estudos que abrangem a
 345 fisiopatologia óssea e os mecanismos de reparação frente aos diferentes tipos de tratamento
 346 (Pearce et al., 2007). Nesta pesquisa, as bases justificativas para a escolha dos animais desta
 347 espécie foi o fácil manejo dos animais quando comparado aos roedores também utilizados em
 348 pesquisas e o fato do coelho possuir porte maior, permitindo desta forma, a realização de
 349 defeitos ósseos maiores. Além disso, o coelho possui osso cortical com sistema completo de
 350 canais de Havers, semelhante ao humano, sugerindo desta forma, a possibilidade de
 351 extrapolação de resultados (Norris et al., 2001). Os roedores menores, por sua vez,
 352 apresentam estrutura óssea primitiva, sem sistemas Haversianos, sendo inadequados para

353 pesquisas que envolvam estudos da forma, função ou propriedades materiais dos esqueletos
354 com sistemas haversianos (Nunamaker, 1998).

355 Optou-se pela utilização da diáfise distal do rádio para a aplicação do modelo
356 experimental de defeito segmentar devido, especialmente, aos diversos fatores que tornam a
357 regeneração óssea nesta região um grande desafio em cães e gatos. O pequeno diâmetro
358 ósseo, a discreta cobertura por tecidos moles, a formação persistente de cartilagem dentro do
359 local da fratura e a escassa densidade vascular na junção diafisária-metáfisária distal dos cães
360 de raças pequenas em relação aos cães de raças grandes, fazem com que esta região seja o
361 local mais frequente de complicações como as uniões retardadas e as não uniões ósseas
362 (Welch et al., 1997; Garofolo e Pozzi, 2013).

363 Além disso, a anatomia do rádio e ulna dos coelhos apresenta algumas características
364 importantes que facilitam a realização deste modelo experimental. A disposição anatômica
365 permite acesso cirúrgico com baixa morbidade para a musculatura adjacente, vasos e nervos
366 mais importantes. Além de todos esses fatores, a presença de forte membrana interóssea
367 unindo o rádio e a ulna faz com que esta funcione como estabilizador do rádio, não
368 permitindo movimentação nociva, dispensando, portanto, o uso de fixadores ósseos
369 associados (Lacreta Junior et al., 2010).

370 Classicamente, o menor defeito em um determinado osso que não se regenera
371 espontaneamente por completo durante o seu período de vida, é definido como defeito de
372 tamanho crítico (Schmitz e Hollinger, 1986). Defeitos maiores do que o tamanho crítico
373 resultam em não união e o tecido fibroso cresce no espaço intermediário no lugar do osso
374 regenerado (Young et al., 2008).

375 Atualmente, o conceito de “tamanho crítico” não indica o menor tamanho possível e
376 não leva em consideração o período de vida do animal como critério. Refere-se, agora, a
377 qualquer defeito de tamanho tal que não regenera durante um período de tempo especificado
378 para a formação óssea (Spicer et al., 2012). Essa mudança conceitual ocorreu diante do fato
379 de que diversos fatores como idade, o sexo, o “*strain*” e outras características de uma
380 população animal, podem influenciar a reparação, tornando difícil determinar com precisão o
381 menor tamanho de defeito possível. Além disso, existiam limitações práticas de estender o
382 tempo de reparação ao tempo de vida de um animal durante o desenvolvimento do
383 experimento (Cooper et al., 2010).

384 No presente estudo, pode-se considerar que o defeito ósseo segmentar de um cm
385 criado na diáfise radial distal foi de tamanho crítico tendo em vista que nenhum coelho do
386 grupo controle apresentou reparação óssea suficiente para o restabelecimento da cortical
387 diafisária com conseqüente restabelecimento do eixo biomecânico do rádio.

388 Apesar de 75% dos coelhos dos grupos GCTM e GCTMH terem apresentado altos
389 escores de avaliação radiográfica e histológica, demonstrando intensa reação periosteal,
390 produção de osso trabecular e formação de ponte óssea, somente quatro animais do GCTM
391 (30,7%) e dois do GCTMH (20%) apresentaram reparação óssea completa do defeito criado,
392 com ausência de grandes depressões ou falhas no tecido neoformado e verdadeiro
393 restabelecimento do eixo biomecânico do rádio. Entretanto, a reação periosteal e a produção
394 de osso trabecular no defeito ósseo foram nitidamente superiores nos grupos tratados em
395 relação ao grupo controle (GC).

396 A hidroxiapatita sintética é um exemplo de biomaterial aloplástico e funciona como
397 uma espécie de “arcabouço” (suporte passivo) por onde ocorre neoformação vascular,
398 proliferação celular, crescimento fibrovascular, formação de osteoide e crescimento do osso
399 mineralizado (Bicalho et al., 2008). Apesar das potenciais vantagens e benefícios, observou-
400 se, no presente estudo, que os coelhos do GCTMH apresentaram, intenso infiltrado
401 inflamatório, apresentando macrófagos espumosos e células gigantes permeando os depósitos
402 de hidroxiapatita. Segundo Rich (2002), os coelhos possuem elevada tendência à formação
403 excessiva de tecido de granulação em resposta ao material estranho, em qualquer tecido do
404 organismo, o que explicaria a reação observada ao biomaterial utilizado.

405 Radiograficamente o GCTMH apresentou escores superiores em relação aos demais,
406 entretanto, na avaliação histológica o GCTM mostrou-se superior, pois a formação de tecido
407 ósseo, formação de ponte óssea e qualidade da união foram estatisticamente superiores aos 45
408 dias. Além disso, o GCTM apresentou processo de reparação óssea mais precoce e eficaz
409 comparado ao GCTMH que apresentou alto escore de formação de tecido fibroso em meio ao
410 tecido ósseo e cartilaginoso formado no defeito. Detectou-se dificuldade na avaliação
411 radiográfica do GCTMH devido à elevada radiopacidade da hidroxiapatita, sendo difícil a sua
412 diferenciação da reação periosteal e do calo ósseo em formação, nos momentos de avaliação
413 iniciais. Acredita-se que isso pode ter superestimado o escore de avaliação radiográfica dos
414 coelhos do GCTMH.

415 Diversos estudos, “*in vitro*” e “*in vivo*”, têm mostrado resultados promissores no
416 beneficiamento da regeneração óssea utilizando a terapia celular associada aos biomateriais
417 (Tajima et al., 2014; Gómez-Barrena et al., 2015; Grayson et al., 2015; Tevlin et al., 2015;
418 Venkatesan et al., 2016). As células-tronco mesenquimais (CTM) podem responder ao
419 ambiente biológico e mecânico local e diferenciar-se em qualquer componente celular
420 necessário na união óssea secundária, portanto, oferecem importante potencial de reparo ósseo
421 para uma variedade de situações (Kraus e Kirker-Head, 2006). Além disso, CTM secretam
422 uma variedade de fatores de crescimento e citocinas importantes para o processo reparativo
423 (Chen et al., 2008).

424 Os resultados obtidos no presente estudo forneceram fortes evidências para a
425 comprovação dos efeitos positivos das CTM na neoformação óssea em defeitos segmentares
426 na diáfise distal do rádio. As avaliações radiográficas e histológicas indicaram que a ação das
427 CTM, isoladas ou associadas à hidroxiapatita, permitiu que 30,7% dos coelhos do GCTM e
428 20% dos coelhos do GCTMH apresentassem regeneração óssea completa, em um defeito de
429 tamanho considerado crítico. Adicionalmente, mesmo nos coelhos dos GCTM e GCTMH que
430 não tiveram regeneração completa do defeito ósseo, houve formação de calo e produção de
431 tecido ósseo trabecular mais intensas e efetivas quando comparado ao GC, nas avaliações
432 radiográficas e histológicas.

433 No presente estudo, foram utilizadas células-tronco mesenquimais autólogas derivadas
434 do tecido adiposo (CTM-AD) e são diversas as justificativas para sua escolha. O tecido
435 adiposo subcutâneo é rica fonte de CTM-AD, está disponível em grandes quantidades e, é
436 relativamente fácil de obter (Zuk et al., 2001). Além disso, relatos recentes demonstraram
437 que, em condições adequadas, as CTM-AD têm o potencial de se diferenciar em linhagem
438 osteogênica tão eficientemente quanto as CTM derivadas de medula óssea (Mizuno et al.,
439 2012). Adicionalmente, tanto as respostas parácrinas quanto autócrinas podem ser provocadas
440 por fatores de crescimento secretados pelas CTM-AD (Tajima et al., 2014). As CTM-AD não
441 somente secretam os fatores de crescimento, mas podem também responder a eles, ampliando
442 assim a resposta biológica do corpo à terapia celular (Mizuno, 2009). Muitos fatores que são
443 secretados pelas CTM-AD funcionam em mecanismos antiapoptóticos ou, alternativamente,
444 induzem migração e proliferação celular (Salgado et al., 2010).

445 Nauta et al. (2013) descrevem os benefícios da utilização das CTM-AD no aumento da
446 neovascularização em lesões cutâneas, secundariamente à secreção de citocinas angiogênicas

447 (VEGF e HGF). Adicionalmente, diversos estudos relataram a neoformação de vasos
448 promovida pelo VEGF durante a reparação e remodelamento ósseo (Keramaris et al., 2008;
449 Stegen et al., 2015). Apesar dos potenciais benefícios, não se observou diferença estatística
450 entre os três grupos nas avaliações histológicas do tecido neoformado quanto à
451 neovascularização. Acredita-se, contudo, que as CTM tenham promovido neovascularização
452 do defeito ósseo, porém a baixa densidade de vasos sanguíneos e discreta cobertura de tecidos
453 moles na região distal do rádio contribuíram para que não fosse possível quantificá-la por
454 meio da avaliação histológica.

455 De acordo com os conceitos da engenharia de tecidos, é possível regenerar vários
456 tecidos ou órgãos utilizando CTM semeadas em “scaffolds” tridimensionais (Burg et al.,
457 2000). Um “scaffold” ideal para engenharia de tecido ósseo deve proporcionar ambiente
458 adequado para o desenvolvimento dos tecidos, deve favorecer a ligação celular, crescimento e
459 diferenciação e ter componentes biocompatíveis (Oliver et al., 2004) . O uso de hidroxiapatita
460 para a engenharia de tecidos tem sido descrito há muitos anos, especialmente devido à sua
461 propriedade osteocondutora (Khan et al., 2000). Além disso, a hidroxiapatita pode ser
462 utilizada em combinação com CTM, a fim de promover indução osteogênica (Caplan, 2005).
463 A distribuição, regularidade e tamanho dos poros presentes na hidroxiapatita são fatores
464 críticos na adesão e proliferação celular (Oliver et al., 2004). No presente estudo, a
465 hidroxiapatita apresentou características de um bom “scaffold”, entretanto a reação
466 granulomatosa prejudicou parcialmente o processo de regeneração óssea, fazendo com que o
467 potencial da terapia celular não fosse explorado por completo. Acredita-se que este resultado
468 esteja diretamente relacionado à espécie leporina, a qual apresenta frequentemente reações
469 granulomatosas de corpo estranho, até mesmo a materiais inertes (Rich, 2002). Apesar disso,
470 o GCTMH apresentou intensa reação periosteal, de forma mais homogênea entre os
471 indivíduos do grupo, quando comparado aos demais grupos. Portanto, as propriedades de
472 osteocondução e osteoindução, esperadas na associação das CTM-AD com a HAP-91,
473 ocorreram nos animais deste experimento.

474 No presente estudo foram utilizadas CTM-AD autólogas, ou seja, as células foram
475 isoladas do tecido adiposo de cada animal, cultivadas no laboratório e utilizadas nele próprio.
476 Entretanto, CTM heterólogas têm sido utilizadas recentemente na rotina veterinária e
477 apresenta como vantagem a disponibilização imediata de material biológico de maneira rápida
478 e segura, tendo em vista, a possibilidade de manutenção de banco de células congeladas em

479 nitrogênio líquido. As CTM expressam moléculas do complexo principal de
480 histocompatibilidade de classe I (MHC I), porém não apresentam marcadores para as
481 moléculas de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (Aggarwal e Pittenger, 2005). Por
482 estas razões, as CTM são consideradas células não imunogênicas, ou seja, incapazes de
483 induzir aloreatividade em mamíferos (Aggarwal e Pittenger, 2005). Esta propriedade é
484 extremamente importante, pois evita manifestações de sintomas de rejeição pelo paciente após
485 o transplante de CTM heterólogas.

486 As CTM, quando interagem com um tecido, desencadeiam a liberação de diversos
487 fatores solúveis que atuarão sobre as células do sistema imunológico (linfócitos B, T e NK,
488 células dendríticas e macrófagos) (Pittenger, 1999). Os principais fatores solúveis secretados
489 pelas CTM são as PGE2, IL-4, IL-6, IL-1, TGF- β , HGF e IDO (Caplan e Dennis, 2006). A
490 PGE2 é o mediador central da resposta imunomodulatória sobre as outras células do sistema
491 imune. Entre suas ações, podemos citar o efeito antiproliferativo sobre as células T e natural
492 killer e modulação da secreção de moléculas inflamatórias pelas células dendríticas e
493 macrófagos (Martinet *et al.*, 2009). As citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, TGF- β , LIF,
494 HLA-G e IDO, também suprimem a proliferação dos linfócitos T (Martinet *et al.*, 2009).
495 Além disso, as CTM reduzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2 e IFN γ que são
496 liberadas pelas células de defesa do hospedeiro (Caplan e Dennis, 2006). Por todas estas ações
497 as CTM são consideradas células com potencial anti-inflamatório (Meisel *et al.*, 2004; Nasef
498 *et al.*, 2007). Na avaliação clínica dos coelhos do GCTM, o escore de avaliação para o
499 parâmetro edema no membro torácico direito foi significativamente menor comparado aos
500 demais grupos. Acredita-se que o potencial anti-inflamatório das CTM tenha contribuído para
501 maior controle do edema na região operada no 3º dia de pós-operatório. Além disso, acredita-
502 se que o GCTMH não apresentou diminuição do edema devido à reação granulomatosa
503 induzida pela presença da hidroxiapatita.

504 Finalmente, mais estudos são necessários para a total compreensão do funcionamento
505 das células-tronco mesenquimais, principalmente no que diz respeito aos estímulos que levam
506 à sua diferenciação. Uma melhor compreensão dos fatores que influenciam e das condições
507 necessárias para que ocorra a diferenciação dessas células em linhagens osteogênicas
508 possibilitará um melhor emprego dessas na regeneração tecidual. Outras investigações são
509 indispensáveis para melhor elucidação dos efeitos dessas células e de maneiras como elas
510 podem ser manipuladas para o benefício em cirurgias.

511 **CONCLUSÃO**

512 Os resultados obtidos neste trabalho, baseados em análises clínicas, radiográficas e
 513 histológicas, mostraram que o uso das células-tronco mesenquimiais autólogas derivadas de
 514 tecido adiposo (CTM-AD) favoreceu a regeneração óssea em defeitos ósseos segmentares de
 515 tamanho crítico induzidos experimentalmente na diáfise distal do rádio de coelhos. A
 516 associação das CTM-AD com a hidroxiapatita sintética (HAP-91) foi benéfica à regeneração
 517 óssea e apresentou resultados mais homogêneos entre os indivíduos do grupo. Entretanto, a
 518 ocorrência de reação granulomatosa intensa em resposta ao biomaterial atrapalhou o processo de
 519 reparação, fazendo com que o grupo em que foram utilizadas somente as células-tronco
 520 apresentasse processo de reparação mais rápido e eficaz.

521 **REFERÊNCIAS**⁵⁰

- 522 AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J.; DRAUGHN, R.A. Animal Models of Bone Fracture or
 523 Osteotomy. c.11 In: AN, Y.H. and FRIEDMAN, R.J. *Animal Models In Orthopaedic*
 524 *Research*. Boca Raton: CRC Press. p.197-217. 1999.
- 525 AGGARWALL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate
 526 allogeneic immune cell responses. *Blood*, v. 4, p. 1815-1822, 2005.
- 527 BICALHO, S. M. C. M. et al. *HAP-91® e COL. HAP-91® Casuísticas e Estudos Científicos*. 3
 528 ed. Sabará: Sabará, 2008. 253 p.
- 529 BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue
 530 engineering. *Biomaterials.*, v. 21, p. 2347-2359, 2000.
- 531 CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics.
 532 *Tissue Eng.*, v.11(7/8), p.1198-1211, 2005.
- 533 CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell*
 534 *Biochem*, v. 98, p.1076–1084, 2006.
- 535 CHEN, J.H.; LIU, C.; YOU, L. et al. Boning up on Wolff's law: mechanical regulation of the
 536 cells that make and maintain bone. *Journal of Biomechanics.*, v. 43, p.108-118, 2009.
- 537 CHEN, L.; TREDGET, E.E.; WU, P.Y. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells
 538 recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One.*,
 539 v.3, p.1886, 2008.
- 540 COOPER, G.M. et al. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept
 541 of a critical-size defect. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.125, p.1685–1692, 2010.

⁵⁰ Normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABNT adaptado para ABMVZ)

- 542 CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; BITAR, G. et al. Efeito do concentrado de plasma em
543 falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea.
544 Estudo experimental. *Acta Ortopédica Brasileira.*, v.11, n.4, 2003.
- 545 GAROFOLO, S.; POZZI, A. Effect of Plating Technique on Periosteal Vasculature of the
546 Radius in Dogs: A Cadaveric Study. *Veterinary Surgery*, v. 42, n. 3, p. 255–261, 2013.
- 547 GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T.A.; MARSH, D. Fracture healing: The diamond concept.
548 *Injury.*, v. 38 (4 SUPPL.), p. S3-S6, 2007.
- 549 GÓMEZ-BARRENA, E. et al. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and
550 nonunions. *Bone.*, v. 70, p. 93–101, 2015.
- 551 GRAYSON, W. L. et al. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev*
552 *Endocrinol.*, v. 11, n. 3, p. 140–150, 2015.
- 553 KERAMARIS, N.; CALORI, G.; NIKOLAOU, V. et al. Fracture vascularity and bone
554 healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury.*, v.39, n.2, p.45-57, 2008.
- 555 KHAN, S.N.; TOMIN. E.; LANE, J.M. Clinical applications of bone graft substitutes.
556 *Orthop Clin North Am.*, v.31, n. 3, p. 389-398, 2000.
- 557 KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration.
558 *Veterinary Surgery*, v.35, p.232–242, 2006.
- 559 LACRETA JUNIOR, A. C. C.; REGONATO, E.; COSSI, L. B. et al. Modelo experimental de
560 falha óssea por meio de ostectomia do rádio em coelhos. v. 23, n. 3, p. 149–157, 2010.
- 561 LEVI, B.; LONGAKER, M.T. Adipose derived stromal cells for skeletal regenerative
562 medicine. *Stem Cells.*, v.29, p.576-582, 2011.
- 563 MARTINET, L. et al. A regulatory cross-talk between T lymphocytes and mesenchymal stem
564 cells. *Eur J Immunol*, v. 3, p. 752–62, 2009.
- 565 MEISEL, R. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T- cell responses by
566 indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, v. 103, p. 4619-4621,
567 2004.
- 568 MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of
569 research and a literature review. *J Nippon Med Sch.*, v.76, p.56, 2009.
- 570 MIZUNO, H.; TOBITA, M.; UYSAL, A.C. Concise review: adipose-derived stem cells as a
571 novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells.*, v.30, p.804, 2012.
- 572 NASEF, A. et al. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition
573 of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene*
574 *Expr*, v. 13, p. 217–226, 2007.
- 575 NAUTA, A.; SEIDEL, C.; DEVEZA, L; et al. Adipose-derived stromal cells overexpressing
576 vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing. *Mol Ther.*,
577 v.21, p.445, 2013.

- 578 NORRIS, S.A.; PETTIFOR, J.M.; GRAY D.A. et al. Calcium metabolism and bone mass in
579 female rabbits during skeletal maturation: effects of dietary calcium intake. *Bone.*, v.29, n.1,
580 p.62-69. 2001.
- 581 NUNAMAKER, D. M. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop.*, v. 355, p. 56-
582 65, 1998.
- 583 OLIVIER, V.; FAUCHEUX, N.; HARDOUIN, P. Biomaterial challenges and approaches to
584 stem cell use in bone reconstructive surgery. *Drug Discov Today.*, v.9, n.18, p.803-811, 2004.
- 585 ÖZTÜRK, A.; ILMAN, A.A.; SAGLAM, H. et al. The effects of phytoestrogens on fracture
586 healing: experimental research in New Zealand white rabbits. *Turkish Journal of Trauma &*
587 *Emergency Surgery.*, v.14, n.1, p.21-27. 2008.
- 588 PEARCE, A.; RICHARDS, R.; MILZ, S. et al. Animal models for implant biomaterial
589 research in bone: A review. *European Cells and Materials.*, v.13, p.1-10, 2007.
- 590 PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al. Multilineage potential of adult
591 human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p.143–147, 1999.
- 592 PONS, J.; HUANG, Y.; ARAKAWA-HOYT, J. et al. VEGF improves survival of
593 mesenchymal stem cells in infarcted hearts. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.376, p.419,
594 2008.
- 595 RICH, G.A. Rabbit Orthopedic Surgery. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal*
596 *Practice.*, v.5, n.1, p.157-168. 2002.
- 597 SALGADO, A.J.; REIS, R.L.; SOUSA, N.J. et al. Adipose tissue derived stem cells
598 secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.*,
599 v.5, p.103, 2010.
- 600 SCHMITZ, J.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for
601 craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research.*, v. 205, p. 299-
602 308, 1986.
- 603 SPICER, P.P. et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect.
604 *Nat. Protoc.*, v.7, p.1918–1929, 2012.
- 605 STEGEN, S.; VAN GASTEL, N.; CARMELIET, G. Bringing new life to damaged bone: The
606 importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone.*, v.70, p.19-27, 2015.
- 607 TAJIMA, S. et al. Direct and Indirect Effects of a Combination of Adipose-Derived Stem
608 Cells and Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration. *Tissue engineering. Part A*, v. 0, n. 0,
609 p. 1–11, 2014.
- 610 TEVLIN, R. et al. Stem and progenitor cells : advancing bone tissue engineering. *Drug*
611 *Delivery and Translational Research.*, v.6, n.2, p.159-173, 2015.
- 612 VENKATESAN, J.; LOWE, B.; ANIL, S. et al. Combination of nano-hydroxyapatite with
613 stem cells for bone tissue engineering. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.*, v.16,
614 p.8881-8894, 2016.

- 615 WELCH, J.A.; BOUDRIEAU, R.J.; DEJARDIN, L.M. et al. The intraosseous blood supply of
616 the canine radius: implications for healing of distal fractures in small dogs. *Vet Surg.*, v.26, p.
617 57-61, 1997.
- 618 YOUNG, S. et al. Development and characterization of a rabbit alveolar bone nonhealing
619 defect model. *J. Biomed. Mater. Res., A* v. 86A, p. 182–194, 2008.
- 620 ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue:
621 implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, v.7, p.211, 2001.

CAPÍTULO 3 – Considerações finais

1. Considerações metodológicas relevantes

O presente estudo foi realizado no período de junho de 2015 a setembro de 2016. Os animais foram adquiridos com dois meses de idade e foram mantidos em criação em gaiola até completarem os cinco meses de idade. Esse protocolo foi importante para permitir crescimento máximo do animal e maturidade esquelética suficiente para realização do defeito ósseo segmentar na diáfise do rádio de forma que esses fatores influenciassem o mínimo possível na regeneração óssea.

Foi realizado treinamento inicial dos procedimentos cirúrgicos em cadáveres, a fim de minimizar que a curva de aprendizado para a realização da ostectomia do rádio influenciasse nos resultados. As cirurgias foram realizadas em um total de quatro dias. Os coelhos dos grupos tratados com células-tronco foram operados no mesmo dia devido à logística de envio das células de Brasília até Jaboticabal e o período de viabilidade celular.

Toda parte da metodologia relacionada ao isolamento, cultivo e transporte celular foi realizado por parte do Laboratório Bio Cell de Brasília-DF.

As avaliações radiográficas foram realizadas no setor de imagem do hospital veterinário da FCAV, Unesp, Jaboticabal e os coelhos foram transportados individualmente do setor de cunicultura, onde estavam alocados, até o local de exame em gaiolas de transporte.

As avaliações histológicas foram realizadas no departamento de morfologia e no departamento de patologia clínica da Universidade de Brasília (UnB). Foi estabelecida parceria com o professor Eduardo e professor Márcio, sendo eles os responsáveis pela confecção e avaliação das lâminas do experimento.

A avaliação por escore é subjetiva e, muitas vezes, requer avaliação adicional para detectar diferenças sutis entre os indivíduos e os grupos. Estudos quantitativos de contagem celular, imunohistoquímica, mensuração da área de formação de osso novo e área de vascularização foram realizados na tentativa de esclarecer melhor e com maior exatidão estas tendências positivas da utilização da terapia celular na regeneração óssea. Os resultados destas avaliações serão incluídos no artigo a ser submetido ao periódico.

2. Dificuldades encontradas

A principal dificuldade do experimento foi a logística para a manutenção dos animais do projeto. A princípio os animais foram mantidos em gaiolas dispostas em canil com uma capacidade máxima de acomodação, o que limitou a aquisição de todos os animais do experimento simultaneamente. Por este motivo houve um atraso no desenvolvimento das atividades por se tratar de protocolo experimental longo para um mestrado. Além disso, houve atraso no início dos procedimentos cirúrgicos do primeiro grupo a ser operado devido à quebra de equipamentos que seriam utilizados no experimento.

Em relação à avaliação histopatológica, algumas dificuldades foram encontradas. Devido à inexperiência e o pouco tempo de treinamento, algumas amostras colhidas dos coelhos desse experimento foram perdidas no processo de descalcificação e não puderam ser incluídas na avaliação histológica das lâminas. Isso prejudicou de certa forma a análise estatística.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Tabelas e Figuras suplementares dos resultados da avaliação clínica.

Tabela 1A. Média e desvio padrão do escore de avaliação (1 - ausente, 2 - discreto), 3 - moderado e 4 - Intenso) em relação aos parâmetros clínicos avaliados no diferentes grupos (GC, GCTM, GCTMH) no 3º dia de pós-operatório.

	Dor	Edema	Secreção	Claudicação
GC	2 ±0,4	2,7±0,5	1±0	3,5±0,5
GCTM	1,6±0,5	1,7±0,5	1±0	3,1±0,5
GCTMH	2,1±0,7	2,5±0,5	1±0	3,2±0,4

* Diferença significativa ao teste de Kruskal-Wallis entre GCTM vs GC ($p<0,001$), e GCTM vs GCTMH ($p<0,05$).

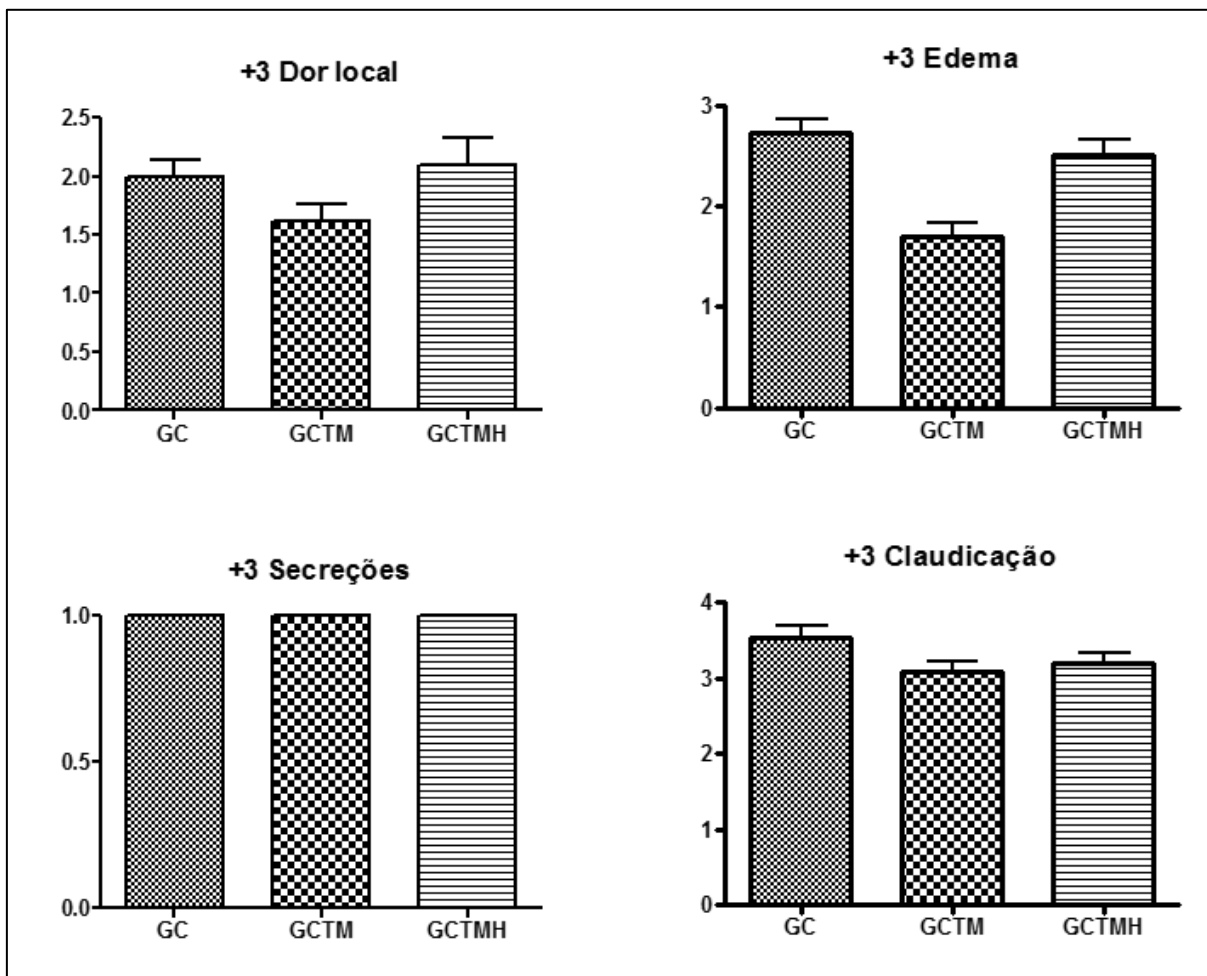


Figura 1A. Gráficos demonstrando a média do escore de avaliação clínica e o erro padrão da média dos grupos GC, GCTM e GCTMH para os parâmetros dor local, edema, secreções e claudicação no 3º dia de pós-operatório.

APÊNDICE B: Tabelas e Figuras suplementares dos resultados da avaliação radiográfica

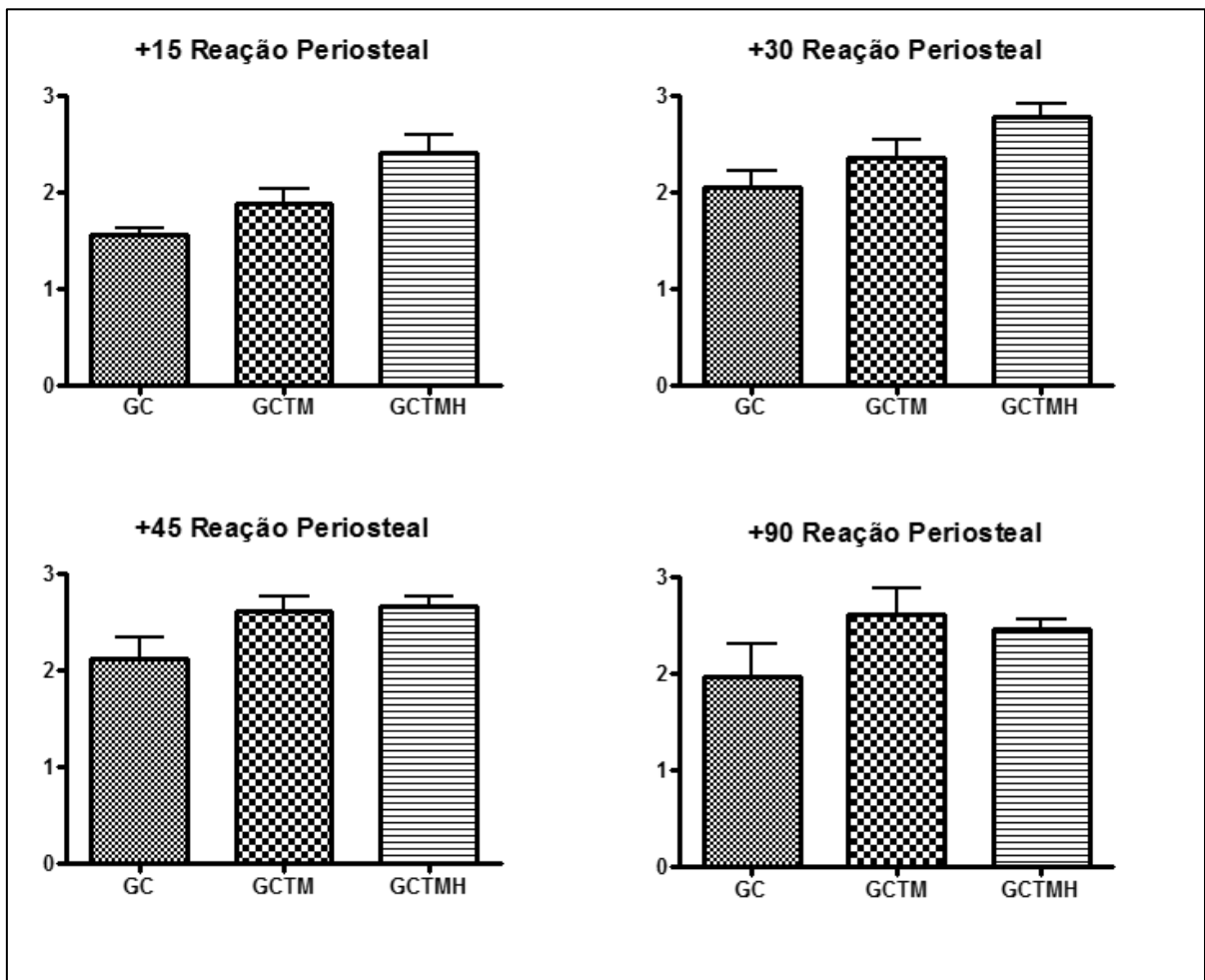


Figura 1B. Gráficos mostrando a média do escore de avaliação radiográfica e o erro padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para o parâmetro reação periosteal.

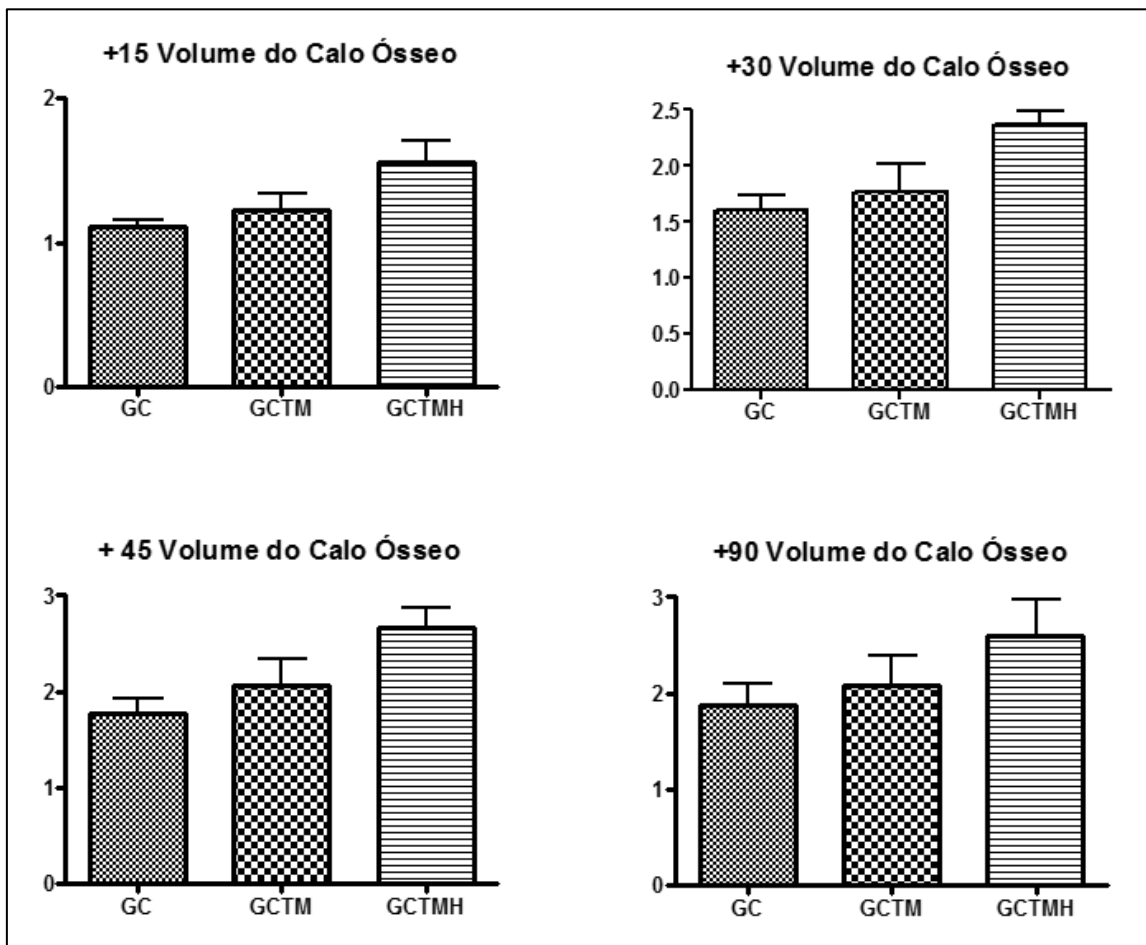


Figura 2B. Gráficos mostrando a média do escore de avaliação radiográfica e o erro padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para o parâmetro volume do calo ósseo.

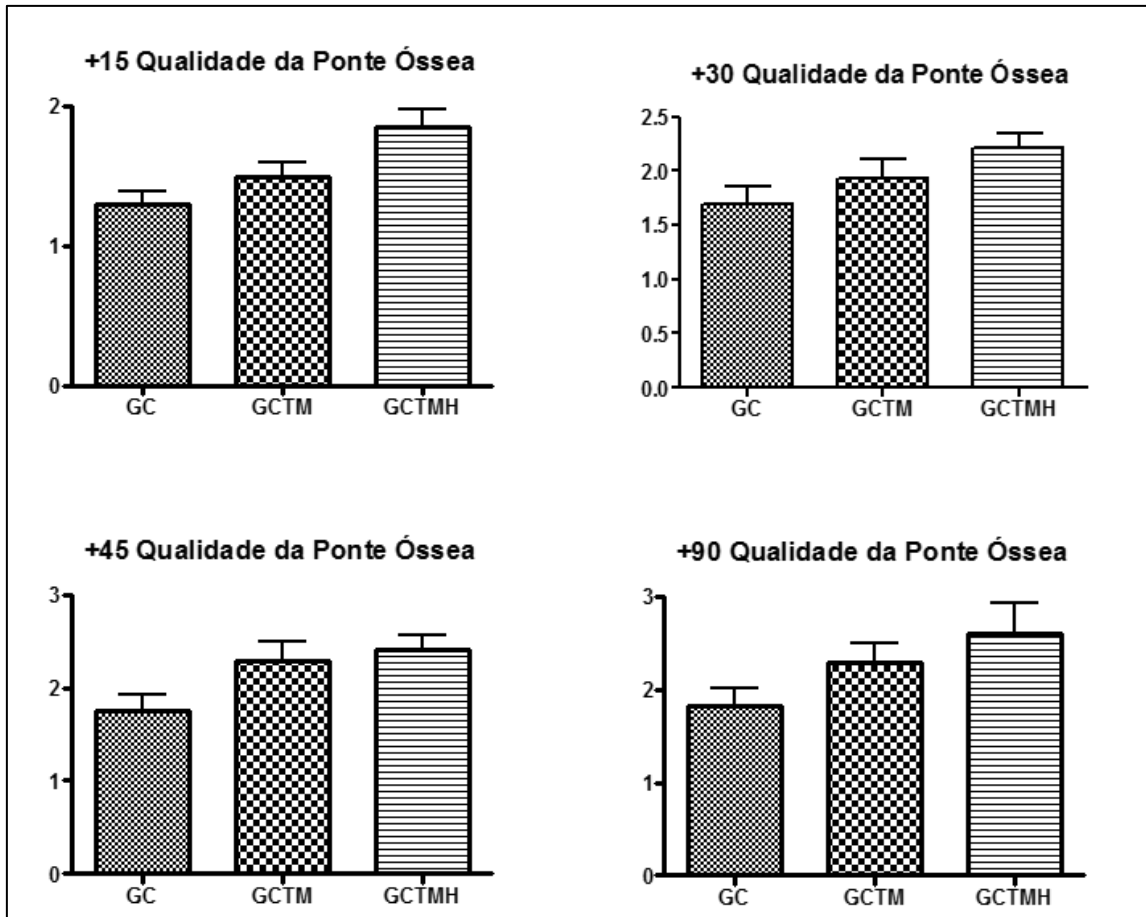


Figura 3B. Gráficos mostrando a média do escore de avaliação radiográfica e o erro padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para o parâmetro qualidade da ponte óssea.



Figura 4B. Aspecto radiográfico final do processo de reparação do defeito ósseo segmentar no rádio dos coelhos do grupo controle (GC) no momento da eutanásia. A: Coelho GC3 , 45 dias; B: coelho GC4, 45 dias; C: coelho GC5 , 45 dias; D: coelho GC7, 90 dias; E: coelho GC8, 90 dias; F: coelho GC10, 90 dias; G: coelho GC11, 90 dias; H: coelho GC12, 45 dias; I: coelho GC2, 90 dias; J: coelho GC6, 90 dias.



Figura 5B. Aspecto radiográfico final do processo de reparação do defeito ósseo segmentar no rádio dos coelhos do grupo células-tronco mesenquimais (GCTM) no momento da eutanásia. A: coelho GCTM13, 90 dias; B: coelho GCTM12, 90 dias; C: coelho GCTM11, 90 dias; D: coelho GCTM10, 45 dias; E: coelho GCTM9, 45 dias; F: coelho GCTM8, 90 dias; G: coelho GCTM7, 90 dias; H: coelho GCTM6, 90 dias; I: coelho GCTM5, 90 dias; J: coelho GCTM1, 45 dias.



Figura 6B. Aspecto radiográfico final do processo de reparação do defeito ósseo segmentar no rádio dos coelhos do grupo células-tronco mesenquimais e hidroxiapatita (GCTMH) no momento da eutanásia. A: coelho GCTMH1, 90 dias; B: coelho GCTMH2, 90 dias; C: coelho GCTMH3, 90 dias; D: coelho GCTMH4, 90 dias; E: coelho GCTMH6, 45 dias; F: coelho GCTMH7, 45 dias; G: coelho GCTM8, 45 dias; H: coelho GCTMH9, 45 dias; I: coelho GCTMH10, 45 dias; J: coelho GCTM13, 90 dias.

Tabela 1B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC,GCTM e GCTMH) no momento de avaliação pós-operatório.

Pós-operatório			
	Reação periosteal	Volume do calo ósseo	Qualidade da ponte óssea
GC	1,2±0,2	1±0	1,2±0,3
GCTM	1,2±0,2	1±0	1,2±0,3
GCTMH	1,7±0,3	1,1±0,2	1,5±0,4

Tabela 2B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros reação periosteal, volume do calo ósseo e qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC,GCTM e GCTMH) no momento de avaliação 15 dias.

15 dias			
	Reação periosteal	Volume do calo ósseo	Qualidade da ponte óssea
GC	1,5±0,2	1,1±0,2	1,3±0,3
GCTM	1,9±0,6	1,2±0,4	1,5±0,4
GCTMH	2,4±0,6*	1,6±0,5**	1,8±0,4*

* Diferença significativa ao teste de Kruskal-Wallis entre GCTMH vs GC ($p<0,01$);

** Diferença significativa ao teste de Kruskal-Wallis entre GCTMH vs GC ($p<0,05$).

Tabela 3B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros Reação periosteal, Volume do calo ósseo e Qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC,GCTM e GCTMH) no momento de avaliação 30 dias.

30 dias			
	Reação periosteal	Volume do calo ósseo	Qualidade da ponte óssea
GC	2,0±0,6	1,6±0,4	1,7±0,5
GCTM	2,4±0,7	1,8±0,9**	1,9±0,7
GCTMH	2,8±0,6*	2,4±0,4*	2,2±0,4*

* Diferença significativa ao teste de Kruskal-Wallis entre GCTMH vs GC ($p<0,05$)

** Diferença significativa ao teste de Kruskal-Wallis entre GCTM vs GCTMH ($p<0,05$)

Tabela 4B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros Reação periosteal, Volume do calo ósseo e Qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC, GCTM e GCTMH) no momento de avaliação 45 dias.

45 dias			
	Reação periosteal	Volume do calo ósseo	Qualidade da ponte óssea
GC	2,1±0,7	1,8±0,6	1,8±0,6
GCTM	2,6±0,6	2,1±1,0	2,3±0,7
GCTMH	2,7±0,3	2,7±0,6*	2,4±0,5*

* Diferença significativa ao teste de Kruskal-Wallis entre GCTMH vs GC ($p < 0,05$).

Tabela 5B. Média e desvio padrão do escore de avaliação radiográfica da regeneração óssea para os parâmetros Reação periosteal, Volume do calo ósseo e Qualidade da ponte óssea dos 3 grupos (GC, GCTM e GCTMH) no momento de avaliação 90 dias.

90 dias			
	Reação periosteal	Volume do calo ósseo	Qualidade da ponte óssea
GC	1,9±0,9	1,9±0,5	1,8±0,5
GCTM	2,6±0,7	2,1±0,8	2,3±0,6
GCTMH	2,5±0,2	2,6±0,8	2,6±0,7

APÊNDICE C: Tabelas e Figuras complementares da avaliação histopatológica.

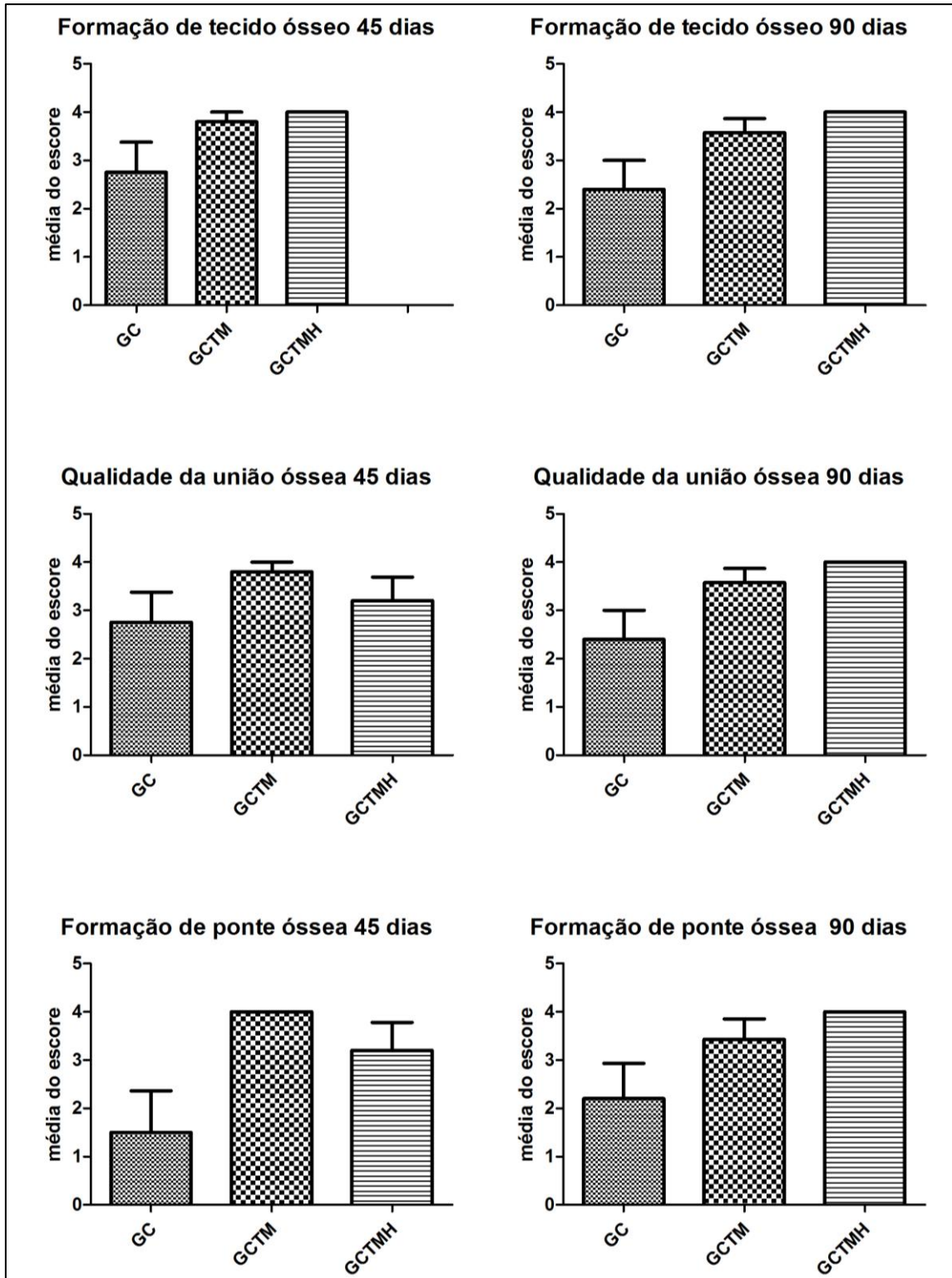


Figura 1C. Gráficos mostrando a média do escore de avaliação histopatológica e o desvio padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para os parâmetros formação de tecido ósseo, qualidade da união óssea, formação de ponte óssea.

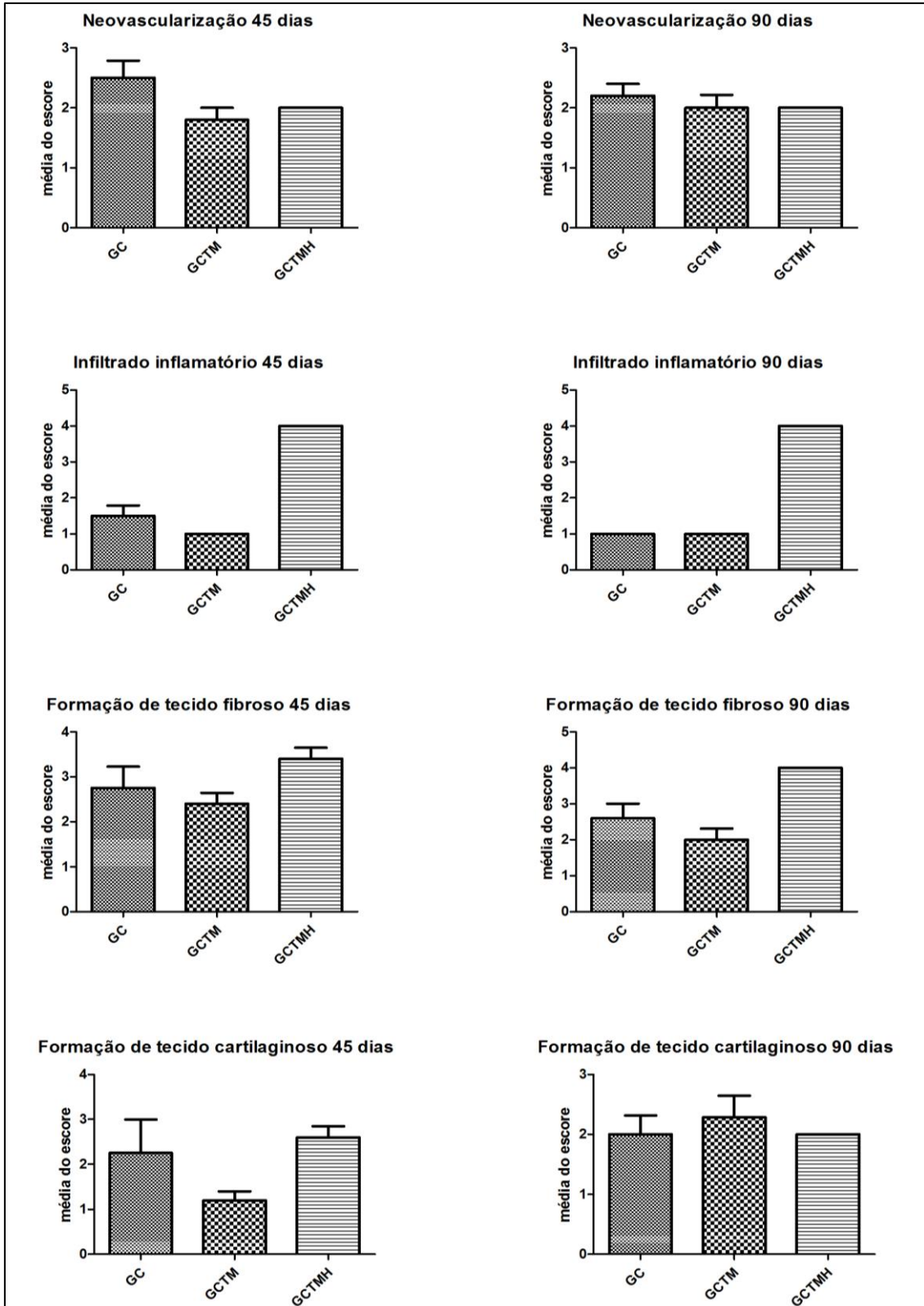


Figura 2C. Gráficos mostrando a média do escore de avaliação histopatológica e o desvio padrão da média de cada grupo em diferentes momentos de avaliação para os parâmetros neovascularização, infiltrado inflamatório, formação de tecido fibroso e formação de tecido cartilaginoso.

Tabela 1C. Graduação histológica utilizando escores de avaliação dos grupos GC, GCTM e GCTMH aos 45 e 90 dias de pós-operatório.

Parâmetros/Grupos	45 dias			90 dias		
	GC(4)	GCTM(5)	GCTMH(5)	GC(5)	GCTM(7)	GCTMH(3)
Total 29 coelhos						
Neovascularização	2,5±0,6	1,8±0,4	2	2,2±0,4	2±0,6	2
Infiltrado inflamatório	1,5±0,6	1	4	1	1	4
Formação de tecido fibroso	2,75±1	2,4±0,5	3,4±0,5	2,6±0,9	2±0,8	4
Formação de tecido cartilaginoso	2,25±1,5	1,2±0,4	2,6±0,5	2±0,7	2,3±1	2
Formação de tecido ósseo	2,75±1,3	3,8±0,4	4	2,4±1,3	3,6±0,8	4
Qualidade da união	2,75±1,3	3,8±0,4	3,2±1,1	2,4±1,3	3,6±0,8	4
Formação e ponte óssea e remodelamento	1,5±1,7	4	3,2±1,3	2,2±1,6	3,4±1,1	4

Os valores são médias e desvio padrão dos escores. GC: grupo controle; GCTM: grupo células-tronco mesenquimais; GCTMH: grupo células-tronco mesenquimais e hidroxiapatita.

ANEXO 1 - Normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é consentido o uso comercial dos resultados.

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

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de Publicação on-line do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em “Figure or Image” (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O ABMVZ comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em “Ethics Conmittee” (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve

exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências. O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”. O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês na forma impessoal.

Formatação do texto

O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis 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 ultrapassar 50 palavras.

□ **Autores e Afiliação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word.

□ **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

□ **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o *Keyword* (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto *keyword* (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

□ **Introdução.** Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

□ **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.** (verificar o Item Comitê de Ética).

□ **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

□ **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu

entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

□ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota:

□ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

□ **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

□ **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

□ **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

□ **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

□ A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

□ autoria única: (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 alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

□ *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

□ *Comunicação pessoal.* Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

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

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

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

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

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

NUTRIENT requirements of swine. 6a ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de 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 quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação:

SOMENTE PARA ARTIGOS NACIONAIS

☐ **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

☐ **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

☐ **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be

paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be in the invoice issuance.

Recursos e diligências:

No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.