

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS NO
TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE INDUZIDA DA
ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL EM COELHOS
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Lívia de Paula Coelho

Médica Veterinária

Jaboticabal – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS NO
TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE INDUZIDA DA
ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL EM COELHOS
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Lívia de Paula Coelho

Orientador: Prof. Adj. 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.**

Jaboticabal - SP

2017

Coelho, Livia de Paula

C672 Células-tronco mesenquimais autólogas no tratamento da
c osteoartrite da articulação coxofemoral em coelhos
 (Oryctolagus cuniculus) / Livia de Paula Coelho. – –
 Jaboticabal, 2017

 x, 78 p. : il. ; 29 cm

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

 Orientador: Bruno Watanabe Minto

 Banca examinadora: Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias,
 Paulo César Jark.

 Bibliografia

 1. Cartilagem articular. 2. Terapia celular. 3. Doença articular
 degenerativa. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
 Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.71-018.3:636.92

Certificado de Aprovação



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



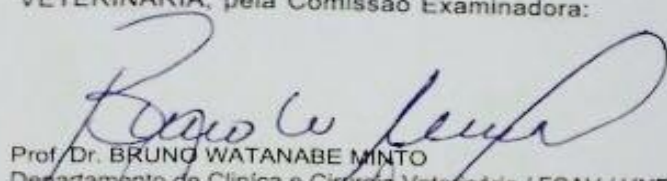
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS NO TRATAMENTO DA
OSTEOARTRITE INDUZIDA DA ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL EM
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

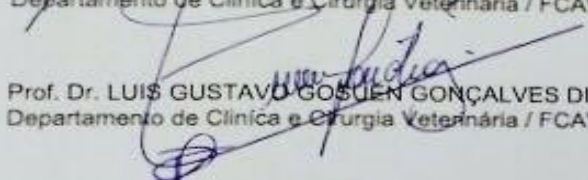
AUTORA: LÍVIA DE PAULA COELHO

ORIENTADOR: BRUNO WATANABE MINTO

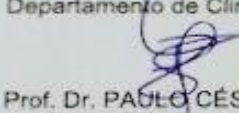
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. LUIS GUSTAVO GOSSEN GONÇALVES DIAS

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. PAULO CÉSAR JARK

UNICASTELO / Descalvado, SP

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lívia de Paula Coelho, nasceu em 18 de janeiro de 1988, no município de Itaperuna, estado do Rio de Janeiro. Coursou Medicina Veterinária de 2007 a 2010 na Universidade Iguaçu – Câmpus V, em Itaperuna RJ. Em 2013 ingressou no Programa de Residência Multiprofissional em Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Animais de Companhia na Universidade Federal de Lavras (UFLA), o qual concluiu em 2015. Neste mesmo ano, ingressou no programa de pós-graduação em cirurgia veterinária, sob orientação do Prof. Adj. Bruno Watanabe Minto com ênfase em Ortopedia e Neurocirurgia Veterinária, curso de mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, que está em curso atualmente, tendo sido bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

EPÍGRAFE

*“A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.
Para que serve a utopia?
Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”*
Eduardo Galeano

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às pessoas que mais abdicaram e
sonharam comigo para que ele se tornasse real:
Meus pais, Alfredo e Marise; minha irmã Bárbara.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus. Porque sem Ele nada seria possível. Porque a Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas. Pela oportunidade de chegar até aqui, pois, apesar de todas as lutas e lágrimas, todas as coisas cooperaram para o bem daquele que esperam em Deus, e em tudo Deus tem um propósito. Toda honra e glória a Ele.

Ao meu orientador, Bruno Watanabe Minto, pela oportunidade. Obrigada pelos puxões de orelha. Seu papel tem sido crucial na minha jornada profissional e pessoal.

À querida amiga Patrícia Malard e sua equipe do Laboratório Biocell (Brasília - DF) por terem sido muito mais do que parceiros, por terem se tornado nosso time. Obrigada pelo companheirismo e por toda ajuda neste projeto.

À equipe do Laboratório de Ortopedia e Neurocirurgia, que contribuiu diretamente para a realização desse trabalho, tal apoio foi crucial para desenvolvimento da pesquisa e da minha mudança e adaptação em Jaboticabal. Fernando Kawamoto, Fabrícia Geovana, Denise Chug, Arícia Sprada, Guilherme Galhardo, Caroline Ribeiro, João Augusto Leonel, Paula Gomide, Rafael Dreibi, Lúcia Izique, Maria Eduarda Moutinho, Luis Guilherme Faria, obrigada por tudo. Vocês são exemplos de pessoas e profissionais que eu tenho a seguir.

A todos funcionários, residentes e pós-graduandos do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, que contribuíram de forma direta ou indireta nesse projeto. Agradecimento especial as queridas Tamara Silva, Ana Carolina Simamura e Mariana Dôssin pela ajuda nos exames radiográficos. À Juliana Cerqueira, Marcela Aldrovani, Débora Souza e sua mãe, Dona Maria, por não terem medido esforços em me ajudar.

A querida Prof. Dra. Paola Castro Moraes, que me inspira todos os dias com seu carisma e dom pela cirurgia, espero um dia poder ser pelo menos um pouco como ela. Ao estimado Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias por me chamar atenção sempre que mereci e por me ensinar que: “Quem planta tâmaras não colhe tâmaras”.

Ao professor Dr. João Ademir do Departamento de Ciências Exatas da FCAV – UNESP – Câmpus Jaboticabal, pela ajuda na confecção da análise estatística deste trabalho. Aos Professores Márcio Botelho de Castro e Eduardo Lima, ambos da UnB

pela ajuda na análise da avaliação microscópica deste estudo. Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Lacreta Jr, Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias e Daniele Rolemberg pela ajuda com as avaliações radiográficas do projeto. Ao Prof. Dr. Paulo César Jark por sua ajuda na correção deste trabalho e por ter se disposto a nos ajudar tão prontamente no momento mais difícil.

Aos queridos estagiários do HV por toda ajuda nas partes práticas deste projeto.

Ao meu eterno orientador e amigo Prof. Dr. Renato Moran Ramos por me incentivar e me ensinar a acreditar em meus sonhos desde os tempos da graduação. Seu apoio foi fundamental em todas as etapas da minha carreira. Obrigada por não medir esforços em me ajudar e por estar sempre do meu lado. Sinto muito orgulho de ter sido sua primeira orientada, sigo seus passos até hoje. Nunca me esqueci que me ensinou que na vida temos duas opções: “Voar com as águias ou ciscar com as galinhas”. Obrigada por tudo. Me desculpa, mais uma vez.

A minha família, que desde muito cedo abriu mão da minha presença e companhia, sempre me apoiando em busca dos meus sonhos e objetivos. Aos meus pais, Alfredo e Marise que, mesmo a distância tem orado e acreditado em mim, me incentivado. Sem dúvida os melhores pais do mundo. À minha irmã, Bárbara por todo carinho e companheirismo. Foi por vocês, que cheguei até aqui e busco chegar muito além.

Ao Deive Pereira Abreu, por todo companheirismo, carinho e apoio nestes últimos meses, que foram cruciais para a finalização deste trabalho.

Agradeço a toda minha família que sempre acreditou em mim, em especial a minha Vó Carmen, Edmara, Délbia, Maurício, Adriano, Débora, Jurema, Josélia, Ivandir, Mara e Tuta. A todos meus queridos primos!

A todos os meus amigos, em especial Matheus Roberto Motta, Fernanda de Paula e Maryanne Souza, por se fazerem presentes mesmo com a distância. O apoio e amizade de vocês foi imprescindível para esta conquista!

Aos queridos, Lauro César, Chica e Edson (600) por todo carinho. Muito obrigada por terem me “adotado” em Jaboticabal. Ficar longe de casa só tem sido suportável porque tenho vocês aqui.

Aos meus eternos pacientes. É por vocês que cheguei até aqui. Por vocês busco cada dia mais aprimorar meus conhecimentos para dar-lhes o meu melhor como Médica Veterinária.

A agência de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária e ao Hospital Veterinário da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

Aos Animais deste experimento, com sua ingenuidade e pureza, permitiram a execução deste estudo.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.3 Cartilagem Articular	5
3.3 Osteoartrite.....	6
3.3 Células-tronco Mesenquimais	7
4. RESUMO DA METODOLOGIA UTILIZADA.....	11
4.1 Animais.....	11
4.2 Anestesia.....	14
4.3 Coleta de tecido adiposo	16
4.4 Procedimento laboratorial.....	16
4.5 Preparo de solução de collagenase e indução da osteoartrite experimental	17
4.6 Implantação cirúrgica	19
4.7 Avaliação radiográfica	21
4.8 Avaliação microscópica	23
4.9 Avaliação estatística.....	25
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2 - Células-tronco mesenquimais autólogas no tratamento da osteoartrite induzida da articulação coxofemoral em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	35

MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO 1 - Normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	65

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Jaboticabal

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 7510/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Uso de células tronco mesenquimais na osteoartrose coxofemoral experimentalmente induzida 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 NO TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE INDUZIDA DA ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL EM COELHOS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)

RESUMO – A cartilagem articular possui capacidade de reparação limitada, aumentando a predisposição ao desenvolvimento de alterações degenerativas, muitas vezes irreversíveis. Diversas formas de tratamento, cirúrgicas ou conservativas, são descritas, entretanto a terapêutica da osteoartrite continua sendo grande desafio ao médico veterinário. Neste contexto, a pesquisa envolvendo células-tronco mesenquimais destaca-se na busca de melhorias e avanços na reparação da cartilagem articular. Objetivou-se, no presente projeto, comparar a regeneração cartilaginosa da articulação coxofemoral de coelhos, com e sem o transplante de células-tronco mesenquimais autólogas, por meio de exames radiográficos e histopatológicos. Dois grupos, com 15 animais da espécie leporina cada, foram submetidos à indução química de osteoartrite com solução de collagenase 2% na articulação coxofemoral direita. No Grupo 1 (Células-tronco) realizou-se a aplicação intra-articular de células-tronco mesenquimais autólogas, enquanto que, o Grupo 2 (Controle) foi constituído por animais submetidos à aplicação intra-articular de solução salina estéril. Foram realizadas avaliações radiográficas e histopatológicas aos 30, 60 e 90 dias após a aplicação. Os resultados histológicos deste ensaio indicam que células-tronco mesenquimais (Grupo 1) melhoraram discretamente a qualidade do tecido de reparo, de acordo com os critérios da escala semi-quantitativa ICRS 1 (*“International Cartilage Repair Society”*). O Grupo 1 (Células-Tronco) demonstrou superioridade em relação ao Grupo 2 principalmente nos parâmetros: Superfície articular, matriz extracelular e distribuição celular.

Palavras chave: cartilagem articular, collagenase, displasia coxofemoral, doença articular degenerativa, dor, terapia celular

USE OF AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF HIP OSTEOARTHRITIS IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)

ABSTRACT - The articular cartilage has limited repair capacity, leading to an increased risk for degenerative changes, potentially irreversible. Several treatments, surgical or not, are described, however osteoarthritis remains a major challenge for the veterinarian. In this context, research involving mesenchymal stem cells stands out. The aim of this study was to compare cartilage regeneration of the hip in rabbits, with and without the transplantation of autologous mesenchymal stem cells. Radiographic and histopathological evaluation were used. Thirty rabbits were submitted to chemical induction of osteoarthritis with a 2% collagenase in the right hip. They were divided into 2 groups of 15 animals each: Group 1 (intra-articular application of autologous mesenchymal stem cells) and Group 2 (control - intra-articular application of sterile saline solution). Radiographic and histopathological evaluations were performed at 30, 60 and 90 days after application. The mesenchymal stem cells group (Group 1) showed slight improvement of the quality of the repair tissue, according to the semi-quantitative scale criteria ICRS 1 (International Cartilage Repair Society). The Group 1 (Stem Cells) showed superiority in relation to Group 2, specially in the parameters joint surface, extracellular matrix and cellular distribution.

Key words: articular cartilage, collagenase, hip dysplasia, degenerative joint disease, pain

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	Página
Tabela 1. Escala de avaliação radiográfica de osteoartrite (adaptado de Kellgren; Lawrence (1957); Black et al. (2007)).	21
Tabela 2. Escala histológica ICRS 1 (Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem - International Cartilage Repair Society).	25
 Capítulo 2	
Tabela 1. Escala de avaliação radiográfica de osteoartrite (adaptado de Kellgren; Lawrence (1957); Black et al. (2007)).	42
Tabela 2. Escala histológica ICRS 1 (Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem - International Cartilage Repair Society).	43
Tabela 3. Análise de variáveis do grau de osteoartrite entre os Grupos 1 (Células-Tronco CT) e 2 (Controle – GC).	44
Tabela 4. Análise de variáveis do grau de osteoartrite entre os Grupos 1 (Células-Tronco – CT) e 2 (Controle – GC) nos tempos M1 (Pré OA), M2 (Pós OA), M3 (30 dias), M4 (60 dias) e M5 (90 dias). Mínimo representa o menor escore apresentado, 0. Máximo representa a maior pontuação.	45

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1		Página
Figura 1.	Representação esquemática do delineamento metodológico do projeto. Número de amostras em cada etapa é representado pela letra “n”. Total de 30 coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) foram submetidos a indução de osteoartrite experimental na articulação coxofemoral direita. Animais foram divididos em dois Grupos com 15 animais cada. Grupo 1 (CT - Célula-tronco) e Grupo 2 (GC - Controle). Cada Grupo foi dividido em três subgrupos para avaliações pós tratamento em períodos diferentes (30, 60 e 90 dias).	13
Figura 2.	Representação esquemática da sequência cronológica dos procedimentos anestésicos e cirúrgicos realizados na metodologia do presente estudo. Total de 30 coelhos foram submetidos a exames radiográficos (Rx) pré indução de osteoartrite (OA). Anestesia 1 – coleta de tecido adiposo. Anestesia 2 – Primeira indução de OA (Dia 1). Anestesia 3 – Segunda indução de OA (quatro dias após primeira indução de OA). Rx pós indução de OA sete semanas após Anestesia 3. Anestesia 4 – Procedimentos cirúrgicos para tratamento dos Grupos 1 e 2.	15
Figura 3.	Imagens fotográficas da abordagem à articulação coxofemoral (ACF) direita de coelhos para aplicação intra-articular de tratamento pré-estabelecido de acordo com os Grupos 1 (Células-tronco) e 2 (Controle). A: Acesso cirúrgico à ACF direita de coelho e exposição da cápsula articular. B: Exposição da cápsula articular com auxílio de	20

Página

afastadores cirúrgicos e posterior aplicação intra-articular de 1,0 mL de solução com tratamento de forma estéril. C: Aplicação de 1,0 mL de solução após abordagem à ACF direita de coelho. D: Aproximação da musculatura após acesso cirúrgico à ACF direita e aplicação intra-articular de tratamento; sutura no padrão simples contínuo com fio de poliglactina 910, 3-0.

- Figura 4.** Representação esquemática da sequência cronológica da metodologia do projeto de pesquisa com ênfase nos exames radiográficos (Rx) da articulação coxofemoral de coelhos. Momento 1 - representa a avaliação radiográfica pré indução de osteoartrite (OA); Momento 2 - avaliação (Rx) realizada sete semanas após indução de OA; Momento 3 - Rx realizados 30 dias após tratamento cirúrgico (Anestesia 4) conforme o Grupo. Momento 4 - Rx realizados após 60 dias; Momento 5 - Rx realizados após 90 dias de tratamento. 22
- Figura 5.** Imagem fotográfica de articulação coxofemoral (corte longitudinal) de coelho submetido a indução experimental de osteoartrite e posterior tratamento com aplicação de células-tronco mesenquimais autólogas (Grupo 1 – CT). Seta preta indicando cartilagem articular hialina. Asteriscos (*) indicando cápsula articular. Acetábulo e fêmur identificados na imagem. 23
- Figura 6.** Representação esquemática do delineamento metodológico do projeto baseado na avaliação histopatológica. Número de amostras em cada etapa é 24

Página

representado pela letra “n”. Total de 30 coelhos (Oryctolagus cuniculus) foram submetidos a indução de osteoartrite experimental na articulação coxofemoral direita. Animais foram divididos em dois Grupos com 15 animais cada. Grupo 1 (CT - Célula-tronco) e Grupo 2 (GC - Controle). Cada Grupo foi dividido em três subgrupos para avaliações radiográficas e histopatológicas pós tratamento em períodos diferentes (30, 60 e 90 dias). Em todos os 30 animais foi realizada avaliação histopatológica a partir da coloração com Hematoxilina e eosina (H&E).

Figura 7. Representação esquemática da sequência cronológica de todas as etapas da metodologia do presente estudo. Total de 30 coelhos foram submetidos a exames radiográficos (Rx) (Momentos 1,2,3,4 e 5), coleta de tecido adiposo (Anestesia 1), duas induções de osteoartrite experimental (Anestesias 2 e 3), procedimentos cirúrgicos para tratamento dos Grupos 1 e 2 (Anestesia 4). Avaliações histopatológica e estatística foram realizadas após eutanásia dos animais.

Capítulo 2

Figura 1. Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação radiográfica da osteoartrite (OA) ao longo dos momentos de avaliação dos Grupos 1 (Células-tronco) e 2 (Controle) do presente estudo. Momento 1 representa a avaliação radiográfica pré indução de OA. Momento 2, avaliação após sete semanas de indução de OA.

Momentos 3, 4 e 5 avaliações radiográficas após respectivamente 30, 60 e 90 dias de tratamento.

- Figura 2.** Imagens microscópicas das lâminas coradas H&E. A- Coelho, articulação coxofemoral, Grupo 2 (Controle), 30 dias. Superfície articular do fêmur íntegra e cartilagem da articulação acetabular (seta) em processo de reparação e superfície discretamente irregular (H&E, barra 100µm). B- Coelho, superfície articular acetabular, Grupo 1 (Célula-tronco), 30 dias. Cartilagem articular com superfície contínua, em processo de reparação (seta) com condrócitos distribuídos em grupos (H&E, barra 100µm). 46
- Figura 3.** Imagens microscópicas das lâminas coradas H&E. A- Coelho, superfície articular acetabular, Grupo 2 (Controle), 90 dias. Cartilagem articular e osso subcondral íntegros, totalmente restituídos (H&E, barra 400µm). B- Coelho, superfície articular acetabular, Grupo CT, 90 dias. Restituição total da cartilagem articular e integridade do osso subcondral (H&E, barra 400µm). 46
- Figura 4.** Imagem de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histopatológica ao longo dos momentos de avaliação para os grupos 1 (Células-Tronco) e 2 (Controle). 47
- Figura 5.** Imagens de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histológica no primeiro período de avaliação para os grupos 1 (Células-Tronco) e 2 (Controle). 47
- Figura 6.** Imagens de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histopatológica no segundo período 48

(60 dias) de avaliação histológica para os grupos 1 (Células-Tronco) e 2 (Controle).

Figura 7. Imagens de gráfico demonstrando a evolução da média do 48
escore de avaliação histopatológica no terceiro período
(90 dias) de avaliação histológica para os grupos 1
(Células-Tronco) e 2 (Controle)

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF - Articulação coxofemoral

AINE – Anti-inflamatório não-esteroidal

CEUA - Comitê de Ética para o Uso de Animais

cm - Centímetros

CO₂ - Gás carbônico

CTM - Célula-tronco mesenquimal

DAD - Doença articular degenerativa

H&E - Hematoxilina e eosina

ICRS - Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem (*International Cartilage Repair Society*)

IM - Intra muscular

kg - Kilogramas

kV - Kilovoltagem

mA - Miliamperagem

mA_s - Miliamperagem por segundo

mL - Mililitro

OA - Osteoartrite

RPM - Rotações por minuto

SVF - do inglês “*Stromal vascular fraction*”

VD - Ventro dorsal

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1 . Introdução

A reparação do tecido cartilaginoso é um processo fisiológico complexo, representando assim grande desafio para os ortopedistas humanos e veterinários. A cartilagem em si possui capacidade limitada de regeneração (SIEBERT et al., 2006). Fatores como a baixa atividade mitótica, ausência de inervação, deficiência de suprimento sanguíneo e a não mobilidade dos condrócitos predisõem à cicatrização ineficiente (FITZPATRICK et al., 2010).

Lesões na cartilagem articular podem levar a alterações degenerativas a longo prazo, se não forem tratadas. As consequências clínicas de lesões osteocondrais não efetivamente tratadas são dor, edema e desenvolvimento de osteoartrose (OA), com posterior distúrbio potencialmente incapacitante do membro acometido (MARTIN-HERNANDEZ et al., 2010; ORTH et al., 2011; KHAN et al., 2013; ZAK et al., 2014).

A cicatrização da cartilagem articular é caracterizada pelo preenchimento do defeito com tecido fibrocartilaginoso e não por tecido cartilaginoso original (SIEBERT et al., 2006; FITZPATRICK et al., 2010). Este novo tecido reparador oferece propriedades bioquímicas e mecânicas inferiores quando comparadas à cartilagem normal, tendo sua resistência e durabilidade substancialmente reduzidas. Em pequenas lesões, o preenchimento do defeito por fibrocartilagem pode ser suficiente para restaurar função aceitável. Em lesões mais amplas, o recobrimento por fibrocartilagem não é eficiente e, pode não suportar adequadamente a pressão articular por longo período. Lesões cartilaginosas extensas levam ao desenvolvimento da OA e podem requerer a substituição da articulação por prótese, em casos avançados (KALSON et al., 2010; O'LOUGHLIN et al., 2010).

A osteoartrite é afecção degenerativa muito comum na medicina humana e veterinária, afetando cerca de 15% da população humana mundial (EGLOFF; HUGLE; VALDERRABANO, 2012; CUERVO et al., 2014). É uma afecção crônica debilitante, que causa dor e desconforto para o indivíduo. Sua prevalência aumenta com o envelhecimento e obesidade (KUYINU et al., 2016).

Os tratamentos disponíveis objetivam, principalmente, a prevenção ou pelo menos o retardo das alterações estruturais e funcionais da OA. Terapias conservadoras incluem a modificação de estilo de vida do paciente e medicações para a dor (terapia multimodal) que, predominantemente, tratam os sinais clínicos e não a OA (MCALINDON et al., 2014).

Como alternativa para o tratamento de pacientes portadores de osteoartrite, a terapia celular é promissora, especialmente em tecidos com deficiência na cicatrização, como o cartilaginoso (CUCCHIARINI et al., 2016). Há grande perspectiva de uso clínico desta moderna tecnologia nas afecções degenerativas ou que apresentam pouca resposta aos tratamentos atuais (VINATIERA; GUICHEUXA, 2016).

Células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de auto replicação e diferenciação em diversas outras linhagens celulares. Algumas populações de células-tronco adultas, como as células-tronco mesenquimais (CTMs), derivadas da medula óssea e tecido adiposo, possuem maior potencial de diferenciação, que não se limita apenas ao tecido de onde é originada. As CTMs apresentam uma maneira relativamente mais simples de serem coletadas e isoladas em comparação as demais. Possuem a plasticidade de células multipotentes, com a capacidade de se diferenciarem em tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo, muscular, epitelial e, mais recentemente, neural (VIEIRA et al., 2010; VINATIERA; GUICHEUXA, 2016). Destaca-se a possibilidade de diferenciarem-se em linhagens selecionadas, incluindo condrócitos (MANFERDINI et al., 2013).

Devido à sua forte propensão para formar cartilagem, relativa facilidade de colheita de tecidos adultos, efeitos anti-inflamatórios e por apresentarem características imunomoduladoras e imunossupressoras, as CTMs têm sido o foco de inúmeras pesquisas visando a reparação da cartilagem em pacientes humanos ou veterinários com osteoartrite (WHITWORTH; BANKS, 2014).

A hipótese deste estudo foi que a implantação de células-tronco mesenquimais autólogas cultivadas a partir da coleta de tecido adiposo autólogo promoveria a melhora da qualidade do tecido de reparação da cartilagem articular em comparação a um grupo controle sem o uso de células. Para avaliação foram realizadas análises radiográficas e histopatológicas em períodos de 30, 60 e 90 dias após indução química de osteoartrite com solução de collagenase 2% (*Clostridium histolyticum*, tipo II) na articulação coxofemoral direita de coelhos adultos.

2 Objetivos

2. 1 Objetivo geral

Avaliar a exequibilidade e evolução do tratamento com aplicação intra-articular de células-tronco mesenquimais autólogas na osteoartrite induzida quimicamente na articulação coxofemoral de coelhos.

2. 2 Objetivos específicos

- Comparar a regeneração cartilaginosa, com e sem o transplante de células-tronco autólogas, por meio de exames radiográficos e histopatológicos;
- Estabelecer as vantagens e desvantagens do procedimento utilizado, além da constatação e análise de possíveis complicações associadas.

3 Revisão de Literatura

3.1 Cartilagem Articular

A cartilagem articular cobre as extremidades dos ossos nas articulações diartrodiais, tendo como particularidade a ausência de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos em seu interior. Possui número reduzido de condrócitos, que são células especializadas, presentes no interior de uma densa matriz extracelular por eles produzida, organizada e mantida. A principal função da cartilagem articular é a transmissão suave das forças de compressão através da articulação (POOLE, 1997).

Macroscopicamente, a cartilagem hialina apresenta aspecto opaco e semelhante ao vidro; podendo apresentar duas variações: a permanente e a transitória. A permanente é encontrada nas superfícies articulares, com diferenças significativas em termos de estrutura, matriz extracelular, perfil genético e propriedades mecânicas, em relação a cartilagem hialina do tipo transitória, como a encontrada nas fises de crescimento, que sofrem ossificação endocondral com o tempo (IWAMOTO, 2014).

A cartilagem hialina, microscopicamente é dividida em quatro camadas: superficial; intermediária; profunda e calcificada. A linha nítida de separação entre a camada profunda e a camada calcificada é denominada *“tidemark”*. A camada calcificada apresenta pouca quantidade de proteoglicanos, e fica aderida ao osso subcondral, do qual é separada pela linha cimentante (POOLE, 1997).

Lesões que atingem somente o tecido cartilaginoso são denominadas lesões focais, devendo ser diferenciadas das lesões condrais presentes na osteoartrite (OA), um quadro muito mais amplo que afeta todos os tecidos da articulação. Nem sempre estas lesões são sintomáticas, mas esporadicamente podem causar sintomas como dor e edema nas articulações, sendo consideradas fator de risco para o desenvolvimento de OA (OUSSEDIK, 2013).

3.2 Osteoartrite

Osteoartrite (OA) pode ser definida, em termos patológicos, como a reparação e eventual degradação da cartilagem articular em associação com alterações no metabolismo ósseo subcondral, osteofitose peri articular e grau variável de inflamação. Doença articular degenerativa (DAD) e osteoartrose são sinônimos para OA, que pode ser classificada como primária (idiopática) ou secundária (INNES, 2012).

Embora as alterações articulares mais evidentes sejam na cartilagem, avaliação minuciosa mostra que a afecção abrange todo o conjunto, incluindo a membrana sinovial, tendões, ligamentos, osso e tecidos neurais (HARMAN et al., 2016). Os mecanismos patofisiológicos da OA foram bem descritos, incluindo o papel fundamental que citocinas inflamatórias e reguladoras desempenham na homeostase e degradação articular (HOUARD et al., 2013).

Em cães, fatores secundários como distúrbios do desenvolvimento, instabilidade articular ou traumatismos articulares, como ocorre na displasia coxofemoral, osteocondrite dissecante e doença do ligamento cruzado são as causas mais comuns de OA (INNES, 2012; MEHLER et al., 2016).

Uma variedade de sinais clínicos e achados no exame físico são associados a OA, incluindo claudicação, intolerância ao exercício, atrofia muscular, edema articular, diminuição da amplitude de movimento, crepitação e dor na manipulação articular. Os sinais clínicos são variáveis dependendo de múltiplos fatores, como estágio da afecção e articulação afetada (INNES, 2012).

Abordagens terapêuticas atuam na prevenção ou retardo das alterações estruturais e funcionais da OA. Terapia multimodal conservativa baseia-se principalmente na redução da inflamação e da dor. Isso inclui administração a longo prazo de medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) e analgésicos, associados a modificação no estilo de vida do paciente, fisioterapia e manejo nutricional (HOUARD et al., 2013; MCALINDON et al., 2014; MEHLER et al., 2016). Há também promessas no uso de agentes nutracêuticos como glicosamina e condroitina (INNES, 2012; MEHLER et al., 2016).

Osteoartrite moderada pode ser tratada com uma variedade de cirurgias intra-articulares tais como debridamento ou micro fraturas por artroscopia. O objetivo é estimular a reparação da fibrocartilagem. O real benefício de tais cirurgias ainda é controverso. A intervenção cirúrgica, com a substituição parcial ou total da articulação é o método de tratamento de eleição na fase mais crônica da doença (grave) proporcionando alívio da sintomatologia, e consequentemente da dor (BIJLSMA et al., 2011; MCALINDON et al., 2014).

3.3 Células-tronco mesenquimais

A terapia celular e gênica tem se mostrado promissora como opção de tratamento em tecidos com deficiência na cicatrização, como o cartilaginoso. Há grande perspectiva de uso clínico desta moderna tecnologia, surgindo como alternativa para o tratamento de pacientes portadores de OA (CUCCHIARINI et al., 2016). Avanços em estudos médicos de regeneração têm sido representados em grande parte pelo interesse crescente no uso das células-tronco em terapia de doenças degenerativas ou de pobre resposta aos tratamentos atuais (SANTOS JUNIOR, 2010; VINATIERA; GUICHEUXA, 2016).

O objetivo principal na medicina regenerativa é substituir os tecidos lesados por um tecido o mais próximo ao original, visando assim a regeneração e não a reparação. Isso é possível por meio do direcionamento e ampliação do processo de reparo (SERAKINCI; KEITH, 2006). Esta otimização do reparo pode ser realizada pelo fornecimento de elementos celulares requeridos, dos fatores de proliferação e diferenciação celular, que podem garantir a geração de quantidade suficiente de células novas e das estruturas supramoleculares que providenciam a organização espacial plenamente funcional de novos tecidos gerados e sua integração sistêmica (VINATIERA; GUICHEUXA, 2016).

Células-tronco são um tipo de célula indiferenciada, sem função específica nos tecidos, com capacidade de multiplicação por longos períodos, mas que diante de estímulos específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais (MAJKA et al., 2005). Podem ser classificadas quanto ao seu potencial de diferenciação celular como:

- Totipotentes: Células que quando isoladas são capazes de diferenciar-se em todos os tecidos fetais, incluindo placenta e anexos embrionários. São as células embrionárias na fase de mórula, quando o embrião é composto de 16 a 32 células, que corresponde a 3-4 dias de vida;

- Pluripotentes: Células capazes de diferenciação em todos os tecidos de um indivíduo adulto, exceto nos anexos embrionários. São as células embrionárias na fase de blastocisto. São as únicas capazes de se diferenciarem “*in vitro*”, de modo inerente e espontâneo, em células das três linhagens germinativas. Apresentam alta capacidade de proliferação, morfologia típica, expressão de marcadores específicos e capacidade de formação de teratomas;

- Multipotentes: Possuem potencial de diferenciação mais restrito, limitado a apenas alguns tipos celulares. São as células-tronco adultas. São encontradas em estágios posteriores ao desenvolvimento fetal e que persistem ao nascimento (células da medula óssea (MO), do cordão umbilical e células tronco do tecido adiposo, endotelial, dentário, etc);

- Oligopotentes: diferenciação em poucas células de um mesmo folheto embrionário; e

- Unipotentes: capazes de gerar só um tipo de célula, responsáveis pela regeneração de tecidos particulares (Exemplo: células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, espermatogônicas no testículo) (MAJKA et al., 2005).

De modo geral, as células-tronco podem ser divididas em duas principais classes: embrionárias e adultas. Por razões éticas, o uso de células-tronco adultas tem sido mais frequente (WHITWORTH; BANKS, 2014). Friedenstein et al. (1966), descobriram que a medula óssea do indivíduo adulto possui, células-tronco endoteliais capazes de diferenciação em linhagens celulares de origem mesenquimal, além das células-tronco que dão origem a linhagens hematopoiéticas. Esse tipo celular é denominado células-tronco mesenquimais (CTMs).

Também conhecidas como células mesenquimais estromais, as CTMs, são de especial interesse na terapia celular por apresentarem maneira relativamente mais simples de serem coletadas e isoladas quando comparadas às demais, e pela facilidade de cultivo e alto potencial de expansão “*in vitro*”. Além disso, possuem a plasticidade de células multipotentes, com a capacidade de se diferenciarem em tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo, muscular, epitelial, células de ilhotas pancreáticas, hepatócitos e neurônios (VIEIRA et al., 2010; CAPLAN; CORREA, 2011; MANFerdini, 2013; VINATIERA; GUICHEUXA, 2016). Tais características de plasticidade sugerem que este tipo celular é o responsável pelo “*turnover*” e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009).

As CTMs em humanos são isoladas tipicamente a partir de medula óssea adulta e tecido adiposo. Também têm sido coletadas com sucesso a partir da placenta, sangue do cordão umbilical e do líquido amniótico; além de rim, pâncreas, fígado, pulmão, baço, tecido músculo esquelético, periósteo e sinóvia (ALIOTTA et al., 2005; KERN et al., 2006; BIEBACK et al., 2008; NEUPANE et al., 2008; VIEIRA et al., 2010; KISIEL et al., 2012; REICH et al., 2012; TAKEMITSU et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

As CTMs têm a capacidade de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento, além de secretarem grande variedade de quimiocinas. Permitindo assim, sua interação com as células residentes e posteriormente indução das mesmas, por mecanismo parácrino, a se diferenciarem em linhagens celulares distintas (TAKAHASHI et al., 2007). A resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual são moduladas pela atuação dessas moléculas (HARMAN, 2016).

As CTMs são a linhagem de células-tronco somáticas que apresentam maior plasticidade, tendo a capacidade de originar tecidos mesodermis e não mesodermis (MEIRELLES et al., 2008). Porém, ainda há muita dúvida na compreensão desses mecanismos de plasticidade. Duas teorias são questionadas. Acreditava-se que a transdiferenciação era responsável pela capacidade das CTMs darem origem a linhagens celulares diferentes. Baseado nesta teoria inicial, as CTMs teriam a capacidade de alterar sua expressão gênica para a de uma linhagem celular completamente diferente, originando tipos celulares distintos. A transdiferenciação pode ocorrer de forma indireta, quando a CTMs desdiferenciam-se em célula-tronco

mais primitiva e posteriormente, rediferenciar-se em outro tipo celular, ou de forma direta, quando a célula altera seu citoesqueleto e sua síntese proteica para rediferenciar-se em outro tipo celular específico (VIEIRA et al., 2010; CAPLAN; CORREA, 2011). Outro mecanismo proposto é que a diferenciação celular pode ocorrer por fusão. Segundo essa teoria, as CTMs teriam a capacidade de fusionar-se a uma célula adulta-alvo, assumindo seu padrão de expressão gênico. Este mecanismo ocorre principalmente em hepatócitos e células musculares esqueléticas (MEIRELLES et al., 2006).

4. Resumo da metodologia utilizada

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)¹ da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Câmpus* de Jaboticabal, sob Protocolo nº 7510/15.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados junto ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV / UNESP - Jaboticabal. A manipulação, processamento e cultivo das células-tronco mesenquimais foi realizado pelo Laboratório BIOCELL² – Brasília – DF. Os exames radiográficos foram realizados no Setor de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV / UNESP - Jaboticabal. As análises microscópicas foram realizadas no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade de Brasília – UnB - DF.

4.1 Animais

Foram utilizados 30 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas, da linhagem Nova Zelândia Branco, com 12 meses de idade e peso corporal de 4,5 a 5 kg, provenientes de cunicultura regulamentada UNESP / FMVZ- Botucatu - SP.

Os animais foram avaliados inicialmente por meio de exame físico geral e ortopédico, sendo todos clinicamente saudáveis e com deambulação normal. Os coelhos foram acomodados em gaiolas individuais, mantidos com ração sólida própria para a espécie e água à vontade, conforme as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal)³.

Os animais foram avaliados por meio de exames ortopédicos e radiográficos da articulação coxofemoral de ambos os membros, para descartar a presença de alterações articulares e registrar as características da articulação antes da intervenção cirúrgica.

¹ Comissão de Ética no Uso de Animais.

² Laboratório Biocell. Brasília, DF, Brasil.

³ Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA- Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC. Esplanada Dos Ministérios. Brasília, DF, Brasil.

Os 30 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (tratamento e controle), com 15 animais em cada. Foi realizada indução de osteoartrite (OA) experimental na articulação coxofemoral (ACF) direita de todos os animais. Em ambos os grupos, o tratamento de escolha foi realizado após sete semanas (49 dias) da indução experimental de OA com solução de colagenase 2% (*Clostridium histolyticum*, tipo II)⁴.

- Grupo 1 – (Tratamento Células-tronco - CT), cada animal foi submetido ao tratamento com aplicação intra-articular de células-tronco mesenquimais autólogas na articulação coxofemoral direita.
- Grupo 2 – (Controle - GC), cada animal foi submetido à aplicação intra-articular de solução salina estéril (mesmo volume da solução de CTM's utilizada no Grupo 1) na articulação coxofemoral direita..

Os animais dos dois grupos foram distribuídos aleatoriamente em três subgrupos, com cinco animais cada, os quais diferenciaram-se quanto ao período de acompanhamento e avaliação (após 30, 60 e 90 dias da aplicação intra-articular de CTMs ou solução salina estéril). Nestes momentos, foram realizados exames radiográficos e coleta da articulação coxofemoral direita para análise histopatológica (Figura 1).

⁴ Colagenase *Clostridium histolyticum*, type II - Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, U.S.A.

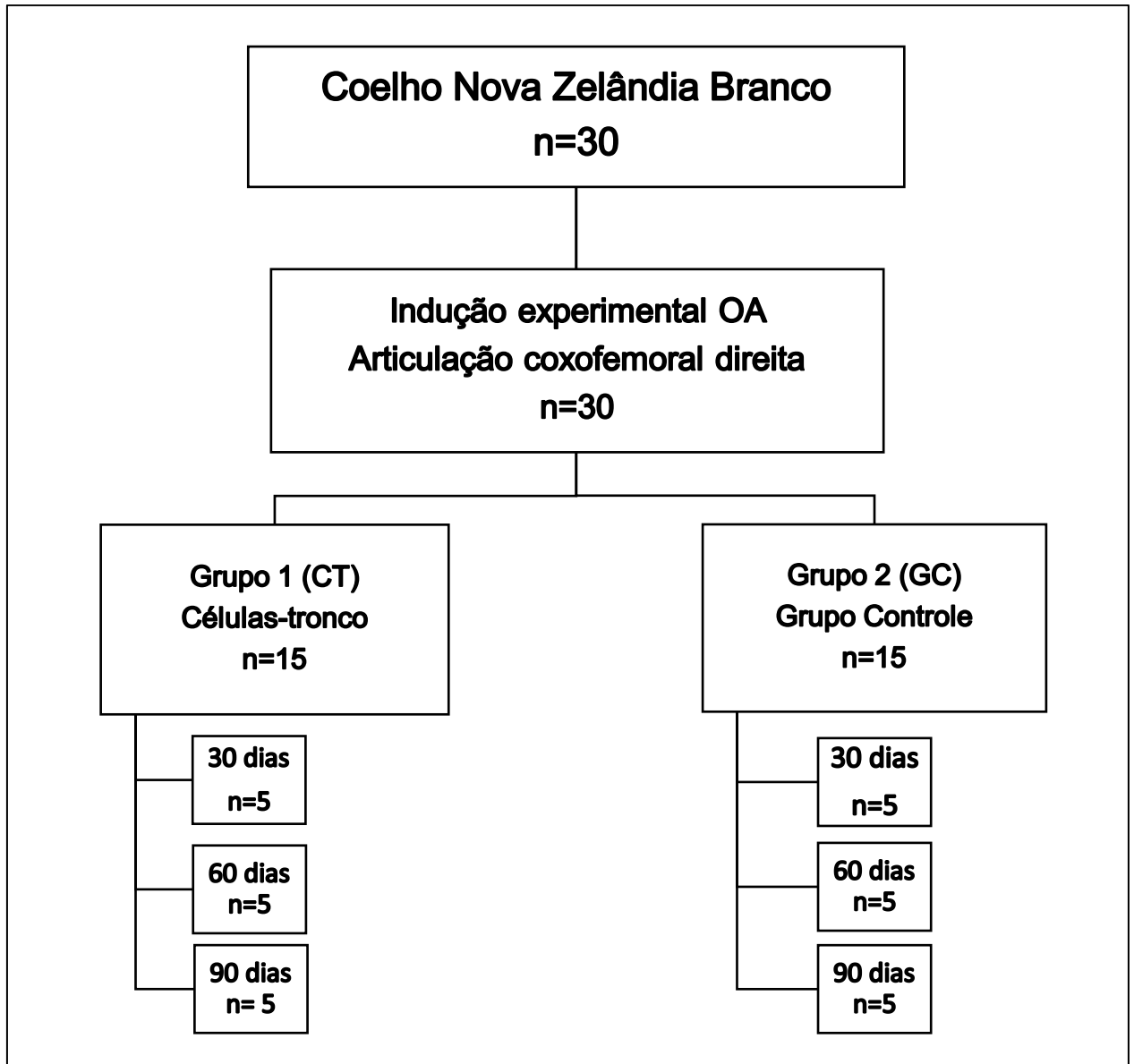


Figura 1. Representação esquemática do delineamento metodológico do projeto. Número de amostras em cada etapa é representado pela letra “n”. Total de 30 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) foram submetidos a indução de osteoartrite experimental na articulação coxofemoral direita. Animais foram divididos em dois Grupos com 15 animais cada. Grupo 1 (CT - Célula-tronco) e Grupo 2 (GC - Controle). Cada Grupo foi dividido em três subgrupos para avaliações pós tratamento em períodos diferentes (30, 60 e 90 dias).

4. 2 Anestesia

Todos os 30 animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. Cada animal foi submetido a um total de quatro anestésias (geral inalatória), para a realização dos seguintes procedimentos cirúrgicos: coleta de tecido adiposo (anestesia 1); duas induções químicas (dias 1 e 4) de osteoartrite (anestésias 2 e 3) e tratamento correspondente ao grupo (anestesia 4) (Figura 2).

Como terapia antimicrobiana, aproximadamente 30 minutos antes dos procedimentos cirúrgicos, foi administrada enrofloxacin⁵ (5 mg/kg), por via subcutânea em dose única. A medicação pré-anestésica constituiu na administração por via intramuscular (IM) de midazolam⁶ (2 mg/kg) associado à morfina⁷ (2 mg/kg) e cetamina (25 mg/kg)⁸. Após tricotomia da região auricular e introdução de cateter 24G⁹ na veia auricular para acesso venoso, foi realizada fluidoterapia com solução de ringer¹⁰ (3 mL/kg/hora). A indução e manutenção anestésica dos animais foi realizada com isoflurano¹¹ diluído em 100% de oxigênio sob ventilação espontânea, por meio de máscara facial completamente vedada, sem intubação endotraqueal. O plano anestésico foi monitorado por meio da aferição da frequência respiratória, frequência cardíaca e saturação parcial de oxigênio.

⁵ Chemitril injetável 2,5%® - Chemitec Agroveterinária Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

⁶ Dormonid injetável® 5 mg/5ml. Laboratório Roche. São Paulo, SP, Brasil.

⁷ Dimorf injetável® 1mg/ml. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁸ Quetamina injetável 10%®. Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brasil.

⁹ Cateter SAFELET® 24G – NIPRO – Miami, Florida, EUA.

¹⁰ Ringer. Eurofarma. Ribeirão Preto, SP, Brasil.

¹¹ Isoforine® 100%. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA. Itapira, SP, Brasil.

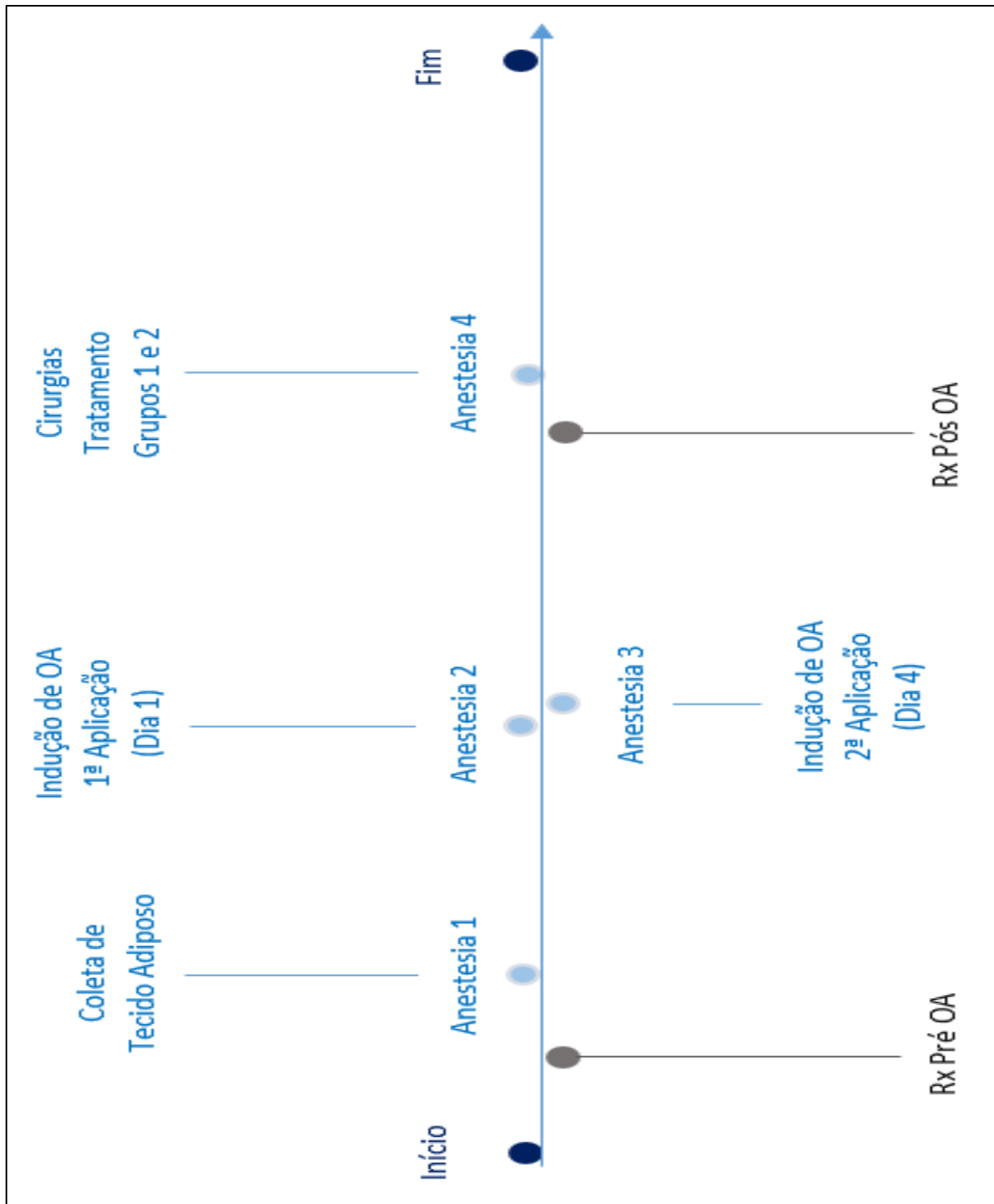


Figura 2. Representação esquemática da sequência cronológica dos procedimentos anestésicos e cirúrgicos realizados na metodologia do presente estudo. Total de 30 coelhos foram submetidos a exames radiográficos (Rx) pré indução de osteoartrite (OA). Anestesia 1 – coleta de tecido adiposo. Anestesia 2 – Primeira indução de OA (Dia 1). Anestesia 3 – Segunda indução de OA (quatro dias após primeira indução de OA). Rx pós indução de OA sete semanas após Anestesia 3. Anestesia 4 – Procedimentos cirúrgicos para tratamento dos Grupos 1 e 2.

4. 3 Coleta de tecido adiposo

As células-tronco mesenquimais autólogas foram cultivadas e fornecidas pelo Laboratório BIOCELL (Brasília – DF)² a partir da coleta de tecido adiposo de cada animal. Os animais foram submetidos ao protocolo de anestesia geral inalatória (citado anteriormente). Após indução anestésica foi realizada ampla tricotomia da região cervical e torácica dorsais, seguida de antissepsia com clorexidine degermante 2%¹² e clorexidine alcoólico 0,5%¹³. Foi realizada incisão de aproximadamente dois centímetros na pele da linha média dorsal da região interescapular. Com o auxílio de material cirúrgico estéril foi colhido aproximadamente 20 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa interescapular. O tecido adiposo foi acondicionado em tubo de 50 mL contendo meio de lavagem estéril por dois minutos. Imediatamente após esse tempo o tecido adiposo foi retirado do primeiro tubo de lavagem e acondicionado no segundo tubo de lavagem por três minutos, em seguida foi armazenado no tubo contendo meio de transporte. O tubo foi identificado com o nome do animal e acondicionado na geladeira até o momento do envio do material. O material foi encaminhado devidamente refrigerado em temperatura de aproximadamente 2°C para o laboratório BIOCELL (Brasília-DF)².

Ao término da recuperação anestésica, os animais foram mantidos em suas gaiolas, com livre movimentação. Imediatamente após o procedimento cirúrgico e durante dois dias consecutivos, todos os animais receberam dipirona¹⁴ na dose de 10 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas.

4. 4 Procedimento Laboratorial

O processamento das células-tronco mesenquimais de cada animal no Laboratório BIOCELL² iniciou-se a partir da lavagem do tecido adiposo em solução tampão fosfato salina (*PBS - Phosphate buffered saline*)¹⁵ para retirada de debris

¹² RIOHEX® 2% - Solução degermante - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

¹³ RIOHEX® 0,5% - Solução alcoólica - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

¹⁴ Dipirona 50% - Laboratório Ibaso Ltda. Porto Alegre, RS, Brasil.

¹⁵ Tampão Fosfato (D-PBS) – Cultilab Materiais para Cultura de Células. Campinas, SP, Brasil.

celulares e excesso de sangue. Em seguida, o tecido foi fragmentado em partículas pequenas e colocado em contato com a solução de collagenase e hialuronidase para realização de digestão enzimática. Posteriormente a mistura foi centrifugada por 15 minutos e o “*pellet*” celular foi ressuspendido. O mesmo procedimento foi repetido quatro vezes. Foi realizado o método de exclusão “*trypan blue*”. Esse processo constituiu a preparação do SVF (“*stromal vascular fraction*”). Após a obtenção das células-tronco, as mesmas foram armazenadas em garrafas de cultivo contendo meio TCM 199¹⁶. As garrafas de cultivo foram acondicionadas em estufas de cultivo celular à temperatura de 39,5 °C e 5 % de CO₂.

Após aproximadamente sete dias de cultivo foi realizado o repique celular. Parte das células permaneceram na garrafa de cultivo e cerca de 2 milhões de células foram acondicionadas em seringas de 1,0 mL¹⁷ e encaminhadas para aplicação. Uma parte das células que permaneceram no laboratório foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo e outra parte foi congelada e permanece em nitrogênio líquido. Aproximadamente 2 milhões de células-tronco foram fixadas em solução de formaldeído e encaminhadas para o Laboratório MOFA Global (Estados Unidos)¹⁸ para realização de caracterização celular.

4. 5 Preparo de solução de collagenase e indução da osteoartrite experimental

A metodologia de escolha para indução de osteoartrite (OA) foi indução química, a partir da aplicação intra-articular de solução de collagenase a 2% (*Clostridium histolyticum*, tipo II)⁴ (KIKUCHI et al. 1998). A indução de osteoartrite química foi realizada em dois momentos, dias 1 e 4, respectivamente (Figura 2).

A solução indutora de OA foi preparada a partir da diluição de 2 mg de collagenase (*Clostridium histolyticum*, tipo II)¹⁵ em 1,0 mL de solução salina estéril¹⁹. A solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm, conforme metodologia adaptada de Kikuchi et al. (1998). Em seguida foi armazenada em criotubo estéril até a aplicação intra-articular. O preparo da solução foi realizado em capela de fluxo laminar.

¹⁶ Solução contendo fosfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio, glicose, antioxidantes e soro halógeno. Biocell – Brasília, DF, Brasil.

¹⁷ Seringa de insulina 1ml com agulha 13x0,45mm - Descarpac do Brasil. São Paulo, SP, Brasil.

¹⁸ MOFA Global – Verona, Wisconsin, EUA.

¹⁹ Solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% - Eurofarma Brasil - Ribeirão Preto, SP, Brasil

Todos os 30 animais foram submetidos a procedimento anestésico (citado anteriormente) para abordagem a articulação coxofemoral direita e primeira aplicação intra-articular de solução de colagenase 2%⁴ (dia 1).

A preparação para o procedimento cirúrgico foi realizada de maneira rotineira, realizando-se tricotomia ampla no membro pélvico direito, estendendo-se da linha média dorsal até a região dos tarsos. Após o posicionamento do animal em decúbito lateral esquerdo, procedeu-se a antisepsia utilizando clorexidine 2%¹² e clorexidine alcoólico 0,5%¹³, o campo cirúrgico foi preparado para intervenção asséptica na articulação coxofemoral direita.

A abordagem cirúrgica à articulação coxofemoral direita, compreendeu na incisão cutânea de dois a três cm de comprimento, iniciando-se na região cranial do trocânter maior e progredindo em direção à crista ilíaca. Nessa área foram abordados os músculos bíceps femoral, glúteo médio e o tensor da fáscia lata, os quais foram divulsionados, em seguida os músculos glúteos médio e profundo foram afastados, expondo a cápsula articular. Em seguida realizou-se aplicação intra-articular com seringa de 1,0 mL e agulha 13x 0,46 de 1,0 mL¹⁷ da solução de colagenase⁴ (*Clostridium histolyticum*, tipo II) de forma estéril. A aproximação da musculatura foi realizada com fio de poliglactina 910 3-0²⁰ em pontos simples contínuos e a pele foi suturada em padrão simples interrompido com fio nylon 4-0²¹.

Quatro dias após a primeira aplicação de solução de colagenase 2% foi realizada segunda abordagem (dia 4) à articulação coxofemoral direita de todos os 30 animais. O protocolo anestésico, preparo de campo cirúrgico, antisepsia e procedimento cirúrgico foram semelhantes à primeira aplicação intra-articular (dia 1) de solução indutora de osteoartrite.

Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos e durante dez dias consecutivos a primeira indução de osteoartrite, todos os animais receberam cloridrato de tramadol²² na dose de 4 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas e dipirona¹⁴ na dose de 10 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas. Foi realizada limpeza diária da ferida cirúrgica durante sete dias consecutivos.

²⁰ Vicryl – Ethicon Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio. São Paulo, SP, Brasil.

²¹ Nylon Monofilamentado - Shalon Suturas. Goiânia, GO, Brasil

²² Cloridrato de Tramadol 50 mg/mL ® Hipolabor. Sabará, MG, Brasil.

4. 6 Implantação Cirúrgica

Sete semanas (49 dias) após a segunda aplicação intra-articular (dia 4) de solução indutora de osteoartrite (colagenase 2%), foram realizadas avaliações radiográficas das articulações coxofemorais (ACF) direita de todos os animais. Em seguida, os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para abordagem a ACF direita e aplicação intra-articular de célula-tronco mesenquimal autóloga (animais do Grupo 1 – CT) e aplicação intra-articular de solução salina estéril¹⁹ (animais do Grupo 2 – GC).

Protocolo anestésico, preparo de campo cirúrgico, antissepsia local e abordagem à articulação coxofemoral foram semelhantes aos procedimentos realizados para indução de osteoartrite (citados anteriormente). Os animais do Grupo 1 (Célula-tronco – CT) foram submetidos ao transplante (aplicação intra-articular) de 1,0 mL de solução de células-tronco mesenquimais autólogas preparadas no laboratório BIOCELL². As células-tronco autólogas 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 ressuspensionado com 1,0 mL de solução salina 0,9% estéril¹⁹ e acondicionado em uma seringa 1,0 mL¹⁷, em seguida realizou-se a aplicação intra-articular. Nos animais do Grupo 2 (Grupo Controle – GC) foi realizada aplicação intra-articular de 1,0 mL de solução salina estéril¹⁹.

A aproximação da musculatura foi realizada com fio de poliglactina 910 3-0¹⁶ em pontos simples contínuos e a pele foi suturada em padrão simples interrompido com fio nylon 4-0²¹ (Figura 3).

Semelhante aos procedimentos cirúrgicos anteriores, imediatamente após a cirurgia e durante sete dias consecutivos, todos os animais receberam cloridrato de tramadol¹⁸ na dose de 4 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas e dipirona¹⁴ na dose de 10 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas. Foi realizada limpeza diária da ferida cirúrgica durante sete dias consecutivos.

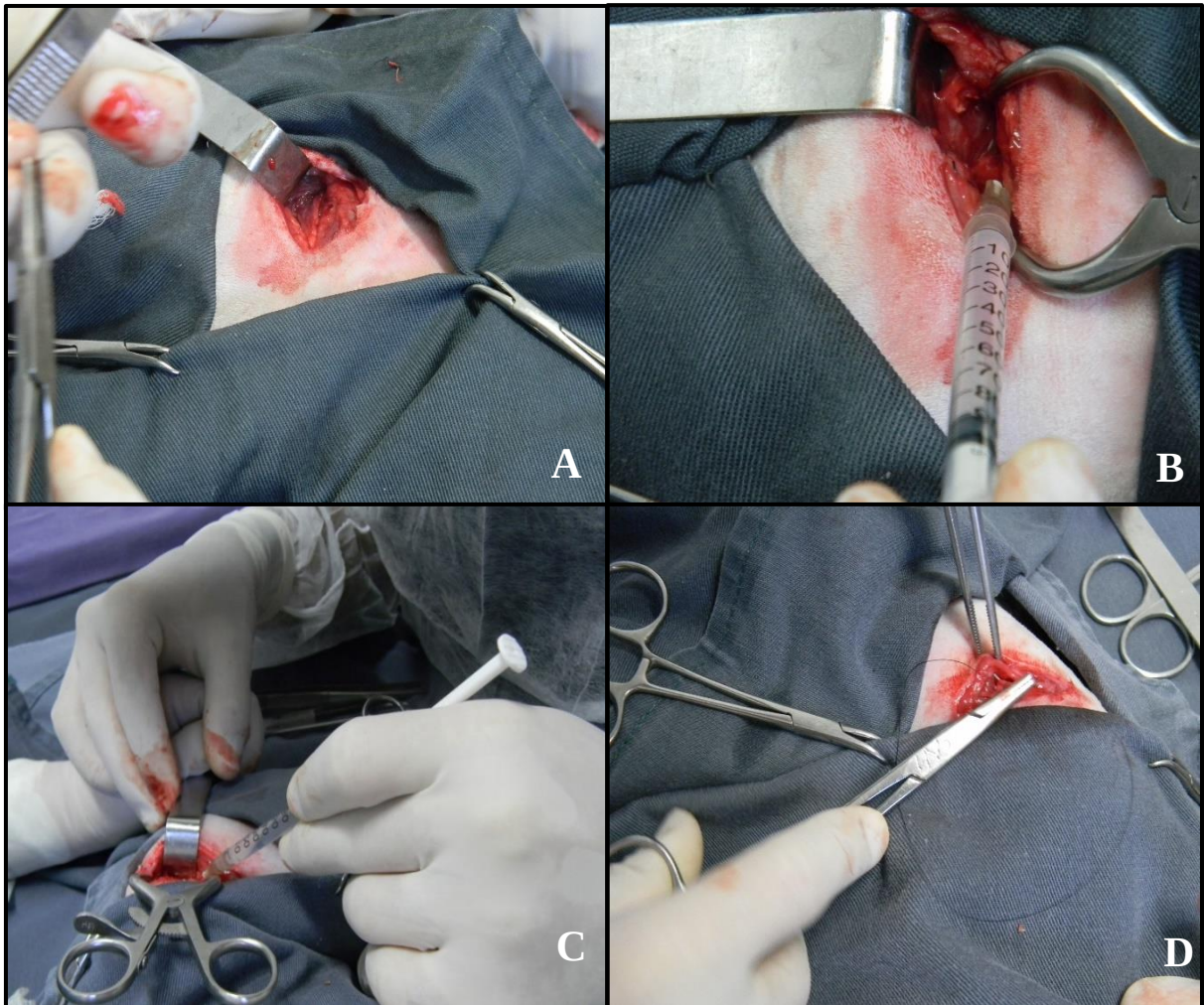


Figura 3. Imagens fotográficas da abordagem à articulação coxofemoral (ACF) direita de coelhos para aplicação intra-articular de tratamento pré-estabelecido de acordo com os Grupos 1 (Células-tronco) e 2 (Controle). A: Acesso cirúrgico à ACF direita de coelho e exposição da cápsula articular. B: Exposição da cápsula articular com auxílio de afastadores cirúrgicos e posterior aplicação intra-articular de 1,0 mL de solução com tratamento de forma estéril. C: Aplicação de 1,0 mL de solução após abordagem à ACF direita de coelho. D: Aproximação da musculatura após acesso cirúrgico à ACF direita e aplicação intra-articular de tratamento; sutura no padrão simples contínuo com fio de poliglactina 910, 3-0.

4. 7 Avaliação radiográfica

Exames radiográficos foram realizados antes dos procedimentos cirúrgicos (momento 1), sete semanas (49 dias) após a indução de osteoartrite (momento 2), 30 (momento 3), 60 (momento 4) e 90 dias (momento 5) após procedimento cirúrgico

para tratamento (Figura 4). As radiografias foram obtidas na projeção ventrodorsal (VD) das articulações coxofemorais (ACF).

Realizou-se a avaliação “duplo cego” das imagens radiográficas por três avaliadores distintos (dois radiologistas e um cirurgião ortopédico), os quais desconheciam o tempo de realização do exame e o grupo experimental de cada animal. Para análise foram atribuídos escores radiográficos de acordo com a presença e o grau de osteoartrite (adaptado de Kellgren; Lawrence ,1957; Black et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Escala de avaliação radiográfica de osteoartrite (adaptado de Kellgren; Lawrence, 1957); Black et al., 2007).

Escore	Avaliação
Grau 0	Articulação Normal;
Grau 1	Evidência radiográfica de instabilidade (sem alterações degenerativas);
Grau 2	Alterações degenerativas discretas (osteófitos ocasionais);
Grau 3	Alterações degenerativas moderadas (esclerose subcondral, osteófitos);
Grau 4	Alterações degenerativas graves (grandes osteófitos, esclerose subcondral grave, remodelação óssea).

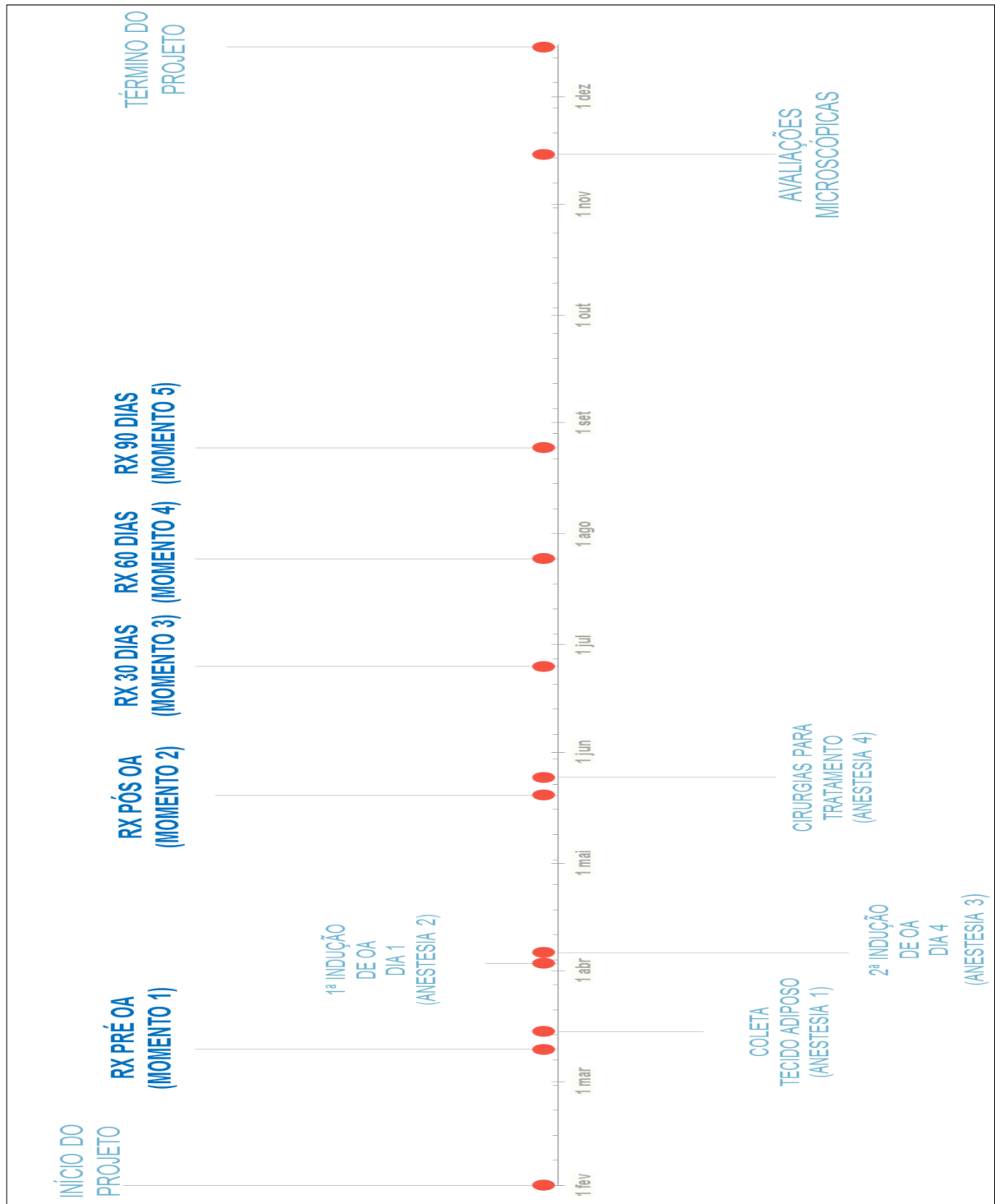


Figura 4. Representação esquemática da sequência cronológica da metodologia do projeto de pesquisa com ênfase nos exames radiográficos (Rx) da articulação coxofemoral de coelhos. Momento 1 - representa a avaliação radiográfica pré indução de osteoartrite (OA); Momento 2 - avaliação (Rx) realizada sete semanas após indução de OA; Momento 3 - Rx realizados 30 dias após tratamento cirúrgico (Anestesia 4) conforme o Grupo. Momento 4 - Rx realizados após 60 dias; Momento 5 - Rx realizados após 90 dias de tratamento.

4.8 Análise Microscópica

A eutanásia dos animais foi realizada 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico de tratamento. Em cada período, dez animais (cinco de cada grupo) foram submetidos à eutanásia. Realizou-se primeiramente a sedação com cloridrato de xilazina²³ (2,0 mg/kg) por via intramuscular. Após tricotomia da região auricular e introdução de cateter 24G⁸ na veia auricular foi realizada infusão intravenosa de propofol²⁴ suficiente para parada respiratória e, em seguida, infusão intravenosa de cloreto de potássio²⁵ suficiente para parada cardíaca.

Imediatamente após a eutanásia, os coelhos foram submetidos à necropsia, onde as articulações coxofemorais direitas foram coletadas (acetábulo, cabeça do fêmur e cápsula articular) (Figura 5).

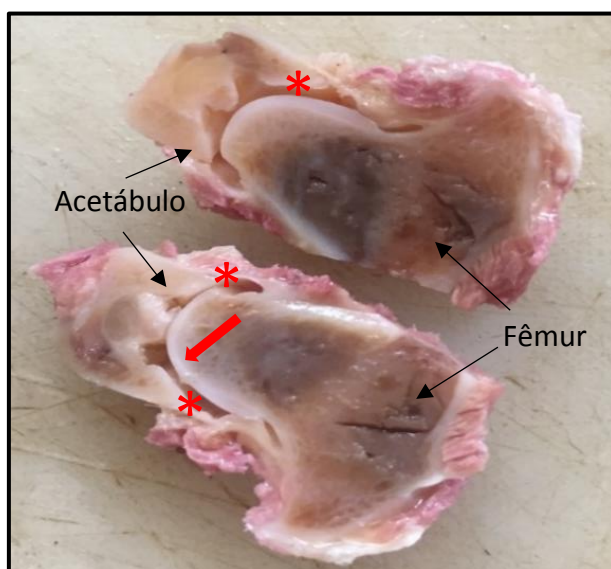


Figura 5. Imagem fotográfica de articulação coxofemoral (corte longitudinal) de coelho submetido a indução experimental de osteoartrite e posterior tratamento com aplicação de células-tronco mesenquimais autólogas (Grupo 1 – CT). Seta vermelha indicando cartilagem articular hialina. Asteriscos (*) indicando cápsula articular. Acetábulo e fêmur identificados na imagem.

As peças foram fixadas em formalina tamponada 10% durante 48 horas e posteriormente mantidas em álcool 70%. A cartilagem e o osso foram descalcificados por líquido descalcificador (1,0 mL de ácido nítrico concentrado, 99 mL de água

²³ Xilazin® Syntec do Brasil LTDA- Horlândia, SP, Brasil.

²⁴ Propovan®. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA. Itapira, SP, Brasil.

²⁵ Solução de cloreto de potássio 19,1% - - Indústria Farmacêutica Equiplex, Goiânia, GO, Brasil.

destilada) por 24 horas. Seções com espessura de 7 μ m foram cortadas ao longo do eixo longitudinal dos blocos, e uma secção do nível médio foi utilizado para a análise. As secções foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E) (Figura 6).

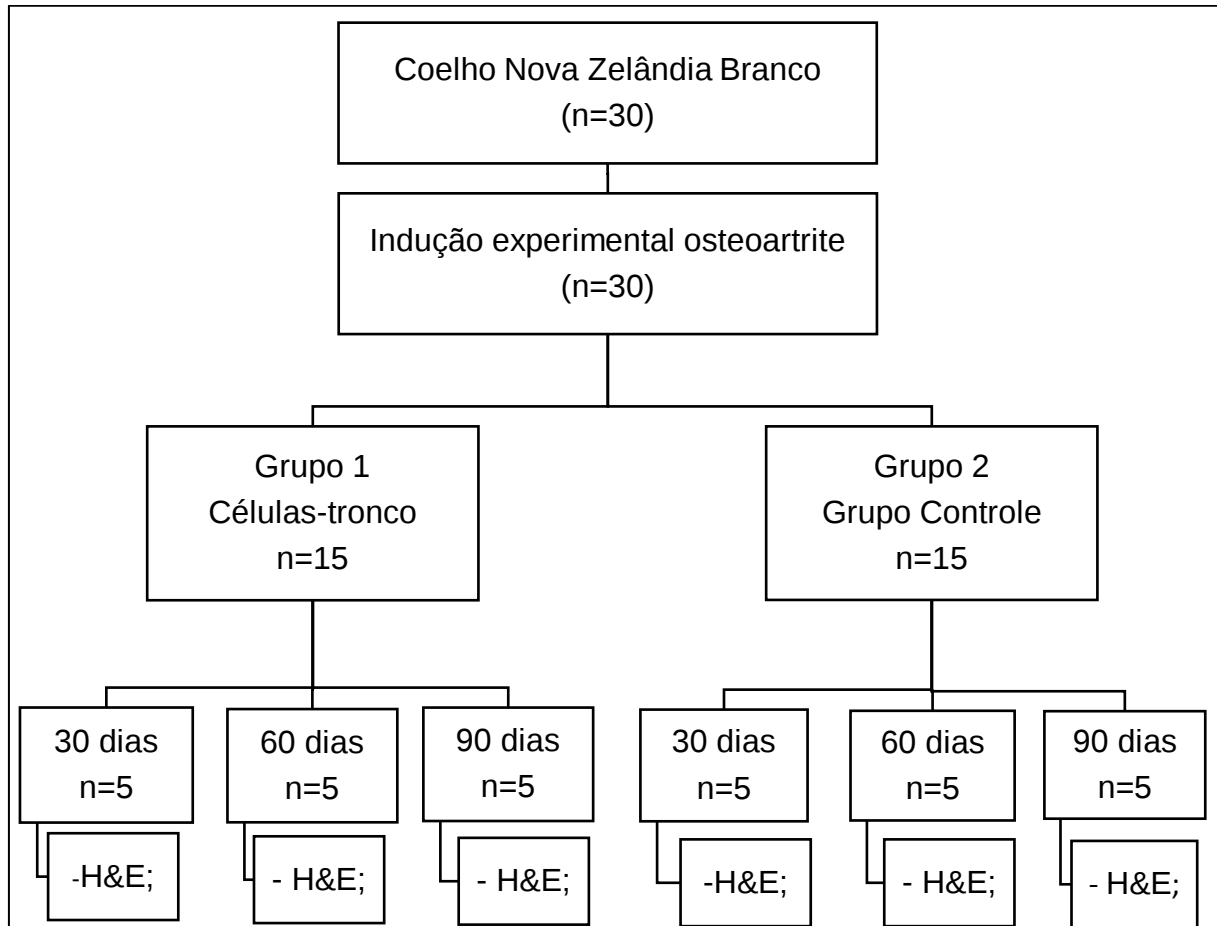


Figura 6. Representação esquemática do delineamento metodológico do projeto baseado na avaliação histopatológica. Número de amostras em cada etapa é representado pela letra “n”. Total de 30 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) foram submetidos a indução de osteoartrite experimental na articulação coxofemoral direita. Animais foram divididos em dois Grupos com 15 animais cada. Grupo 1 (CT - Célula-tronco) e Grupo 2 (GC - Controle). Cada Grupo foi dividido em três subgrupos para avaliações radiográficas e histopatológicas pós tratamento em períodos diferentes (30, 60 e 90 dias). Em todos os 30 animais foi realizada avaliação histopatológica a partir da coloração com Hematoxilina e eosina (H&E).

As avaliações microscópicas foram quantificadas em escores de 0 a 3, de acordo com a pontuação da escala ICRS 1 (Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem - *International Cartilage Repair Society*), frequentemente usada para avaliações histopatológicas na medicina humana. As características microscópicas

avaliadas foram: superfície articular, matriz extracelular, distribuição celular, viabilidade celular, osso subcondral e cartilagem calcificada (Tabela 2) (HOEMANN, et al., 2011). Os escores de cada parâmetro foram somados após avaliação e pontuação (0 a 3), sendo 0 o valor mínimo (osteoartrite grave) e 18 o valor máximo (cartilagem articular normal).

Tabela 2. Escala histológica ICRS 1 (Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem - *International Cartilage Repair Society*).

	Parâmetro	Escore
<i>Superfície</i>		
I	Contínua	3
	Descontínua	0
<i>Matriz extracelular</i>		
II	Hialina	3
	Mista	2
	Fibrocartilagem	1
	Tecido fibroso	0
<i>Distribuição celular</i>		
III	Colunar	3
	Mista	2
	Clusters	1
	Desorganizada	0
<i>Viabilidade celular</i>		
IV	Predominantemente viável	3
	Parcialmente viável	1
	< 10% viáveis	0
<i>Osso subcondral</i>		
V	Normal	3
	Remodelação	2
	Necrose/granulação	1
	Fratura/calco	0
<i>Cartilagem calcificada</i>		
VI	Normal	3
	Mal localizada	0

4. Análise Estatística

As variáveis (escore de avaliação radiográfica e escore de avaliação histopatológica) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico) (Figura 7). Na avaliação radiográfica, foi avaliada média entre os grupos (2 níveis) e entre os grupos dentro dos tempos (5 níveis). Na análise dos dados histopatológicos foi avaliada média entre os grupos (2 níveis) e entre os grupos dentro dos parâmetros (6 níveis). Para a análise foi utilizado o procedimento NPAR1WAY do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary. NC, USA).

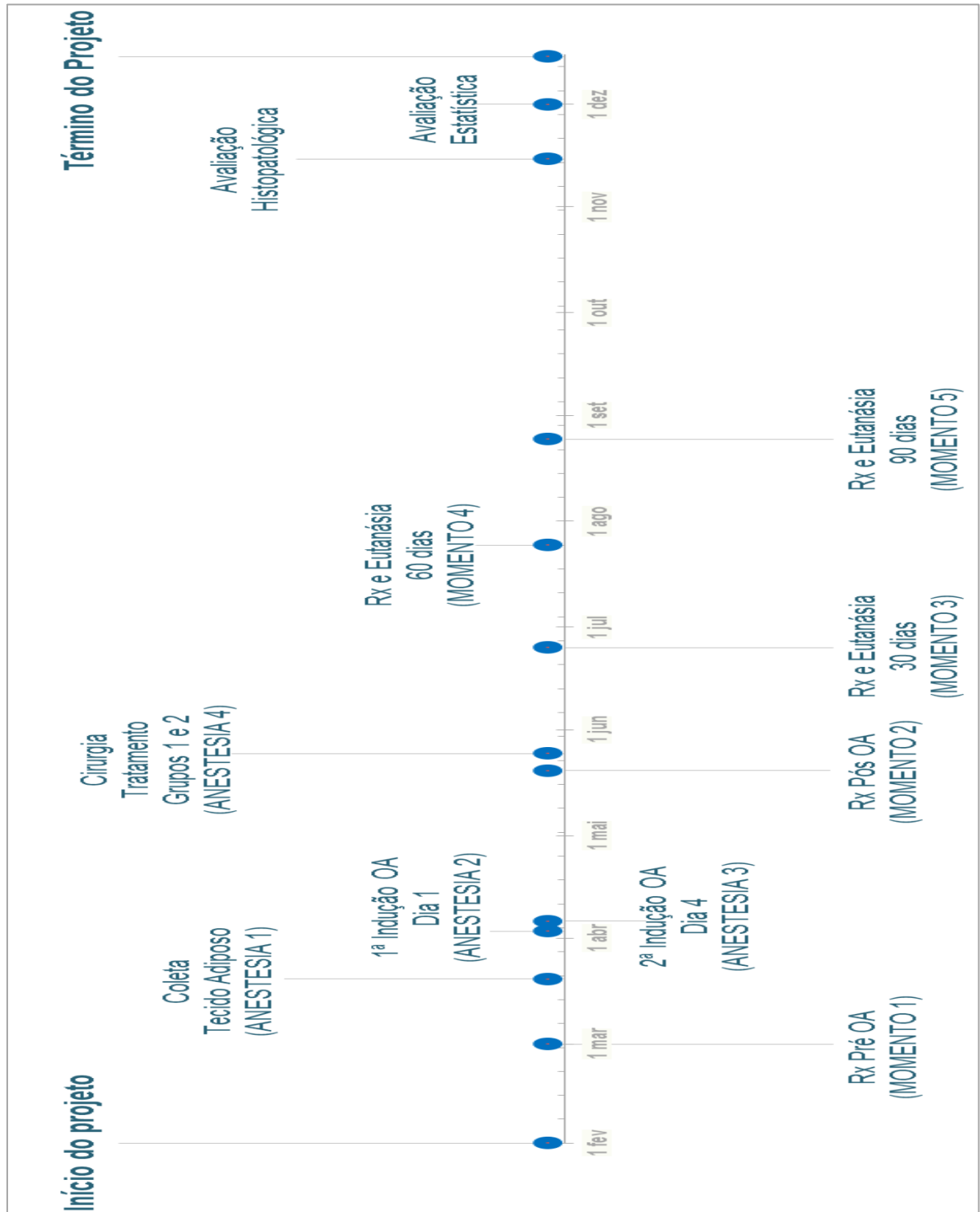


Figura 7. Representação esquemática da sequência cronológica de todas as etapas da metodologia do presente estudo. Total de 30 coelhos foram submetidos a exames radiográficos (Rx) (Momentos 1, 2, 3, 4 e 5), coleta de tecido adiposo (Anestesia 1), duas induções de osteoartrite experimental (Anestесias 2 e 3), procedimentos cirúrgicos para tratamento dos Grupos 1 e 2 (Anestesia 4). Avaliações histopatológica e estatística foram realizadas após eutanásia dos animais.

REFERÊNCIAS²⁶

ALIOTTA, J.M.; PASSERO, M.; MEHARG, J.; KLINGER, J.; DOONER, M. S.; PIMENTEL, J.; QUESENBERRY, P. J. Stem cells and pulmonary metamorphosis: new concepts in repair and regeneration. **Journal of Cell Physiology**. v. 204, n. 3, p. 725-741, 2005.

BIEBACK, K.; KERN, S.; KOCAOMER, A.; FERLIK, K.; BUGERT, P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: Bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. **Bio-Medical Materials and Engineering**. v. 18, n. 1, p. 71-76, 2008.

BIJLSMA, J. W.; BERENBAUM, F.; LAFEVER, F. P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. **The Lancet**. v.377, n. 9783, p. 2115–26, 2011.

BLACK, L.; GAYNOR, J.; GAHRING, D.; ADAM, C. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. **Veterinary Therapeutics**. v. 8, n. 4, p. 272–84, 2007.

CAPLAN, A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal Pathology**. v. 217, n. 2, p. 318-324, 2009.

CAPLAN, A.; CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. **Stem Cell**. v. 9, n. 1, p. 11-15, 2011.

CUCCHIARINI, M.; GIROLAMO, L.; FILARDO, G.; OLIVEIRA, J. M.; ORTH, P.; PAPE, D.; REBOUL, P. Basic science of osteoarthritis. **Journal of Experimental Orthopaedics**. v. 3, n. 22, 2016.

CUERVO, B.; RUBIO, M.; SOPENA, J.; DOMINGUEZ, J. M.; VILAR, J.; MORALES, M.; CUGAT, R.; CARRILLO, J. M. Hip Osteoarthritis in Dogs: A Randomized Study Using Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Plasma Rich in Growth Factors. **International Journal Molecular Science**. v.15, n. 8, p. 13437-13460, 2014.

EGLOFF, C.; HUGLE, T.; VALDERRABANO, V. Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. **Swiss Medical. Weekly**. v. 142, n. 35, 2012.

²⁶ Normas ABNT NBR 10520/2002

FITZPATRICK, N.; TERHEIJDEN, C. V.; SMITH, T. J. Osteochondral autograft transfer for treatment of osteochondritis dissecans of the caudolateral humeral head in dogs. **Veterinary Surgery**. v. 39, n. 8, p. 925-935, 2010.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Development**. v.6, n. 3, p. 381–90, 1966.

HARMAN, R.; CARLSON, K.; GAYNOR, J.; GUSTAFSON, S.; DHUPA, S.; CLEMENT, K.; HOELZLER, M.; MCCARTHY, T.; SCHWARTZ, P.; ADAMS C. A Prospective, Randomized, Masked, and Placebo-Controlled Efficacy Study of Intraarticular Allogeneic Adipose Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs. **Frontier Veterinary Science**. v. 3, n. 81, 2016.

HOEMANN, C.; KANDEL, R.; ROBERTS, S.; SARIS, B. F.; CREEMERS, L.; MAINIL-VARLET, P.; MÉTHOT, S.; HOLLANDER, A. P.; BUSCHMANN, M. D. International Cartilage Repair Society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. **Cartilage**. v. 2, p. 153-172, 2011.

HOUARD, X.; GOLDRING, M. B.; BERENBAUM, F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation. Osteoarthritis current rheumatology reports. v. 15, n. 375, 2013.

INNES, J. F. Arthritis. In: TOBIAS, K. M.; JOHNSTON S. A. (Eds.). **Veterinary Surgery: small animal**. 1. ed. St Louis: Elsevier, 2012. vol. 1, p. 1078-1111.

IWAMOTO, M; OHTA, Y.; LARMOUR, C.; ENOMOTO-IWAMOTO, M. Towards regeneration of articular cartilage. **Birth Defects Research Embryo Today**. v. 99, n. 3, p. 192-202, 2014.

KALSON, N. S.; GIKAS, P. D.; BRIGGS, T. W. R. Current strategies for knee cartilage repair. **International Journal of Clinical Practice**, v. 64, n. 10, p. 1444-1452, 2010.

KELLGREN, J. H.; LAWRENCE, J. S. Radiological Assessment of Osteoarthrosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**. n. 16, n. 4, p. 494-502, 1957.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**. v. 24, n. 5, 1294–1301, 2006.

KHAN, I. M.; FRANCIS, L.; THEOBALD, P. S.; PERNI, S.; YOUNG, R. D.; PROKOPOVICH, P.; CONLAN, R. S.; ARCHER, C. W. In vitro growth factor-induced bioengineering of mature articular cartilage. **Biomaterials**. v. 34, n. 5, p. 1478-1487, 2013.

KIKUCHI, T.; SAKUTA, T.; YAMAGUCHI, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 6, n. 3, p. 177-186, 1998.

KISIEL, A. H.; MCDUFFEE, L. A.; MASAUD, E.; BAILEY, T. R.; ESPARZA GONZALEZ, B. P.; NINO-FONG, R. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 8, p. 1305–1317, 2012.

KUYINU, E. L.; NARAYANAN, G.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**. v. 11, n. 19, 2016.

MAJKA, M.; KUCIA, M.; RATAJCZAK, M. Z. Stem cell biology - a never ending quest for understanding. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p.353-358, 2005.

MANFERDINI, C.; MAUMUS, C.; GABUSI E.; PIACENTINI, A.; FILARDO, G.; PEYRAFITTE, J. A.; JORGENSEN, C.; BOURIN, P.; FLEURY-CAPPELLESO, S.; FACCHINI, A.; NOËL, D.; LISIGNOLI, G. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. **Arthritis and Rheumatism**. v. 65, n. 5, p. 1271-1281, 2013.

MARTIN-HERNANDEZ, C.; CEBAMANOS-CELMA, J.; MOLINA-ROS, A.; BALLESTER-JIMENEZ, J.; BALLESTER-SOLEDA, J. Regenerated cartilage produced by autogenous periosteal grafts: a histologic and mechanical study in rabbits under the influence of continuous passive motion. **Arthroscopy**. v. 26, n. 1, p. 76-83, 2010.

MCALINDON, T.E.; BANNURU, R. R.; SULLIVAN, M. C.; ARDEN, N. K.; BERENBAUM, F.; BIERMA-ZEINSTRA, S. M.; HAWKER, G. A.; HENROTIN, Y.; HUNTER, D. J.; KAWAGUCHI, H.; KWOH, K.; LOHMANDER, S.; RANNOU, F.; ROOS, E. M.; UNDERWOOD, M. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 22, n. 3, p.363–88, 2014.

MEHLER, S. J.; MAY, L. R.; KING, C.; HARRIS, W. S.; SHAH, Z. A prospective, randomized, double blind, placebo-controlled evaluation of the effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on the clinical signs and erythrocyte membrane polyunsaturated fatty acid concentrations in dogs with osteoarthritis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 109, n. 6, p.1-7, 2016.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. D. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n.45 p. 2287-2299, 2008.

NEUPANE, M.; CHANG, C. C.; KIUPEL, M.; Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 6, p. 1007–1015, 2008.

O'LOUGHLIN, P. F.; HEYWORTH, B. E.; KENNEDY, J. G. Current concepts in the diagnosis and treatment of osteochondral lesions of the ankle. **American Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 2, p. 396-404, 2010.

ORTH, P.; KAUL, G.; CUCCHIARINI, M.; ZURAKOWSKI, D.; MENDER, M.D.; KOHN, D.; MANDRY, H. Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**. v. 19, n. 12, p. 2119-2130, 2011.

OUSSEDIK, S.; TSITSKARIS, K.; PARKER, D. Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review. **Arthroscopy**. v. 1, n.8, p. 3-10, 2013.

POOLE, C.A. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. **Journal Anat.** Feb 4; 191:1–13. 1997.

REICH, C. M.; RAABE, O.; WENISCH, S.; BRIDGER, P. S.; KRAMER, M.; ARNHOLD, S. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells – A comparative study. **Veterinary Research Communications**. v. 36, n. 2, p. 139-148, 2012.

SANTOS JUNIOR, E. B. Fração total de células mononucleares como adjuvantes no reparo de cartilagem articular em trocleoplastia experimental de cães / Eduardo de Bastos Santos Junior. - 2010. 151 f.; il. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2010.

SERAKINCI, N.; KEITH, W. N. Therapeutic potential of adult stem cell. **European Journal of Cancer**. v. 42, n. 9, p. 1243-1246, 2006.

SIEBERT, C. H.; SCHNEIDER, U.; SOPKA, S.; WAHNER, T.; MILTNER, O.; NIEDHART, C. Ingrowth of osteochondral grafts under the influence of growth factors: 6-month results of an animal study. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 126, n. 4, p. 247-252, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**. v.131, p. 1-12, 2007.

TAKEMITSU, H.; ZHAO, D.; YAMAMOTO, I.; HARADA, Y.; MICHISHITA, M.; ARAI, T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. **BMC Veterinary Research**. v.8, p. 150, 2012.

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, n. 3, p. 279–289, 2010.

VINATIERA, C.; GUICHEUXA, J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. **Physical and Rehabilitation Medicine**. v. 59, n. 3, p. 139–144, 2016.

WHITWORTH, D. J.; BANKS, T. A. Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? **The Veterinary Journal**. v. 202, n. 3, p. 416-424, 2014.

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

ZHANG, N.; DIETRICH, M. A.; LOPEZ, M. J. Canine intra-articular multipotent stromal cells (MSC) from adipose tissue have the highest in vitro expansion rates, multipotentiality, and MSC immunophenotypes. **Veterinary Surgery**. v. 42, n. 2, p. 137–146, 2013.

Capítulo 2 - Células-tronco mesenquimais autólogas no tratamento da osteoartrite induzida da articulação coxofemoral em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

Células-tronco mesenquimais autólogas no tratamento da osteoartrite induzida da articulação coxofemoral em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

*[Use of autologous mesenchymal stem cells in the treatment of hip osteoarthritis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)]*

RESUMO

A cartilagem articular possui capacidade de reparação limitada, aumentando a predisposição ao desenvolvimento de alterações degenerativas, muitas vezes irreversíveis. Diversas formas de tratamento, cirúrgicas ou conservativas, são descritas, entretanto a terapêutica da osteoartrite continua sendo grande desafio ao médico veterinário. Neste contexto, a pesquisa envolvendo células-tronco mesenquimais destaca-se na busca de melhorias e avanços na reparação da cartilagem articular. Objetivou-se, no presente projeto, comparar a regeneração cartilaginosa da articulação coxofemoral de coelhos, com e sem o transplante de células-tronco mesenquimais autólogas, por meio de exames radiográficos e histopatológicos. Dois grupos, com 15 animais da espécie leporina cada, foram submetidos à indução química de osteoartrite com solução de collagenase 2% na articulação coxofemoral direita. No Grupo 1 (Células-tronco) realizou-se a aplicação intra-articular de células-tronco mesenquimais autólogas, enquanto que, o Grupo 2 (Controle) foi constituído por animais submetidos à aplicação intra-articular de solução salina estéril. Foram realizadas avaliações radiográficas e histopatológicas aos 30, 60 e 90 dias após a aplicação. Os resultados histológicos deste ensaio indicam que células-tronco mesenquimais (Grupo 1) melhoraram discretamente a qualidade do tecido de reparo, de acordo com os critérios da escala semi-quantitativa ICRS 1 (“International Cartilage Repair Society”). O Grupo 1 (Células-Tronco) demonstrou superioridade em relação ao Grupo 2 principalmente nos parâmetros: Superfície articular, matriz extracelular e distribuição celular.

Palavras chave: cartilagem articular, collagenase, displasia coxofemoral, doença articular degenerativa, dor, terapia celular

ABSTRACT

The articular cartilage has limited repair capacity, leading to an increased risk for degenerative changes, potentially irreversible. Several treatments, surgical or not, are described, however osteoarthritis remains a major challenge for the veterinarian. In this context, research involving mesenchymal stem cells stands out. The aim of this study was to compare cartilage regeneration of the hip in rabbits, with and without the transplantation of autologous mesenchymal stem cells. Radiographic and histopathological evaluation were used. Thirty rabbits were submitted to chemical induction of osteoarthritis with a 2% collagenase in the right hip. They were divided into 2 groups of 15 animals each: Group 1 (intra-articular application of autologous mesenchymal stem cells) and Group 2 (control - intra-articular application of sterile saline solution). Radiographic and histopathological evaluations were performed at 30, 60 and 90 days after application. The mesenchymal stem cells group (Group 1) showed slight improvement of the quality of the repair tissue, according to the semi-quantitative scale criteria ICRS 1 (International Cartilage Repair Society). The Group 1 (Stem Cells) showed superiority in relation to Group 2, specially in the parameters joint surface, extracellular matrix and cellular distribution.

Key words: articular cartilage, collagenase, hip dysplasia, degenerative joint disease, pain

INTRODUÇÃO

A cartilagem possui capacidade limitada de regeneração (SIEBERT et al., 2006). Fatores como a baixa atividade mitótica, ausência de inervação, deficiência de suprimento sanguíneo e a não mobilidade dos condrócitos predispõem-na à cicatrização ineficiente. Lesões na cartilagem podem levar a alterações degenerativas sintomáticas a longo prazo, se não forem tratadas. As consequências clínicas de lesões osteocondrais não efetivamente tratadas são dor, edema e desenvolvimento de osteoartrite, com posterior distúrbio potencialmente incapacitante do membro acometido (FITZPATRICK et al., 2010; MARTIN-HERNANDEZ et al., 2010; ORTH et al., 2011; KHAN et al., 2013; ZAK et al., 2014).

A cicatrização da cartilagem articular é caracterizada pelo preenchimento do defeito com tecido fibrocartilaginoso e não por tecido cartilaginoso original (SIEBERT et al., 2006; FITZPATRICK et al., 2010). Este novo tecido reparador oferece propriedades bioquímicas e mecânicas inferiores quando comparadas à cartilagem normal, tendo sua resistência e

61 durabilidade substancialmente reduzidas. Em pequenas lesões, o preenchimento do defeito por
62 fibrocartilagem pode ser suficiente para restaurar função aceitável. Em lesões mais amplas, o
63 recobrimento por fibrocartilagem não é eficiente e, pode não suportar adequadamente a pressão
64 articular por longo período. Lesões cartilaginosas extensas levam ao desenvolvimento da OA e
65 podem requerer a substituição da articulação por prótese, em casos avançados (KALSON et al.,
66 2010; O'LOUGHLIN et al., 2010).

67 A osteoartrite é afecção degenerativa muito comum na medicina humana e veterinária,
68 afetando cerca de 15% da população humana mundial (EGLOFF; HUGLE;
69 VALDERRABANO, 2012; CUERVO et al., 2014). É uma afecção crônica debilitante, que
70 causa dor e desconforto para o indivíduo. Sua prevalência aumenta com o envelhecimento e
71 obesidade (KUYINU et al., 2016).

72 Abordagens terapêuticas atuam na prevenção ou retardo das alterações estruturais e
73 funcionais da OA. Terapia multimodal conservativa baseia-se principalmente na redução da
74 inflamação e da dor. Isso inclui administração a longo prazo de medicamentos anti-
75 inflamatórios não-esteroidais (AINES) e analgésicos, associados a modificação no estilo de
76 vida do paciente, fisioterapia, dieta e manejo nutricional (HOUARD et al., 2013; MC
77 ALINDON et al., 2014; MEHLER et al., 2016).

78 Como alternativa para o tratamento de pacientes portadores de osteoartrite, a terapia
79 celular é promissora, especialmente em tecidos com deficiência na cicatrização, como o
80 cartilaginoso (CUCCHIARINI et al., 2016). Há grande perspectiva de uso clínico desta
81 moderna tecnologia nas afecções degenerativas ou que apresentam pouca resposta aos
82 tratamentos atuais (VINATIERA e GUICHEUXA, 2016). O objetivo da medicina regenerativa
83 é substituir os tecidos lesados por tecido o mais próximo ao original, visando assim a
84 regeneração e não a reparação. Isso é possível por meio do direcionamento e ampliação do
85 processo de reparo (SERAKINCI e KEITH, 2006). Esta otimização do reparo pode ser realizada
86 pelo fornecimento de elementos celulares requeridos, dos fatores de proliferação e
87 diferenciação celular, que podem garantir a geração de quantidade suficiente de células novas
88 e das estruturas supramoleculares que providenciam a organização espacial plenamente
89 funcional de novos tecidos gerados e sua integração sistêmica (VINATIERA e GUICHEUXA,
90 2016).

91 Células-tronco mesenquimais (CTMs) são de especial interesse na terapia celular por
92 apresentarem maneira relativamente mais simples de serem coletadas e isoladas quando

comparadas às demais, e pela facilidade de cultivo e alto potencial de expansão “*in vitro*”. Além disso, possuem a plasticidade de células multipotentes, com a capacidade de se diferenciarem em tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo, muscular, epitelial, células de ilhotas pancreáticas, hepatócitos e neurônios (VIEIRA et al., 2010; CAPLAN e CORREA, 2011; MANFERDINI, 2013; VINATIERA e GUICHEUXA, 2016). Tais características de plasticidade sugerem que este tipo celular é o responsável pelo “*turnover*” e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009).

As CTMs têm a capacidade de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento, além de secretarem grande variedade de quimiocinas. Permitindo assim, sua interação com as células residentes e posteriormente indução das mesmas, por mecanismo parácrino, a se diferenciarem em linhagens celulares distintas (TAKAHASHI et al., 2007; HARMAN et al., 2016). Devido à sua forte propensão para formar cartilagem, relativa facilidade de colheita de tecidos adultos, efeitos anti-inflamatórios e por apresentarem características imunomoduladoras e imunossupressoras, as CTMs têm sido o foco de terapias celulares visando a reparação da cartilagem em veterinária e em pacientes humanos com osteoartrite (WHITWORTH e BANKS, 2014).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, sob Protocolo nº 7510/15.

Foram utilizados 30 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas, da linhagem Nova Zelândia Branco, com 12 meses de idade e peso corporal de 4,5 a 5 kg, provenientes de cunicultura regulamentada. Os coelhos foram acomodados em gaiolas individuais, mantidos com ração sólida e água à vontade.

Os 30 animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (tratamento e controle), com 15 animais cada. Foi realizada indução de osteoartrite (OA) experimental na articulação coxofemoral (ACF) direita de todos os animais. Em ambos os grupos, o tratamento de escolha foi realizado após sete semanas (49 dias) de indução de OA. • Grupo 1 – (Tratamento Células-tronco - CT), cada animal foi submetido ao tratamento com aplicação intra-articular de células-tronco mesenquimais autólogas na articulação coxofemoral direita. • Grupo 2 – (Controle - GC), cada animal foi submetido a aplicação intra-articular de solução salina estéril (mesmo

volume da solução de CTM's utilizada no grupo 1) na ACF direita. Os animais dos dois grupos foram distribuídos aleatoriamente em três subgrupos, com cinco animais cada, os quais diferenciaram-se quanto ao período de acompanhamento e avaliação (após 30, 60 e 90 dias da aplicação intra-articular de CTMs ou solução salina estéril). Nestes momentos, foram realizados exames radiográficos e coleta da articulação coxofemoral direita para análise histopatológica.

Todos os 30 animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. Cada animal foi submetido a um total de quatro anestésias geral inalatória, para a realização dos seguintes procedimentos cirúrgicos: coleta de tecido adiposo (anestesia 1); duas induções químicas (dias 1 e 4) de osteoartrite (anestésias 2 e 3) e tratamento correspondente ao grupo (anestesia 4).

Como terapia antimicrobiana, aproximadamente 30 minutos antes dos procedimentos cirúrgicos foi administrada enrofloxacina (5 mg/kg), por via subcutânea. A medicação pré-anestésica constituiu na administração por via intramuscular (IM) de midazolam (2 mg/kg) associado à morfina (2 mg/kg) e cetamina (25 mg/kg). Após tricotomia da região auricular e introdução de cateter 24G na veia auricular para acesso venoso, foi realizada fluidoterapia com solução de ringer (3 mL/kg/hora). A indução e manutenção anestésica dos animais foi realizada com isoflurano diluído em 100% de oxigênio sob ventilação espontânea, por meio de máscara facial completamente vedada, sem intubação endotraqueal. O plano anestésico foi monitorado por meio da aferição da frequência respiratória, frequência cardíaca e saturação parcial de oxigênio.

As células-tronco mesenquimais autólogas foram cultivadas e fornecidas pelo Laboratório BIOCELL (Brasília – DF) a partir da coleta de tecido adiposo de cada animal. Os animais foram submetidos ao protocolo de anestesia geral inalatória (citado anteriormente). Após indução anestésica foi realizada ampla tricotomia da região cervical e torácica dorsais, seguida de antissepsia com clorexidine degermante 2% e clorexidine alcoólico 0,5%. Foi realizada incisão de aproximadamente dois centímetros na pele da linha média dorsal da região interescapular. Com o auxílio de material cirúrgico estéril foi colhido aproximadamente 20 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa interescapular. O tecido adiposo foi acondicionado em tubo de 50 mL contendo meio de lavagem estéril por dois minutos. Imediatamente após esse tempo o tecido adiposo foi retirado do primeiro tubo de lavagem e acondicionado no segundo tubo de lavagem por três minutos, em seguida foi armazenado no tubo contendo meio de transporte. O tubo foi identificado com o nome do animal e acondicionado na geladeira até o

momento do envio do material. O material foi encaminhado devidamente refrigerado a temperatura de aproximadamente 2°C para o laboratório BIOCELL (Brasília-DF).

O processamento das células-tronco mesenquimais de cada animal iniciou-se a partir da lavagem do tecido adiposo em solução tampão fosfato salina (PBS) para retirada de debris celulares e excesso de sangue. Em seguida, foi fragmentado em partículas pequenas e colocado em contato com a solução de collagenase e hialuronidase para realização de digestão enzimática. Posteriormente a mistura foi centrifugada por 15 minutos e o “*pellet*” celular foi ressuscitado. O mesmo procedimento foi repetido quatro vezes. Foi realizado o método de exclusão “*trypan blue*”. Esse processo constituiu a preparação do SVF (“*stromal vascular fraction*”). Após a obtenção das células-tronco, as mesmas foram armazenadas em garrafas de cultivo contendo meio TCM 199. As garrafas de cultivo foram acondicionadas em estufas de cultivo celular à temperatura de 39,5°C e 5% de CO₂.

Após aproximadamente sete dias de cultivo foi realizado o repique celular. Parte das células permaneceram na garrafa de cultivo e cerca de dois milhões de células foram acondicionadas em seringas de 1,0 mL e encaminhadas para aplicação. Uma parte das células que permaneceram no laboratório foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo e outra parte foi congelada e permanece em nitrogênio líquido. Aproximadamente 2 milhões de células-tronco foram fixadas em solução de formaldeído e encaminhadas para o Laboratório MOFA Global (Estados Unidos) para realização de caracterização celular.

A indução de osteoartrite (OA) ocorreu a partir da aplicação intra-articular de solução de collagenase a 2% (*Clostridium histolyticum*, tipo II) (KIKUCHI et al. 1998). A indução de osteoartrite química foi realizada em dois momentos. A segunda indução ocorreu quatro dias após a primeira.

A solução indutora de OA foi preparada a partir da diluição de 2 mg de collagenase (*Clostridium histolyticum*, tipo II) em 1,0 mL de solução salina estéril. A solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm (conforme metodologia adaptada de Kikuchi et al. 1998). Em seguida foi armazenada em criotubo estéril até a aplicação intra-articular.

Todos os 30 animais foram submetidos a procedimento anestésico (descrito anteriormente) para abordagem a articulação coxofemoral direita e aplicações intra-articulares de solução de collagenase 2% (dias 1 e 4). A preparação para o procedimento cirúrgico foi realizada de maneira rotineira, realizando-se tricotomia ampla no membro pélvico direito, estendendo-se da linha média dorsal até a região dos tarsos. Após o posicionamento do animal

em decúbito lateral esquerdo, procedeu-se a antissepsia utilizando clorexidine 2% e clorexidine alcoólico 0,5%, o campo cirúrgico foi preparado para intervenção asséptica na articulação coxofemoral direita.

A abordagem cirúrgica à articulação coxofemoral direita, compreendeu na incisão cutânea de dois a três cm de comprimento, iniciando-se na região cranial do trocânter maior e progredindo em direção à crista ilíaca. Nessa área foram abordados os músculos bíceps femoral, glúteo médio e o tensor da fáscia lata, os quais foram divulsionados, em seguida os músculos glúteos médio e profundo foram afastados, expondo a cápsula articular. Em seguida realizou-se aplicação intra-articular com seringa de 1,0 mL e agulha 13x0,46 de 1,0 mL da solução de collagenase (*Clostridium histolyticum*, tipo II) de forma estéril. A aproximação da musculatura foi realizada com fio de poliglactina 910 3-0 em pontos simples contínuos e a pele foi suturada em padrão simples interrompido com fio nylon 4-0. Quatro dias após a primeira aplicação de solução de collagenase 2%, foi realizada segunda abordagem (dia 4) à articulação coxofemoral direita de todos os 30 animais. O protocolo anestésico, preparo de campo cirúrgico, antissepsia e procedimento cirúrgico foram semelhantes à primeira aplicação intra-articular (dia 1) de solução indutora de osteoartrite.

Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos e durante sete dias consecutivos, todos os animais receberam cloridrato de tramadol na dose de 4 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas e dipirona na dose de 10 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas. Foi realizada limpeza diária da ferida cirúrgica durante sete dias consecutivos.

Sete semanas (49 dias) após a segunda aplicação intra-articular (dia 4) de solução indutora de osteoartrite foram realizadas avaliações radiográficas das articulações coxofemorais (ACF) direita de todos os animais. Em seguida, os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para abordagem a ACF direita e aplicação intra-articular de célula-tronco mesenquimal autóloga (animais do Grupo 1 – CT) e aplicação intra-articular de solução salina estéril (animais do Grupo 2 – GC). O protocolo anestésico e as técnicas antissépticas foram semelhantes ao procedimento cirúrgico para indução química de OA (citado previamente).

Após acesso cirúrgico à articulação coxofemoral direita (semelhante à abordagem cirúrgica usada na indução de OA) e exposição da cápsula articular realizou-se aplicação intra-articular do tratamento pré-estabelecido. Animais do Grupo 1 (Célula-tronco – CT) foram submetidas ao transplante (aplicação intra-articular) de 1,0 mL de solução de células-tronco

mesenquimais autólogas preparadas no laboratório BIOCELL. As células-tronco autólogas que estavam acondicionadas em 5 mL de meio de transporte foram submetidas à centrifugação a 1250 RPM durante cinco minutos até a formação do botão celular no fundo do tubo. Descartou-se o sobrenadante, logo após, o botão celular foi ressuspendido com 1,0 mL de solução salina 0,9% estéril e acondicionado em uma seringa 1,0 mL, em seguida realizou-se a aplicação intra-articular. Nos animais do Grupo 2 (Grupo Controle – GC) foi realizada aplicação intra-articular de 1,0 mL de solução salina estéril. A aproximação da musculatura foi realizada com fio de poliglactina 910 3-0 em pontos simples contínuos e a pele foi suturada em padrão simples interrompido com fio nylon 4-0.

Exames radiográficos foram realizados antes dos procedimentos cirúrgicos (momento 1), sete semanas (49 dias) após a indução de osteoartrite (momento 2), 30 (momento 3), 60 (momento 4) e 90 dias (momento 5) após procedimento cirúrgico para tratamento. As radiografias foram obtidas na projeção ventro dorsal (VD) das articulações coxofemorais (ACF). Realizou-se a avaliação “duplo cego” das imagens radiográficas por três avaliadores distintos que desconheciam o tempo de realização do exame e o grupo experimental de cada animal. Para análise foram atribuídos escores radiográficos de acordo com a presença e o grau de osteoartrite, onde Grau 0- indicava articulação normal; Grau 1- evidência radiográfica de instabilidade (sem alterações degenerativas); Grau 2- alterações degenerativas discretas (osteófitos ocasionais); Grau 3- alterações degenerativas moderadas (esclerose subcondral, osteófitos) e Grau 4- alterações degenerativas graves (grandes osteófitos, esclerose subcondral grave, remodelação óssea) (adaptado de Kellgren e Lawrence (1957); Black et al. (2007)) (Tabela 1).

A eutanásia dos animais foi realizada 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico de tratamento. Em cada período, dez animais (cinco de cada grupo) foram submetidos à eutanásia. Realizou-se primeiramente a sedação com cloridrato de xilazina (2,0 mg/kg) por via intramuscular. Após tricotomia da região auricular e introdução de cateter 24G na veia auricular foi realizada infusão intravenosa de propofol suficiente para parada respiratória e, em seguida, infusão intravenosa de cloreto de potássio suficiente para parada cardíaca.

Tabela 1: Escala de avaliação radiográfica de osteoartrite (adaptado de Kellgren e Lawrence, 1957; Black et al. 2007).

Escore	Avaliação
Grau 0	Articulação Normal;
Grau 1	Evidência radiográfica de instabilidade (sem alterações degenerativas);
Grau 2	Alterações degenerativas discretas (osteófitos ocasionais);
Grau 3	Alterações degenerativas moderadas (esclerose subcondral, osteófitos);
Grau 4	Alterações degenerativas graves (grandes osteófitos, esclerose subcondral grave, remodelação óssea).

Imediatamente após a eutanásia, os coelhos foram submetidos à necropsia, onde as articulações coxofemorais direitas foram coletadas (acetábulo, cabeça do fêmur e cápsula articular). As peças foram fixadas em formalina tamponada 10% durante 48 horas e posteriormente mantidas em álcool 70%. A cartilagem e o osso foram descalcificados por líquido descalcificador (1,0 mL de ácido nítrico concentrado, 99 mL de água destilada) por 24 horas. Seções com espessura de 7 µm foram cortadas ao longo do eixo longitudinal dos blocos, e uma secção do nível médio foi utilizado para a análise. As secções foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E).

As avaliações microscópicas foram quantificadas em escores de 0 a 3, de acordo com a pontuação da escala ICRS 1 (Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem - *International Cartilage Repair Society*), frequentemente usada para avaliações histopatológicas na medicina humana. As características microscópicas avaliadas foram: superfície articular, matriz extracelular, distribuição celular, viabilidade celular, osso subcondral e cartilagem calcificada (Tabela 2) (HOEMANN, et al., 2011). Os escores de cada parâmetro foram somados após avaliação e pontuação (0 a 3), sendo 0 o valor mínimo (osteoartrite grave) e 18 o valor máximo (cartilagem articular normal).

As variáveis (escore de avaliação radiográfica e escore de avaliação histopatológica) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico). Na avaliação radiográfica, foi avaliada média entre os grupos (dois níveis) e entre os grupos dentro dos tempos (cinco níveis). Na análise dos dados histopatológicos foi avaliada média entre os grupos (dois níveis) e entre os grupos dentro dos parâmetros (seis níveis). Para a análise foi utilizado o procedimento NPAR1WAY do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary. NC, USA).

278 Tabela 2. Escala histológica ICRS 1 (Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem -
 279 International Cartilage Repair Society).

	Parâmetro	Escore
	<i>Superfície</i>	
I	Contínua	3
	Descontínua	0
	<i>Matriz extracelular</i>	
II	Hialina	3
	Mista	2
	Fibrocartilagem	1
	Tecido fibroso	0
	<i>Distribuição celular</i>	
III	Colunar	3
	Mista	2
	<i>Clusters</i>	1
	Desorganizada	0
	<i>Viabilidade celular</i>	
IV	Predominantemente viável	3
	Parcialmente viável	1
	< 10% viáveis	0
	<i>Osso subcondral</i>	
V	Normal	3
	Remodelação	2
	Necrose/granulação	1
	Fratura/calco	0
	<i>Cartilagem calcificada</i>	
VI	Normal	3
	Mal localizada	0

280

281

282

283

284

RESULTADOS

Os animais utilizados neste estudo apresentaram homogeneidade de idade e condição corpórea. As etapas práticas de desenvolvimento do projeto foram realizadas adequadamente, sem intercorrências dignas de nota.

A indução química de osteoartrose foi realizada sem complicações em todos os animais. Duas punções intra-articulares (dias 1 e 4) foram realizadas mediante acesso cirúrgico à articulação coxofemoral direita. Todos os animais apresentaram algum grau de osteoartrite após sete semanas (49 dias) da aplicação da solução de colagenase 2% (*Clostridium histolyticum*, tipo II) segundo avaliação radiográfica. Não foram observados sinais de infecção, reação anormal ou deiscência das feridas cirúrgicas.

No que tange à análise radiográfica, escores radiográficos foram atribuídos por três pesquisadores de acordo com a presença e o grau de osteoartrite (OA). Observou-se presença de OA no Momento 2 (sete semanas após indução de OA), Momento 3 (30 dias de tratamento), Momento 4 (60 dias de tratamento) e Momento 5 (90 dias de tratamento).

A comparação dos graus de osteoartrite entre os grupos 1 (Célula-Tronco - CT) e 2 (Controle - GC) não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Segundo a análise estatística da avaliação dos graus de OA a mediana foi 1, classificada como evidência discreta de instabilidade, sem alterações degenerativas (Grau 1 de OA) (Tabela 3).

Tabela 3: Análise de variáveis do grau de osteoartrite entre os Grupos 1 (Células-Tronco CT) e 2 (Controle – GC).

Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
1 (Células)	1,28 ($\pm 1,21$)	1	0	4
2 (Controle)	1,26 ($\pm 1,28$)	1	0	4

Observou-se presença de osteoartrite no Momento 2 (M2 - Pós OA) do Grupo 2 (Controle) e nos Momentos 3 (M3 - 30 dias de tratamento), 4 (M4 - 60 dias de tratamento) e 5 (90 dias de tratamento) de ambos os grupos. O Grupo 2 apresentou média maior do que o Grupo 1 (Células) nos momentos M3(30), M4(60) e M5(90). O Momento 1, refere-se à avaliação radiográfica anterior à indução de OA. O M2 corresponde ao período de sete semanas (49 dias) após a 2ª indução de OA (dia 4) e o M3 a avaliação após 30 dias de tratamento (Grupo 1- Células-Tronco e Grupo 2 – Controle). O M4 foi referente ao período de 60 dias após

tratamento. O M5 foi correspondente ao período de 90 dias de tratamento (Figura 1) (Tabela 4).

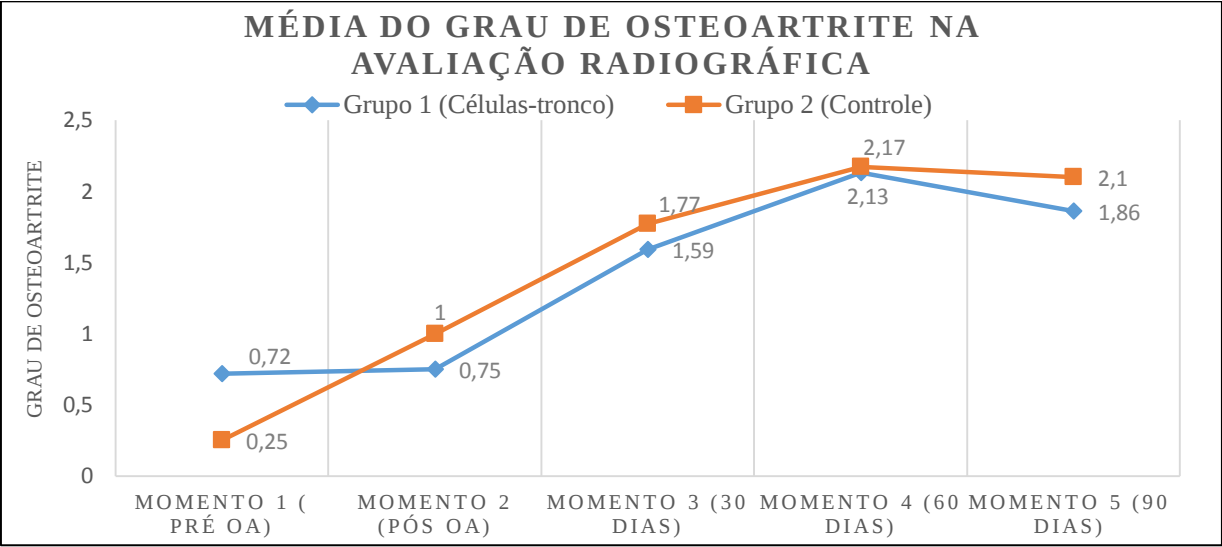


Figura 1. Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação radiográfica da osteoartrite (OA) ao longo dos momentos de avaliação dos Grupos 1 (Células-tronco) e 2 (Controle) do presente estudo. Momento 1 representa a avaliação radiográfica pré indução de OA. Momento 2, avaliação após sete semanas de indução de OA. Momentos 3, 4 e 5 avaliações radiográficas após respectivamente 30, 60 e 90 dias de tratamento.

Tabela 4. Análise de variáveis do grau de osteoartrite entre os Grupos 1 (Células-Tronco – CT) e 2 (Controle – GC) nos tempos M1 (Pré OA), M2 (Pós OA), M3 (30 dias), M4 (60 dias) e M5 (90 dias). Mínimo representa o menor escore apresentado, 0. Máximo representa a maior pontuação.

Momento	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
1 (Pré OA)	1	0,72 (± 0,99)	0	0	3
	2	0,25 (± 0,48)	0	0	2
2 (Pós OA)	1	0,75 (± 0,94)	0	0	3
	2	1,00 (± 1,14)	1	0	4
3 (30 dias de Tratamento)	1	1,59 (± 1,12)	2	0	4
	2	1,77 (± 1,24)	2	0	4
4 (60 dias de Tratamento)	1	2,13 (± 1,16)	2	0	4
	2	2,17 (± 1,31)	3	0	4
5 (90 dias de Tratamento)	1	1,86 (± 1,35)	2	0	4
	2	2,10 (± 1,29)	2	0	4

A avaliação histopatológica foi realizada em um total de 30 coelhos, sendo 15 de cada grupo. Os subgrupos (cinco animais de cada grupo) diferenciaram-se quanto ao tempo avaliação

após tratamento em 30, 60 e 90 dias (Figuras 2 e 3). Foram atribuídos escores de 0 a 3 para cada parâmetro segundo a escala ICRS 1. Os escores de cada parâmetro foram somados após avaliação e pontuação (0 a 3), sendo 0 o valor mínimo (osteoartrite grave) e 18 o valor máximo (cartilagem articular normal). A média da soma do escore de cada parâmetro da avaliação histopatológica do Grupo 1 (Células-Tronco) foi superior à do Grupo 2 (Controle)(Figura 4) nos períodos de 30 dias (Figura 5), 60 dias (Figura 6) e 90 dias (Figura 7).

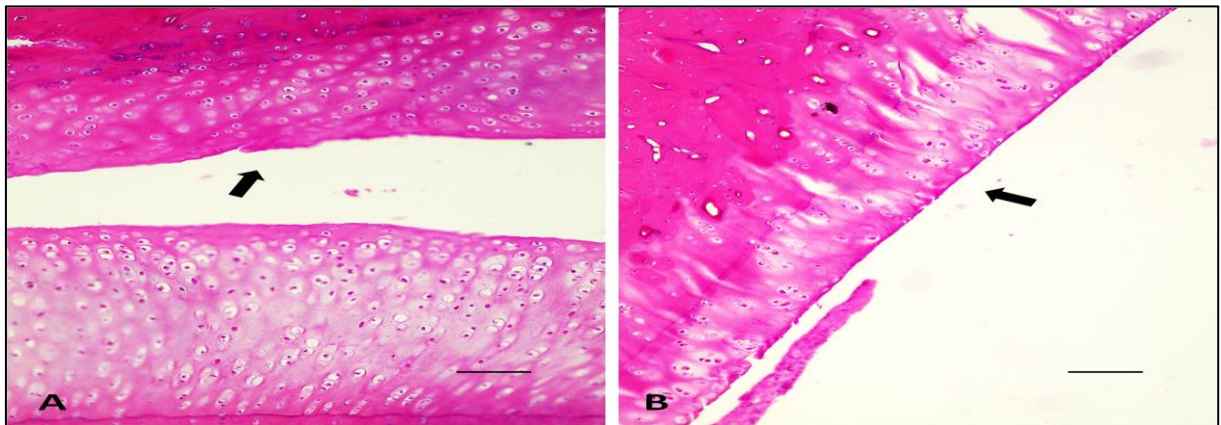


Figura 2. Imagens microscópicas das lâminas coradas H&E. **A-** Coelho, articulação coxofemoral, Grupo 2 (Controle), 30 dias. Superfície articular do fêmur íntegra e cartilagem da articulação acetabular (seta) em processo de reparação e superfície discretamente irregular (H&E, barra 100µm). **B-** Coelho, superfície articular acetabular, Grupo 1 (Célula-tronco), 30 dias. Cartilagem articular com superfície contínua, em processo de reparação (seta) com condrócitos distribuídos em grupos (H&E, barra 100µm).

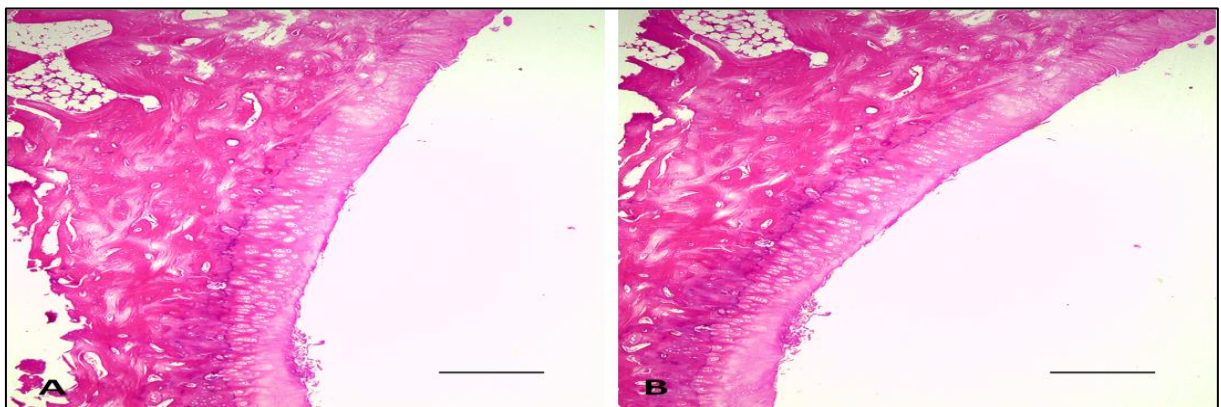
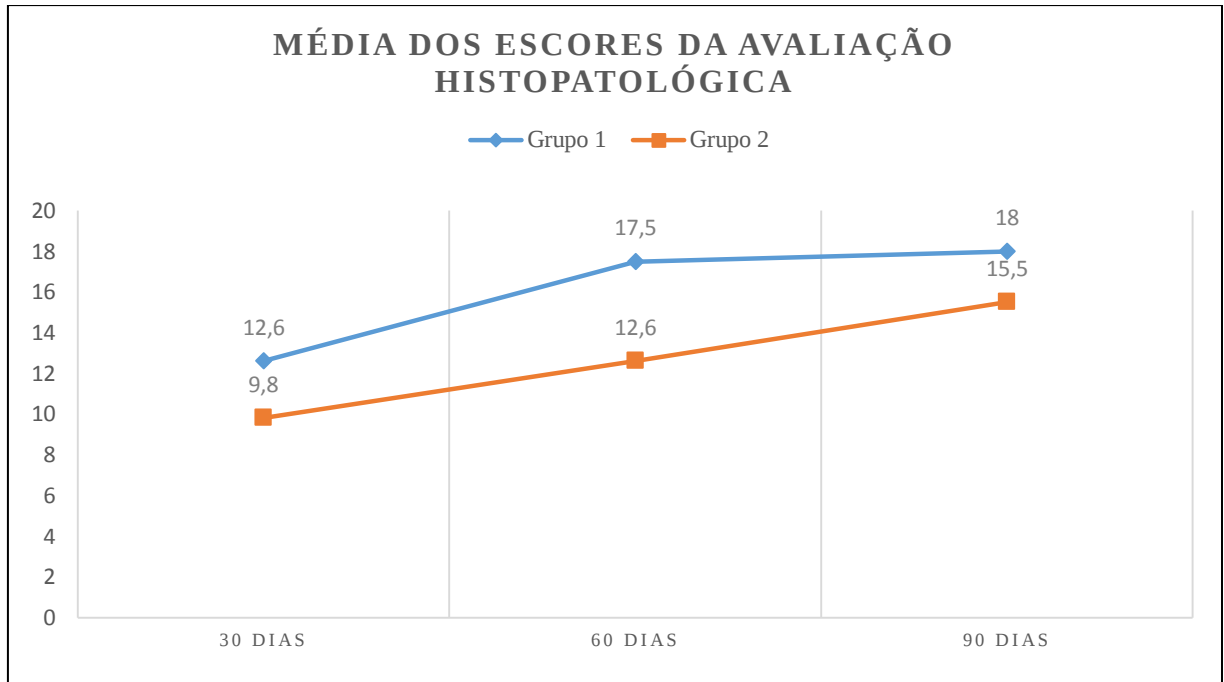


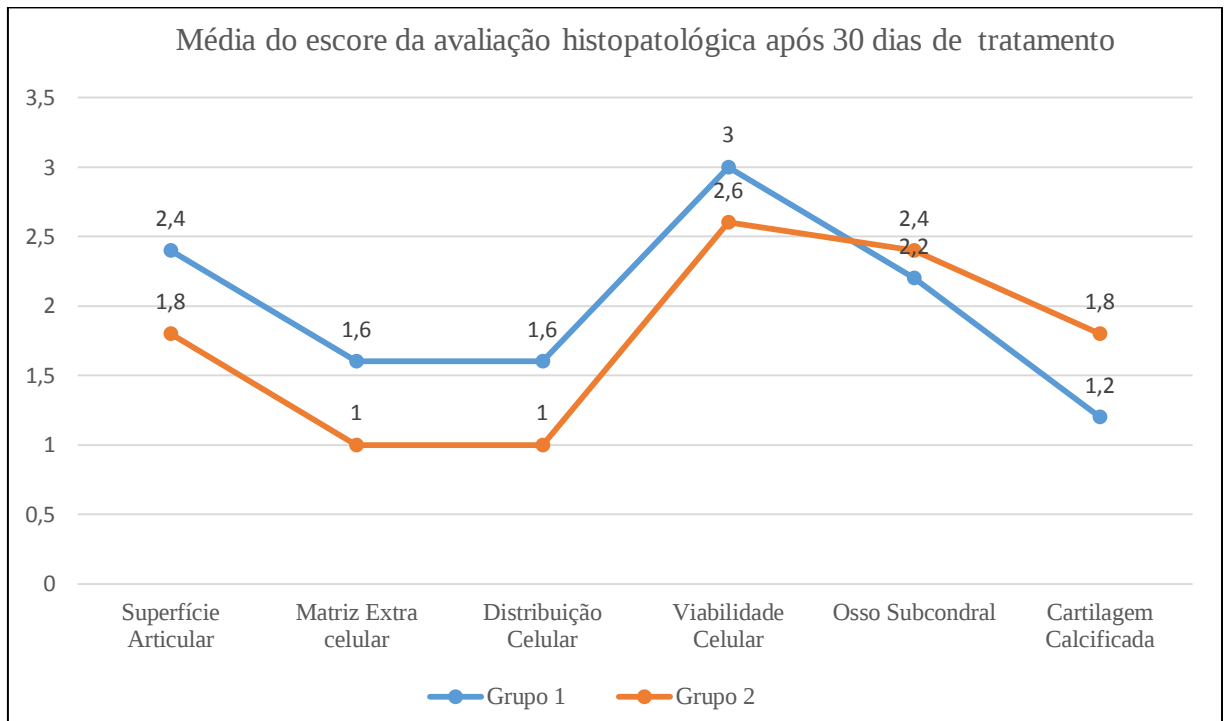
Figura 3. Imagens microscópicas das lâminas coradas H&E. **A-** Coelho, superfície articular acetabular, Grupo 2 (Controle), 90 dias. Cartilagem articular e osso subcondral íntegros, totalmente restituídos (H&E, barra 400µm). **B-** Coelho, superfície articular acetabular, Grupo CT, 90 dias. Restituição total da cartilagem articular e integridade do osso subcondral (H&E, barra 400µm).

353



354

355 Figura 4. Imagem de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação
 356 histopatológica ao longo dos momentos de avaliação para os Grupos 1 (Células-
 357 Tronco) e 2 (Controle).
 358



359

360 Figura 5. Imagens de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação
 361 histológica no primeiro período de avaliação para os grupos 1 (Células-Tronco) e 2
 362 (Controle).

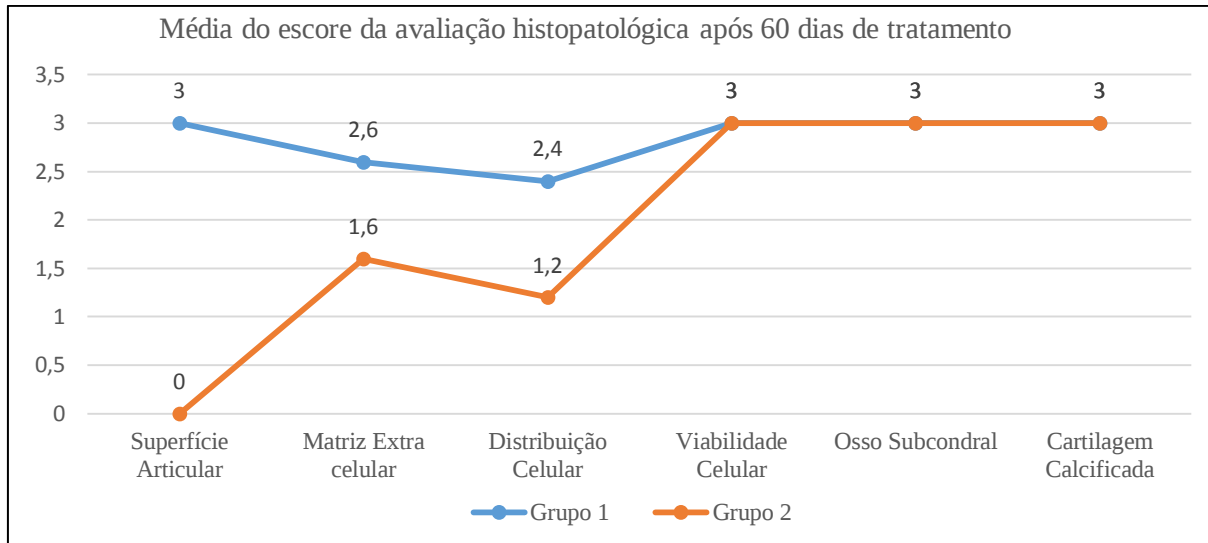


Figura 6. Imagens de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histopatológica no segundo período (60 dias) de avaliação histológica para os grupos 1 (Células-Tronco) e 2 (Controle).

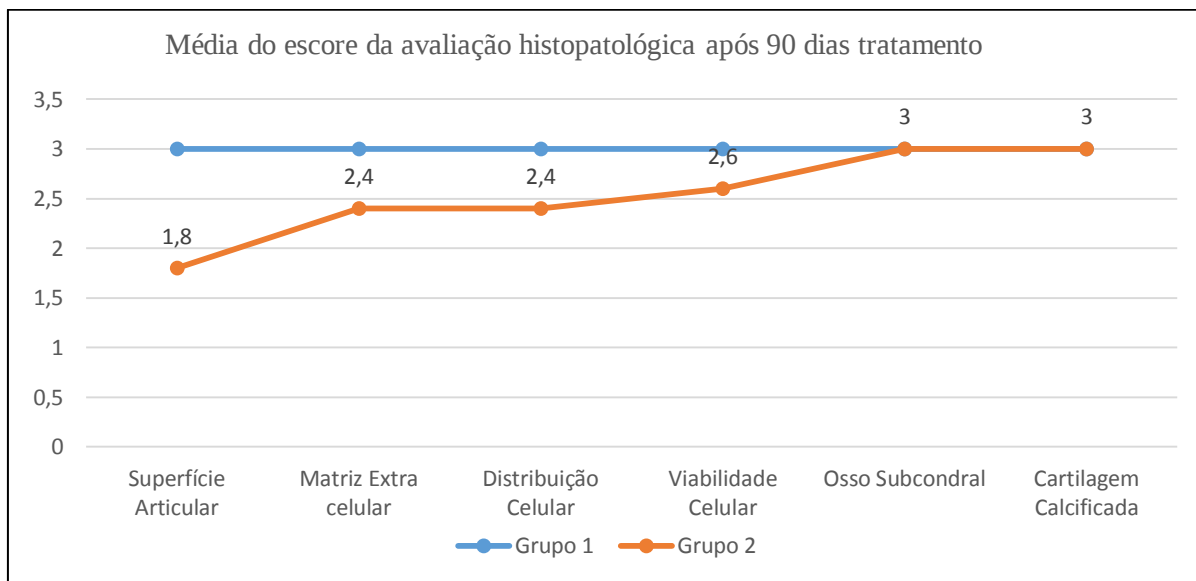


Figura 7. Imagens de gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histopatológica no terceiro período (90 dias) de avaliação histológica para os grupos 1 (Células-Tronco) e 2 (Controle)

DISCUSSÃO

O tratamento da osteoartrite (OA) e dos defeitos condrais, representa um dos maiores desafios na prática ortopédica humana e veterinária, tal qual citado por Hunter e Felson (2006) há cerca de uma década, e mais recentemente por Makris et al. (2014). Numerosas abordagens terapêuticas medicamentosas e cirúrgicas falharam em melhorar a capacidade de recuperação

do tecido cartilaginoso. Os tratamentos conservativos disponíveis para a OA são eficazes apenas em curto prazo e existe uma necessidade clínica não satisfeita. Neste contexto, a terapia celular apresenta nova esperança para promover a regeneração da cartilagem (RUETZE e RICHTER, 2014).

Baseado na ampla casuística de envolvimento da articulação do quadril nas referidas alterações osteocondrais, a utilização de modelos animais representa uma boa estratégia no reconhecimento das variáveis envolvidas em tais afecções, bem como na instituição de novas abordagens de tratamento, inclusive regenerativo. A viabilidade da utilização de células-tronco mesenquimais (CTMs) a partir de tecido adiposo ou outros locais teciduais, com base na sua capacidade de influenciar e regular os diferentes estádios de reparação da cartilagem, é de grande interesse para os clínicos. Em particular, estudos utilizando modelos animais têm mostrado resultados promissores a partir do uso de terapia celular com CTMs para o tratamento de lesões musculoesqueléticas (MURPHY et al., 2003; DESANDO et al., 2013; LAM et al., 2014; SINGH et al., 2014; WEI et al., 2014; WAN et al., 2015). Tal realidade estimulou o desenvolvimento da presente pesquisa.

Diferentes espécies animais têm sido utilizadas para o estudo de tratamentos de lesões osteocondrais, tais como ratos (VAN BUUL et al., 2014; OZEKI et al., 2016), cães (BLACK et al., 2007; LITTLE e ZAKI, 2012; VILAR et al., 2013), ovino (AL FAQEH et al., 2013; SONG et al., 2014; ZORZI et al., 2015) e equinos (MCILWRAITH et al., 2011; SEO et al., 2014; MC COY, 2015). No entanto, a grande maioria (HEIR et al., 2010; LAVERTY et al., 2010; MAZETTI et al., 2010; TOGHRAIE et al., 2011; KIM et al., 2012; LEE et al., 2013; KURODA et al., 2015; KUYINU et al., 2016) utiliza o coelho, da mesma forma que o atual estudo. Esta espécie possui baixo custo de aquisição e manutenção quando comparada a animais de maior porte, além de ser de fácil manejo. Por possuírem articulações maiores comparadas com outros roedores de pequeno porte e por ter vasta literatura ratificando seu uso para os fins de obtenção de osteoartrose induzida, optou-se pela sua utilização. A anatomia do quadril do coelho é de fácil dissecação e visualização da cápsula articular, o que facilita o procedimento cirúrgico de aplicação intra-articular (LAVERTY et al., 2010).

Além disso, modelos de animais pequenos são usados principalmente para estudar a patogênese e a fisiopatologia da afecção. Estes modelos são relativamente mais rápidos, mais baratos e mais fáceis de implementar e estudar do que aqueles em grandes animais. Eles são utilizados como o primeiro modelo de triagem para a intervenção terapêutica na doença. O

sucesso dos fármacos ou do tratamento no modelo de pequeno animal então justifica novos testes em animais maiores antes de estudos clínicos em seres humanos (KURODA et al., 2015; KUYINU et al., 2016).

A terapia com células-tronco mesenquimais autólogas no campo da medicina veterinária regenerativa envolve a colheita de tecido, tal como gordura, a partir do paciente, isolando as CTMs e administrando as células de volta para o paciente. A terapêutica com células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de adiposo está comercialmente disponível desde 2003 e o presente estudo avaliou essa terapia em coelhos com osteoartrite experimentalmente induzida na articulação coxofemoral direita. Vilar et al. (2013) estudaram o uso de CTMs na osteoartrite do quadril em cães e também obtiveram resultados positivos no uso da terapia.

Neste ensaio, a escolha do tecido adiposo como fonte de CTMs deveu-se ao fato do referido tecido apresentar disponibilidade e facilidade de obtenção, quando comparado a outros tecidos como, por exemplo, a medula óssea (BUSSE et al., 2014). Estes et al. (2010) relataram que as CTMs derivadas do tecido adiposo apresentam maior potencial de diferenciação condrogênica. Além disso, segundo Ruetze e Richter (2014), os sinais de senescência ocorrem mais tardiamente em CTMs derivadas do tecido adiposo em comparação as originadas de medula óssea.

A digestão enzimática utilizando-se da collagenase seguiu as recomendações de Zuk et al. (2001), que descreveram primeiramente o método de extração das CTM do tecido adiposo, e que até os dias atuais, ainda é o método mais amplamente utilizado (MARKARIAN et al., 2014).

A lógica subjacente ao uso de CMTs refere-se ao tratamento anti-inflamatório e as propriedades imunomoduladoras dessas células, o que poderia facilitar a regeneração articular, conforme estudos realizados por Black (2007), Kim et al. (2012), Desando et al. (2013), Kuroda et al. (2015), Vinatiera e Guicheux (2016). O presente estudo evidenciou bom resultado na análise histopatológica do Grupo 1 (Células-tronco) em comparação ao Grupo Controle, ressaltando os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores do uso de CTMs na regeneração articular. Para Frosina (2009), as células-tronco protegem seu genoma por meio do aumento da capacidade de reparação do DNA, e neste sentido, podem reduzir a taxa de proliferação e aumentar a atividade de proteínas envolvidas com o fenômeno da reparação natural. As CTMs também são de maior interesse na engenharia de tecidos, porque geralmente não expressam

moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II), responsável pela rejeição imunológica.

Tajima et al. (2014) reiteram que fatores de crescimento secretados por CTMs de origem de tecido adiposo podem induzir respostas parácrinas e autócrinas. Ruetze e Richter (2014), consideram que o efeito parácrino das CTMs pode ser o mecanismo mais relevante na mediação do reparo osteoarticular. Além disso, CTMs demonstraram a capacidade de secretar vasta gama de proteínas com propriedades anti apoptóticas e efeitos imunomoduladores, segundo Guilak (2010). Corroborando os achados precedentemente citados pelo presente estudo, pesquisas recentes realizadas por Toghraie et al. (2011), Horie et al. (2012), Al Faqeh et al. (2013) apontam a terapia com CTMs como ferramenta terapêutica válida no tratamento da OA. Os efeitos benéficos da utilização terapêutica de CTMs foram relatados em modelos experimentais conduzidos, dentre outros, por Guercio et al. (2012), Lee et al. (2012), Ter Huurne et al. (2012), Desando et al. (2013), Song et al. (2014) e, também agora, neste ensaio.

O presente estudo optou por modelo experimental de osteoartrite quimicamente induzida em articulação coxofemoral de coelhos devido especialmente aos diversos fatores que tornam a lesão nessa articulação grande desafio para ortopedistas humanos e veterinários. Modelos quimicamente induzidos descritos por Kuyinu et al. (2016) envolvem principalmente a injeção de composto tóxico ou inflamatório diretamente na articulação. A papaína, quinolona e collagenase são alguns dos produtos químicos empregados para induzir OA em animais. Eles eliminam a necessidade de cirurgia e evitam possíveis problemas de infecção em alguns animais. A sua facilidade de indução e reprodutibilidade são vantajosas na concepção de estudos a curto prazo.

O objetivo da aplicação intra-articular da solução de collagenase 2%, não é só destruir diretamente a cartilagem, mas também causar inflamação, reação dos tecidos sinoviais e acelerar a degeneração da cartilagem. A degeneração neste modelo é associada à digestão direta do colágeno na cartilagem e a reação inflamatória no tecido articular. Além disso, o estresse subsequentemente aumenta a degradação da cartilagem (MOSKOWITZ et al., 2010; ADAES et al., 2014). O referido método apresenta-se menos invasivo quando comparado a metodologias experimentais cirúrgicas (KIKUCHI et al., 1998), proporcionando menor estresse aos animais, além do período de indução da OA ser de apenas sete semanas, e nos métodos de ruptura de ligamentos, leva cerca de oito a doze semanas para atingir a degeneração esperada (GRIGOLO et al., 2009).

No presente ensaio, o grau de osteoartrite experimentalmente induzida foi considerada leve, as respostas do tecido sinovial diminuíram com o tempo e permaneceu leve às sete semanas após a indução, corroborando com os resultados encontrados por Kikuchi et al. (1998). Estudo realizado por Ter Huurne (2012) com CTMs autólogas para tratamento de OA experimental induzida com colagenase em ratos, indicou que uma única aplicação intra-articular de CTMs nas articulações do joelho com OA em estágio inicial inibiu o espessamento e destruição da cartilagem. Neste ensaio, optou-se por duas aplicações de solução indutora de OA visando maior degeneração articular.

A injeção intra-articular direta dos tratamentos de ambos os Grupos (Grupo 1 - Células-tronco mesenquimais autólogas e Grupo 2 – Controle) foi realizada de maneira simples e prática, e os animais não apresentaram edema ou desconforto após a aplicação. Tecnicamente, os achados aqui alcançados revelam tratar-se de abordagem simples para a aplicação das CTMs e de acordo com relatos de outros autores (UCCELLI et al., 2007; MOKBEL et al., 2011).

Os resultados deste ensaio indicam que as CTMs (Grupo 1 – Células-tronco) melhoraram discretamente a qualidade do tecido de reparo, de acordo com os critérios da escala semi-quantitativa ICRS 1, resultado semelhante ao encontrado por Zorzi et al. em 2016. O Grupo 1 (Células-Tronco) demonstrou superioridade principalmente nos parâmetros: Superfície articular, Matriz extracelular e Distribuição celular.

Os animais do Grupo 1 (Células-tronco) apresentaram melhor resultado no que diz respeito ao tempo de avaliação de 90 dias após instituição de tratamento. Este grupo (Células) apresentou mais frequentemente tecido hialino em relação ao Grupo controle (Grupo 2). As alterações degenerativas no osso subcondral e cartilagem calcificada foram semelhantes em ambos os grupos nos períodos de 60 e 90 dias após tratamento. Predomínio de células viáveis ocorreu nos dois grupos no período após 60 dias de tratamento. Em conjunto, estes achados suportam a conclusão de que a implantação de CTMs autólogas de tecido adiposo melhorou discretamente a qualidade do tecido de reparo em comparação com o grupo controle, mas ainda estão longe da qualidade da cartilagem hialina normal. Estudo experimental realizado por Brittberg et al. (1996) demonstrou não apenas o reparo tecidual, mas a regeneração de cartilagem hialina originalmente presente na articulação. Noth et al. (2008) apontaram que injeções intra-articulares de CTMs são efetivas nos estágios iniciais da OA, quando as lesões estão localizadas na superfície da cartilagem, como relatado no presente estudo. Entretanto, não ocorreu grande diferença estatística entre os grupos, corroborando com o que se imagina sobre

a dificuldade de regeneração do tecido condral que permanece até os dias de hoje (ZORZI et al., 2015). É importante salientar que a comparação com outros resultados na literatura é difícil devido à variabilidade de protocolos.

Maior quantidade de material hialino em ambos os grupos provavelmente não ocorreu porque os condrócitos são células que necessitam de cultivo tri-dimensional, para a manutenção do seu fenótipo original, pois em monocamadas estas células se diferenciam, produzindo componentes da matriz como o colágeno tipo I característico da fibrocartilagem e não da cartilagem hialina, portanto, sendo consequência de alteração da expressão gênica, conforme salientado por Jayasinghe, (2013) e Murata et al. (2015). Sendo assim, quando se trabalha com cartilagem articular, o interesse é somente tecido cartilaginoso hialino, pois em uma abordagem articular a produção de colágeno tipo I, indica fibrose, ou seja, a transformação do tecido hialino em fibroso. A fibrocartilagem é um tecido de transição e apresenta propriedades, funcionais e estruturais, entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem hialina. Como citado por Ghivizzani et al. (2000), a fibrocartilagem, embora resistente a tensões, caracteriza-se pela presença de colágeno I. Portanto, a formação de fibrocartilagem observada é indesejada, por alterar as propriedades estruturais e biomecânicas da articulação (VIDOTTO et al., 2013).

Com o uso de biotecnologia surgiram alternativas, como o uso de fatores de crescimento (TALHEDEN et al., 2005) ou biomateriais (BRODKIN et al., 2004). O avanço mais significativo na área de regeneração condral está relacionado à terapia celular (COHEN et al., 2008) como a utilizada no estudo. Grande et al. em 1987 propôs o reparo de lesões condrais com o uso de células autólogas.

Dados da literatura confirmam os resultados deste ensaio, afirmando que as CTMs são capazes de se diferenciarem em fenótipo celular específico, dependendo do ambiente em que estão residentes. Segundo Djouad et al. (2007), a diferenciação das CTMs e condrócitos pode ser o fator importante da interação entre as CTMs e a matriz extracelular. Para Birmingham et al. (2007), o microambiente da OA pode influenciar a capacidade das CTMs em regenerar a cartilagem articular ou matriz do osso subcondral, que podem responder conforme os diferentes estímulos, devido a fatores de sinalização secretados pelos condrócitos ou osteoblastos residentes.

Csaki et al. (2008) propõem que a diferenciação *in vivo* das CTMs é iniciada pela interação de moléculas sinalizadoras emitidas por células locais e vizinhas, transduzidas via extra ou intracelular, por estímulo dos receptores de membrana das CTMs, citocinas e fatores

de crescimento solúveis, proteínas da matriz extracelular como proteoglicanos e colágeno ou por interação direta com os condrócitos residentes. Todavia, os mecanismos de interações celulares no microambiente da osteoartrite, que influencia a diferenciação condrogênica e osteogênica das CTMs ainda não foram completamente elucidados. Além disso, os fatores que podem modular o fenótipo condrogênico das CTMs ainda não estão, compreensivamente, bem estabelecidos (LEYH et al., 2014).

Algumas limitações foram identificadas no desenvolvimento da presente pesquisa. O grau de osteoartrite, como mencionando anteriormente foi considerado leve, conforme ocorreu no estudo de Kikuchi et al. (1998). Sugere-se aumento da concentração de colagenase na solução indutora de OA. Além disso, parâmetros pré-clínicos de modelo animal incluindo histologia e avaliações biomecânicas apresentariam maiores informações. O presente estudo utilizou apenas parâmetros radiográficos e histológicos. Métodos histológicos mais sofisticados, tais como histomorfometria, coloração imuno-histoquímica e microscopia polarizada não foram utilizados.

Outra limitação diz respeito à avaliação histológica, na qual analisou-se apenas uma seção da região central da articulação. Idealmente, mais seções deveriam ser avaliadas para abordar a heterogeneidade do tecido reparado na lesão. Métodos de diagnóstico por imagem mais avançados, como a ressonância magnética ou a tomografia computadorizada poderiam ser mais elucidativos do que imagens radiográficas. A utilização de biomarcadores de degeneração celular e inflamação poderiam servir como medida de avaliação dos resultados do tratamento da osteoartrite e progresso da mesma. Essas moléculas são precursoras ou produtos do metabolismo liberados no soro, urina e líquido sinovial, e seus níveis correlacionam-se com alterações osteoartríticas na articulação.

Por fim, 90 dias representam período de acompanhamento experimental, mas pode ser considerado demasiadamente curto para avaliar alterações degenerativas e comportamento do tecido regenerativo. Sugere-se acompanhamento por período maior de tempo, conforme indicado por Wei et al. (2014) e Zorzi et al. (2015).

CONCLUSÃO

Com base nas condições em que foram realizadas as diversas etapas deste experimento, conclui-se que:

- O protocolo de coleta de tecido adiposo, isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais autólogas de coelhos, revelaram-se satisfatórios e propícios à obtenção de número viável de células;
- Foram observados efeitos benéficos discretos do uso de CTMs autólogas derivadas do tecido adiposo na regeneração da cartilagem articular do quadril de coelhos submetidos a osteoartrite experimental, comprovada pela análise histológica;
- Não houve diferença estatística significativa do sucesso do tratamento da osteoartrite experimentalmente induzida com colagenase, no período analisado;
- A indução de osteoartrite química foi considerada leve;
- O modelo de estudos mostra-se factível para outras espécies animais, inclusive para dar suporte à medicina regenerativa em geral.

REFERÊNCIAS²⁷

- ADAES, S.; MENDONÇA, M.; SANTOS, T. N.; CASTRO-LOPES, J. M. et al. Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, v. 16, n.1, 2014.
- AL FAQEH, H.; NOR HAMDAN, B. M.; CHEN, H. C.; AMINUDDIN, B. S. et al. The potential of intra-articular injection of chondrogenic-induced bone marrow stem cells to retard the progression of osteoarthritis in a sheep model. *Experimental Gerontology*, v. 47, p.458–464, 2012.
- ALIOTTA, J.M.; PASSERO, M.; MEHARG, J.; KLINGER, J.; DOONER, M. S.; PIMENTEL, J.; QUESENBERRY, P. J. Stem cells and pulmonary metamorphosis: new concepts in repair and regeneration. *Journal of Cell Physiology*. v. 204, n. 3, p. 725-741, 2005.
- BIEBACK, K.; KERN, S.; KOCAOMER, A.; FERLIK, K.; BUGERT, P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: Bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Bio-Medical Materials and Engineering*. v. 18, n. 1, p. 71-76, 2008.
- BIJLSMA, J. W.; BERENBAUM, F.; LAFEBER, F. P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *The Lancet*. v.377, n. 9783, p. 2115–26, 2011.
- BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G. L.; MCHUGH, P. E. et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European Cells and Materials*, v. 12, n. 23, p.13–27, 2012.
- BLACK, L.; GAYNOR, J.; GAHRING, D.; ADAM, C. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Veterinary Therapeutics*. v. 8, n.4, p. 272–84, 2007.
- BRITTBERG, M.; NILSSON, A.; LINDAH, L. A.; OHLSSON C. et al. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clinical Orthop*, v. 32n.6, p. 270–283, 1996.
- BRODKIN, K. R. et al. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials*. v. 25, n. 28, p. 5929-5938, 2004.

²⁷ Normas do periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABNT NBR 10520/2002 adaptado para ABMVZ)

- BUSSER, H.; DE BRUYN, C.; URBAIN, F.; NAJAR, M. et al. Isolation of Adipose-Derived Stromal Cells Without Enzymatic Treatment: Expansion, Phenotypical, and Functional Characterization. *Stem Cells and Development*, v. 23, n. 19, p. 2390-2400, 2014.
- CAPLAN, A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal Pathology*. v. 217, n. 2, p. 318-324, 2009.
- CAPLAN, A.; CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. *Stem Cell*. v. 9, n. 1, p. 11-15, 2011.
- COHEN, M. et al. Implante autólogo de condrócitos para o tratamento de lesão do côndilo femoral e talo. *Einstein*, v. 6, n. 1, p. 37-41, 2008.
- CUCCHIARINI, M.; GIROLAMO, L.; FILARDO, G.; OLIVEIRA, J. M.; et al. Basic science of osteoarthritis. *Journal of Experimental Orthopaedics*, v.3, n. 22, 2016.
- CUERVO, B.; RUBIO, M.; SOPENA, J.; DOMINGUEZ, J. M.; et al. Hip Osteoarthritis in Dogs: A Randomized Study Using Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Plasma Rich in Growth Factors. *International Journal Molecular Science*. v.15, n. 8, p. 13437-13460, 2014.
- CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; et al. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochemistry and Cell Biology, Germany*, v. 128, n. 6, p. 507-520, 2007.
- DESANDO, G.; CAVALLO, C.; SARTONI, F.; MARTINI, L.; et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Research & Therapy*, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2013.
- DJOUAD, F.; DELORME, B.; MAURICE, M.; BONY, C. et al. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, v. 9, n. 2, p. 1-12, 2007.
- EGLOFF, C.; HUGLE, T.; VALDERRABANO, V. Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. *Swiss Medical Weekly*, v. 142, n. 35, 2012.
- FITZPATRICK, N.; TERHEIJDEN, C. V.; SMITH, T. J. Osteochondral autograft transfer for treatment of osteochondritis dissecans of the caudolateral humeral head in dogs. *Veterinary Surgery*, v. 39, n.8, p. 925-935, 2010.
- FROSINA, G. DNA repair in normal and cancer stem cells, with special reference to the central nervous system. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, n.7, p. 854-866, 2009.

- GHIVIZZANI, S.C.; OLIGINO, T. J.; ROBBINS P. D.; EVANS, C. H. Cartilage injury and repair. *Phys Med Rehabil Clinical North Animal*, v.11, n.2, p. 289–307, 2000.
- GRANDE, D. A. et al. Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage follow chondrocyte implantation. *The Anatomical Records*. v. 218, n. 2, p. 142- 8, 1987.
- GRIGOLO, B.; LISIGNOLI, G.; DESANDO, G.; CAVALLO, C.; et al. Osteoarthritis Treated with Mesenchymal Stem Cells on Hyaluronan-Based Scaffold in Rabbit. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 15, n. 4, p. 647- 658, 2009.
- GUILAK, F. Homing in on a biological joint replacement. *Stem Cell Research Ther.* v. 1, 2010.
- GUERCIO, A.; DI MARCO, P.; CASELLA, S.; CANNELLA, V. et al. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. *Cell Biology International Immediate Publication*, v. 36, n. 2, p. 189-194, 2012.
- HARMAN, R.; CARLSON, K.; GAYNOR, J.; GUSTAFSON, S.; et al. Prospective, Randomized, Masked, and Placebo-Controlled Efficacy Study of Intraarticular Allogeneic Adipose Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs. *Frontier Veterinary Science*. v. 3, n. 81, 2016.
- HEIR, S.; AROEN, A.; LOKEN, A.; HOLME, I.; et al. Cartilage repair in the rabbit knee: mosaic plasty resulted in higher degree of tissue filling but affected subchondral bone more than microfracture technique. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, v. 20, n. 2, p.197–209, 2012.
- HOEMANN, C.; KANDEL, R.; ROBERTS, S.; SARIS, B. F.; et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. *Cartilage*, v. 2, p. 153-172, 2011.
- HORIE, M.; CHOI, H.; LEE, R. H.; et al. Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage*.v. 20, n. 10, p. 1197–1207, 2012.
- HOUARD, X.; GOLDRING, M. B.; BERENBAUM, F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation. *Osteoarthritis current rheumatology reports*. v. 15, n. 375, 2013.
- HUNTER, D. J.; FELSON, D. T. Osteoarthritis. *British Medical Journal*, London, UK, v. 332, n. 7542, p. 639-42, 2006.

- JAYASINGHE, S. N. Cell electrospinning: A novel tool for functionalising fibres, scaffolds and membranes with living cells and other advanced materials for regenerative biology and medicine. *Analyst*, v. 138, p. 2215–2223, 2013.
- KALSON, N. S.; GIKAS, P. D.; BRIGGS, T. W. R. Current strategies for knee cartilage repair. *International Journal of Clinical Practice*, v. 64, n. 10, p. 1444-1452, 2010.
- KELLGREN, J. H.; LAWRENCE, J. S. Radiological Assessment of Osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. n. 16, n. 4, p. 494-502, 1957.
- KHAN, I. M.; FRANCIS, L.; THEOBALD, P. S.; PERNI, S.; et al. In vitro growth factor-induced bioengineering of mature articular cartilage. *Biomaterials*, v. 34, n. 5, p. 1478-1487, 2013.
- KIM, S. S.; KANG, M.S.; LEE, K. Y.; LEE, M. J. et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells and hyaluronic acid injection on osteochondral defects in rabbits knees. *Knee Surgery & Related Research*, v. 24, p. 164–172, 2012.
- KIKUCHI, T.; SAKUTA, T.; YAMAGUCHI, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. v. 6, n. 3, p. 177-186, 1998.
- KISIEL, A. H.; MCDUFFEE, L. A.; MASAUD, E.; BAILEY, T. R.; et al. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American Journal of Veterinary Research*, v. 73, n. 8, p. 1305–1317, 2012.
- KURODA, K.; KABATA, K.; HAYASHI, K.; MAEDA, T. et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskelet Disord*. n.16, p. 236, 2015.
- KUYINU, E. L.; NARAYANAN, G.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. v. 11, n. 19, 2016.
- LAM, J.; LU, S.; LEE, E. J.; TRACHTENBERG, J. E.; et al. Osteochondral defect repair using bilayered hydrogels encapsulating both chondrogenically and osteogenically pre-differentiated mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 22, n.9, p. 1291-300, 2014.

- 715 LAVERTY, S.; GIRARD, C.A.; WILLIAMS J. M.; HUNZIKER, E. B. et al. The OARSI
 716 histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the
 717 rabbit. *Osteoarthritis Cartilage*. v. 18, n.3, p. 53-65, 2010.
- 718 LEE, J. C.; MIN, H. J.; PARK, H. J.; LEE, S. et al. Synovial membranederived mesenchymal
 719 stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model.
 720 *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, v. 29, p.1034–1046, 2013.
- 721 LEYH, M.; SEITZ, A.; DURSELEN, L.; SCHAUMBURGER, J. et al. Subchondral bone
 722 influences chondrogenic differentiation and collagen production of human bone marrowderived
 723 mesenchymal stem cells and articular chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, v. 16, n. 5,
 724 p. 2014.
- 725 LITTLE, C. B.; ZAKI, S. What constitutes an “animal model of osteoarthritis” the need for
 726 consensus? *Osteoarthritis Cartilage*, v.20, n.4, p. 261–267, 2012.
- 727 MURATA, D.; TOKUNAGA, S.; TAMURA, T.; KAWAGUCHI, H. et al. A preliminary study
 728 of osteochondral regeneration using a scaffold-free three-dimensional construct of porcine
 729 adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal Orthop. Surg. Res.* v. 10, 2015.
- 730 MAKRIS, E. A.; GOMOLL, A. H.; MALIZOS, K. N.; HU, J. C.; ATHANASIOU, K. A.
 731 Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature Reviews Rheumatology*,
 732 p.1-14, 2014.
- 733 MANFERDINI, C.; MAUMUS, C.; GABUSI E.; PIACENTINI, A.; et al. Adipose-derived
 734 mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from
 735 osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis and Rheumatism*. v. 65, n. 5, p. 1271-
 736 1281, 2013.
- 737 MARKARIAN, C. F.; FREY, G. Z.; SILVEIRA, M. D.; CHEM, E. M. et al. Isolation of
 738 adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnology Letters*,
 739 Germany, v. 36, n.4, p. 693-702, 2014.
- 740 MARTIN-HERNANDEZ, C.; CEBAMANOS-CELMA, J.; MOLINA-ROS, A.;
 741 BALLESTER-JIMENEZ, J.; et al. Regenerated cartilage produced by autogenous periosteal
 742 grafts: a histologic and mechanical study in rabbits under the influence of continuous passive
 743 motion. *Arthroscopy*, v. 26, n. 1, p. 76-83, 2010.
- 744 MAZETTI, M. P.V.; OLIVEIRA, I. S.; FERREIRA, R. M.; FAUAZ, G. et al. Qualitative and
 745 quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.25,
 746 n.1, p. 24-27, 2010.

- 747 MC ALINDON, T.E.; BANNURU, R. R.; SULLIVAN, M. C.; ARDEN, N. K.; et al. OARSI
748 guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. v.
749 22, n. 3, p.363–88, 2014.
- 750 MCCOY, A. M. Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations. *Vet*
751 *Pathology*. v. 16, p. 236, 2015.
- 752 MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; RODKEY, W. G.; KISIDAY, J. D. et al. Evaluation
753 of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral
754 defects. *Arthroscopy*. v. 29, n.11, p. 1552-1556, 2011.
- 755 MEHLER, S. J.; MAY, L. R.; KING, C.; HARRIS, W. S.; et al. A prospective, randomized,
756 double blind, placebo-controlled evaluation of the effects of eicosapentaenoic acid and
757 docosahexaenoic acid on the clinical signs and erythrocyte membrane polyunsaturated fatty
758 acid concentrations in dogs with osteoarthritis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential*
759 *Fatty Acids*. v. 109, n. 6, p.1-7, 2016.
- 760 MOKBEL, A.; EL-TOOKHY, O.; SHAMAA, A.A.; SABRY, D.; et al. Homing and efficacy
761 of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in experimental chondral
762 defects in dogs. *Clinical and Experimental Rheumatology*, Pisa, Italy, v. 29, n. 2, p. 275-284,
763 2011.
- 764 MOSKOWITZ, R. W.; ALTMAN, R.D.; HOCHBERG, M.C.; BUCKWALTER, J.A.;
765 Experimental models of osteoarthritis. In: MOSKOWITZ, R.W.; GOLDBERG, V. M.;
766 HOCHBERG, M.C, (Editors). *Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management*. 4th
767 ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 107-125, 2007.
- 768 MURPHY, J. M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E. B.; BARRY, F. P. Stem cell therapy in a caprine
769 model of osteoarthritis. *Artrite Rheum*, v, 48, n.12, p. 3464-3474, 2003.
- 770 NOTH, U.; STEINERT, A.F.; TUAN, R.S. Technology insight: adult mesenchymal stem cells
771 for osteoarthritis therapy. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, v. 4, n. 7, p. 371-380, 2008.
- 772 O'LOUGHLIN, P. F.; HEYWORTH, B. E.; KENNEDY, J. G. Current concepts in the diagnosis
773 and treatment of osteochondral lesions of the ankle. *American Journal of Sports Medicine*, v.
774 38, n.2, p. 396-404, 2010.
- 775 ORTH, P.; KAUL, G.; CUCCHIARINI, M.; ZURAKOWSKI, D.; et al. Transplanted articular
776 chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee*
777 *Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, v. 19, n. 12, p. 2119-2130, 2011.

778 OUSSEDIK, S.; TSITSKARIS, K.; PARKER, D. Treatment of articular cartilage lesions of the
 779 knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review.
 780 Arthroscopy. v. 1, n.8, p. 3-10, 2013.

781 OZEKI, N.; MUNETA, T.; KOGA, H.; NAKAGAWA, Y. et al. Not single but periodic
 782 injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit
 783 osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 24, n. 6, p. 1061-1070, 2016.

784 REICH, C. M.; RAABE, O.; WENISCH, S.; BRIDGER, P. S.; KRAMER, M.; ARNHOLD, S.
 785 Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue and bone marrow-
 786 derived mesenchymal stem cells – A comparative study. *Veterinary Research Communications*.
 787 v. 36, n. 2, p. 139-148, 2012.

788 RUETZE, M.; RICHTER, W. Adipose-derived stromal cells for osteoarticular repair: Trophic
 789 function versus stem cell activity. *Expert Rev. Mol. Medicine*, v. 16, 2014.

790 SERAKINCI, N.; KEITH, W. N. Therapeutic potential of adult stem cell. *European Journal of*
 791 *Cancer*. v. 42, n. 9, p. 1243-1246, 2006.

792 SEO, J.P., TANABE, T., TSUZUKI, N., HANEDA, S. et al. Effects of bilayer gelatin/ β -
 793 tricalcium phosphate sponges loaded with mesenchymal stem cells, chondrocytes, bone
 794 morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on osteochondral defects of the talus in
 795 horses. *Research in Veterinary Science*, v. 95, p.1210–1216, 2013.

796 SIEBERT, C. H.; SCHNEIDER, U.; SOPKA, S.; WAHNER, T.; et al. Ingrowth of
 797 osteochondral grafts under the influence of growth factors: 6-month results of an animal study.
 798 *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v. 126, n. 4, p. 247-252, 2006.

799 SINGH, A.; GOEL, S. C.; GUPTA, K. K.; KUMAR, M.; et al. The role of stem cells in
 800 osteoarthritis: An experimental study in rabbits. *Bone Joint Research*, v.3, n. 2, p. 32-37, 2014.

801 SONG, F.; TANG, J.; GENG, R.; HU, H. et al. Comparison of the efficacy of bone marrow
 802 mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep
 803 model. *International Journal Clinical Exp Pathology*. v.7, n. 4, p. 1415–1426, 2014.

804 TAJIMA, S.; TOBITA, H.; ORBAY, H.; HYAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. Direct and Indirect
 805 Effects of a Combination of Adipose-Derived Stem 586 Cells and Platelet-Rich Plasma on Bone
 806 Regeneration. *Tissue engineering. Part A*, v. 0, n. 0, 587 p. 1–11, 2014.

807 TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; Induction of pluripotent stem cells from adult
 808 human fibroblasts by defined factors. *Cell*. v.131, p. 1-12, 2007.

- 809 TAKEMITSU, H.; ZHAO, D.; YAMAMOTO, I.; HARADA, Y.; MICHISHITA, M.; ARAI,
810 T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells.
811 BMC Veterinary Research. v.8, p. 150, 2012.
- 812 TALHEDEN, T. et al. Human serum for culture of articular chondrocytes. *Cell Transplant.* v.
813 14, n. 7, p. 469-479, 2005.
- 814 TER HUURNE, M.; SCHELBERGEN, R.; BLATTES, R.; BLOM, A.; et al. Antiinflammatory
815 and chondroprotective effects of intra articular injection of adipose-derived stem cells in
816 experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, v. 64, n. 11, p. 3604-3613, 2012.
- 817 TOGHRAIE, F. S., CHENARI, N., GHOLIPOUR, M. A., FAGHIH, Z. et al. Treatment of
818 osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in rabbit. *The Knee* v.
819 18, p.71–75, 2011.
- 820 VAN BUUL, G. M.; SIEBELT, M.; LEIJS, M. J.; BOS P. K. Mesenchymal stem cells reduce
821 pain but no degenerative changes in a mono-iodoacetate rat model of osteoarthritis
822 *Journal Orthopaedic Research*, v.32, n. 9, p. 1167-74, 2014.
- 823 VIDOTTO, V. T.; ROCHA, R. T.; PAIVA, C. L.; NARDOTTO, J. R. et al. Estudo comparativo
824 do uso de meloxicam por via intra-articular e sistêmica no controle da osteoartrite
825 experimentalmente induzida em joelho de coelhos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v.48, n.6,
826 p. 524–531, 2013.
- 827 VIEIRA, N. M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M. et al. Isolation,
828 characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell*
829 *transplantation*, v. 19, n.3, p. 279–289, 2010.
- 830 VILAR, J. M.; MORALES, M.; SANTANA, A.; SPINELLA, G. et al. Controlled, blinded force
831 platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived
832 mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC Veterinary*
833 *Research*, v.9, n.131. 2013.
- 834 VINATIERA, C.; GUICHEUXA, J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem
835 cells to osteoarthritis treatments. *Physical and Rehabilitation Medicine*. v. 59, n. 3, p. 139–144,
836 2016.
- 837 WAN, W.; LI, Q.; GAO, H.; GE, L.; et al. BMSCs laden injectable amino-diethoxypropane
838 modified alginate-chitosan hydrogel for hyaline cartilage reconstruction. *Journal of Materials*
839 *Chemistry B*, v.3, n.9, p. 1990-2005, 2015.

- 840 WEI, C. C.; LIN, B.; HUNG, S.C. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine for
841 Musculoskeletal Diseases: Bench, Bedside, and Industry. *Cell Transplantation*, v. 23, p. 505–
842 512, 2014.
- 843 WHITWORTH, D. J.; BANKS, T. A. Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient
844 or premature? *The Veterinary Journal*. v. 202, n. 3, p. 416-424, 2014.
- 845 ZAK, L.; KRUSCHE-MANDL, I.; ALDRIAN, S. Clinical and MRI evaluation of medium- to
846 long-term results after autologous osteochondral transplantation (OCT) in the knee joint. *Knee
847 Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*,. v. 22, n. 6, p. 1288-1297, 2014.
- 848 ZHANG, N.; DIETRICH, M. A.; LOPEZ, M. J. Canine intra-articular multipotent stromal cells
849 (MSC) from adipose tissue have the highest in vitro expansion rates, multipotentiality, and
850 MSC immunophenotypes. *Veterinary Surgery*, v. 42, n. 2, p. 137–146, 2013.
- 851 ZORZI, A. R.; AMSTALDEN, E. M. I.; PLEPIS, A. M. G.; MARTINS, V. C. A. et al. Effect of
852 Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells on the Regeneration of Ovine Articular
853 Cartilage. *International Journal Molecular Science*, v. 16, p. 26813–2683, 2015.
- 854 ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J. et al. Multilineage cells from human adipose
855 tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, v.7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ANEXO 1

Normas Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

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 Committee” (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.

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**.

Seções de um artigo

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

Autores e Filiação: 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: Explicação 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. 6.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/critca16.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/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.