



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Fagner de Moraes de Oliveira

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E DA
MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA, NA REPARAÇÃO
OSTEOCONDRA DO JOELHO DE COELHOS**

*(Influence of mesenchymal stem cells and fibrin rich plasma membrane, in osteochondral
repair of rabbit knee)*

**Curitiba, PR
Julho de 2017**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

O48i
2017
Oliveira, Fagner de Moraes de
Influência das células-tronco mesenquimais e da membrana de plasma rico em fibrina, na reparação osteocondral do joelho de coelhos = *Influence of mesenchymal stem cells and fibrin rich plasma membrane, in osteochondral repair of rabbit knee* / Fagner de Moraes de Oliveira ; orientador: José Ademar

Villanova Júnior. -- 2017
44 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2017
Bibliografia: f. 37-42

1. Cartilagem articular. 2. Medula óssea. 3. Fibrina. 4. Terapia celular.
5. Microscopia. I. Villanova Júnior, José Ademar. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
III. Título.

CDD 20. ed. – 611. 0183

Fagner de Moraes de Oliveira

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E DA
MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA, NA REPARAÇÃO e
OSTEOCONDAL EM JOELHO DE COELHOS**

(Influence of mesenchymal stem cells and fibrin rich plasma membrane, isolated and associated in osteochondral repair of rabbit knee)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: José Ademar Villanova Jr.

**CURITIBA
JULHO 2017**

TERMO DE APROVAÇÃO

FAGNER DE MORAES DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E DA MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA, ISOLADAS E ASSOCIADAS NA REPARAÇÃO OSTEOCONDAL DO JOELHO DE COELHOS

Aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 0999 - 1ª versão (ANEXO 1).

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. José Ademar Villanova Junior
Orientador – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, PUCPR

Profª Drª Rosangela Locatelli Dittrich
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFPR

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio
Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP Campus São Paulo e Biociência Animal, Campus Pirassununga

Curitiba, 10 de julho de 2017.

Dedicatória

Dedico primeiramente essa dissertação a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível e pelo seu amor colocou todas essas pessoas que citarei abaixo em minha vida.

Dedico essa dissertação a minha filha Agatha Amanda de Camargo de Oliveira, mesmo pela minha ausência sempre me ama e espero que um dia entenda que todo sacrifício é para tê-la mais perto.

Dedico essa dissertação a minha esposa Jenifer Franciele Grein de Oliveira pela paciência e por sempre me apoiar e acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditava. Amo você.

Dedico esta dissertação a minha mãe Natalina Aparecida de Moraes por ser um exemplo, minha meta como pessoa e por nunca deixar de demonstrar o seu amor por mim.

Dedico esta dissertação ao Sr. Major Agobar Josino de Oliveira, por todas as flexões e polichinelo após um erro meu, pois assim me ensinou que para cada escolha existe uma consequência e não importa se ela será boa ou ruim, o importante é que estarei mais forte a cada dia. Obrigado pai.

Dedico essa dissertação a minha avó Maria da Cruz Moraes por sempre demonstrar orgulho imenso pelo neto, sempre me fez ser um homem reto e justo para nunca a decepcionar.

Dedico essa dissertação a Silvia Aparecida de Moraes e a Sonia Aparecida de Moraes, que nos momentos mais difíceis de nossas vidas me colocaram em primeiro lugar e me apoiaram para que eu sempre continuasse estudando.

Agradecimentos

Agradeço o meu orientador, Prof. Dr. José Ademar Villanova Jr., por sempre depositar muita confiança em minha pessoa e me tratar como um filho, tanto se preocupando como chamando a minha atenção, meu exemplo de profissional e pessoa.

Meus agradecimentos a Dr. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto por seu profissionalismo, dedicação, prestatividade e bom humor que sempre marcaram nossos encontros.

A Duaila Ledur Bona e a Juliana Cláudio Wenceslau da empresa BmdCon que nos doaram as membranas de plasma rico em fibrina. Participaram ativamente dos experimentos, e para isto, cancelaram atendimentos para o bom andamento da presente dissertação.

A Leticia Fracaro e Felipe Yukio Ishikawa Fragoso representando aqui toda a equipe o Núcleo de Terapia Celular da PUCPR, foram muito prestativos nas diversas fases da dissertação, nunca apresentaram desprazer ou má vontade.

Ao Prof. Dr. Luiz Guilherme Achcar Capriglione e sua equipe de anestesistas por abraçarem nosso projeto, não mediram esforços para que pudéssemos cumprir as metas diárias propostas.

Ao Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii que tantos nos ensinou e contribui de forma determinante na análise dos resultados. Sempre disposto mesmo com sua agenda lotada.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Coágulo de fibrina e a membrana de plasma rico em fibrina (MPRF).....	15
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 1: Imagem do molde metálico usado para padronizar o tamanho das lesões.	27
Figura 2: Etapas de produção de membrana de plasma rico em fibrina.	28
Figura 3. Mensurações das lesões e contagens de condrócitos e condroblastos.....	29
Figura 4. Diferenciação <i>in vitro</i> das células-tronco derivadas da medula óssea (CTMO) após 21 dias de cultivo.	31
Figura 5. Gráfico da densidade de condrócitos.	32
Figura 6. Gráfico da densidade de condroblastos.....	32
Figura 7. Gráfico da densidade das células totais.	33
Figura 8. Gráfico do comprimento da lesão.	33
Figura 9: Gráfico da distribuição dos escores de cada critério entre os grupos.....	35

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Escala de avaliação histopatológica de cartilagem.	30
Tabela 1. Resultados das densidades de condrócitos e condroblastos do Grupo 0 e dos tecidos regenerados e adjacentes dos Grupos A, B, C e D.	32
Tabela 2. Resultados dos valores de critérios histológicos para cartilagem articular, estabelecidos por Chen et al. (2016) dos animais pertencentes aos Grupos A (controle), B (CTMO), C (MPRF) e D (CTMO + MPRF).....	34
Tabela 3. Distribuição dos escores em número de indivíduos (n) e sua porcentagem para cada um dos critérios.	35

LISTA ABREVIATURAS

Bid - *Bis in die*
CL - Comprimento da lesão
CN - Comprimento do tecido normal
CTMs - Células-tronco mesenquimais
CTMO - Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
DCB – Densidade de condroblasto
DCD – Densidade de condrócito
DT – Densidade de células totais
DL - Densidade de condrócitos da lesão
DMEM - Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DN - Densidade de condrócitos normais
EGF - Fator de crescimento epidérmico
FGF-2 - Fator de crescimento de fibroblastos tipo 2
FGF-18 - Fator de crescimento de fibroblastos tipo 18
FGFs - Fatores de crescimento de fibroblastos
HE - Hematoxilina – eosina
ICRS - *International Cartilage Repair Society*
IGFs - Fatores de crescimento semelhantes à insulina
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1 β - Interleucina 1 β
IL-6 - Interleucina 6
IL-8 - Interleucina 8
IM – Intramuscular
MEC - Matriz extracelular cartilaginosa
MMPs - Metaloproteinases
MPRF - Membrana de plasma rico em fibrina
NO - Óxido nítrico
PBS - Tampão salina fosfatada
PDGFs - Fatores de crescimento derivados de plaquetas
PGE2 - Prostaglandina E2
PRP - Plasma rico em plaquetas
SBF - Soro bovino fetal
Sid - *Semel in die*.
TGF - Fatores de crescimento transformantes
TGF- β 1 - Fator de crescimento transformante-beta-1
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

A presente dissertação está dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda o estado da arte das lesões e reparações osteocondrais, bem como das terapias usadas atualmente e o potencial das células-tronco mesenquimais e da membrana de plasma rico em fibrina nestes tipos de lesões. O segundo capítulo avalia a influência das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMO) e da membrana de plasma rico em fibrina (MPRF), isoladas ou associadas na reparação osteocondral do joelho de coelhos. O estudo mostra que a associação de CTMO e MPRF nas proporções avaliadas, 5×10^6 de CTMO e MPRF de $0,5 \times 1$ cm resultante de 8 ml de sangue total, foi superior aos tratamentos isolados na diminuição da lesão iatrogênica. Em todos os grupos a densidade de condrócitos tanto do tecido regenerado como do tecido adjacente foi maior que a densidade observada no Grupo 0, já a densidade de condroblastos todos os grupos foi menor que a densidade observada no Grupo 0. Em relação ao escore total e itens isolados pertencentes à graduação de *International Cartilage Repair Society*, não foi observada diferença estatística entre os Grupos A, B, C e D. Conclui-se que a associação de CTMO e MPRF foi mais eficiente em diminuir a lesão iatrogênica do que a reparação natural e suas utilizações isoladas. Mesmo sem diferença estatística a associação da CTMO e da MPRF apresentou uma avaliação histológica mais uniforme. Esse estudo será submetido à avaliação da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Palavras-chave: cartilagem articular, osso, medula óssea, fibrina, terapia celular, microscopia.

ABSTRACT

This dissertation is divided into two chapters. The first chapter deals with the state of the art of osteochondral lesions and repairs, as well as the therapies currently used and the potential of mesenchymal stem cells and fibrin-rich plasma membrane in these types of lesions. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow and fibrin-rich plasma membrane, isolated or associated in the osteochondral repair of the knee of rabbits. The study shows that the association of CTMO and MPRF in the proportions evaluated, 5×10^6 de CTMO e MPRF de $0,5 \times 1$ cm resulting from 8 ml of whole blood, was higher than the treatments isolated in the reduction of the iatrogenic lesion. In all groups the chondrocyte density of both the regenerated tissue and the adjacent tissue was greater than the density observed in Group 0, whereas the chondroblasts density in all groups was lower than the density observed in Group 0. In relation to the total and Isolated items belonging to the *International Cartilage Repair Society* graduation, no statistical difference was observed between Groups A, B, C and D. It was concluded that the association of CTMO and MPRF was more efficient in decreasing the iatrogenic injury than the natural repair and their isolated uses. Even without statistical difference, the association of CTMO and MPRF presented a more uniform histological evaluation. This study will be submitted to the evaluation of the Brazilian Journal of Veterinary Research.

Key words: articular cartilage, bone, bone marrow, fibrin, cell therapy, microscopy.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	13
CAPÍTULO 2	22
2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	26
2.2.1 Animais	26
2.2.2 Técnicas anestésica e cirúrgica.....	Erro! Indicador não definido.
2.2.3 Isolamento, cultivo e caracterização das células-tronco da medula óssea (CTMO)	26
2.2.4 Diferenciação celular.....	27
2.2.4.1 Diferenciação adipogênica e osteogênica.....	27
2.2.4.2 Diferenciação condrogênica	27
2.2.5 Transplante intra-articular de CTMO.....	28
2.2.6 Produção e colocação de MPRF sobre a lesão.	28
2.2.7 Cuidados pós-operatórios	29
2.2.8 Eutanásia dos animais	29
2.2.9 Análise histológica da área de sulcoplastia troclear por abrasão.....	30
2.2.10 Análises estatísticas	31
2.3 RESULTADOS	32
2.3.1 Contagem, viabilidade e diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMO)	32
2.3.2 Densidade de condrócitos e condroblastos.....	32
2.3.3 Comprimento da lesão.....	34
2.3.4 Avaliação histológica.	35
2.4 DISCUSSÃO.....	37
2.5 CONCLUSÕES.....	38
2.6 REFERÊNCIAS.....	38
ANEXO 1	44
ANEXO 2	45

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

A cartilagem é um tecido conjuntivo de origem mesenquimal formada por células chamadas de condroblastos e pela matriz extracelular que a diferencia em três tipos de cartilagem: hialina, elástica e fibrocartilagem. A cartilagem hialina é encontrada nas fossas nasais, brônquios, traqueia e nas articulações (KIERSZENBAUM, et al. 2012).

A cartilagem articular apresenta características físicas particulares por ter resistência às forças que atuam sobre as articulações e é capaz de absorvê-las deformando-se, devido a sua elasticidade tem capacidade de retornar à forma anterior (resiliência). Quando a cartilagem articular é submetida à ação dessas forças, o líquido intersticial faz a primeira resistência hidrostática e se distribui para outros pontos do tecido ocorrendo assim a deformação inicial (LEITE e FALOPPA, 2013).

Ela se comporta como uma esponja resistente: quando comprimida, deforma-se com saída de líquido e catabólitos; cessada a ação dessas forças, retorna a sua forma original pela entrada do líquido sinovial que traz nutrientes, hormônios e eletrólitos para dentro da matriz extracelular, de onde são absorvidos pelos condrocitos (LEITE e FALOPPA, 2013). Por ser avascular e sem redes linfáticas ou nervosas (DENNY e BUTTERWORTH, 2006) a sua nutrição ocorre por embebição do líquido sinovial (LEITE e FALOPPA, 2013).

Uma lesão articular mecânica ou química não é reconhecida pelo organismo antes que ocorra a reação sinovial. Lesões superficiais tem baixa capacidade de regeneração, alguns agentes usados para tratar doença sinovial podem ser prejudiciais à cartilagem articular (p. ex., corticosteroides no tratamento da artrite reumatoide), e não são detectados pelas células cartilaginosas devido à ausência de terminações nervosas. A insuficiência de vasos sanguíneos torna impossível o processo de reparo inflamatório após o traumatismo antes que lesões profundas invadam o osso subcondral (SCHULZ, 2013).

A condrogênese ocorre por dois mecanismos: 1) intersticial, a partir dos condrocitos do interior da matriz extra-articular, e 2) aposicional, a partir das células-tronco progenitoras da superfície ou na porção mais profunda do tecido cartilaginoso

(KIERSZENBAUM, et al. 2012; JIANG e TUAN, 2015). Apesar disso, as lesões superficiais da cartilagem articular que não envolvem o osso subcondral, têm pouca capacidade intrínseca de reparação (BRINKER et al., 2009; LEITE e FALOPPA, 2013).

Dentre os tratamentos clínicos utilizados na rotina para osteoartrites estão a fisioterapia, acupuntura, eletroestimulação, anti-inflamatórios não esteroidais, opioides ou opiáceos, além de regeneradores articulares (FANTONI, 2011; JOHNSON, 2013).

Baseando-se no conceito de regenerador articular aquele que promove a reconstituição/reorganização de tecidos articulares, diferentes moléculas têm sido testadas com o propósito de promover a reconstituição cartilaginosa e consequente melhoria do líquido sinovial. Dentre elas estão os compostos da sucupira-branca (CARVALHO, et al. 1999; LORENZI e MATOS, 2002; CRAGG e NEWMAN, 2005), maca peruana (MILLER et al., 2006; CHRUBASIK et al., 2007; MAROON et al., 2006; TOEGEL et al., 2007), sulfato de condroitina (LARGO et al., 2010; SCHULZ, 2013; RAYNAULD et al., 2016), sulfato de glucosamina (MELO et al., 2008; REZENDE e GOMES, 2009), diacereína (NGANVONGPANIT et al., 2015, MARTEL-PELLETIER et al., 2010) e metilsulfonilmetano (TAMURA et al., 2002).

Os resultados obtidos com tratamentos citados acima se limitam a melhoras clínicas como diminuição da dor, melhora da motricidade, mas sem comprovação de estimular ou promover a regeneração do tecido osteocondral. Como uma alternativa para o tratamento de defeitos da cartilagem articular as terapias celulares têm sido propostas por diversos autores (MATSUMOTO, et al. 2010; FILARDO, et al. 2013; WANG, et al. 2015).

CÉLULAS-TRONCO

Células tronco são células com duas características importantes: capacidade de diferenciação em vários tipos de células “maduras” (multipotentes) e de repor o pool de células tronco (autorrenovação), para manter o desenvolvimento do tecido (Nombela-Arrieta et al., 2011). As células-tronco mesenquimais (CTMs), são células-tronco adultas, multipotentes (KIM et al., 2015) e dentre as suas suas funções *in vivo* esta estabilizar os vasos sanguíneos e contribuir para a homeostase tecidual e agir como agentes imunomediadores (Nombela-Arrieta et al., 2011).

Estas células secretam fatores bioativos que protegem e reparam o tecido danificado, além dos efeitos antiapoptóticos, inibitórios da cicatriz, estimulador da angiogênese e mitogênico para células progenitoras intrínsecas do tecido (CAPLAN; DENNIS, 2006; KUSUMA et al., 2017). Há também a secreção de moléculas quimioatrativas pelas CTMs que podem recrutar outros tipos celulares para o reparo do tecido lesionado (KINNAIRD et al., 2004).

Embora a fonte de tecido influencie o potencial de diferenciação, as CTMs podem ser encontradas e isoladas de vários locais, incluindo medula óssea, tecido adiposo, sinóvia, polpa dentária, ligamento periodontal, matriz de cordão umbilical e outros tecidos mesenquimais (ROUBELAKIS et al. 2007; BOEUF e RICHTER, 2010).

Sob indução apropriada ou condições ambientais, as CTMs podem ser diferenciadas em múltiplas linhagens de células tais como odontoblastos, osteoblastos, adipócitos, neurônios, melanócitos e condrócitos (LV et al. 2014).

As CTMs isolada de sangue de cordão umbilical se apresentam com um bom potencial condrogênico (PIEVANI et al., 2014).

Em cães a utilização de CTMO em animais com osteoartrite apresentou uma melhora clínica e uma melhora na qualidade de vida desses animais (HARMAN, et al., 2016) o mesmo foram observados em humanos (JO et al., 2017).

Estudos em cabras (JÜLKE et al. 2015), ovelhas (AL FAQEH et al. 2012), coelhos (HORIE, et al. 2012) e ratos (OKUNO et al. 2014) demonstraram a capacidade das CTMs aumentar a regeneração da cartilagem e menisco. Estudos mostram que as CTMs têm a função de modular a resposta local de células T e aumentar a regeneração tecidual. (LE BLANC E RINGDEN, 2007)

MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA

A membrana de plasma rico em fibrina (MPRF) foi desenvolvida na França, por Joseph Choukroun, para uso específico em cirurgia oral e maxilofacial (ANITUA, 2006; CHOUKROUN, 2006; DOHAN, 2006), o uso da MPRF autóloga na cirurgia oral e maxilofacial favoreceu a cicatrização óssea e a fixação de implantes odontológicos (DOHAN, 2006).

A MPRF é um concentrado de leucócitos e plaquetas de segunda geração, derivada de plasma rico em plaquetas (PRP) [EHRENFEST et al., 2010; YANG, et

al. 2012] obtida da centrifugação, com baixa rotação, do sangue sem anticoagulante ou aditivos. Após a centrifugação obtêm-se um coágulo de fibrina (Figura 1A) que após a drenagem do excesso de soro se tornar uma MPRF composta de duas partes principais, observáveis a olho nu (Figura 1B): uma porção de fibrina amarela e uma porção avermelhada localizada na extremidade onde estão os glóbulos vermelhos. Entre estas duas áreas, uma camada esbranquiçada denominada "camada leucocitária".

Nos estudos de Ehrenfest et al. (2010) as MPRF foram processadas para exame por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura com o objetivo de realizar um exame detalhado da composição e arquitetura da MPRF. Foi demonstrado no estudo que aproximadamente 97% das plaquetas e acima de 50% dos leucócitos estavam concentrados na MPRF e mostraram uma distribuição tridimensional específica.

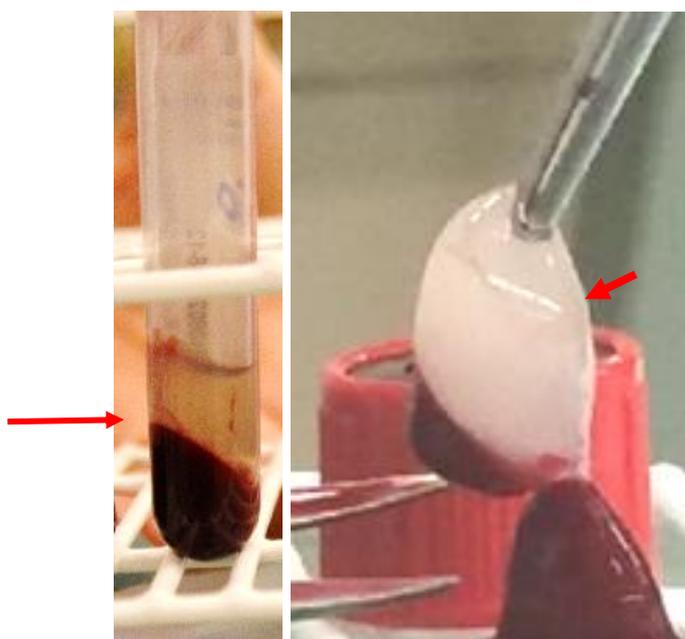


Figura 1: Coágulo de fibrina e a membrana de plasma rico em fibrina (MPRF). A) Aspecto do coágulo de fibrina dentro do tubo sem anticoagulante ou aditivos após a centrifugação (seta maior). B) Retirando a MPRF [seta menor] e retirando o excesso de coágulo.

Uma ampla gama de eventos intra e extra-articulares e várias proteínas de sinalização medeiam e regulam o processo de cicatrização de tecidos duros e moles. Ainda não se entende todo esse processo, no entanto, sabe-se que as plaquetas desempenham papel crucial não só na hemostasia, mas também no processo de cicatrização de feridas (GASSLING, 2009). A MPRF é um método de concentração

de plaquetas no formato de uma membrana autóloga (DOHAN, 2006). A MPRF consiste em uma membrana de fibrina com alto potencial de reparação de lesão devido a concentração de fatores de crescimento (ANITUA, et al. 2004).

A hipótese deste estudo é que o transplante de CTMs, devido ao seu potencial de diferenciação celular e liberação de fatores bioativos, e da MPRF, que atua no processo de cicatrização, possam auxiliar na regeneração cartilaginosa após lesão traumática.

O objetivo da presente dissertação é avaliar histologicamente e morfometricamente os efeitos do uso de CTMO e da de MPRF separados e associados em lesões osteocondrais iatrogênicas, usando o coelho como modelo animal.

Referências bibliográficas

AL FAQEH, H., HAMDAN, B. M. Y. N., CHEN, H. C., AMINUDDIN, B. S., RUSZYMAH, B. H. I. 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*, 47(6):458-464. 2012.

BOEUF, S.; RICHTER, W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem cell res ther.* 1:31. 2010.

BRINKER, W. O.; PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. *Ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais.* São Paulo: manole. 4:28–179. 2009.

CARVALHO, J. C. T.; SERTIÉ, J. A. A.; BARBOSA, M. V. J.; PATRÍCIO, K. C. M.; CAPUTO, L. R. G.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory activity of the crude extract form the fruits of *pterodon emarginatus* vog. *Journal of ethnopharmacology.* 64:127-133. 1999.

CHRUBASIK, J. E.; ROUFOGALIS, B. D.; CHRUBASIK, S. Evidence Of Effectiveness Of Herbal Antiinflammatory Drugs In The Treatment Of Painful Osteoarthritis And Chronic Low Back Pain. *Phytotherapy Research.* 21:675–683. 2007.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology.* 100(25):72-79. 2002.

EHRENFEST, D. M. D.; CORSO, M. D.; DISS, A.; MOUHYI, J.; CHARRIER. J.B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol.* 81(4):546-555. 2010.

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. *A guide to canine and feline orthopaedic surgery* (4th edition). Blackwell Science, Oxford.4:29-73. 2000.

DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S. L.; DOHAN, A. J. J.; MOUHYI, J.; GOGLY, B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101(3): 37-449. 2006.

FILARDO, G.; MADRY, H.; JELIC, M.; ROFFI, A.; CUCCHIARINI, M.; KON, E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee surg sports traumatol arthrosc.* 21:1717–1729. 2013.

GASSLING, V. L.; AÇIL, Y.; SPRINGER, I. N.; HUBERT, N.; WILTFANG, J. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 108: 48-55. 2009.

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. *Frontiers in Veterinary Science*. 3:81. 2016

JIANG, Y.; TUAN R. S. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 11:206–212. 2015.

JO, C. H., CHAI, J. W., JEONG, E. C., OH, S., SHIN, J. S., SHIM, H., & YOON, K. S. Intra-articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A 2-Year Follow-up Study. *The American Journal of Sports Medicine*, 0363546517716641. 2017.

JOHNSON, A. L. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management. In: Fossum, T. W. *Small animal surgery*. Philadelphia: Elsevier. 4:1033–1105. 2013.

JÜLKE, H., MAINIL-VARLET, P., JAKOB, R.P., BREHM, W., SCHÄFER, B., NESIC, D. The role of cells in meniscal guided tissue regeneration: a proof of concept study in a goat model. *Cartilagem*, 6(1):20-29. 2015.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. *Histologia e biologia celular: uma introdução a patologia*. Rio de Janeiro: Elsevier. 3:128-129. 2012.

KUSUMA G. D., CARTHEW J., LIM R., & FRITH J. E. 2017. Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect. *Stem cells and development*, 26(9), 617-631.

LARGO, R.; ROMAN-BLAS, J.; MORENO-RUBIO, J.; SÁNCHEZ-PERNAUTE, O.; MARTÍNEZ-CALATRAVA, M. J.; CASTAÑEDA, S.; HERRERO-BEAUMONT, G. Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen-induced arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 18 (Suppl 1). 2010.

LE BLANC, K., & DAVIES, L. C. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunology letters*, 168(2), 140-146. 2015.

LEITE, M. N.; FALOPPA, F. *Propedêutica ortopédica e traumatologia*. Porto Alegre: artmed, 1:24-30. 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 1:544. 2002.

LV, F.J.; TUAN, R. S.; CHEUNG, K. M.; LEUNG, V. Y. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 32:1408–1419. 2014.

MAROON, J. C.; BOST, J. W.; BORDEN, M. K.; LORENZ, K. M.; ROSS, N. A. Natural antiinflammatory agents for pain relief in athletes. *Neurosurgery Focus*. 21(4):1-13. 2006.

MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P. Effects of diacerein on the molecular level in the osteoarthritis disease process. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2:95-104. 2006.

MATSUMOTO, T.; OKABE, T.; IKAWA, T.; IIDA, T.; YASUDA, H.; NAKAMURA, H.; WAKITANI, S. Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. *J cell physiol.* 225:291–295. 2010.

MELO, E. G.; NUNES, V. A.; REZENDE, C. M. F.; GOMES, M. G.; MALM, C. GHELLER, V. A. Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa em cães. Estudo histológico da cartilagem articular e membrana sinovial. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(1):83-92. 2008.

MILLER, M. J. S.; AHMED, S.; BOBROWSKI, P.; HAQQI, T. M. The chondroprotective actions of a natural product are associated with the activation of IGF-1 production by human chondrocytes despite the presence of IL-1 β . *Bmc Complementary And Alternative Medicine*. 6(3):1-10. 2006.

NOMBELA-ARRIETA, C., RITZ, J., & SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(2): 126. 2011.

NGANVONGPANIT, K.; BOONSRI, B.; SRIPRATAK, T.; MARKMEE, P.; KONGTAWELERT, P. Clinical study on the effects of diacerein and diacerein combined with chondroitin sulfate on canine hip osteoarthritis. *Kafkas Univ. Vet Fak Derg.* 20(3):383-392. 2014.

OKUNO, M., MUNETA, T., KOGA, H., OZEKI, N., NAKAGAWA, Y., TSUJI, K., YOSHIYA, S. AND SEKIYA, I. Meniscus regeneration by syngeneic, minor mismatched, and major mismatched transplantation of synovial mesenchymal stem cells in a rat model. *J. Orthop. Res.* 32:928–936. 2014.

PIEVANI, A., SCAGLIOTTI, V., RUSSO, FM, AZARIO, I., RAMBALDI, B., SACCHETTI, B., et al. Comparative analysis of multilineage properties of mesenchymal stromal cells derived from fetal sources shows an advantage of mesenchymal stromal cells isolated from cord blood in chondrogenic differentiation potential. *Cytotherapy*, 16(7), 893-905. 2014.

RAYNAULD, J. P.; PELLETIER, J. P.; ABRAM F.; DELORME P.; MARTEL-PELLETIER, J. Long- term effects of glucosamine/chondroitin sulfate on the progression of structural changes in knee osteoarthritis: 6-year follow-up data from the osteoarthritis initiative. *Arthritis Care Research*. 68(10):1560-1566.2016.

REZENDE, M. U.; GOMES, R. G. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 44(1):14-19. 2009.

ROUBELAKIS, M. G.; PAPPA, K. I.; BITSIKA, V.; ZAGOURA, D.; VLAHOU, A.; PAPADAKI, H. A.; ANTSAKLIS, A.; ANAGNOU, N. P. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 16 (6): 931-952. 2007.

SCHULZ, K. S. Diseases of the joints. In: Small animal surgery. Philadelphia: Elsevier, 4:4:1215–1374.

TAMURA, T.; SHIRAI, T.; KOSAKA, N.; OHMORI, K.; TAKAFUMI, N. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *European journal of pharmacology*. 448:81–87. 2002.

TOEGEL, S.; HUANG, W. W.; PIANA, C.; UNGER, F. M.; WIRTH, M.; GOLDRING, M. B.; GABOR, F.; VIERNSTEIN, H. Setecion of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action. *BMC Molecular Biology*. v. 8, n.13. 2007, p. 1-10.

YANG, K.C.; WANG, C.H.; CHANG, H.H.; CHAN, W.P.; CHI, C.H.; KUO, T.F.. Fibrin glue mixed with platelet-rich fibrin as a scaffold seeded with dental bud cells for tooth Regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 6: 777–785. 2012.

WANG, Y.; YUAN, M.; GUO. Q. Y; LU, S. B.; PENG, J. Mesenchymal stem cells for treating articular cartilage defects and osteoarthritis. *Cell transplant*. 24:1661–1678. 2015.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS E ASSOCIADAS À MEMBRANA DE PLASMA RICO EM FIBRINA NA REPARAÇÃO OSTEOCONDAL DO JOELHO DE COELHOS

Influence of mesenchymal stem cells isolated and associated with fibrin rich plasma membrane in osteocondral repair of the knee of rabbits

RESUMO

Neste estudo foi avaliada a influência das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMO) e da membrana de plasma rico em fibrina (MPRF) na reparação osteocondral do joelho de coelhos. Foram avaliados 51 coelhos da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, pesando em média 4 kg, com idade média de sete meses. Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: Grupo 0 (controle imediato): 7 animais submetidos à remoção de flape cartilaginoso até a exposição do osso subcondral da tróclea femoral, por meio de sulcoplastia por abrasão de 0,3 (largura) x 0,9 (comprimento) cm; Grupo A (controle 60 dias): 11 animais submetidos ao mesmo procedimento do Grupo 0; Grupo B (células-tronco): 11 animais submetidos ao mesmo procedimento do Grupo 0 e transplante de 5×10^6 de CTMO no local da lesão; Grupo C (membrana de plasma rico em fibrina): 11 animais submetidos ao mesmo procedimento do Grupo 0 e colocação de MPRF sobre a lesão e Grupo D (CTMO + MPRF): 11 animais submetidos ao mesmo procedimento do Grupo 0 e transplante de 5×10^6 de CTMO no local da lesão, cobertas com MPRF. Animais do Grupo 0 foram submetidos à eutanásia logo após remoção do flape cartilaginoso, enquanto que os animais dos Grupos A, B, C e D foram submetidos à eutanásia após 60 dias da remoção do flape cartilaginoso e terapia estabelecida. Por meio da morfometria e análise histológica foi possível avaliar se houve diminuição do comprimento da lesão e aumento da densidade de condrócitos e condroblastos no tecido regenerado e no tecido adjacente. No presente estudo, pode-se observar que a associação dos tratamentos foi superior aos tratamentos isolados na diminuição da lesão iatrogênica. Em todos os grupos a densidade de condrócitos tanto do tecido regenerado como do tecido adjacente foi maior que a densidade observada no Grupo 0, já a densidade de condroblastos todos os grupos foi menor que a densidade observada no Grupo 0. Em relação ao escore total e itens isolados pertencentes à graduação de *International Cartilage Repair Society*, não foi observada diferença estatística entre os Grupos A, B, C e D. Conclui-se que a associação de CTMO e MPRF foi mais eficiente em diminuir a lesão iatrogênica do que a reparação natural e suas utilizações isoladas. Mesmo sem diferença estatística a associação da CTMO e da MPRF apresentou uma avaliação histológica mais uniforme.

Palavras-chave: cartilagem articular; medula óssea; fibrina; terapia celular; terapia tecidual.

ABSTRACT

This study evaluated the influence of bone marrow mesenchymal stem cells (CTMO) and fibrin-rich plasma membrane (MPRF) on the osteochondral repair of the rabbit knee. We evaluated 51 New Zealand male and female rabbits weighing on average 4 kg, with an average age of seven months. The animals were randomly divided into five groups: Group 0 (immediate control): 7 animals submitted to removal of cartilaginous flap until exposure of the subchondral bone of the femoral trochlea, by abrasion sulcoplasty of 0.3 (width) x 0,9 (length) cm; Group A (control 60 days): 11 animals submitted to the same procedure as Group 0; Group B (stem cells): 11 animals submitted to the same Group 0 procedure and 5×10^6 CTMO transplantation at the lesion site; Group C (fibrin-rich plasma membrane): 11 animals submitted to the same procedure of Group 0 and placement of MPRF on the lesion and Group D (CTMO + MPRF): 11 animals submitted to the same procedure of Group 0 and transplantation of 5×10^6 of CTMO at the site of injury, covered with MPRF. Group 0 animals were submitted to euthanasia shortly after removal of the cartilaginous flap, while the animals of Groups A, B, C and D were submitted to euthanasia after 60 days of cartilage flap removal and established therapy. Through morphometry and histological analysis, it was possible to evaluate if there was a decrease in lesion length and an increase in the density of chondrocytes and chondroblasts in the regenerated tissue and adjacent tissue. In the present study, it can be observed that the association of the treatments was superior to the isolated treatments in the reduction of the iatrogenic lesion. In all groups the chondrocyte density of both the regenerated tissue and the adjacent tissue was greater than the density observed in Group 0, whereas the chondroblasts density in all groups was lower than the density observed in Group 0. In relation to the total and Isolated items belonging to the International Cartilage Repair Society graduation, no statistical difference was observed between Groups A, B, C and D. It was concluded that the association of CTMO and MPRF was more efficient in decreasing the iatrogenic injury than the natural repair and their isolated uses. Even without statistical difference, the association of CTMO and MPRF presented a more uniform histological evaluation.

Keywords: articular cartilage; Bone marrow; fibrin; Cell therapy; Tissue therapy.

2.1 INTRODUÇÃO

A cartilagem é um tecido conjuntivo de origem mesenquimal com células chamadas de condrócitos. A cartilagem hialina é encontrada nas fossas nasais, brônquios, traqueia e nas articulações. Hialina vem do grego *hyalos* que significa vítreo (Kierszenbaum, et al. 2012) leva esse nome devido a sua aparência macroscópica ser branca, lisa, brilhante e translúcida, é também avascular e sem redes linfáticas ou nervosas (Denny e Butterworth, 2006, Leite e Faloppa, 2013).

Em situações normais, figuras mitóticas não são observadas na cartilagem articular de animais adultos. Nas lacerações da cartilagem articular ou na artrose, contudo, o condrócito pode reiniciar a síntese de DNA e a divisão celular, possivelmente por meio da liberação da supressão biológica do sistema de replicação (Denny e Butterworth, 2006; Hulse e Hyman, 2007).

No estudo realizado por Brinker et al. (2009) em coelhos, foi observado que lacerações superficiais não cicatrizaram nem progrediram a distúrbios mais graves um ano após a lesão. Quando as lesões eram profundas e invadiram o osso subcondral, um tecido reparador de granulação invadiu o defeito, que então se transformou em fibrocartilagem por metaplasia. O resultado final, anos após a lesão, foi a presença de cartilagem de coloração alterada e depressão grosseira circundada por cartilagem hialina lisa.

Caso as lacerações nos animais adultos estejam limitadas às camadas superiores da cartilagem articular avascular, nenhuma inflamação ou cicatrização eficaz pode ocorrer, a atividade mitótica certamente ocorre, porém cessa uma semana após o início da lesão (Brinker et al., 2009; Schulz, 2013).

Nas lesões na cartilagem articular, os condrócitos e as células sinoviais, produzem níveis aumentados de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que atuam na diminuição da síntese de colágeno e aumentam mediadores catabólicos, como metaloproteinases (MMPs) e outros mediadores inflamatórios, como interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (NO) [DiBattista, 1991; Pelletier, 2001].

Dentre os tratamentos clínicos utilizados na rotina para osteoartrites estão a fisioterapia, acupuntura, eletroestimulação, anti-inflamatórios não esteroidais, opioides ou opiáceos, além de regeneradores articulares (Fantoni, 2011; Johnson, 2013).

Diferentes moléculas estão sendo estudadas com o propósito de promover a reconstituição cartilaginosa e conseqüente melhoria do tecido sinovial, porém todas elas apresentaram um potencial clínico, facilitaram a reparação, mas foram ineficientes na regeneração. Desta forma, novas alternativas terapêuticas estão sendo consideradas.

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são facilmente isoladas e apresentam grande potencial de proliferação em cultura, uma característica importante para sua aplicação clínica (Madrabettu et al., 2015). As CTMs podem ser utilizadas de forma alogênica sem problemas com a rejeição devido a sua baixa imunogenicidade. Estas células apresentam baixa expressão de antígenos MHC de classe I e ausência de expressão de MHC de classe II e moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 e CD40, além de estimular a proliferação de células T reguladoras CD4⁺ e CD25⁺, as quais atuam na indução e manutenção da tolerância periférica (Pittenger e Martin, 2004; De Minguel et al., 2012).

As CTMs também podem ter um efeito anti-inflamatório no local da lesão, pois reprimem a vigilância imunológica e inibem a destruição mediada pelas células T e B no sítio danificado (Le Blanc e Ringden, 2007).

Embora a fonte de tecido influencie o potencial de diferenciação, as CTMs podem ser encontradas e isoladas de vários locais, incluindo medula óssea, tecido adiposo, sinóvia, polpa dentária, ligamento periodontal, matriz de cordão umbilical e outros tecidos mesenquimais (Roubelakis et al. 2007; Boeuf e Richter, 2010). Sob indução apropriada ou condições ambientais, as células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMO) podem se diferenciar em múltiplas linhagens de células tais como odontoblastos, osteoblastos, adipócitos, células tipo neural, melanócitos e condrócitos (Lv et al. 2014). O uso de CTMO autólogas para o tratamento de defeitos da cartilagem articular tem sido proposto (Matsumoto et al. 2010; Wang et al. 2015; Filardo et al. 2013).

A membrana de plasma rico em fibrina (MPRF) é um concentrado de plaquetas de segunda geração derivado do plasma rico em plaquetas (PRP), que é produzido por meio da coleta de sangue autólogo em tubos de vidro, sem anticoagulantes e centrifugação imediata. O produto resultante é um biomaterial contendo coágulo de fibrina, plaquetas e leucócitos com uma concentração elevada de fatores de crescimento. O MPRF não requer qualquer ativação antes da sua utilização e os fatores de crescimento são liberados lentamente, durante um longo período de tempo (Ehrenfest, 2009).

A MPRF contém alta concentração de fatores de crescimento, incluindo fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento transformantes (TGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), e fator de crescimento endotelial vascular (Yang, et al. 2012). Foi proposto que as plaquetas podem atuar como reguladores locais para curar ferimentos e regenerar tecidos (Anitua et al. 2004 e Werner e Grose, 2003).

Injúrias aos tecidos cartilagosos das articulações geram doenças degenerativas que afetam diferentes espécies, sendo bastante documentadas em seres humanos, cães e equinos tendo grande relevância na qualidade de vida (Krasnokutsky et al. 2008; Rychel, 2010; Goodrich e Nixon, 2006). Vários fatores etiológicos de risco e processos fisiopatológicos contribuem para a natureza progressiva da doença, dentre outros estão: idade, sexo, trauma, uso excessivo (atividade laboral ou comportamental), genética e obesidade. Cada um contribui de forma singular para o início do processo de lesão em diferentes componentes articulares (Krasnokutsky, et al. 2008).

As opções terapêuticas atuais para lesões cartilaginosas promovem melhora clínica, porém há baixa eficácia regenerativa e o tecido cartilaginoso é incapaz de restabelecer continuidade (Chen et al., 2016).

A terapia celular, vem contribuindo com a melhora de muitos pacientes com diferentes afecções, as CTMO possuem a capacidade de diferenciação, estas células exibem efeitos parácrinos através da secreção de fatores de crescimento, citocinas, mediadores antifibróticos ou angiogênicos (Djouad, et al. 2009) e a MPRF libera gradualmente os fatores de crescimento autólogos e expressa um efeito duradouro na proliferação e diferenciação dos osteoblastos *in vitro* (He et al. 2009), mas pouco se sabe sobre sua ação na regeneração da cartilagem (Leite e Faloppa, 2013).

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial do uso das CTMO e da MPRF na reparação osteocondral do joelho de coelhos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Animais

O experimento foi realizado após aprovação (ANEXO 1) da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 54 coelhos hípidos da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, pesando entre 3,5 e 4,5 kg, com idade média de sete meses. Três foram submetidos à eutanásia para coleta de medula óssea que serviu como fonte de CTMs. Os demais foram mantidos em gaiolas individuais com um animal em cada gaiola, com água e ração *ad libitum* em biotério com controle de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($45\% \pm 15\%$), ventilação (exaustores superiores e inferiores) e de ciclos luminosos de 12/12h (lâmpada fluorescente).

Os animais foram identificados e distribuídos aleatoriamente em 5 grupos: Grupo 0 (controle imediato): 7 animais submetidos à remoção de flape cartilaginosa até a exposição do osso subcondral, por meio de sulcoplastia por abrasão de 0,3 (largura) x 0,9 (comprimento) cm da tróclea femoral; Grupo A (controle 60 dias): 11 animais submetidos ao mesmo procedimento do Grupo 0; Grupo B (células-tronco): 11 animais submetidos ao mesmo procedimento do Grupo 0 e transplante de 5×10^6 de CTMO no local da lesão; Grupo C (membrana de plasma rico em fibrina): 11 animais submetidos ao mesmo procedimento do Grupo 0 e colocação de MPRF sobre a lesão e Grupo D (CTMO + MPRF): 11 animais submetidos ao mesmo procedimento do Grupo 0 e transplante de 5×10^6 de CTMO no local da lesão, cobertas com MPRF.

2.2.2 Isolamento, cultivo e caracterização das células-tronco da medula óssea (CTMO)

O isolamento, o cultivo e a caracterização das CTMO foram realizadas no Núcleo de Terapia Celular da PUCPR.

Três animais foram submetidos à eutanásia e os fêmures e tíbias foram removidos. Toda a musculatura foi retirada e os ossos foram colocados em placas de Petri contendo tampão salina fosfatada (PBS) (GibcoTM Invitrogen, NY, USA). As epífises foram removidas e a cavidade medula foi exposta. Com auxílio de seringa e agulha, foi realizada uma lavagem interna da medula com meio de cultura DMEM (Meio Eagle Modificado de Dulbecco) e 10,000 UI heparina. A medula óssea foi processada imediatamente após a coleta.

O material foi acondicionado em um tubo cônico (TPP, Trasadingen, Suíça). Para o isolamento das células mononucleares, foi utilizado o método de separação por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque ($d = 1.077 \text{ g/mL}$) (Sigma Chemical, St Louis, USA) de acordo com Boyüm et al. (1966). As células obtidas após o isolamento, foram plaqueadas em frascos de cultivo de 75 cm^2 (TPP, Trasadingen, Suíça) e cultivadas com meio DMEM contendo 15% de soro bovino fetal (SBF) (GibcoTM Invitrogen, NY, USA), 1% de antibiótico, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (GibcoTM Invitrogen, NY, USA).

As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 (Thermo Fisher Scientific, OH, USA) O meio foi trocado duas vezes por semana até atingirem a confluência de 80%, quando foram dissociadas utilizando a enzima tripsina-EDTA (GibcoTM Invitrogen, NY, USA) e foram replaqueadas até a obtenção do número de células para transplante que foi de 5×10^6 células/animal.

Antes do transplante foi realizada a avaliação da viabilidade celular com Azul de Tripán (Sigma Chemical, St Louis, USA) e observação em Câmara de Neubauer.

2.2.3 Diferenciação celular

O potencial de diferenciação das CTMs foi avaliado pela indução da diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos. As células foram incubadas com os meios de indução a diferenciação.

2.2.3.1 Diferenciação adipogênica e osteogênica

As CTMs foram plaqueadas em triplicata, em duas placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) sobre lamínulas. As células foram incubadas em estufa a 37°C, com 5 % de CO₂ até atingirem uma confluência de 80%. Foi adicionado 300 µL de meio comercial para as diferenciações em adipócitos e osteoblastos (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). A troca de meio foi realizada três vezes por semana durante três semanas. Após a diferenciação adipocítica, foi possível observar a presença de lipídeos no interior dos vacúolos, pela coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.). Brevemente, as células foram fixadas com Bouin (Biotec, Labmaster, Paraná, Brazil) durante 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas duas vezes com etanol a 70% e uma vez com água miliQ, e coradas com uma solução de 0.5% de Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) durante 1 hora. Para coloração do núcleo foi utilizado Hematoxilina-Eosina (HE) (Biotec, Labmaster, Paraná, Brazil).

Após 21 dias, as células diferenciadas (osteogênica), foram fixadas com o fixador de Bouin e coradas com Vermelho de Alizarina S por 15 minutos (Fluka Chemie, Buchs, UK) a temperatura de 22-24°C para avaliar a presença de cristais de cálcio. O corante *Light green* (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) foi utilizado como conta-corante.

2.2.3.2 Diferenciação condrogênica

Foi realizada a cultura em micromassa para a diferenciação condrogênica. Brevemente 2x10⁵ células em 0,5 mL de meio de cultura foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos, em um tubo cônico para formar um botão celular. Foi adicionado 500 µL de meio de diferenciação condrogênica e as células foram cultivadas durante 21 dias. O meio foi trocado três vezes por semana. Após este período, o agregado celular foi fixado com 10% de formaldeído durante uma hora a temperatura ambiente, desidratado com diluições seriadas de etanol e emblocadas em blocos de parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram corados com solução de Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para demonstrar a presença de mucopolissacarídeos na matriz intracelular.

As células controle foram mantidas com meio DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal durante 21 dias.

2.2.4 Técnicas anestésica e cirúrgica

Foi realizada tricotomia ampla do terço distal do fêmur até o terço proximal da tíbia do membro pélvico esquerdo, antisepsia com álcool 70%, álcool iodado e iodo-povidona.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (20 mg/Kg/IM) e cloridrato de xilazina (0,15 mg/kg/IM). A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano em circuito anestésico com oxigênio 100%.

A indução da sulcoplastia troclear por abrasão foi realizada conforme método de Souza et al. (1999) que consiste, resumidamente, em artrotomia lateral do joelho, seguida de luxação patelar temporária, permitindo assim, visualização e remoção completa (até exposição do osso subcondral) do flape cartilaginoso de 0,3 cm de largura x 0,9 cm da tróclea femoral (Figura 2), a medida usada foi padronizada com uso de molde produzido para este fim (Figura 2).

A cápsula articular foi reconstituída com fio de poliglacina 910 n.3-0 em sutura com padrão de Lambert. Os planos seguintes (muscular e tecido celular subcutâneo) foram aproximados com sutura ancorada de Ford com o mesmo fio. A dermorrafia foi realizada com

sutura colchoeiro horizontal contínua, com sobreposição de alguns pontos isolados simples, com fio de mononáilon 3-0.

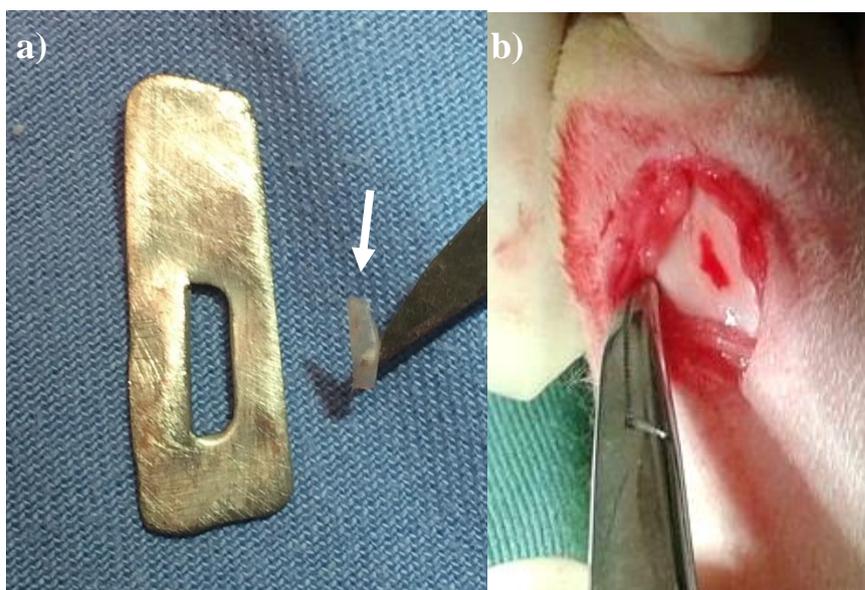


Figura 1: Imagem do molde metálico usado para padronizar o tamanho das lesões (3 mm de largura x 9 mm de comprimento) a) flape cartilaginoso removido (seta) da tróclea femoral de coelho. b) Aspecto da lesão iatrogênica após a retirada do flape cartilaginoso.

2.2.5 Transplante intra-articular de CTMO.

Os transplantes de CTMO foram realizados nos animais dos grupos B e D, imediatamente após a indução da lesão articular por artrotomia do joelho.

No transplante foram utilizadas 5×10^6 CTMO, diluídas em 50 μ l de meio de cultura. As células foram aplicadas sobre a lesão com agulha acoplada a seringa de Hamilton e aguardou-se 5 minutos para a aderência das CTMO a lesão.

2.2.6 Produção e colocação de MPRF sobre a lesão.

As MPRFs foram usadas nos Grupos C e D, elas tinham dimensão de 0,5 x 1 cm e foi suficiente para recobrir a falha iatrogênica (0,3 x 0,9 cm). No Grupo D, após os transplantes CTMO aguardou-se 5 minutos para o transplante da MPRF.

A produção das MPRFs foi feita pela empresa BmdCon, (Curitiba-PR, Brasil), imediatamente após a indução anestésica foram coletados 8 ml de sangue em tubos de coleta sem anticoagulante e centrifugados durante oito minutos a 2700rpm. O processo de coleta e de centrifugação foram realizados no menor tempo possível para não ocorrer a interferência dos anestésicos e da formação de coágulos na formação da MPRF.

Com o término deste processo, foi possível observar que a MPRF ficou dividida em uma porção superior de cor branca amarelada e outra de cor avermelhada presente na porção inferior do tubo.

Em seguida, o tubo foi aberto de forma cuidadosa, e com o auxílio de uma pinça anatômica foi retirada a MPRF, e com uma tesoura foi realizada a divisão dessas duas porções (Figura 2a). Em seguida a porção superior foi transferida para uma caixa metálica e com a tampa o material biológico foi prensado (Figura 2b). O peso da tampa foi suficiente para retirar o excesso de soro e para moldar a membrana.

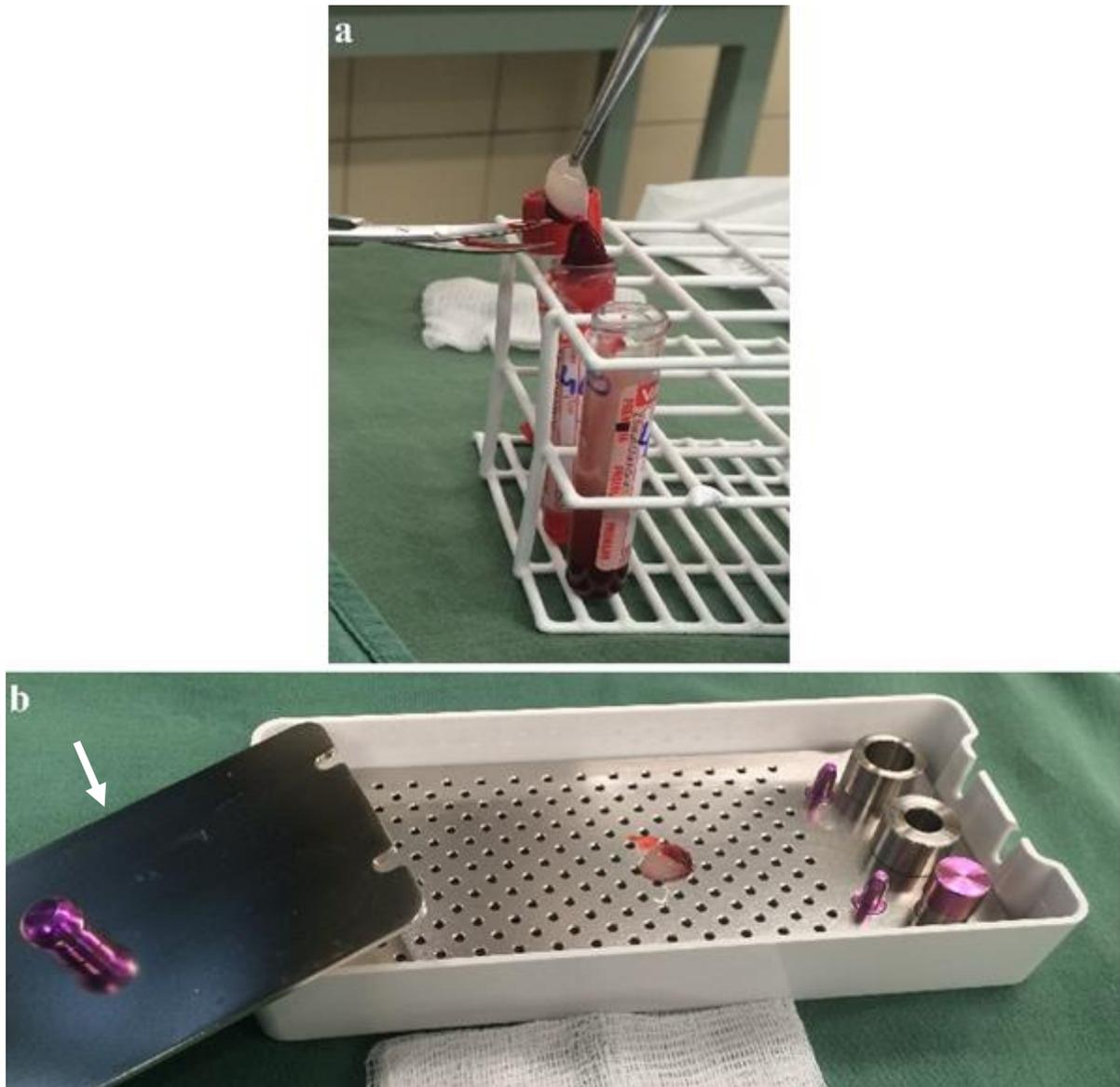


Figura 2: Etapas de produção de membrana de plasma rico em fibrina (MPRF). a) Com uma tesoura foi separada a porção branca da porção vermelha da MPRF. b) A porção branca foi colocada na grade da caixa metálica e realizada a pressão no material biológico com a tampa (seta branca) para formação da MPRF.

2.2.7 Cuidados pós-operatórios

Ao término do procedimento cirúrgico e por mais três dias, foi praticada antibioticoprofilaxia com enrofloxacina 10 mg/kg/sid por via intramuscular, e analgesia com cloridrato de tramadol 5 mg/kg/bid e meloxicam 0,1 mg/kg/sid, ambos por via subcutânea.

2.2.8 Eutanásia dos animais

Todos os animais pertencentes ao Grupo 0 foram submetidos à eutanásia logo após o procedimento cirúrgico e os Grupos A, B, C e D foram submetidos à eutanásia dois meses após o procedimento cirúrgico.

Os animais foram tranquilizados com cloridrato de cetamina (20 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (0,15 mg/Kg) por via intramuscular, com os animais tranquilizados foram anestesiados com propofol (20 mg/Kg) aplicado na veia auricular e quando anestesiados foi aplicado ainda na veia auricular 5 ml de cloreto de potássio.

2.2.9 Análise histológica da área de sulcoplastia troclear por abrasão.

Após eutanásia dos animais, foi realizada coleta da epífise distal do fêmur esquerdo. Estes materiais foram acondicionados individualmente em recipientes contendo formol a 10%. Depois de retirados do formol e lavados com água corrente por 15 minutos, os espécimes foram cortados no epicentro da área da sulcoplastia troclear por abrasão.

Em seguida foram desidratados com álcool, diafanizados em xilol, submetidos à inclusão com formação dos blocos de parafina e seccionados com micrótomo a uma espessura média de 4 μm .

As seções foram coradas com Hematoxilina-Eosina (universal) e Safranina-O que permite a avaliação da cartilagem.

Inicialmente as lâminas foram digitalizadas em aumento de 20x pelo Axion Scan Z1 (Zeiss). Em seguida foi utilizado o software Zen 2® para conversão das imagens em formato compatível com o software Image-Pro Plus versão 4.5.029, isto serviu para a avaliação das áreas da cartilagem e realização das mensurações (Figura 3).

Foi confeccionada uma lâmina de cada amostra, no Grupo 0 (controle imediato) foi realizada a mensuração do comprimento da lesão (em micrômetros) e na mesma lâmina, foi definida a área adjacente a lesão (μm^2) e realizado a contagem de condrócitos e condroblastos. Dividindo o número de células pela área obteve-se os valores da densidade de condrócitos (DCD) e a densidade de condroblastos (DCB). Esses valores foram considerados como valores de referência.

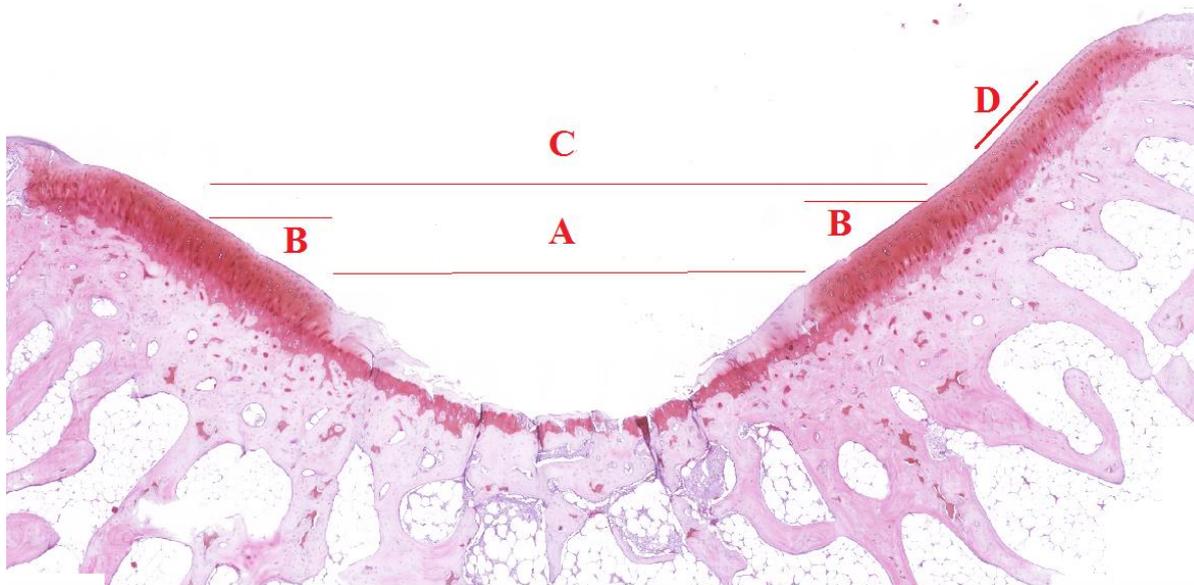


Figura 3. Mensurações da lesão e contagens de condrócitos e condroblastos, em coelho do Grupo 0. A: tamanho da lesão após 60 dias. B: tamanho do tecido regenerado após 60 dias. C: Tamanho médio da lesão iatrogênica do Grupo 0. D: Região adjacente.

Considerando que o molde metálico realizou lesões padronizadas (0,3 cm de largura) por (0,9 cm de comprimento) [Figura 3], ao subtrairmos do valor da lesão do Grupo 0 (controle imediato) [Figura 3 – medida C] os valores das lesões dos Grupos A (controle 60 dias), B (CTMO), C (MPRF) e D (CTMO + MPRF) [Figura 3 – medida A], foi obtida a diferença que corresponde a área regenerada (Figura 3 – medidas B). Na área adjacente a lesão (Figura 3 – medida D) foi realizada a mensuração da das densidades de condrócitos (DCD) e de condroblastos (DCB).

As lâminas coradas em HE foram avaliadas de acordo com a escala de avaliação histopatológica de cartilagem da *International Cartilage Repair Society* (ICRS) citado por Chen et al em 2016 (Quadro 1).

Quadro 1: Escala de avaliação histopatológica de cartilagem (Chen et al. 2016).

Aparência Histológica	Pontos
I Superfície	
Suave, nivelado com normal	4
Suave	3
Irregular	2
Fissuras	1
Fissuras nos ossos	0
II Matriz	
Cartilagem tipo hialina	3
Hialina e fibrocartilagem	2
Fibrocartilagem	1
Células não condrócitas	0
III Distribuição Celular	
Colunar	3
Grupos mistos / Colunares	2
<i>Clusters</i>	1
Células individuais, desorganizadas	0
IV Osso subcondral	
Normal	3
Principalmente remodelado	2
Osteonecrose	1
Irregular / fraturas	0
V Integração com cartilagem circundante	
Completo	2
Interrupção menor (< 25% da área)	1
VI Mineralização da cartilagem	
Normal	3
Calcificação anormal / heterotópica	0

Escala de avaliação histopatológica de cartilagem da *International Cartilage Repair Society* (ICRS). Avaliando os critérios de superfície, matriz, distribuição celular, aspecto do osso subcondral, integração com cartilagem circundante e mineralização da cartilagem.

2.2.10 Análises estatísticas.

Para avaliação da densidade, tamanho da lesão e avaliação histológica entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's, tanto para a nota total como para a avaliação de cada critério. Para a análise estatística da colagenização entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com posterior teste de Dunn's. Os dados estão sendo apresentados em mediana. O nível de significância adotado foi 5% ($\alpha=0,05$). Todos os dados foram analisados no *software GraphPad Prism 5.0* para Mac.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Contagem, viabilidade e diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMO)

O número médio de células mononucleates da medula óssea obtidas de cada animal foi de $62,25 \times 10^6$ células, com média de viabilidade celular de 92,8%.

Para a caracterização das células transplantadas, foi realizada a indução da diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos. Na diferenciação adipogênica foram visualizados vacúolos lipídicos no interior das células induzidas a diferenciação. Nas células tratadas com meio de diferenciação osteogênica foi observada a presença de cristais de cálcio. Nos ensaios de diferenciação condrogênica, as CTMs formaram agregados que cresceram em suspensão em cultura. Foi possível observar a presença de mucopolissacarídeos na matriz cartilaginosa e lacunas ao redor dos condrócitos jovens (Figura 4).

As células controle, não demonstraram diferenciação espontânea após 21 dias de cultivo.

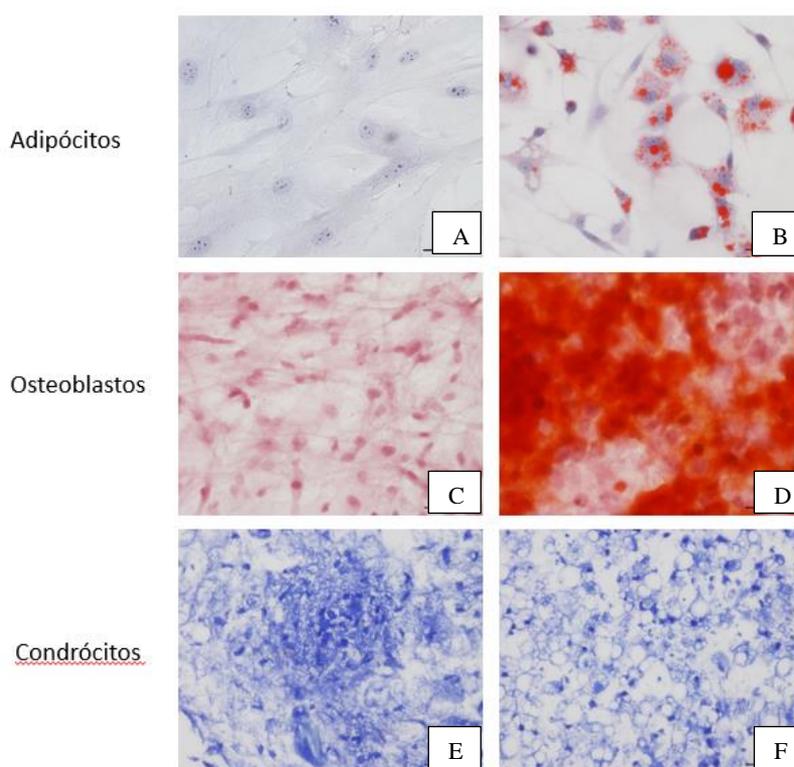


Figura 4. Diferenciação *in vitro* das CTMO após 21 dias de cultivo. (A, C e E) - células controle. (B) Células diferenciadas em adipócitos, demonstrando a presença de vacúolos lipídicos no interior das células corados com *Oil Red O*. (D) - Células diferenciadas em osteoblastos, presença de depósito de cálcio corado com Vermelho de Alizarina S. (F) - Diferenciação condrocítica, sendo evidenciado a presença de mucopolissacarídeos na matriz cartilaginosa e vacúolos ao redor de condrócitos jovens.

2.3.2 Densidade de condrócitos e condroblastos

As avaliações da DCD (Figura 5), DCB (Figura 6) e densidade total das células (DT) no tecido regenerado (Figura 7) e adjacente entre os grupos, foram obtidas tendo a média da densidade do Grupo 0 como valor de referência (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados das densidades de condrócitos, condroblastos e totais do Grupo 0 e dos tecidos regenerados e adjacentes dos Grupos A, B, C e D.

	Tecido regenerado					Tecido adjacente			
	GRUPO 0	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
DCD	2,891 ^a	11,27 ^b	12,28 ^b	9,75 ^b	11,27 ^b	11,82 ^b	12,46 ^b	11,32 ^b	11,82 ^b
DCB	10,09 ^a	4,262 ^b	4,24 ^b	4,518 ^b	4,262 ^b	4,427 ^b	4,042 ^b	4,087 ^b	4,427 ^b
DT	13,25 ^a	16,54 ^b	17,09 ^b	13,80 ^b	16,54 ^b	18,88 ^b	16,51 ^b	14,97 ^b	18,88 ^b

DCD= Densidade de condrócitos; DCB= Densidade de condroblastos; DT= Densidade total de células. Letras iguais entre as linhas $p>0,05$ e letras diferentes entre as linhas $p<0,05$.

Valores dados em medianas e com a unidade de $\times 10^{-4}$ cel/ μm^2 .

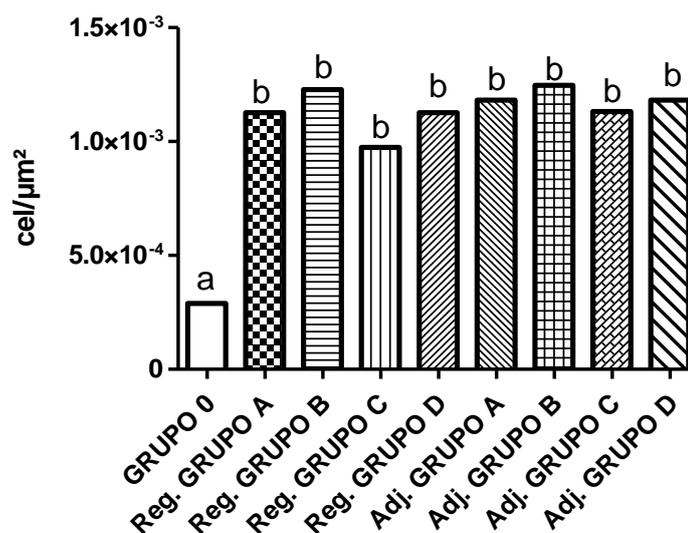


Figura 5. Gráfico das densidades de condrócitos no Grupo 0 e dos tecidos regenerados (Reg.) e adjacentes (Adj.) dos Grupos A, B, C e D. As barras indicam a mediana. Letras iguais entre as colunas $p>0,05$ e letras diferentes $p<0,05$.

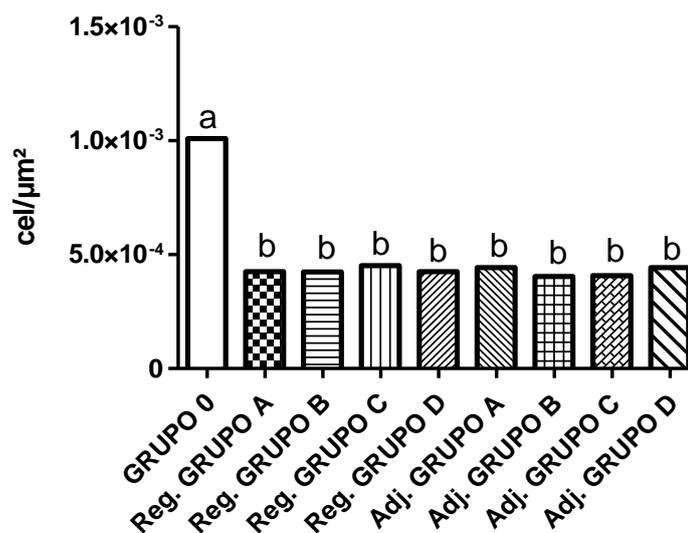


Figura 6. Gráfico da densidade de condroblastos no Grupo 0 e dos tecidos regenerados e adjacentes dos Grupos A, B, C e D. As barras indicam a mediana. Letras iguais entre as colunas $p>0,05$ e letras diferentes $p<0,05$.

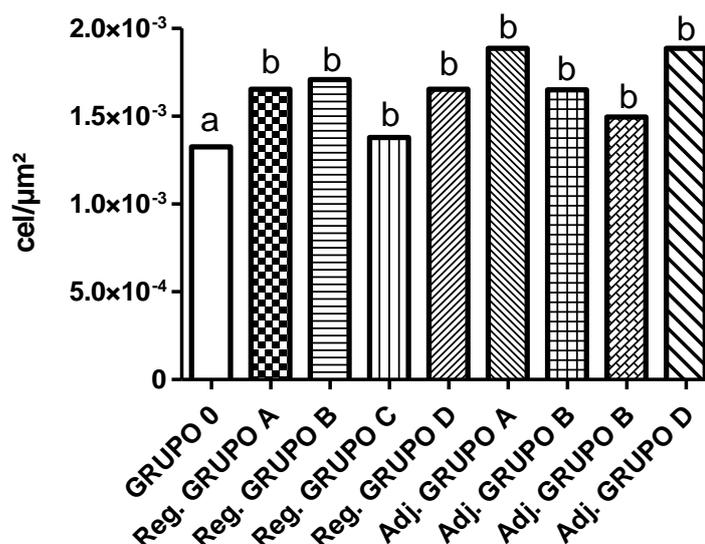


Figura 7. Gráfico da densidade das células totais no Grupo 0 e dos tecidos regenerados (Reg.) e adjacentes (Adj.) dos Grupos A, B, C e D. As barras indicam a mediana. Letras iguais entre as colunas $p>0,05$ e letras diferentes $p<0,05$.

2.3.3 Comprimento da lesão

A largura da lesão iatrogênica no Grupo 0 foi, em média, 3085 μm , valor muito próximo do molde utilizado (0,3 cm = 3000 μm). O Grupo 0 não apresentou diferença em relação ao Grupo A (2.329 μm) mas foi diferente dos Grupo B (2.071 μm), C (1845 μm) e D (1.498 μm).

Os resultados observados no Grupo A só foram diferentes do Grupo D, e os Grupos B, C e D não apresentaram diferença estatística entre eles.

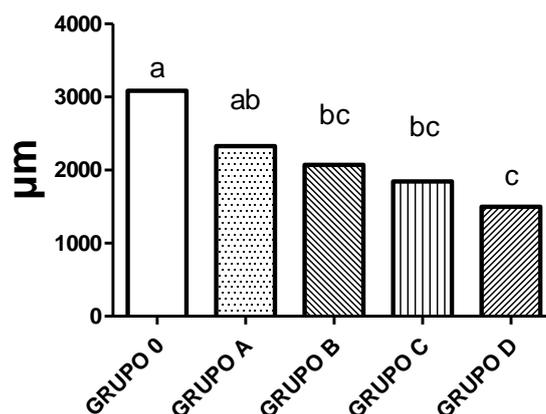


Figura 8. Gráfico do comprimento da lesão. As barras indicam média e desvio padrão. Letras iguais entre as colunas $p>0,05$ letras diferentes $p<0,05$.

2.3.4 Avaliação histológica.

Foram excluídas as lâminas de histopatológico que apresentaram alterações de degeneração ou deformação óssea totalizando no Grupo A 9 lâminas (n=9), Grupo B 10 lâminas (n=10), Grupo C 12 lâminas (n=12) e do Grupo D 10 lâminas (n=10).

No critério interação da cartilagem e mineralização da cartilagem todos receberam nota máxima.

Os dados da avaliação histológica foram obtidos (Tabela 2) conforme graduação histopatológica de cartilagem citado por Chen et al. (2016). Os valores da soma total dos escores ou a avaliação de cada um dos critérios (superfície; matriz; distribuição celular; osso subcondral; interação da cartilagem circundante e mineralização da cartilagem) não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) das suas medianas. Pode-se perceber a distribuição dos escores de cada critério entre os grupos notando uma tendência de uma qualidade melhor da cartilagem do Grupo D, porém sem significância estatística.

Tabela 2. Resultados dos valores de critérios histológicos para cartilagem articular, estabelecidos por Chen et al. (2016) dos animais pertencentes aos Grupos A (controle 60 dias), B (CTMO), C (MPRF) e D (CTMO + MPRF).

Crítérios	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Superfície	1 ^a	1 ^a	1,5 ^a	1,5 ^a
Matriz	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1,5 ^a
Distribuição de células	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1,5 ^a
Osso subcondral	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a
Interação da cartilagem	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
Mineralização da cartilagem	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
Total	8 ^a	8,5 ^a	9 ^a	10,5 ^a

Letras iguais entre as linhas $p>0,05$. Medianas de cada um dos critérios entre os grupos.

Quando observamos as distribuições dos escores em cada grupo podemos avaliar a tendência de cada tratamento e seus resultados (Tabela 3)

Na soma de todos os critérios (Figura 9) tendo em vista que a escala vai de 0 a 18 a menor nota foi 6 e a maior foi 14. No Grupo A das 9 lâminas (n=9) três receberam nota 6, três receberam nota 8, uma recebeu nota 9, uma recebeu nota 10 e uma recebeu nota 12. No Grupo B das 10 lâminas avaliadas (n=10) duas receberam nota 6, duas receberam nota 7, uma recebeu nota 8, uma recebeu nota 9, duas receberam nota 10 e duas receberam nota 12. No Grupo C das 12 lâminas (n=12) duas receberam nota 6, três receberam nota 7, uma recebeu nota 8, uma recebeu nota 10, uma recebeu nota 11, uma recebeu nota 12, duas receberam nota 13, uma recebeu nota 14. No Grupo D das 10 lâminas avaliadas (n=10) uma recebeu nota 6, uma recebeu nota 7, duas receberam nota 8, uma recebeu nota 9 e 5 receberam nota 12.

Tabela 3. Distribuição dos escores em número de indivíduos (n) e sua porcentagem para cada um dos critérios.

Superfície										
Escore	0		1		2		3		4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Grupo A	0	0	5	55,56	4	44,44	0	0	0	0
Grupo B	0	0	6	60	4	40	0	0	0	0
Grupo C	0	0	6	50	5	41,66	1	8,34	0	0
Grupo D	1	10	4	40	5	50	0	0	0	0

Matriz										
Escore	0		1		2		3		4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Grupo A	3	33,3	5	55,5	1	11,2	0	0	***	***
Grupo B	2	20	5	50	3	30	0	0	***	***
Grupo C	3	25	5	41,66	4	33,34	0	0	***	***
Grupo D	1	10	4	40	5	50	0	0	***	***

Distribuição Celular										
Escore	0		1		2		3		4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Grupo A	3	33,3	3	33,3	3	33,4	0	0	***	***
Grupo B	4	40	4	40	2	20	0	0	***	***
Grupo C	3	25	5	41,66	4	33,34	0	0	***	***
Grupo D	1	10	4	40	5	50	0	0	***	***

Osso Subcondral										
Escore	0		1		2		3		4	
	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%
Grupo A	2	22,2	6	66,6	1	11,2	0	0	***	***
Grupo B	0	0	6	60	4	40	0	0	***	***
Grupo C	2	16,6	3	25	3	25	4	33,34	***	***
Grupo D	0	0	4	40	6	60	0	0	***	***

% - Porcentagem de indivíduos que alcançaram esse escore.

*** - Escore não existente para esse critério.

n – Numero de indivíduos.

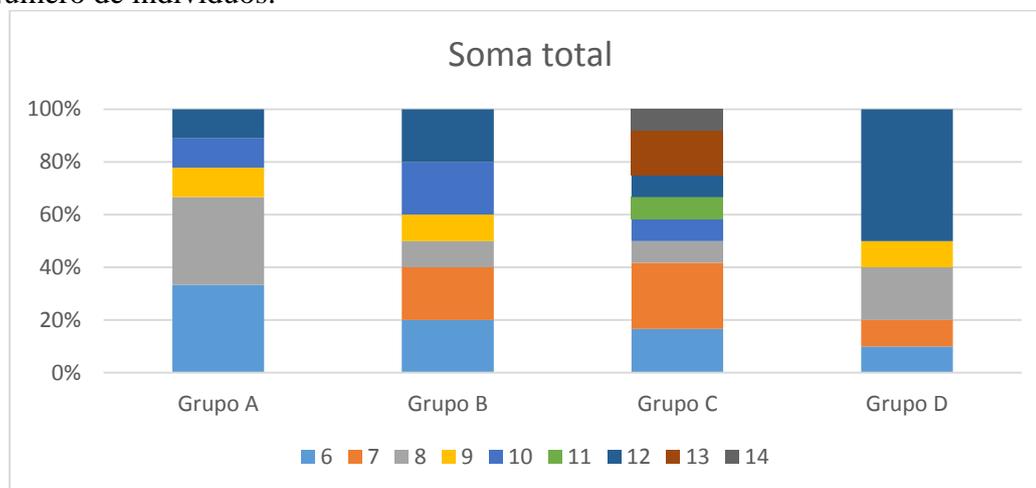


Figura 9: Gráfico da distribuição dos escores de cada critério entre os grupos.

2.4 DISCUSSÃO

O tratamento dos defeitos condrais e da osteoartrite, representa um dos maiores desafios na prática ortopédica humana e veterinária, tal qual citado por Hunter e Felson (2006) há pouco mais de uma década, e mais recentemente por Makris et al. (2014). Numerosas abordagens terapêuticas medicamentosas e cirúrgicas falharam na tentativa de melhorar a capacidade de recuperação do tecido cartilaginoso. Neste contexto, a terapia celular e tecidual apresentam novas esperanças para promover a regeneração da cartilagem (Ruetze e Richter, 2014).

Os coelhos foram uma ótima espécie para experimentação em tecido cartilaginoso. Katayama et al. (2004), Yan et al. (2007) e Coelho (2017) também usaram o coelho para estudos experimentais no mesmo tecido e tiveram a mesma opinião devido a articulação do joelho do coelho ser proporcionalmente maior em relação ao corpo, além da facilidade de manejo e baixo custo de aquisição e manutenção.

Baseado na ampla casuística de envolvimento da articulação do joelho em lesões 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.

As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMO) e a membrana de plasma rico em fibrina (MPRF) têm grande efeito anabólico na formação óssea e podem induzir a diferenciação condrogênica, pois foi percebida nota máxima no critério de interação da cartilagem e mineralização da cartilagem, conforme escala de avaliação histológica ICRS, tais resultados foram similares aos observados por Lu et al. (2017) e Tong et al. (2017).

Sob indução apropriada ou condições ambientais, as CTMO podem se diferenciar em condrócitos (Lv, et. al. 2014), e ter ação parácrina pós-transplante, pois alguns autores, já demonstraram ações anti-inflamatórias, de angiogênese e anti-apoptose (Queiramont et al., 2008). Outros autores já estudaram o uso de células-tronco (CT) em artropatias, pois diferentes estudos revelavam ação de osteogênese e condrogênese pós-transplantes de CT (Jang et al. 2002; Santos Jr, 2010).

O uso de CTMO autólogas para o tratamento de defeitos da cartilagem articular tem sido proposto (Matsumoto, et. al. 2010; Wang, et. al. 2015; Filardo, et. al. 2013; Coelho, 2017), porém no presente estudo foram usadas células alogênicas por representar de forma mais fidedigna situações clínicas, se considerar o tempo de isolamento, cultivo e caracterização. O uso de células autólogas inviabilizaria o transplante de CT na fase aguda. Espera-se que em um futuro próximo bancos de células-tronco estejam disponíveis para o uso em diferentes hospitais humanos e veterinários. A MPRF contém alta concentração de fatores de crescimento, incluindo fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento transformadores (TGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), e fator de crescimento endotelial vascular. Estes fatores de crescimento podem auxiliar na regeneração de diferentes tecidos (Werner e Grose, 2003; Anitua, et. al. 2004 e Yang, et. al. 2012), inclusive o cartilaginoso (Fortier, et. al. 2011), entretanto nesse estudo não foi observada resposta favorável no tocante as análises da superfície, matriz, distribuição celular, osso subcondral e interação da cartilagem circundante em todos os grupos avaliados (CTMO, MPRF e associados), pois tiveram as mesmas respostas pós lesão traumática (sulcoplastia por abrasão).

Resultados parcialmente favoráveis como os observados por Coelho (2016), Lv et al. (2017) e Tong et al. (2017), comprovam a ação multifatorial da regeneração cartilaginosa. Recuperação da espessura, número de condrócitos e de camadas de condroblastos ativos secretores de colágeno ainda é algo desafiante.

Jiang e Tuan (2015) citam que as células-tronco progenitoras intrínsecas do tecido cartilaginoso estão localizadas na zona superficial da cartilagem articular, razão pela qual foi observado pouco efeito mitogênico das CTMO transplantadas nas células-tronco progenitoras (Caplan e Dennis, 2006; Kusuma et al., 2017), pois os transplantes foram intralesionais, dispersos, portanto, na sua maioria no osso subcondral.

Apesar do transplante realizado nesse estudo ser intralesional os fatores bioativos que geram a estimulação causada pelos fatores de crescimento da MPRF (Ehrenfest, 2009) e os mediadores inflamatórios liberados pelos condrócitos e células sinoviais (Pelletier, 2001; DiBattista, 1991) apresentaram suas ações em toda superfície articular, isso explica o fato da DCD e a DCB dos Grupos A, B, C e D serem iguais tanto no tecido regenerado como no tecido adjacente. Eles também estimularam a divisão dos condroblastos em condrócitos (Jiang et al. 2015) pois, quando comparando a DCD e a DCB dos Grupos A, B, C e D com o os valores do Grupo 0, analisamos que a DCD foi maior e a DCB foi menor em relação ao Grupo 0, tanto do tecido regenerado como do tecido adjacente.

Com os resultados obtidos na avaliação do tamanho da lesão, todos os grupos apresentaram alguma diminuição da lesão, comprovando que a regeneração da cartilagem ocorreu de maneira centrípeta, ou seja, das bordas para o centro, evidenciando a informação de Jiang e Tuan (2015) onde a regeneração não ocorrerá do osso subcondral à superfície, mas sim da superfície ao osso subcondral. O Grupo D mostrou-se eficiente na diminuição da lesão comparando com demais grupos, pois apresentou diminuição da lesão estatisticamente significativa e em um dos animais não foi possível localizar a lesão iatrogênica pois ocorreu a completa regeneração.

Os resultados da DCD, da DCB e DT dos Grupos A, B, C e D foram superiores aos do Grupo 0, e a DCB foi menor que a do tecido adjacente. Esses resultados vão de encontro com os resultados obtidos por Jiang e Tuan (2015).

Em relação a avaliação de escore histológico do grupo tratado com CTMO do estudo de Chen et al. (2016) no mesmo período de tempo avaliado no presente estudo (60 dias) observamos que os resultados por eles obtidos ($7,5 \pm 1,32$) foram similares ao do presente estudo ($8,7 \pm 2,26$) e foi gradativamente melhor com o passar das semanas, finalizado com 12 semanas obtiveram valor estatisticamente maior ($10,96 \pm 1,62$). Razão pela qual recomendamos em estudos futuros avaliação com período pós-operatório superior ao deste estudo.

2.5 CONCLUSÕES

Tanto a reparação natural como a ação da CTMO e a MPRF estimulam as células-tronco progenitoras a se diferenciarem em novos condrócitos.

A associação da CTMO e da MPRF foi mais eficiente em diminuir a lesão iatrogênica do que a reparação natural e suas utilizações isoladas.

Mesmo sem diferença estatística a associação da CTMO e da MPRF apresentou uma avaliação histológica mais uniforme.

2.6 REFERÊNCIAS

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden A.T. 2004. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb haemost.* 91:4-15.

Boeuf S., Richter W. 2010. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem cell res ther.* 1:31.

- Brinker W. O. Piermattei D. L. Flo G. L. 2009. Ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais. são paulo: manole.4:28–179.
- Carvalho J. C. T. Sertié J. A. A. Barbosa M. V. J. Patrício K. C. M. Caputo L. R. G. Sarti S. J. Ferreira L. P. Bastos J. K. 1999. Anti-inflammatory activity of the crude extract form the fruits of *pterodon emarginatus* vog. *Journal of ethnopharmacology*. 64:127-133.
- Ceylan H.H., Bilsel K., Buyukpinarbasili N., Ceylan H., Erdil M., Tuncay I., Sem, C. 2016. *The Knee* 23 (2016) 442–449
- Chrubasik, J. E.; Roufogalis, B. D.; Chrubasik, S. 2007. Evidence Of Effectiveness Of Herbal Antiinflammatory Drugs In The Treatment Of Painful Osteoarthritis And Chronic Low Back Pain. *Phytotherapy Research*. 21:675–683.
- Chen Y., Chen Y., Zhang S., Du X., Bai B. 2016. Parathyroid Hormone-Induced Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation and its Repair of Articular Cartilage Injury in Rabbits. *Med Sci Monit Basic Res*. 22: 132-145
- Coelho L. P., 2017. Células-tronco mesenquimais autólogas no tratamento da osteoartrite induzida na articulação coxofemoral em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) – finalizar referência. Dissertação Mestrado. Disponível em <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150483>> Acesso em 07 jun. 2017.
- Cragg G.M., Newman D.J. 2002. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*. 100(25):72-79.
- Denny C. 2002. Atividade antiinflamatória do óleo de sucupira *pterodon pubescens* benth. (leguminosae-papilionoideae). Dissertação (mestrado em odontologia). - faculdade de odontologia de piracicaba, da Universidade estadual de campinas.
- Denny H .R., Butterworth S. J. 2000. A guide to canine and feline orthopaedic surgery (4th edition). Blackwell Science, Oxford.4:29-73
- Dibattista J. A., Martel-Pelletier J. O. H. A. N. N. E., Wosu L. O., Sandor T., Antakly T., & Pelletier J. P. 1991. Glucocorticoid Receptor Mediated Inhibition Of Interleukin-1 Stimulated Neutral Metalloprotease Synthesis In Normal Human Chondrocytes. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 72(2), 316-326.
- Djouad F., Bouffi C., Ghannam S., Noel D., Jorgensen C. 2009. Mesenchymal stem cells: innovate therapeutic tools for reumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, Maryland, v. 5, n. 104, p. 392-399, 2009.
- Ehrenfest D.M.D., Rasmusson L., Albrektsson T. 2009. Classification of platelet concentrates: From purê platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet- rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 27: 158-167.
- Fantoni D. T. 2011. Tratamento da dor na clínica de pequenos animais – rio de janeiro: elsevier. 1:131-135

- Filardo G., Madry H., Jelic M., Roffi A., Cucchiarini M., Kon E. 2013. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee surg sports traumatol arthrosc.* 21:1717–1729.
- Fortier L. A., Barker J. U., Strauss E. J., McCarrel T. M., Cole B. J. 2011. The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res* (2011) 469:2706–2715.
- Goodrich L. R., Nixon A. J., 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *The Veterinary Journal.* 171:51–69.
- He L., Lin Y., Hu X., Zhang Y., Wu H. 2009. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 108:707-713
- Hunter D. J., Felson D. T., 2006. Osteoarthritis. *British Medical Journal, London, UK,* 683. 332(7542):639-42.
- Hulse D., Hyman B., 2007. Biomecânica e biologia das fraturas. In: Slatter, d. *Manual de cirurgia de pequenos animais.* São paulo: manole.3(2):1785–1818.
- Illingworth K.D., Musahl V., Lorenz S.G., Fu F.H. 2010. Use of fibrin clot in the knee. *Operat tech orthopaed.* 20(2):90–7.
- Jacobi M., Villa V., Magnussen R.A., Neyret P., Maci A. 2011. New era? *Sports med. Arthrosc. Rehabil. Ther. Technol.* 3.
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du, J. Aldrich, S. Lisberg, A. Low, W. C. Largaespada, D. A. Verfaillie, C. M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418:41-49.
- Jiang Y., Tuan R. S. 2015. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11:206–212.
- Johnson A. L. 2013. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management. In: Fossum, t. W. *Small animal surgery.* Philadelphia: Elsevier. 4:1033–1105.
- Katayama R., Wakitani S., Tsumaki N., Morita Y., Matsushita I., Gejo R., Kimura T. 2004. Repairofarticular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology.* 43(8):980–985.
- Kierszenbaum A.L., Tres L.L. 2012. *Histologia e biologia celular: uma introdução a patologia.* rio de janeiro: elsevier.3:128-129.
- Kocamaz E., Gok D., Cetinkaya A., & Tufan A. C. 2012. Implication of C-type natriuretic peptide-3 signaling in glycosaminoglycan synthesis and chondrocyte hypertrophy during TGF-β1 induced chondrogenic differentiation of chicken bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of molecular histology,* 43(5), 497-508.

- Krasnokutsky, S., Attur, M., Palmer, G., Samuels, J., & Abramson, S. B. 2008. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, S1-S3.
- Kusuma G. D., Carthew J., Lim R., & Frith J. E. 2017. Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect. *Stem cells and development*, 26(9), 617-631.
- Le Blanc, K., & Davies, L. C. 2015. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunology letters*, 168(2), 140-146.
- Leite M. N., Faloppa, F. 2013. *Propedêutica ortopédica e traumatologia – porto alegre: artmed*, 1:24-30
- Lorenzi H., Matos F. J. A. 2002. *Plantas medic inais no brasil: nativas e exóticas. Nova odessa: instituto plantarum*. 1:544.
- Lu X., Ding Y., Niu Q., Xuan S., Yang Y., Jin Y., Wang. H. 2017. ClC-3chloride channel mediates the role of parathyroid hormone [1-34] on osteogenic differentiation of osteoblasts. *Plos One*. 12(4):1-14.
- Lv F.J., Tuan R.S., Cheung K. M., Leung V. Y. 2014. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 32:1408–1419.
- Martel-Pelletier J., Pelletier J.P. 2010. Effects of diacerein the molecular level in the osteoarthritis disease process. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2:95-104.
- Maroon J. C., Bost J. W., Borden M. K., Lorenz K. M., Ross, N. A. 2006. Natural antiinflammatory agents for pain relief in athletes. *Neurosurgery Focus*. 21(4):1-13.
- Madeira C., Santhagunam A., Salgueiro J.B., Cabral, J.M. 2015. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends biotechnol*. 33:35–42.
- Makris E.A., Gomoll A.H., Malizos K.N., Hu J.C., Athanasiou K.A. 2015. Repair And Tissue Engineering Techniques For Articular Cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol*. 11:21–34.
- Matsumoto T., Okabe T., Ikawa T., Iida T., Yasuda H., Nakamura H. Wakitani S. 2010. Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. *J cell physiol*. 225:291–295.
- Miller M. J. S., Ahmed S., Bobrowski P., Haqqi T. M. 2006. The chondroprotective actions of a natural product are associated with the activation of IGF-1 production by human chondrocytes despite the presence of IL-1β. *Bmc Complementary And Alternative Medicine*. 6(3):1-10.
- Nganvongpanit K., Boonsri B., Sripratak T., Markmee P., Kongtawelert P. 2014. Clinical study on the effects of diacerein and diacerein combined with chondroitin sulfate on canine hip osteoarthritis. *Kafkas Univ. Vet Fak Derg*. 20(3):383-392.
- Oussedik S., Tsitskaris K., Parker D. 2015. Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *Arthroscopy*. 31: 732–744.

- Pelletier J. P., Martel-Pelletier J., & Abramson S. B. (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatology*, 44(6), 1237-1247.
- Quertainmont R., Cantinieaux D., Botman O., Sid S., Schoenen J., Franzen R. 2012. Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. *Plos One* 7(6):e39500.
- Roubelakis M.G., Pappa K.I., Bitsika V., Zagoura D., Vlahou A., Papadaki H.A. Antsaklis, A. Anagnou, N.P. 2007. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 16(6): 931-952.
- Ruetze M., Richter W. 2014. Adipose-derived stromal cells for osteoarticular repair: trophic function versus stem cell activity, *Expert Rev. Mol. Med.* 16.
- Rychel J. K. 2010. Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis. *Topics in Companion Animal Medicine*. 25(1):20-25.
- Sampson S., Gerhardt M., Mandelbaum B. 2008. Platelet Rich Plasma Injection Grafts For Musculoskeletal Injuries: A Review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 1(3-4):165–74.
- Saris D. B. F., Dhert W. J. A., Verbout A. J. 2003. Joint Homeostasis. *J. Bone Jt. Surg. Br.* 85:1067–1076.
- Saris D., Price A., Widuchowski W., Bertrand-Marchand M., Caron J., Drogset J.O., Emans, P., Podskubka A., Tsuchida A., Kili S., Levine D., Brittberg M. 2014. Matrix-applied characterized autologous cultured chondrocytes versus microfracture: two-year follow-up of a prospective randomized trial. *Am. J. Sports med.* 42(6):1384–1394.
- Schinhan M., Gruber M., Vavken P., Dorotka R., Samouh L., Chiari C., Gruebl-Barabas R., Nehrer S. 2011. Critical-Size Defect Induces Unicompartmental Osteoarthritis In A Stable Ovine Knee. *J. Orthop. Res.* 30:214–220.
- Schulz K. S. 2013. Diseases of the joints. In: *small animal surgery*. Philadelphia: Elsevier, 4(4):1215–1374.
- Smyth N.A., Murawski C.D., Fortier L.A., Cole B.J., Kennedy J.G. 2013. Platelet-Rich Plasma In The Pathologic Processes Of Cartilage: Review Of Basic Science Evidence. *Arthroscopy*. 29(8):1399–409.
- Tamura T., Shirai T., Kosaka N., Ohmori K., Takafumi N. 2002. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *European journal of pharmacology* 448:81–87
- Tong G., Meng Y., Hao S., Hu S. Y., He Y., Yan W., Yang D. 2017. Parathyroid Hormone Activates Phospholipase C (PLC)-Independent Protein Kinase C Signaling Pathway via Protein Kinase A (PKA)-Dependent Mechanism: A New Defined Signaling Route Would Induce Alternative Consideration to Previous Conceptions. *Medical Science Monitor*. 23(1):1896-1906.

- Wang Y., Yuan M., Guo QY., Lu SB., Peng J. 2015. Mesenchymal stem cells for treating articular cartilage defects and osteoarthritis. *Cell transplant.* 24:1661–1678.
- Wei C. C., Lin, B., Hung S.C. 2014. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine for Musculoskeletal Diseases: Bench, Bedside, and Industry. *Cell Transplantation.* 23:505–841.
- Werner S., Grose R. 2003. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Ver.* 83:835–870.
- Woodfield T.B.F., Van Blitterswijk C.A., De Wijn J., Sims, T. J., Hollander A. P., Riesle J. 2005. Polymer Scaffolds Fabricated With Pore-Size Gradients As A Model For Studying The Zonal Organization Within Tissue-Engineered Cartilage Constructs. *Tissue Engineering, V.* 11:1297-1311.
- Wu C-C., Sheu S-Y., Hsu L-H., Yang K-C., Tseng C-C., Kuo T-F. 2016. Intra-articular Injection of platelet-rich fibrin releasates in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of articular cartilage defects: An in vivo study in rabbits. *J Biomed Mater Res Part B* 2016:00B:000–000.
- Yan H., Yu C. 2007. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy.* 23(2):178–187.
- Yang K.C., Wang C.H., Chang H.H., Chan W.P., Chi C.H., Kuo T.F. 2012. Fibrin glue mixed with platelet-rich fibrin as a scaffold seeded with dental bud cells for tooth Regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 6:777–785.
- Zorzi A. R., Amstalden E. M. I., Plepis A. M. G., Martins V. C. A., et al. 2015. Effect of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells on the Regeneration of Ovine Articular Cartilage. *International Journal Molecular Science.* 16:26813–2683.
- Zhu Y., Yuan M., Meng Hy., Wang Ay., Guo Qy. Wang, Y. Peng, J. 2013. Basic Science And Clinical Application Of Platelet-Rich Plasma For Cartilage Defects And Osteoarthritis: A Review. *Osteoarthritis Cartilage.* 21(11):1627–37.

ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais



Curitiba, 03 de Dezembro de 2015.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: **0999 – 1ª versão**

TÍTULO DO PROJETO: Influência da célula-tronco mesenquimais isolado e associado com membrana de fibrina na reparação articular após trauma iatrogênico no joelho de coelhos.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fagner de Moraes de Oliveira

EQUIPE DE PESQUISA: José Ademar Villanova Junior, Christian Henrique Conceição Ribeiro, Claudia Turra Pimpão, Alyne Ariela Anunciação, Luciano José Eigio Isaka.

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Mestrado

VIGÊNCIA DO PROJETO	11/2015 a 06/2016	QUANTIDADE DE ANIMAIS	39
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coelho)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Superior a 07 meses / 3 a 4,5kg	ESPECIÉ – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Biotério - PUCPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **03.12.2015**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificada e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo. Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. **Marta Luciane Fischer**

Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Marta Luciane Fischer
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil

Telefone: (41) 3371-2302 www.pucpr.br

ANEXO 2

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 2.000,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico

ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. **Essa numeração será contínua por todo o artigo**; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriqueiramente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sem pre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis**, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos**. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas**. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.