



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

## MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2014/2015

Elsa Branco

Utilização de Células Estaminais no Tratamento de Fraturas

*The Use of Stem Cells in the Treatment of Fractures*

março, 2015

FMUP

Elsa Branco

## Utilização de Células Estaminais no Tratamento de Fraturas

*The Use of Stem Cells in the Treatment of Fractures*

**Mestrado Integrado em Medicina**

**Área: Ortopedia e Traumatologia**

**Tipologia: Monografia**

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:**

**Dr. João Torres**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:**

**Ata Médica Portuguesa**

março, 2015

# FMUP

Eu, Elsa Alves Branco, abaixo assinado, nº mecanográfico 200 900 288, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 09/03/2015

Assinatura conforme cartão de identificação:

Elsa Branco

NOME

Elsa Alves Branco

CARTÃO DE CIDADÃO OU PASSAPORTE (se estrangeiro)

E-MAIL

TELEFONE OU TELEMÓVEL

137 623 10      elsa.alves.branco@gmail.com      91 236 9079

NÚMERO DE ESTUDANTE

DATA DE CONCLUSÃO

200 900 288      2015

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Ortopedia e Traumatologia

TÍTULO DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA (riscar o que não interessa)

Utilização de células Estaminais no Tratamento de Fraturas

ORIENTADOR

DR. JOÃO TORRES

COORIENTADOR (se aplicável)

—

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia (riscar o que não interessa) para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projectos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 09/03/2015.

Assinatura conforme cartão de identificação:

Elsa Branco

## **Dedicatória**

Gostaria de dedicar este trabalho à minha mãe, irmão e padrinhos, cujo apoio foi imprescindível à realização do mesmo.

# Utilização de Células Estaminais no Tratamento de Fraturas

## *The Use of Stem Cells in the Treatment of Fractures*

### RESUMO

**Introdução:** A medicina regenerativa introduz a possibilidade de regenerar tecidos ou até substituir órgãos na sua totalidade através do uso de células estaminais. Este trabalho abordará principalmente estas últimas, aprofundando um pouco mais sobre quais os tipos celulares até agora usados e respectivas aplicações na clínica, dirigindo o foco principal para a sua aplicação terapêutica na área da reparação de fraturas ósseas e pseudartroses.

**Materiais e Métodos:** A pesquisa de artigos foi efetuada na base de dados MEDLINE, através da PubMed, utilizando os termos "*Stem Cells*", "*Bone fractures*" e "*Orthopedics*". Foram considerados os artigos dos últimos 10 anos e escolhidos aqueles que explorassem as características dos diferentes tipos de células estaminais e principais aplicações clínicas na área da Ortopedia.

**Resultados:** Revisão de tema.

**Discussão:** Células da medula óssea e células estaminais mesenquimatosas autólogas foram já implantadas com sucesso em diferentes casos com o intuito de melhorar a consolidação de fraturas, preencher defeitos ósseos e tratar pseudartroses.

**Conclusão:** O tratamento de grandes defeitos ósseos e pseudartroses representa ainda um grande desafio. A estratégia *gold standard* atual consiste na utilização de enxertos ósseos autólogos, que são limitados, estão associados a morbidade do local dador e risco de infecções. A grande esperança dos nossos dias assenta pois na medicina regenerativa. Uma estratégia ótima de tratamento inclui a combinação de um biomaterial (*scaffold*), técnicas de biologia celular, fatores de crescimento e estimulação mecânica – o chamado *Diamond concept* – com uma intervenção cirúrgica adequada.

### ABSTRACT

**Introduction:** Regenerative medicine introduces the possibility of regenerating tissues or whole organs through the use of stem cells. This article will focus mainly on the latter, characterizing the cell types used so far and their applications in the clinical setting, mainly in the field of bone fractures and nonunions.

**Methods:** The research was performed in MEDLINE through PubMed using the terms "Stem Cells", "Bone fractures" and "Orthopedics". It was considered the articles from the last 10 years and selected those that exploited the characteristics of the different types of stem cells available and their main clinical applications in Orthopedics.

**Results:** Revision on a theme.

**Discussion:** Bone marrow cells and autologous mesenchymal stem cells have already been successfully implemented in different cases in order to improve the consolidation of fractures, filling bone defects and treating nonunions.

**Conclusions:** The treatment of large bone defects and nonunions still represents a major challenge. The current gold standard strategy is the use of autologous bone grafts, which are limited, associated with donor site morbidity and risk of infections. Our great hope today lays in regenerative medicine. An optimum treatment strategy would include the combination of a biomaterial (*scaffold*), cell biology techniques, growth factors and mechanical stimulation - *Diamond concept* - with an appropriate surgical procedure.

**Palavras-Chave (Keywords):** *Stem-cells; Bone; Orthopedics; Regenerative Medicine.*

## Índice

Introdução .....	8
Células Estaminais .....	10
1 - Células Estaminais Embrionárias.....	10
2 - Células Estaminais Adultas .....	11
2.1 – Células estaminais hematopoiéticas .....	12
2.2 – Células estaminais mesenquimatosas.....	12
2.2.1 – Células estaminais mesenquimatosas e seu uso na Patologia Óssea .....	13
2.2.1.1 - Engenharia Tecidual e Reparação de Fraturas Ósseas.....	15
Conclusões .....	16
Referências Bibliográficas .....	17
Agradecimentos .....	24
Anexo .....	25

## Introdução

A medicina regenerativa apresenta grande interesse em todas as áreas da medicina. Fazendo uso de células estaminais, introduz a possibilidade de regenerar tecidos ou até substituir órgãos, a fim de reparar aqueles que sofrem de doença ou lesão <sup>[1], [2]</sup>.

As primeiras tentativas nesta área basearam-se apenas em transplantar células somáticas como osteoblastos e condrócitos para áreas lesadas, mas obtiveram pouco ou nenhum sucesso <sup>[3]</sup>. É importante realçar que o isolamento de células somáticas está associado a morbidade do local dador e que, devido a imunogenicidade, o seu uso limita o potencial da terapia alogénica <sup>[4], [5]</sup>.

Existem essencialmente duas estratégias celulares terapêuticas na área da medicina regenerativa. Uma, a chamada “Terapia Celular”, consiste na injeção de uma suspensão celular na corrente sanguínea ou diretamente no tecido lesado, com o intuito de reconstituir a sua integridade e função. Outra, mais complexa, é a “Engenharia Tecidual”, na qual as células são combinadas com uma matriz tridimensional (*scaffold*) para substituir parte ou a totalidade de um órgão <sup>[1]</sup>. Todavia, a terapia celular, por si só, não é suficiente para regenerar grandes lesões teciduais ou substituir órgãos inteiros. Daí que a engenharia tecidual pareça ser uma opção mais promissora, uma vez que consegue produzir virtualmente todas as células presentes no organismo <sup>[6], [7]</sup>.

Destacando o seu papel na área da ortopedia, deposita-se grande esperança nesta nova abordagem para tratar patologias que apenas poderiam ser insuficientemente tratadas com cirurgias ou implantes convencionais. São exemplos dessas situações lesões articulares extensas, artroses, grandes defeitos ósseos ou roturas tendinosas atroficas <sup>[8] - [9]</sup>.

De notar que os implantes têm uma duração finita, podendo requerer intervenções cirúrgicas adicionais, o que acarreta morbidade acrescida <sup>[2]</sup>.

Algumas patologias e traumatismos podem condicionar perdas ósseas extensas que necessitam de transplantes de tecido ou substitutos ósseos para alcançar a sua integridade estrutural. No entanto, o uso de enxertos, quer alogénicos quer autólogos, está associado a morbidade do local dador e a possibilidade de transmissão de infeções. Muitos autores descreveram a purificação e expansão de células da MO de origem animal e humana, e a capacidade dessas mesmas células originarem osso quando implantadas ectopicamente com hidroxiapatite ou um transportador adequado <sup>[10] - [11]</sup>.

Similarmente, foram desenvolvidos métodos de expansão de osteoprogenitores da MO, o que indica a possibilidade de uso de progenitores estromais autólogos na regeneração de grandes defeitos ósseos <sup>[12]</sup>.

A engenharia tecidual óssea, para ser bem sucedida, requer a combinação de quatro componentes: osteoprodução, osteoindução, osteocondução e estimulação mecânica (*Diamond Concept*) <sup>[2], [13]</sup>. Osteoprodução traduz-se na utilização de células estaminais osteogénicas, isto é, com capacidade de secretar material ósseo. Consegue-se obter uma grande quantidade de células através de expansão em cultura, técnica esta que previne simultaneamente a diferenciação prematura ou descontrolada das células e o início da

senescência<sup>[7]</sup>. A osteoindução diz respeito aos factores de crescimento que atraem as células osteogénicas para o local do defeito. O isolamento de factores como o TGF- $\beta$ 3 e seus análogos, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), tem levado ao seu uso na clínica para melhorar e acelerar a reparação e para a substituição ósseas. Essas moléculas regulam a quimiotaxia, mitose e diferenciação e são fundamentais no início do processo de reparação de fraturas<sup>[14]</sup>. A BMP-2 e BMP-7 já estão aprovadas para uso na clínica desde 2002 e 2001, respetivamente<sup>[15]</sup>. Todavia, a sua sobrevivência biológica é diminuta e, como tal, tem sido usada a ajuda da terapia génica para que sejam mantidas concentrações terapêuticas no local de fratura, de modo a que o resultado seja eficaz<sup>[16]</sup>. Avanços nesta área permitirão que um gene codificador de determinado fator de crescimento seja isolado e transferido para uma célula recetora através de um vetor. Uma possível vantagem é a de que as células geneticamente modificadas possam não só secretar BMPs, como também responder aos seus efeitos, magnificando potencialmente a resposta clínica<sup>[17]</sup>. A osteocondução assenta na incorporação de uma estrutura que venha a receber as células ósseas. O *scaffold* funciona como um “esqueleto”, que será eventualmente remodelado e substituído<sup>[18]</sup>. Os biomateriais são frequentemente usados como transportadores de fármacos, moléculas bioativas e células, e têm que ser imunocompatíveis e não tóxicos. É importante que sejam biodegradáveis, para que haja uma posterior substituição por tecido regenerado. Além disso, as matrizes formadas a partir deles devem ter propriedades distintas consoante o tipo de tecido pretendido<sup>[19]</sup>. Por último, a estimulação mecânica e outros estímulos biofísicos parecem ser essenciais para a proliferação e diferenciação celular óssea, bem como para a formação da estrutura óssea<sup>[20]</sup>.

A engenharia tecidual ainda não atingiu um uso alargado na clínica devido a vários problemas, sendo um deles a vascularização<sup>[21]</sup>. A presença de uma rede vascular intacta é uma condição necessária para que se possam construir *scaffolds* com mais de 400  $\mu$ m de diâmetro<sup>[22]</sup> e, até agora, todos os esforços para a sua aplicação na substituição de grandes tecidos sólidos ou órgãos inteiros tem falhado<sup>[21]</sup>. No entanto, já foi possível obter bons resultados na substituição de tecidos ocos com diâmetro de parede limitado, como a traqueia ou bexiga, ou de tecidos avasculares, como a cartilagem<sup>[23] - [24]</sup>.

Este trabalho abordará principalmente a utilização de células estaminais, aprofundando um pouco mais quais os tipos celulares até agora usados e respetivas aplicações na clínica, dirigindo o foco principal para a sua aplicação terapêutica na área da reparação de fraturas ósseas e pseudartroses.

## Células Estaminais

As células estaminais têm a capacidade de auto-renovação, dando origem a mais células do mesmo tipo, bem como de diferenciação em tecidos de variadas linhagens quando submetidas a condições apropriadas. Dependendo do tipo, podem ser pluri ou multipotentes, sendo que apenas o embrião é totipotente<sup>[25]</sup>.

### 1 - Células Estaminais Embrionárias

As células estaminais embrionárias (CEEs) são pluripotentes, capazes de se diferenciarem em vários tipos de tecido<sup>[25]</sup>.

Alguns autores definem as CEEs com base na sua derivação de embriões pré- ou peri-implantação, capacidade de proliferação por longos períodos de tempo e de diferenciação em células das três camadas germinativas<sup>[26]</sup>.

A principal fonte de CEEs pluripotentes é a massa celular interna (MCI) de um blastocisto humano com 5 a 6 dias de vida. Sob condições laboratoriais apropriadas, a MCI pode ser isolada e colocada em cultura com células alimentadoras, dando origem a colónias de células estaminais embrionárias humanas (CEEHs)<sup>[27], [28]</sup>.

Uma linhagem estável de CEEHs é capaz de se diferenciar em ectoderme, mesoderme e endoderme quando injectada em animais. É possível conseguir uma diferenciação controlada através do contacto directo célula a célula, em co-cultura, ou através do efeito de agentes específicos como os fatores de crescimento. Em alternativa, as CEEs podem ser transfectadas com um produto génico, programado para direcionar a diferenciação numa determinada via pretendida<sup>[29]</sup>.

Têm sido desenvolvidos protocolos de diferenciação em várias linhagens, embora a maioria decorra com baixa eficácia<sup>[7]</sup>.

Essas células têm ainda a capacidade de proliferarem durante meses sem que haja evidência de anomalias do cariótipo ou senescência celular. Esta última propriedade dever-se-á em parte à elevada atividade da telomerase, que mantém o comprimento e integridade dos telómeros à medida que as células se dividem<sup>[26], [30] - [31]</sup>.

Todavia, a aplicação terapêutica de CEEs poderá estar ainda longe de ser concretizada. Existem vários entraves a nível ético, científico e político e diferentes pontos de vista no que diz respeito à clonagem terapêutica e investigação em CEEs. Em muitos países, é permitido o uso de CEEs derivadas de embriões descartados ou excedentários resultantes das técnicas de fertilização *in vitro*<sup>[29]</sup>.

O problema está na aceitação da utilização de novas linhagens de células estaminais derivadas de embriões especificamente criados para fins científicos. Apesar das diferenças existentes entre a forma de atuação dos diferentes governos, cientistas de vários países uniram-se para formar o Fórum Internacional de Células Estaminais no início de 2003, organização que visa estabelecer uma protocolarização das técnicas usadas, partilha de linhagens celulares, troca de

informação e discussão de alguns dos entraves acima referidos. Em 2004, o Reino Unido fundou o Banco de Células Estaminais, que inclui todas as células derivadas de tecidos embrionários, fetais e adultos e controla a sua utilização na investigação <sup>[2]</sup>.

A aplicação terapêutica de CEEs acarreta ainda outros problemas, na medida em que o seu uso alogénico está associado a um reconhecido potencial oncogénico que atualmente proíbe a sua utilização em pacientes. Em 2006, Takahashi e Yamanaka conseguiram produzir uma linhagem de células *CEEs-like*, as chamadas células estaminais pluripotentes induzidas (CEPIs) <sup>[32]</sup>. As CEPIs resultaram da desdiferenciação de células somáticas obtida através da transfeção de fatores de crescimento embrionários, e abriram caminho para a possibilidade de utilização em terapêuticas autólogas no futuro <sup>[33]</sup>. Em teoria, as células seriam colhidas, reprogramadas, expandidas e utilizadas para fins específicos, potencialmente eliminando a necessidade de uso de células alogénicas (e a necessidade de testes de imunocompatibilidade) dado todo o organismo poder servir como fonte celular ilimitada <sup>[34]</sup>.

No entanto, o grande potencial oncogénico persiste, uma vez que causam teratomas quando injetadas no seu estado indiferenciado e os ratinhos obtidos a partir dessas células apresentam uma elevada taxa de tumores. Essa oncogenicidade pode ser devida aos fatores de transcrição usados na desdiferenciação, ou aos retrovírus oncogénicos usados na transfeção <sup>[33]</sup>.

Além disso, as CEPIs podem manter algumas das características epigenéticas residuais das células de origem, com capacidade de interferir no seu comportamento mesmo após ter sido alcançada a pluripotência. Isto sugere que haja alguma restrição na reprogramação de células somáticas <sup>[35] - [36]</sup>.

## **2 - Células Estaminais Adultas**

Existe uma grande variedade de células estaminais adultas (CEAs) multipotentes em praticamente todos os nossos tecidos, onde são responsáveis pela manutenção da sua integridade. Estas células têm uma capacidade mais limitada de diferenciação - geralmente, apenas uma única camada germinativa - e acarretam similarmente problemas de controlo dessa mesma diferenciação, apesar da probabilidade de formação de teratomas ser muito menor <sup>[1]</sup>.

As CEAs são o tipo de células estaminais mais antigo a ser isolado para fins de investigação e terapêutica médica <sup>[7]</sup>. Apresentam menos problemas a nível ético e já mostraram ser muito mais seguras comparativamente ao uso de células pluripotentes. Outra vantagem é a maior facilidade de aplicação autóloga, minimizando o desenvolvimento de respostas imunes <sup>[37]</sup>.

Existem atualmente dois tipos principais de CEAs com grande potencial clínico, as células estaminais hematopoiéticas (CEHs) e as células estaminais mesenquimatosas (CEMs).

## 2.1 – Células estaminais hematopoiéticas

Um dos exemplos de maior sucesso da “Terapia Celular” é o transplante de CEHs, que já é usado há décadas no tratamento de doenças hematológicas graves, nomeadamente leucemia, talassemia e mieloma múltiplo <sup>[2]</sup>. Para o transplante de MO, as CEHs são injectadas na circulação sanguínea do indivíduo recetor e posteriormente “atraídas” para a MO através do efeito *homing* de citocinas <sup>[38], [39]</sup>.

Sendo, pois, de extrema importância na área da Hematologia, não são ainda aplicáveis na área da Ortopedia e Traumatologia.

## 2.2 – Células estaminais mesenquimatosas

As CEMs são células progenitoras multipotentes, capazes de originar cartilagem, músculo, tendões, ligamentos, osso e gordura. Pós-natalmente, podem ser encontradas no estroma da MO, e podem também ser obtidas a partir de periósseo, tecido adiposo, pele, músculo, paredes vasculares, circulação periférica, tendões, sangue do cordão umbilical e tecidos dentários <sup>[40]</sup>. Além disso, já mostraram ser igualmente capazes de dar origem a algumas células derivadas de outras camadas germinativas, como células gliais e cardiomiócitos <sup>[41], [42]</sup>. São caracterizadas por marcadores de superfície celular. Aquelas derivadas da MO partilham as seguintes particularidades: <sup>[2]</sup>

- Ausência de expressão de marcadores de CEHs, como CD34 e CD14;
- Expressão de recetores de matriz, como CD44, CD29 e CD71;
- Expressão de marcadores de CEMs, CD105 (SH2) e CD71 (SH3); <sup>[43]</sup>
- Componentes da matriz extracelular: colagénio, proteoglicanos e fibronectina;
- Recetores de fatores de crescimento e citocinas para o grupo TGF- $\beta$ .

As CEMs participam de diferentes formas na regeneração de tecidos lesados <sup>[44]</sup>. Por um lado, diferenciam-se diretamente em células teciduais específicas, substituindo aquelas lesadas ou perdidas. Por outro, secretam uma variedade de citocinas com propriedades anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$ 1, NO e prostaglandina-E2, modulando a própria resposta inflamatória, e de fatores solúveis, influenciando indiretamente a regeneração de tecidos <sup>[44]</sup>. Por tudo isto, são capazes de promover a vascularização e a proliferação e diferenciação celulares <sup>[19]</sup>. Libertam também fatores parácrinos com o IGF-1, HGF, VEGF, IGF-2, bFGF ou pré-microRNAs, que protegem as células hospedeiras e melhoram a angiogénese <sup>[45], [46]</sup>.

Existe uma evidência crescente de que as CEMs são relativamente não imunogénicas e que podem ser facilmente transplantadas entre diferentes indivíduos sem despertarem uma resposta imunológica <sup>[47]</sup>. Também foram usadas em humanos CEMs injectadas sistemicamente, tendo mostrado benefícios no tratamento de patologias como a osteogenesis imperfecta <sup>[48]</sup>. Os efeitos anti-inflamatórios das CEMs abriram caminho para a sua possível aplicação na área da transplantação e doenças autoimunes, tendo inclusivamente demonstrado efeitos benéficos na doença do enxerto contra o hospedeiro e na doença de Crohn <sup>[49] - [50]</sup>.

A capacidade de diferenciação em vários tipos de tecido musculoesquelético confere um grande potencial de aplicação na reparação e regeneração de osso e cartilagem. Acredita-se

que, num futuro próximo, com *scaffolds* e fatores de crescimento apropriados, se consiga reparar biologicamente grandes defeitos ósseos e cartilagíneos<sup>[2]</sup>.

As CEMs apresentam, pois, algumas vantagens comparativamente às CEEs e CEPs no que respeita à sua aplicação em técnicas de engenharia tecidual musculoesquelética. Por um lado, a indução da diferenciação das CEMs não é tão complexa, podendo ser conseguida de forma direta, ao contrário dos outros tipos celulares, que requerem múltiplos estádios de diferenciação. Por outro lado, a sua implantação não acarreta a formação de teratomas e ainda não foram reportados outros efeitos laterais graves, pelo que a sua aplicação *in vivo* parece ser relativamente segura<sup>[19], [51] - [52]</sup>. No entanto, há que ter em conta que a supressão da função de algumas células T nos hospedeiros transplantados poderá facilitar o crescimento tumoral, pelo que é recomendada alguma cautela na sua utilização<sup>[53]</sup>.

Apesar de todas as suas potencialidades, as CEMs apresentam algumas características que limitam a sua utilidade, nomeadamente heterogeneidade significativa entre diferentes fontes e até mesmo dentro da mesma população celular isolada, o que acarreta comportamentos diferentes em termos de proliferação e diferenciação<sup>[54], [55]</sup>. Parâmetros como idade e género do doador<sup>[56], [57]</sup>, local da coleta<sup>[58]</sup> e técnica de aspiração<sup>[59]</sup> parecem ser responsáveis pela variabilidade observada.

### 2.2.1 – Células estaminais mesenquimatosas e seu uso na Patologia Óssea

Apesar do tecido ósseo possuir capacidades regenerativas, em situações extremas, nas quais a extensão da perda ou dano teciduais devido a traumatismos, intervenções cirúrgicas ou doenças metabólicas como osteoporose é grande de mais, a regeneração completa acaba por não acontecer. Além disso, a probabilidade de falência de consolidação de fraturas aumenta com a idade, *Diabetes Mellitus* e tabagismo<sup>[60] - [61]</sup>. Consequentemente, a indução de formação óssea *in vivo* é um objetivo *major* de várias situações do âmbito da Ortopedia, como por exemplo no caso das fraturas ósseas segmentares<sup>[62]</sup>.

Os principais alvos clínicos da medicina regenerativa a nível ósseo são as pseudartroses atróficas e a substituição de tecido ósseo perdido. As primeiras são normalmente causadas por insuficiência de suprimento sanguíneo, interposição de tecidos moles ou sequelas pós-infeção. A última resulta geralmente de traumatismos, infeções ou tumores. Atualmente, a estratégia de tratamento *gold-standard* consiste na aplicação de enxertos ósseos autólogos derivados da crista ilíaca. Outras estratégias terapêuticas, consideradas “de salvamento”, são o autoenxerto de perónio e o transplante alogénico. As abordagens referidas apresentam algumas limitações, designadamente de suprimento sanguíneo, altas taxas de morbilidade associadas à coleta autóloga e risco de rejeição ou transmissão de doenças com a transplantação alogénica<sup>[63], [64]</sup>.

Ensaio *in vitro*, e posterior confirmação com estudos em animais, permitiram descobrir que as CEMs promovem fortemente a angiogénese através de fatores parácrinos após estimulação mecânica, como ocorre na consolidação de fraturas, tornando-as especialmente interessantes para a regeneração óssea<sup>[65], [66]</sup>.

A já mencionada capacidade de *homing* também se verifica no contexto de fraturas ósseas. Num modelo de ratinho, as CEMs migraram para o local da fratura após terem sido injetadas por via sistémica, participando na sua consolidação através de indução parácrina da cicatrização do tecido, redução da inflamação local e sistémica e diferenciação em células da

linhagem óssea<sup>[67]</sup>. No entanto, a aplicação local das células parece ser uma opção mais vantajosa, uma vez que a maioria daquelas que foram administradas sistemicamente ficou aprisionada nos pulmões<sup>[68]</sup>.

A medicina regenerativa já foi implementada em pacientes com defeitos ósseos localizados ou doenças esqueléticas sistêmicas através da terapia celular<sup>[69]</sup>.

Células da MO ou CEMs autólogas foram implantadas com sucesso em diferentes casos com o intuito de melhorar a consolidação de fraturas/osteotomias, preencher defeitos ósseos, tratamento de pseudartroses, quistos ósseos e osteonecrose e melhorar a fusão vertebral.

Bruder et al<sup>[11]</sup> e Bruden, Fink e Caplan<sup>[70]</sup> conseguiram obter a cura de defeitos ósseos de tamanho crítico através de CEMs purificadas derivadas da MO. Quarto et al<sup>[71]</sup> usaram CEMs autólogas para tratar defeitos ósseos segmentares num grupo limitado de pacientes para os quais a aplicação de terapêuticas alternativas tradicionais fosse muito difícil ou tivesse já falhado. O sucesso do outcome clínico parece depender do número e concentração das células estaminais presentes na solução injetada<sup>[72]</sup>.

Ao longo dos anos, diferentes autores tentaram utilizar a técnica da injeção percutânea de MO autóloga para tratamento de pseudartroses<sup>[19]</sup>. No que concerne às pseudartroses atróficas, Connolly et al., em 1991<sup>[73]</sup>, conseguiram obter uma capacidade de consolidação comparável à dos enxertos autólogos de osso esponjoso; em 2005, Hernigou et al. concluíram que a técnica era segura e eficaz e que existia uma correlação positiva entre o número de células progenitoras usadas e o volume de calo ósseo produzido<sup>[74]</sup>.

Relativamente às pseudartroses da tibia, os resultados mostraram-se igualmente favoráveis: em 2002, Kettunen et al. chegaram à conclusão que a injeção percutânea parecia ser tão eficaz como as técnicas por via aberta<sup>[75]</sup> e, três anos mais tarde, Goel et al. conseguiram obter consolidação óssea em 15 de um total de 20 pacientes<sup>[76]</sup>.

Considerando as pseudartroses em ossos longos no geral, Garg et al. objetivaram a união de 17 de um total de 20 casos no espaço de 5 meses<sup>[77]</sup>.

Alguns autores concluíram, então, que a injeção percutânea de MO é uma "técnica minimamente invasiva", aplicável sob anestesia local, simples, segura, barata e eficaz no tratamento de casos de pseudartrose<sup>[13],[78]</sup>.

Como mencionado acima a propósito da osteoindução, as CEMs podem ser geneticamente modificadas, nomeadamente para sobre-expressarem o gene BMP, de modo a acelerarem a regeneração do tecido ósseo<sup>[62],[79]</sup>. Kallai et al, em 2010<sup>[62]</sup>, usaram um modelo de ratinho para estudar as alterações temporais da microarquitetura e propriedades biomecânicas de fraturas do rádio pós implantação destas células geneticamente modificadas. Os resultados permitiram demonstrar que o tecido regenerado estava sujeito a remodelação ao longo do tempo e verificou-se adicionalmente um aumento de cerca de 1,5 a 2 vezes da rigidez axial do membro reparado comparativamente ao contralateral ao fim de 10 e 35 semanas de seguimento. Os autores concluíram então que havia remodelação significativa do calo ósseo excedentário ao longo do tempo e que o enxerto demonstrava capacidades biomecânicas superiores, dados estes a favor de um benefício clínico na aplicação futura das CEMs na reparação de pseudartroses.

### 2.2.1.1 - Engenharia Tecidual e Reparação de Fraturas Ósseas

A engenharia tecidual também tem sido usada para acelerar o processo de reparação de fraturas ósseas<sup>[15]</sup>. Apesar de já se ter conseguido obter sucesso *in vivo* com análogos ósseos de pequenas dimensões, derivados da combinação de biomateriais com CEMs<sup>[80]</sup>, ainda não se conseguiram desenvolver *construções* de maior calibre, com trajetos de difusão superiores a 200µm. Acima desse valor, o processo de difusão não é suficiente para garantir a adequada nutrição e oxigenação celulares. Posto isto, uma vascularização funcional é essencial para a sobrevivência das *construções*. Vários estudos foram já realizados em humanos e, apesar da heterogeneidade entre eles dificultar um pouco a obtenção de conclusões, foi possível observar deposição óssea a partir dos enxertos associados a CEMs (embora em quantidade insuficiente para consolidar fraturas de grande tamanho)<sup>[15]</sup>. Em 2001, Quarto et al combinaram CEMs humanas expandidas em cultura com *scaffolds* de hidroxiapatite, com sucesso no tratamento de três pacientes com fraturas na diáfise de ossos longos<sup>[71]</sup>. Poucos anos mais tarde, Krecic Stress et al conseguiram obter uma boa recuperação clínica de um paciente com fratura cominutiva do fémur após preencherem o defeito com grânulos de trifosfato de cálcio e CEMs<sup>[81]</sup>. No entanto, não foi mencionado o tamanho exato do defeito, o que seria essencial uma vez que esse é um dos determinantes da sobrevivência das células no interior do enxerto<sup>[82]</sup>.

## Conclusões

O tratamento de grandes defeitos ósseos e pseudartroses ainda representa um grande desafio para a cirurgia de reconstrução. A estratégia terapêutica *gold standard* atual consiste na utilização de enxertos ósseos autólogos, que combinam todas as características necessárias para a indução de crescimento e regeneração ósseos: células osteogénicas e propriedades osteocondutoras e osteoindutoras <sup>[83], [84]</sup>. No entanto, os autoenxertos apresentam desvantagens, uma vez que são limitados, estão associados a morbidade do local dador e risco de infecções, e ao desenvolvimento de hematomas e dor crónica <sup>[83], [85]</sup>. Apesar de alguns destes pontos poderem ser colmatados pelo uso de enxertos alogénicos, a verdade é que também estes apresentam desvantagens, nomeadamente risco de transmissão de doenças do doador para o recetor ou reações imunogénicas <sup>[83]</sup>.

A grande esperança dos nossos dias assenta pois na medicina regenerativa, não só na área da Ortopedia e Traumatologia como em praticamente todas as áreas da medicina <sup>[19]</sup>. Uma estratégia ótima de tratamento seria a combinação de um biomaterial, técnicas de biologia celular, fatores de crescimento e estimulação mecânica – o chamado *Diamond Concept* – com uma intervenção cirúrgica adequada <sup>[13], [86]</sup>.

A vascularização é fundamental para a formação de novo osso. Os vasos sanguíneos atuam não só como fonte de nutrientes, mas também como de CEMs perivasculares, que se diferenciam conseqüentemente em osteoblastos. É, portanto, necessário que haja uma integração perfeita entre a angiogénese e a osteogénese para que se consiga assegurar uma reparação óssea apropriada <sup>[13], [87]</sup>. Como tal, é preciso que se juntem esforços e desviem atenções no sentido de solucionar o problema da vascularização, que parece ser o grande entrave à generalização do uso da engenharia tecidual na clínica <sup>[21]</sup>.

É provável que a melhor estratégia futura seja uma combinação entre terapêuticas sistémicas, tendo em vista a otimização do recrutamento de CEMs para o osso, e terapêuticas locais, que visem melhorar a angiogénese e preparar o microambiente ósseo para o processo de ossificação <sup>[88]</sup>.

## Referências Bibliográficas

- [1] E. M, G. A e S. e. a. , “The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality?,” vol. 394, n.º 6 , pp. 985-997, 2009.
- [2] L. EH e H. JHP, “The potencial of stem cells in orthopaedic surgery,” *The Journal of Bone and Joint Surgery (Br)*, vol. 88 B, n.º 7, 2006.
- [3] V. CA, “The history of tissue engineering,” *J Cell Mol Med.*, n.º 10, pp. 569-76, 2006.
- [4] N. MM, K.-o. M, M. N e e. a. , “Comprehension of terminal differentiation and dedifferentiation of chondrocytes during passage cultures,” *J Biosci Bioeng*, n.º 112, pp. 395-401, 2011.
- [5] Y. HB, S. GF e W. FC, “Effect of cryopreservation on the immunogenicity of osteoblasts,” *Transplant Proc.*, n.º 39, pp. 3030-1, 2007.
- [6] M. A.G, H. S.W, O. P e e. a. , “Engineering complex tissues,” *Tissue Engineering*, vol. 12, n.º 12, pp. 3307-3339, 2006.
- [7] B. PT, H. AM, J. WB e L. W-J, “Stem cell-based tissue engineering approaches for musculoskeleton regeneration,” *Curr Pharm Des.*, n.º 19, pp. 3429-3445, 2013.
- [8] L. U.G, L. A, K. W.S, M. N e D. V, “Synthetic augmentation for massive rotator cuff tears,” *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, vol. 19, n.º 4, pp. 360-365, 2011.
- [9] M. N, L. U.G e D. V, “Novel approaches for the management of tendinopathy,” *Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 92, n.º 15, pp. 2604-2613, 2010.
- [10] G. J, G. VM e C. AI, “Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic,” *Biomaterials*, n.º 12, pp. 253-8, 1991.
- [11] B. SP, K. AA, S. M e e. al, “Bone regeneration by implantation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells,” *J Orthop Res*, n.º 16, pp. 155-62, 1998.
- [12] J. N, H. SE, C. AI e B. SP, “Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro,” *J Cell Biochem*, n.º 64, pp. 295-312, 1997.
- [13] H. C. Fayaz, P. V. Giannoudis, M. S. Vrahas, R. Smith, C. Moran, H. Pape, C. Krettek e J. Jupiter, “The role of stem cells in fracture healing and nonunion,” *International Orthopaedics*, pp. 1587-1597, 2011.
- [14] R. AH, “Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins,” *Clin Orthop*, n.º 355, pp. 66-72, 1998.
- [15] R. Dimitriou, E. Jones, M. Dennis e P. V Giannoudis, “Bone regeneration: current concepts and future directions,” *BMC medicine*, 2011.

- [16] N. C, B. A, L. C e e. al, "Potential role for gene therapy in the enhancement of fracture healing," *Clin Orthop*, n.º 355, pp. 148-53, 1998.
- [17] J. M, Z. WV e S. NS, "Gene therapy in orthopaedic surgery: the current status," *ANZ J Surg*, n.º 74, pp. 46-54, 2004.
- [18] Y. H e M. A, "Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics," *J Artif Organs*, n.º 8, pp. 131-6, 2005.
- [19] S. A, v. G. M, I. AB e B. S, "Application of Stem Cells in Orthopedics," *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International Volume*, 2012.
- [20] W. HP, J. U e M. U, "Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering: part II," *Int J Oral Maxillofac Surg*, n.º 33, pp. 523-30, 2004.
- [21] R. J, R. N.C e v. B. C.A, "Vascularization in tissue engineering," *Trends in Biotechnology*, vol. 26, n.º 8, pp. 434-441, 2008.
- [22] C. P e J. R.K, "Angiogenesis in cancer and other diseases," *Nature*, vol. 407, n.º 6801, pp. 249-257, 2000.
- [23] A. A, B. S.B, S. S., Y. J.J. e R. A.B., "Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty," *Lancet*, vol. 367, n.º 9518, pp. 1241-1246, 2006.
- [24] Y. H, I. K, F. T e Y. K, "Generating ears from cultured autologous auricular chondrocytes by using two-stage implantation in treatment of microtia," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 124, n.º 3, pp. 817-825, 2009.
- [25] A. Bongo e E. Lee, "Stem cells: their definition, classification and sources," *Stem cells: from bench to bedside. Singapore: World Scientific Publishing*, 2005.
- [26] T. JA, I.-E. J, S. SS e e. al, "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts," *Science*, n.º 282, pp. 1145-7, 1998.
- [27] B. A, F. CY, N. SC e R. S., "Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts," *Hum Reprod*, n.º 9, pp. 2110-17, 1994.
- [28] K. HS, O. SK, P. YB e e. al, "Methods for deprivation of human embryonic stem cells," *Stem Cells*, n.º 23, pp. 1228-33, 2005.
- [29] B. J, "Stem cells and translation medicine ethics, law and policy," *Bongso A, Lee EH, eds. Stem cells: from bench to bedside. Singapore: World Scientific Publishing*, n.º 10, pp. 187-210, 2005.
- [30] P. T, S. J, D. B e S. T, "Generation of human embryonic stem cells," *Curr Protoc Cell Biol.*, vol. Unit 1 A 5, p. Chapter 1, 2011.
- [31] G. DE, A. RG, F. HG e e. al, "Telomere structure and telomerase in health and disease (Review)," *Int J Oncol.*, 2012.
- [32] K. Takahashi e S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic

- and adult fibroblast cultures by defined factors,” *Cell*, vol. 126, n.º 4, pp. 663-676, 2006.
- [33] K. Rodolfa, F. di Giorgio e S. Sullivan, “Defined reprogramming: a vehicle for changing the differentiated state,” *Differentiation*, vol. 75, n.º 7, pp. 577-579, 2007.
- [34] Y. J, V. MA, S.-O. K e e. al, “Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells,” *Science*, n.º 318, pp. 1917-20, 2007.
- [35] K. K, D. A, W. B e e. al, “Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells,” *Nature*, n.º 467, pp. 285-90, 2010.
- [36] S. M e H. K, “Induced pluripotency: history, mechanisms, ans applications,” *Genes Dev*, pp. 2239-63, 2010.
- [37] R. Mafi e e. al, “Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature,” *Open Orthopaedics Journal*, vol. 5, n.º 242-248, 2011.
- [38] J. L'evesque, J. Hendy, Y. Takamatsu, P. Simmons e L. Bendall, “Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by gcsf or cyclophosphamide,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 111, n.º 2, pp. 187-196, 2003.
- [39] J. L'evesque, J. Hendy, I. Winkler, Y. Takamatsu e P. Simmons, “Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells,” *Experimental Hematology*, vol. 31, n.º 2, pp. 109-117, 2003.
- [40] X. Wang, Y. Wang, W. Gou, Q. Lu, P. Jiang e S. Lu, “Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review,” *International Orthopaedics*, pp. 2491-2498, 2013.
- [41] P. Bossolasco, L. Cova, C. calzarossa e e. al, “Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro,” *Experimental Neurology*, vol. 193, n.º 2, pp. 312-325, 2005.
- [42] K. Fukuda, “Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes,” *Comptes Rendus: Biologies*, vol. 325, n.º 10, pp. 1027-1038, 2002.
- [43] F. U, Z. PA, L. C e e. al, “Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation,” *Stem Cells*, pp. 1367-77, 2005.
- [44] C. Porada e G. Almeida-Porada, “Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, n.º 12, pp. 1156-1166, 2010.
- [45] X. Yu, Y. Geng, X. Li e e. al, “The effects of mesenchymal stem cells on c-kit up-regulation and cell-cycle reentry of neonatal cardiomyocytes are mediated by activation of insulin-like growth factor 1 receptor,” *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 332, n.º 1-2, pp. 25-32, 2009.

- [46] T. Chen, R. Lai, M. Lee, A. Choo, C. Lee e S. Lim, "Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs," *Nucleic Acids Research*, vol. 38, n.º 1, pp. 215-224, 2009.
- [47] M. Devine, A. Bartholomew, N. Mahmud e e. al, "Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion," *Experimental Hematology*, vol. 29, n.º 2, pp. 244-255, 2001.
- [48] E. Horwitz, P. Gordon, W. Koo e e. al, "Isolated allogenic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, n.º 13, pp. 8932-8937, 2002.
- [49] M. Bernardo, F. Locatelli e F. W.E, "Mesenchymal stromal cells," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1176, pp. 101-117, 2009.
- [50] T. T, P. S, S. Y e e. al, "Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogenic hematopoietic cell transplantation," *Curr Stem Cell Res Ther*, pp. 252-9, 2009.
- [51] B. ME e F. WE, "Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy in autoimmune disorders," *Ann N Y Acad Sci*, pp. 107-17, 2012.
- [52] S. J e L. T, "Emerging stem cell therapies: treatment, safety, and biology," *Stem Cells Int*, 2012.
- [53] O. WR e R. J, "Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage," *Cel Prolif*, pp. 97-110, 2004.
- [54] B. PC e G. H, "Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity," *Stem Cells Int*, 2012.
- [55] P. DG, "Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy," *J Cell Biochem*, pp. 2806-12, 2012.
- [56] D. G, S. PC, R. C e e. al, "Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow," *J Bone Miner Res*, pp. 1115-22, 1999.
- [57] M. K, F. I, R. D e e. al, "Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow," *J Cell Biochem*, pp. 744-54, 2006.
- [58] M. RF, F. JE, B. CA e e. al, "Aspiration of osteoprogenitor cells for augmenting spinal fusion: comparison of progenitor cell concentrations from the vertebral body and iliac crest," *J Bone Joint Surg Am*, pp. 2655-61, 2005.
- [59] M. GF, B. C e E. K, "Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume," *J Bone Joint Surg Am*, pp. 1699-709, 1997.
- [60] L. C, H. E, S. A e e. al, "Effect of age on vascularization during fracture repair," *J Orthop Res*, pp. 1384-1389, 2008.

- [61] C. RC, B. MJ, M. EJ e P. BM, "Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia fractures," *J Orthop Trauma*, pp. 151-157, 2005.
- [62] I. Kallai, G. H. van Lenthe, D. Ruffoni, Y. Zilberman, R. Muller, G. Pelled e D. Gazit, "Quantitative, Structural and Image-based Mesenchymal Analysis of Nonunion Fracture Repaired by Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells," *J Biomech*, pp. 2315-2320, 2010.
- [63] T. Cypher e J. Grossman, "Biological principles of bone graft healing," *Journal of Foot and Ankle Surgery*, vol. 35, n.º 5, pp. 413-417, 1996.
- [64] C. Finkemeier, "Bone-grafting and bone-graft substitutes," *Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 84, n.º 3, pp. 454-464, 2002.
- [65] G. Kasper, N. Dankert, J. Tuischer e e. al, "Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment," *Stem Cells*, vol. 25, n.º 4, pp. 903-910, 2007.
- [66] P. Schumann, F. Tavassol, D. Lindhorst e e. al, "Consequenses of seeded cell type on vascularization of tissue engineering constructs in vivo," *Microvascular Research*, vol. 78, n.º 2, pp. 180-190, 2009.
- [67] F. Granero-Molto, J. Weis, M. Miga e e. al, "Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing," *Stem Cells*, vol. 27, n.º 8, pp. 1887-1898, 2009.
- [68] E. Jones e D. McGonagle, "Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo," *Rheumatology*, vol. 47, n.º 2, pp. 126-131, 2008.
- [69] E. Horwitz, P. Gordon, W. Koo e e. al, "Isolated allogenic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, n.º 13, pp. 8932-8937, 2002.
- [70] B. SP, F. DJ e C. AI, "Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair and skeletal regeneration therapy," *J Cell Biochem*, pp. 283-94, 1994.
- [71] Q. R, M. M, C. T e e. al, "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells," *N Engl J Med*, pp. 385-6, 2001.
- [72] H. PH, P. A, B. F e R. H, "Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: influence of the number and concentration of progenitor cells," *Journal of Bone and Joint Surgery*, pp. 1430-1437, 2005.
- [73] J. Connolly, R. Guse, J. Tiedeman e R. Dehne, "Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n.º 266, pp. 259-270, 1991.
- [74] P. Hernigou, A. Poignard, F. Beaujean e H. Rouard, "Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: influence of the number and concentration of progenitor

cells," *Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 87, n.º 7, pp. 1430-1437, 2005.

- [75] J. Kettunen, E. M"akel"a, V. Turunen, O. Soumalainen e K. Partanen, "Percutaneous bone grafting in the treatment of the delayed union and non-union of tibial fractures," *Injury*, vol. 33, n.º 3, pp. 239-245, 2002.
- [76] A. Goel, S. Sangwan, R. Siwach e A. Ali, "Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union," *Injury*, vol. 36, n.º 1, pp. 203-206, 2005.
- [77] N. Garg, S. Gaur e S. Sharma, "Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture," *Acta Orthopaedica Scandinavica*, vol. 64, n.º 6, pp. 671-672, 1993.
- [78] G. A, S. SS, S. RC e A. AM, "Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union," *Injury*, pp. 203-206, 2005.
- [79] G. D, T. G, K. P, W. E, J. M, Z. Y e M. I, "Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: A novel cell-mediated gene therapy," *J Gene Med*, pp. 121-133, 1999.
- [80] A. Caplan, "Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics," *Tissue Engineering*, vol. 11, n.º 7-8, pp. 1198-1211, 2005.
- [81] M. R. e e. al, "Mesenchymal stem cells: a Modern Approach to Treat Long Bones Defects," em *11th Conference on Medical and Biomedical Engineering and Computing*, Berlin, 2007.
- [82] A. Chatterjea, GertMeijer, C. van Blitterswijk e J. de Boer, "Clinical application of Human Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering," *Stem Cells International*, vol. 2010, 2010.
- [83] P. J e G. S, "What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells," *Injury*, 2011.
- [84] Z. G, W. C, S. K e e. al, "Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft," *Injury*, 2009.
- [85] A. ED, S. WJ, H. Chambers e e. al, "Complications of iliac crest bone graft harvesting," *Clin Orthop Relat Res*, pp. 300-9, 1996.
- [86] F. HC, Y. M e J. J, "Reconstruction of a traumatic transmetatarsal amputation with use of a latissimus dorsi free tissue transfer and the Ilizarov technique: a case report," *J Bone Joint Surg Am*, pp. 459-464, 2010.
- [87] M. C, K. T, S. MK e e. al, "Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels," *Dev Cell*, pp. 329-344, 2010.
- [88] G. A. Clines, "Prospects for Osteoprogenitor Stem Cells in Fracture Repair and Osteoporosis," *Curr Opin Organ Transplant*, pp. 73-78, 2010.

- [89] K. A. I. a. M, T. R, K. H e B. E.A, "High rate of osteolytic lesions in medium-term follow up after the AES total ankle replacement," *Foot and Ankle International*, vol. 32, n.º 2, pp. 168-175, 2011.
- [90] G. J.N, B. J.Y, L. I.K.Y e F. E.L, "Fatty infiltration and atrophy of the rotator cuff do not improve after rotator cuff repair and correlate with poor functional outcome," *American Journal of Sports Medicine*, vol. 35, n.º 5, pp. 719-728, 2007.
- [91] L. U.G, B. A, A. S, M. N, W. A.L e D. V, "Biological resurfacing for early osteoarthritis of the shoulder," *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, vol. 19, n.º 4, pp. 380-394, 2011.
- [92] C. R, L. U.G, D. B. M e e. al, "Platelet rich plasma augmentation for arthroscopic rotator cuff Stem Cells International repair: a randomized controlled trial," *American Journal of Sports Medicine*, vol. 39, n.º 2, pp. 258-265, 2011.
- [93] G. R, J. CJ e T. JT, "Human bone tissue formation in diffusion chamber culture in vivo by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells," *Bone*, n.º 16, pp. 597-601, 1995.
- [94] M. P, J. P, G. T. e e. al, "Clinical transplantation of a tissue-engineered airway," *The Lancet*, vol. 372, n.º 9655, pp. 2023-2030, 2008.
- [95] T. J, V. S e D. R, "Telomere lenght in reproduction," *Andrologia*, 2012.
- [96] B. MP, L. JB, G. Y e e. al, "Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells," *Nat Biotechnol*, n.º 27, pp. 361-8, 2009.
- [97] H. Lazarus, O. Koc, S. Devine e e. al, "Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients," *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 11, n.º 5, pp. 389-398, 2005.
- [98] W. S, O. T, H. S e e. al, "Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months," *J Tissue Eng Regen Med*, pp. 146-150, 2011.
- [99] T. P e H. P, "Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells," *Exp Hematol*, pp. 350-9, 2008.
- [100] B. SE, T. W e K. PH, "The derivation of mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells," *Cells Tissues Organs*, pp. 256-60, 2009.
- [101] H. NS, V. S, L. HJ e e. al, "In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells," *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008.
- [102] G. A, L. F, A. V e e. al, "Diabetic fracture healing," *Foot Ankle Clin*, pp. 805-824, 2006.

## **Agradecimentos**

Um especial agradecimento ao meu orientador, Dr. João Torres, pela sua dedicação e compreensão, que se mostraram fundamentais. Obrigada!

# Anexo

## Normas de Publicação da Acta Médica Portuguesa



### Acta Médica Portuguesa's Publishing Guidelines

Conselho Editorial Acta Médica Portuguesa  
Acta Med Port 2013, 5 de Novembro de 2013

#### 1. Missão

Publicar trabalhos científicos originais e de revisão na área biomédica da mais elevada qualidade, abrangendo várias áreas do conhecimento médico, e ajudar os médicos a tomar melhores decisões.

Para atingir estes objectivos a Acta Médica Portuguesa publica artigos originais, artigos de revisão, casos clínicos, editoriais, entre outros, comentando sobre os factores clínicos, científicos, sociais, políticos e económicos que afectam a saúde. A Acta Médica Portuguesa pode considerar artigos para publicação de autores de qualquer país.

#### 2. Valores

Promover a qualidade científica.  
Promover o conhecimento e actualidade científica.  
Independência e imparcialidade editorial.  
Ética e respeito pela dignidade humana.  
Responsabilidade social.

#### 3. Visão

Ser reconhecida como uma revista médica portuguesa de grande impacto internacional.

Promover a publicação científica da mais elevada qualidade privilegiando o trabalho original de investigação (clínico, epidemiológico, multicêntrico, ciência básica).

Constituir o fórum de publicação de normas de orientação.

Ampliar a divulgação internacional.

**Lema:** "Primum non nocere, primeiro a Acta Médica Portuguesa"

#### 4. Informação Geral

A Acta Médica Portuguesa é a revista científica com revisão pelos pares (*peer-review*) da Ordem dos Médicos. É publicada continuamente desde 1979, estando indexada na PubMed / Medline desde o primeiro número. Desde 2010 tem Factor de Impacto atribuído pelo Journal Citation Reports - Thomson Reuters.

A Acta Médica Portuguesa segue a política do livre acesso. Todos os seus artigos estão disponíveis de forma integral, aberta e gratuita desde 1999 no seu site [www.actamedicaportuguesa.com](http://www.actamedicaportuguesa.com) e através da Medline com interface PubMed.

A taxa de aceitação da Acta Médica Portuguesa é apro-

ximadamente de 55% dos mais de 300 manuscritos recebidos anualmente.

Os manuscritos devem ser submetidos *online* via "Submissões Online" <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/about/submissions#online> Submissions.

A Acta Médica Portuguesa rege-se de acordo com as boas normas de edição biomédica do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), do Committee on Publication Ethics (COPE), e do EQUATOR Network Resource Centre Guidance on Good Research Report (desenho de estudos).

A política editorial da Revista incorpora no processo de revisão e publicação as Recomendações de Política Editorial (*Editorial Policy Statements*) emitidas pelo Conselho de Editores Científicos (Council of Science Editors), disponíveis em <http://www.councilscienceeditors.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=3331>, que cobre responsabilidades e direitos dos editores das revistas com arbitragem científica. Os artigos propostos não podem ter sido objecto de qualquer outro tipo de publicação. As opiniões expressas são da inteira responsabilidade dos autores. Os artigos publicados ficarão propriedade conjunta da Acta Médica Portuguesa e dos autores.

A Acta Médica Portuguesa reserva-se o direito de comercialização do artigo enquanto parte integrante da revista (na elaboração de separatas, por exemplo). O autor deverá acompanhar a carta de submissão com a declaração de cedência de direitos de autor para fins comerciais.

Relativamente à utilização por terceiros a Acta Médica Portuguesa rege-se pelos termos da licença *Creative Commons* 'Atribuição – Uso Não-Comercial – Proibição de Realização de Obras Derivadas (by-nc-nd)'.

Após publicação na Acta Médica Portuguesa, os autores ficam autorizados a disponibilizar os seus artigos em repositórios das suas instituições de origem, desde que mencionem sempre onde foram publicados.

#### 5. Critério de Autoria

A revista segue os critérios de autoria do "International Committee of Medical Journal Editors" (ICMJE).

Todos designados como autores devem ter participado significativamente no trabalho para tomar responsabilidade

pública sobre o conteúdo e o crédito da autoria.

Autores são todos que:

1. Têm uma contribuição intelectual substancial, directa, no desenho e elaboração do artigo
2. Participam na análise e interpretação dos dados
3. Participam na escrita do manuscrito, revendo os rascunhos; ou na revisão crítica do conteúdo; ou na aprovação da versão final

As condições 1, 2 e 3 têm de ser reunidas.

Autoria requer uma contribuição substancial para o manuscrito, sendo pois necessário especificar em carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho.

Ser listado como autor, quando não cumpre os critérios de elegibilidade, é considerado fraude.

Todos os que contribuíram para o artigo, mas que não encaixam nos critérios de autoria, devem ser listados nos agradecimentos.

Todos os autores, (isto é, o autor correspondente e cada um dos autores) terão de preencher e assinar o "Formulário de Autoria" com a responsabilidade da autoria, critérios e contribuições; conflitos de interesse e financiamento e transferência de direitos autorais / *copyright*.

O autor Correspondente deve ser o intermediário em nome de todos os co-autores em todos os contactos com a Acta Médica Portuguesa, durante todo o processo de submissão e de revisão. O autor correspondente é responsável por garantir que todos os potenciais conflitos de interesse mencionados são correctos. O autor correspondente deve atestar, ainda, em nome de todos os co-autores, a originalidade do trabalho e obter a permissão escrita de cada pessoa mencionada na secção "Agradecimentos".

#### 6. *Copyright* / Direitos Autorais

Quando o artigo é aceite para publicação é mandatário o envio via *e-mail* de documento digitalizado, assinado por todos os Autores, com a partilha dos direitos de autor entre autores e a Acta Médica Portuguesa.

O(s) Autor(es) deve(m) assinar uma cópia de partilha dos direitos de autor entre autores e a Acta Médica Portuguesa quando submetem o manuscrito, conforme minuta publicada em anexo:

Nota: Este documento assinado só deverá ser enviado quando o manuscrito for aceite para publicação.

Editor da Acta Médica Portuguesa

O(s) Autor(es) certifica(m) que o manuscrito intitulado: \_\_\_\_\_ (ref. \_\_\_\_\_)

AMP \_\_\_\_\_) é original, que todas as afirmações apresentadas como factos são baseados na investigação do(s) Autor(es), que o manuscrito, quer em parte quer no todo, não infringe nenhum *copyright* e não viola nenhum direito da privacidade, que não foi publicado em parte ou no todo e que não foi submetido para publicação, no todo ou em parte, noutra revista, e que os Autores têm o direito ao *copyright*.

Todos os Autores declaram ainda que participaram no trabalho, se responsabilizam por ele e que não existe, da

parte de qualquer dos Autores conflito de interesses nas afirmações proferidas no trabalho.

Os Autores, ao submeterem o trabalho para publicação, partilham com a Acta Médica Portuguesa todos os direitos a interesses do *copyright* do artigo.

#### **Todos os Autores devem assinar**

Data: \_\_\_\_\_

Nome (maiúsculas): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

#### 7. Conflitos de Interesse

O rigor e a exactidão dos conteúdos, assim como as opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos Autores. Os Autores devem declarar potenciais conflitos de interesse. Os autores são obrigados a divulgar todas as relações financeiras e pessoais que possam enviesar o trabalho.

Para prevenir ambiguidade, os autores têm que explicitamente mencionar se existe ou não conflitos de interesse.

Essa informação não influenciará a decisão editorial mas antes da submissão do manuscrito, os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

Se os autores têm dúvidas sobre o que constitui um relevante interesse financeiro ou pessoal, devem contactar o editor.

#### 8. Consentimento Informado e Aprovação Ética

Todos os doentes (ou seus representantes legais) que possam ser identificados nas descrições escritas, fotografias e vídeos deverão assinar um formulário de consentimento informado para descrição de doentes, fotografia e vídeos. Estes formulários devem ser submetidos com o manuscrito.

A Acta Médica Portuguesa considera aceitável a omissão de dados ou a apresentação de dados menos específicos para identificação dos doentes. Contudo, não aceitaremos a alteração de quaisquer dados.

Os autores devem informar se o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da instituição de acordo com a declaração de Helsínquia.

#### 9. Língua

Os artigos devem ser redigidos em português ou em inglês. Os títulos e os resumos têm de ser sempre em português e em inglês.

#### 10. Processo Editorial

O autor correspondente receberá notificação da recepção do manuscrito e decisões editoriais por *email*.

Todos os manuscritos submetidos são inicialmente revistos pelo editor da Acta Médica Portuguesa. Os manuscritos são avaliados de acordo com os seguintes critérios: originalidade, actualidade, clareza de escrita, método de estudo apropriado, dados válidos, conclusões adequadas e apoiadas pelos dados, importância, com significância e

contribuição científica para o conhecimento da área, e não tenham sido publicados, na íntegra ou em parte, nem submetidos para publicação noutros locais.

A Acta Médica Portuguesa segue um rigoroso processo cego (*single-blind*) de revisão por pares (*peer-review*, externos à revista). Os manuscritos recebidos serão enviados a peritos das diversas áreas, os quais deverão fazer os seus comentários, incluindo a sugestão de aceitação, aceitação condicionada a pequenas ou grandes modificações ou rejeição. Na avaliação, os artigos poderão ser:

- a) aceites sem alterações;
- b) aceites após modificações propostas pelos consultores científicos;
- c) recusados.

Estipula-se para esse processo o seguinte plano temporal:

- Após a recepção do artigo, o Editor-Chefe, ou um dos Editores Associados, enviará o manuscrito a, no mínimo, dois revisores, caso esteja de acordo com as normas de publicação e se enquadre na política editorial. Poderá ser recusado nesta fase, sem envio a revisores.

- Quando receberem a comunicação de aceitação, os Autores devem remeter de imediato, por correio electrónico, o formulário de partilha de direitos que se encontra no site da Acta Médica Portuguesa, devidamente preenchido e assinado por todos os Autores.

- No prazo máximo de quatro semanas, o revisor deverá responder ao editor indicando os seus comentários relativos ao manuscrito sujeito a revisão, e a sua sugestão de quanto à aceitação ou rejeição do trabalho. O Conselho Editorial tomará, num prazo de 15 dias, uma primeira decisão que poderá incluir a aceitação do artigo sem modificações, o envio dos comentários dos revisores para que os Autores procedam de acordo com o indicado, ou a rejeição do artigo.

Os Autores dispõem de 20 dias para submeter a nova versão revista do manuscrito, contemplando as modificações recomendadas pelos peritos e pelo Conselho Editorial. Quando são propostas alterações, o autor deverá enviar, no prazo máximo de vinte dias, um *e-mail* ao editor respondendo a todas as questões colocadas e anexando uma versão revista do artigo com as alterações inseridas destacadas com cor diferente.

- O Editor-Chefe dispõe de 15 dias para tomar a decisão sobre a nova versão: rejeitar ou aceitar o artigo na nova versão, ou submetê-lo a um ou mais revisores externos cujo parecer poderá, ou não, coincidir com os resultantes da primeira revisão.

- Caso o manuscrito seja reenviado para revisão externa, os peritos dispõem de quatro semanas para o envio dos seus comentários e da sua sugestão quanto à aceitação ou recusa para publicação do mesmo.

- Atendendo às sugestões dos revisores, o Editor-Chefe poderá aceitar o artigo nesta nova versão, rejeitá-lo ou voltar a solicitar modificações. Neste último caso, os Autores dispõem de um mês para submeter uma versão revista, a qual poderá, caso o Editor-Chefe assim o determine, voltar

a passar por um processo de revisão por peritos externos.

- No caso da aceitação, em qualquer das fases anteriores, a mesma será comunicada ao Autor principal. Num prazo inferior a um mês, o Conselho Editorial enviará o artigo para revisão dos Autores já com a formatação final, mas sem a numeração definitiva. Os Autores dispõem de cinco dias para a revisão do texto e comunicação de quais-quer erros tipográficos. Nesta fase, os Autores não podem fazer qualquer modificação de fundo ao artigo, para além das correcções de erros tipográficos e/ou ortográficos de pequenos erros. Não são permitidas, nomeadamente, alterações a dados de tabelas ou gráficos, alterações de fundo do texto, etc.

- Após a resposta dos Autores, ou na ausência de resposta, após o decurso dos cinco dias, o artigo considera-se concluído.

- Na fase de revisão de provas tipográficas, alterações de fundo aos artigos não serão aceites e poderão implicar a sua rejeição posterior por decisão do Editor-Chefe.

Chama-se a atenção que a transcrição de imagens, quadros ou gráficos de outras publicações deverá ter a pré-via autorização dos respectivos autores para dar cumprimento às normas que regem os direitos de autor.

## 11. Publicação *Fast-track*

A Acta Médica Portuguesa dispõe do sistema de publicação *Fast-Track* para manuscritos urgentes e importantes desde que cumpram os requisitos da Acta Médica Portuguesa para o *Fast-Track*.

- a) Os autores para requererem a publicação *fast-track* devem submeter o seu manuscrito em <http://www.actamedicaportuguesa.com/> "submeter artigo" indicando claramente porque consideram que o manuscrito é adequado para a publicação rápida. O Conselho Editorial tomará a decisão sobre se o manuscrito é adequado para uma via rápida (*fast-track*) ou para submissão regular;

- b) Verifique se o manuscrito cumpre as normas aos autores da Acta Médica Portuguesa e que contém as informações necessárias em todos os manuscritos da Acta Médica Portuguesa.

- c) O Gabinete Editorial irá comunicar, dentro de 48 horas, se o manuscrito é apropriado para avaliação *fast-track*. Se o Editor-Chefe decidir não aceitar a avaliação *fast-track*, o manuscrito pode ser considerado para o processo de revisão normal. Os autores também terão a oportunidade de retirar a sua submissão.

- d) Para manuscritos que são aceites para avaliação *fast-track*, a decisão Editorial será feita no prazo de 5 dias úteis.

- e) Se o manuscrito for aceite para publicação, o objectivo será publicá-lo, online, no prazo máximo de 3 semanas após a aceitação.

## 12. Regras de ouro Acta Médica Portuguesa

- a) O editor é responsável por garantir a qualidade da revista e que o que publica é ético, actual e relevante para os leitores.

b) A gestão de reclamações passa obrigatoriamente pelo editor-chefe e não pelo bastonário.

c) O peer review deve envolver a avaliação de revisores externos.

d) A submissão do manuscrito e todos os detalhes associados são mantidos confidenciais pelo corpo editorial e por todas as pessoas envolvidas no processo de peer-review.

e) A identidade dos revisores é confidencial.

f) Os revisores aconselham e fazem recomendações; o editor toma decisões.

g) O editor-chefe tem total independência editorial.

h) A Ordem dos Médicos não interfere directamente na avaliação, selecção e edição de artigos específicos, nem directamente nem por influência indirecta nas decisões editoriais.

i) As decisões editoriais são baseadas no mérito do trabalho submetido e adequação à revista.

j) As decisões do editor-chefe não são influenciadas pela origem do manuscrito nem determinadas por agentes exteriores.

k) As razões para rejeição imediata sem peer review externo são: falta de originalidade; interesse limitado para os leitores da Acta Médica Portuguesa; conter graves falhas científicas ou metodológicas; o tópico não é coberto com a profundidade necessária; é preliminar de mais e/ou especulativo; informação desactualizada.

l) Todos os elementos envolvidos no processo de peer review devem actuar de acordo com os mais elevados padrões éticos.

m) Todas as partes envolvidas no processo de peer review devem declarar qualquer potencial conflito de interesses e solicitar escusa de rever manuscritos que sintam que não conseguirão rever objectivamente.

### 13. Normas Gerais

#### Estilo

Todos os manuscritos devem ser preparados de acordo com o "AMA Manual of Style", 10th ed. e/ou "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

Escreva num estilo claro, directo e activo. Geralmente, escreva usando a primeira pessoa, voz activa, por exemplo, "Analisámos dados", e não "Os dados foram analisados". Os agradecimentos são as excepções a essa directriz, e deve ser escrito na terceira pessoa, voz activa; "Os auto-res gostariam de agradecer". Palavras em latim ou noutra língua que não seja a do texto deverão ser colocadas em itálico.

Os componentes do manuscrito são: Página de Título, Resumo, Texto, Referências, e se apropriado, legendas de figuras. Inicie cada uma dessas secções em uma nova página, numeradas consecutivamente, começando com a página de título.

Os formatos de arquivo dos manuscritos autorizados incluem o *Word* e o *WordPerfect*. Não submeta o manuscrito em formato PDF.

#### Submissão

Os manuscritos devem ser submetidos online, via "Submissão Online" da Acta Médica Portuguesa <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/about/submissions#onlineSubmissions>.

Todos os campos solicitados no sistema de submissão online terão de ser respondidos.

Após submissão do manuscrito o autor receberá a confirmação de recepção e um número para o manuscrito.

#### Na primeira página/ página de título:

a) Título em **português** e **inglês**, conciso e descritivo

b) Na linha da autoria, liste o Nome de todos os Autores (primeiro e último nome) com os títulos académicos e/ou profissionais e respectiva afiliação (departamento, instituição, cidade, país)

c) Subsídio(s) ou bolsa(s) que contribuíram para a realização do trabalho

d) Morada e *e-mail* do Autor responsável pela correspondência relativa ao manuscrito

e) Título breve para cabeçalho

#### Na segunda página

a) Título (sem autores)

b) Resumo em **português** e **inglês**. Nenhuma informação que não conste no manuscrito pode ser mencionada no resumo. Os resumos não podem remeter para o texto, não podendo conter citações nem referências a figuras.

c) Palavras-chave (*Keywords*). Um máximo de 5 *Keywords* em inglês utilizando a terminologia que consta no Medical Subject Headings (MeSH), <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>, devem seguir-se ao resumo.

#### Na terceira página e seguintes:

##### ■ Editoriais:

Os Editoriais serão apenas submetidos por convite do Editor. Serão comentários sobre tópicos actuais. Não devem exceder as 1.200 palavras nem conter tabelas/figuras e terão um máximo de 5 referências bibliográficas. Não precisam de resumo.

##### ■ Perspectiva:

Artigos elaborados apenas por convite do Conselho Editorial. Podem cobrir grande diversidade de temas com interesse nos cuidados de saúde: problemas actuais ou emergentes, gestão e política de saúde, história da medicina, ligação à sociedade, epidemiologia, etc.

Um Autor que deseje propor um artigo desta categoria deverá remeter previamente ao Editor-Chefe o respectivo resumo, indicação dos autores e título do artigo para avaliação.

Deve conter no máximo 1200 palavras (excluindo as referências e as legendas) e até 10 referências bibliográficas. Só pode conter uma tabela ou uma figura. Não precisa de resumo.

**■ Artigos Originais:**

O texto deve ser apresentado com as seguintes secções: Introdução (incluindo Objectivos), Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos (se aplicável), Referências, Tabelas e Figuras.

Os Artigos Originais não deverão exceder as 4.000 palavras, excluindo referências e ilustrações. Deve ser acompanhado de ilustrações, com um máximo de 6 figuras/tabelas e 60 referências bibliográficas.

O resumo dos artigos originais não deve exceder as 250 palavras e serão estruturados (com cabeçalhos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão).

A Acta Médica Portuguesa, como membro do ICMJE, exige como condição para publicação, o registo de todos os ensaios num registo público de ensaios aceite pelo ICMJE (ou seja, propriedade de uma instituição sem fins lucrativos e publicamente acessível, por ex. [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)). Todos os manuscritos reportando ensaios clínicos têm de seguir o CONSORT Statement <http://www.consort-statement.org/>.

Numa revisão sistemática ou meta-análise de estudos randomizados siga as PRISMA *guidelines*.

Numa meta-análise de estudos observacionais, siga as MOOSE *guidelines* e apresente como um ficheiro complementar o protocolo do estudo, se houver um.

Num estudo de precisão de diagnóstico, siga as STARD *guidelines*.

Num estudo observacional, siga as STROBE *guidelines*.

Num *Guideline* clínico incentivamos os autores a seguir a GRADE *guidance* para classificar a evidência.

**■ Artigos de Revisão:**

Destinam-se a abordar de forma aprofundada, o estado actual do conhecimento referente a temas de importância. Estes artigos serão elaborados a convite da equipa editorial, contudo, a título excepcional, será possível a submissão, por autores não convidados (com ampla experiência no tema) de projectos de artigo de revisão que, julgados relevantes e aprovados pelo editor, poderão ser desenvolvidos e submetidos às normas de publicação.

Comprimento máximo: 3500 palavras de texto (não incluindo resumo, legendas e referências). Não pode ter mais do que um total de 4 tabelas e / ou figuras, e não mais de 50-75 referências.

O resumo dos artigos de revisão não deve exceder as 250 palavras e serão estruturados (com cabeçalhos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão).

**■ Caso Clínico:**

O relato de um caso clínico com justificada razão de publicação (raridade, aspectos inusitados, evoluções atípicas, inovações terapêuticas e de diagnóstico, entre outras). As secções serão: Introdução, Caso Clínico, Discussão, Bibliografia.

O texto não deve exceder as 1.000 palavras e 15 referências bibliográficas.

Deve ser acompanhado de figuras ilustrativas. O número de tabelas/figuras não deve ser superior a 5.

Inclua um resumo não estruturado que não exceda 150 palavras, que sumarie o objectivo, pontos principais e conclusões do artigo.

**■ Imagens em Medicina (Imagem Médica):**

A Imagem em Medicina é um contributo importante da aprendizagem e da prática médica. Poderão ser aceites imagens clínicas, de imagiologia, histopatologia, cirurgia, etc. Podem ser enviadas até duas imagens por caso.

Deve incluir um título com um máximo de oito palavras e um texto com um máximo de 150 palavras onde se dê informação clínica relevante, incluindo um breve resumo do historial do doente, dados laboratoriais, terapêutica e condição actual. Não pode ter mais do que três autores e cinco referências bibliográficas. Não precisa de resumo.

Só são aceites fotografias originais, de alta qualidade, que não tenham sido submetidas a prévia publicação. Devem ser enviados dois ficheiros: um com a qualidade exigida para a publicação de imagens e outra que serve apenas para referência em que o topo da fotografia deve vir indicado com uma seta. Para informação sobre o envio de imagens digitais, consulte as «Normas técnicas para a submissão de figuras, tabelas ou fotografias».

**■ Guidelines / Normas de orientação:**

As sociedades médicas, os colégios das especialidades, as entidades oficiais e / ou grupos de médicos que desejem publicar na Acta Médica Portuguesa recomendações de prática clínica, deverão contactar previamente o Conselho Editorial e submeter o texto completo e a versão para ser publicada. O Editor-Chefe poderá colocar como exigência a publicação exclusiva das recomendações na Acta Médica Portuguesa.

Poderá ser acordada a publicação de uma versão resumida na edição impressa cumulativamente à publicação da versão completa no *site* da Acta Médica Portuguesa.

**■ Cartas ao Editor:**

Devem constituir um comentário a um artigo da Acta Med Port ou uma pequena nota sobre um tema ou caso clínico. Não devem exceder as 400 palavras, nem conter mais de uma ilustração e ter um máximo de 5 referências bibliográficas. Não precisam de resumo.

Deve seguir a seguinte estrutura geral: Identificar o artigo (torna-se a referência 1); Dizer porque está a escrever; fornecer evidência (a partir da literatura ou a partir de uma experiência pessoal) fornecer uma súmula; citar referências.

A(s) resposta(s) do(s) Autor(es) devem observar as mesmas características.

Uma Carta ao editor discutindo um artigo recente da Acta Med Port terá maior probabilidade de aceitação se for submetida quatro semanas após a publicação do artigo.

**Abreviaturas:** Não use abreviaturas ou acrónimos no título nem no resumo, e limite o seu uso no texto. O uso de acrónimos deve ser evitado, assim como o uso excessivo e desnecessário de abreviaturas. Se for imprescindível re-correr a abreviaturas não consagradas, devem ser definidas na primeira utilização, por extenso, logo seguido pela abreviatura entre parênteses. Não coloque pontos finais nas abreviaturas.

**Unidades de Medida:** As medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser expressas em unidades do sistema métrico (metro, quilograma ou litro) ou seus múltiplos decimais.

As temperaturas devem ser dadas em graus Celsius (°C) e a pressão arterial em milímetros de mercúrio (mm Hg).

Para mais informação consulte a tabela de conversão "Units of Measure" no *website* da AMA Manual Style.

**Nomes de Medicamentos, Dispositivos ou outros Produtos:** Use o nome não comercial de medicamentos, dispositivos ou de outros produtos, a menos que o nome comercial seja essencial para a discussão.

#### Imagens

Numere todas as imagens (figuras, gráficos, tabelas, fotografias, ilustrações) pela ordem de citação no texto.

Inclua um título/legenda para cada imagem (uma frase breve, de preferência com não mais do que 10 a 15 palavras).

A publicação de imagens a cores é gratuita.

No manuscrito, são aceitáveis os seguintes formatos: BMP, EPS, JPG, PDF e TIF, com 300 *dpis* de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

As Tabelas/Figuras devem ser numeradas na ordem em que são citadas no texto e assinaladas em numeração árabe e com identificação, figura/tabela. Tabelas e figuras devem ter numeração árabe e legenda. Cada Figura e Tabela incluídas no trabalho têm de ser referidas no texto, da forma que passamos a exemplificar:

Estes são alguns exemplos de como uma resposta imunitária anormal pode estar na origem dos sintomas da doença de Behçet (Fig. 4).

Esta associa-se a outras duas lesões cutâneas (Tabela 1).

Figura: Quando referida no texto é abreviada para Fig., enquanto a palavra Tabela não é abreviada. Nas legendas ambas as palavras são escritas por extenso.

Figuras e tabelas serão numeradas com numeração árabe independentemente e na sequência em que são referidas no texto.

Exemplo: Fig. 1, Fig. 2, Tabela 1

**Legendas:** Após as referências bibliográficas, ainda no ficheiro de texto do manuscrito, deverá ser enviada legenda detalhada (sem abreviaturas) para cada imagem. A imagem tem que ser referenciada no texto e indicada a sua localização aproximada com o comentário "Inserir Figura nº 1... aqui".

**Tabelas:** É obrigatório o envio das tabelas a preto e

branco no final do ficheiro. As tabelas devem ser elaboradas e submetidas em documento *word*, em formato de tabela simples (*simple grid*), sem utilização de tabuladores, nem modificações tipográficas. Todas as tabelas devem ser mencionadas no texto do artigo e numeradas pela ordem que surgem no texto. Indique a sua localização aproximada no corpo do texto com o comentário "Inserir Tabela nº 1... aqui". Neste caso os autores autorizam uma reorganização das tabelas caso seja necessário.

As tabelas devem ser acompanhadas da respectiva legenda/título, elaborada de forma sucinta e clara.

Legendas devem ser auto-explicativas (sem necessidade de recorrer ao texto) – é uma declaração descritiva.

**Legenda/Título das Tabelas:** Colocada por cima do corpo da tabela e justificada à esquerda. Tabelas são lidas de cima para baixo. Na parte inferior serão colocadas todas as notas informativas – notas de rodapé (abreviaturas, significado estatístico, etc.) As notas de rodapé para conteúdo que não caiba no título ou nas células de dados devem conter estes símbolos \*, †, ‡, §, ||, ¶, \*\*, ††, ‡‡, §§, IIII, ¶¶.

**Figuras:** Os ficheiros «figura» podem ser tantos quantas imagens tiver o artigo. Cada um destes elementos deverá ser submetido em ficheiro separado, obrigatoriamente em versão electrónica, pronto para publicação. As figuras (fotografias, desenhos e gráficos) não são aceites em ficheiros *word*.

Em formato TIF, JPG, BMP, EPS e PDF com 300 *dpis* de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

As legendas têm que ser colocadas no ficheiro de texto do manuscrito.

Caso a figura esteja sujeita a direitos de autor, é responsabilidade dos autores do artigo adquirir esses direitos antes do envio do ficheiro à Acta Médica Portuguesa.

**Legenda das Figuras:** Colocada por baixo da figura, gráfico e justificada à esquerda. Gráficos e outras figuras são habitualmente lidos de baixo para cima.

Só são aceites imagens de doentes quando necessárias para a compreensão do artigo. Se for usada uma figura em que o doente seja identificável deve ser obtida e remetida à Acta Médica Portuguesa a devida autorização. Se a fotografia permitir de forma óbvia a identificação do doente, esta poderá não ser aceite. Em caso de dúvida, a decisão final será do Editor-Chefe.

• **Fotografias:** Em formato TIF, JPG, BMP e PDF com 300 *dpis* de resolução, pelo menos 1200 *pixels* de largura e altura proporcional.

• **Desenhos e gráficos:** Os desenhos e gráficos devem ser enviados em formato vectorial (AI, EPS) ou em ficheiro bitmap com uma resolução mínima de 600 dpi. A fonte a utilizar em desenhos e gráficos será obrigatoriamente Arial.

As imagens devem ser apresentadas em ficheiros separados submetidos como documentos suplementares, em condições de reprodução, de acordo com a ordem em que

são discutidas no texto. As imagens devem ser fornecidas independentemente do texto.

#### Agradecimentos (facultativo)

Devem vir após o texto, tendo como objectivo agradecer a todos os que contribuíram para o estudo mas não têm peso de autoria. Nesta secção é possível agradecer a todas as fontes de apoio, quer financeiro, quer tecnológico ou de consultoria, assim como contribuições individuais. Cada pessoa citada nesta secção de agradecimentos deve enviar uma carta autorizando a inclusão do seu nome.

#### Referências

Os autores são responsáveis pela exactidão e rigor das suas referências e pela sua correcta citação no texto.

As referências bibliográficas devem ser citadas numericamente (algarismos árabes formatados sobrescritos) por ordem de entrada no texto e ser identificadas no texto com algarismos árabes. **Exemplo:** "Dimethylfumarate has also been a systemic therapeutic option in moderate to severe psoriasis since 1994<sup>13</sup> and in multiple sclerosis<sup>14</sup>."

Se forem citados mais de duas referências em sequência, apenas a primeira e a última devem ser indicadas, sendo separadas por traço<sup>5-9</sup>.

Em caso de citação alternada, todas as referências devem ser digitadas, separadas por vírgula<sup>12,15,18</sup>.

As referências são alinhadas à esquerda.

Não deverão ser incluídos na lista de referências quaisquer artigos ainda em preparação ou observações não publicadas, comunicações pessoais, etc. Tais inclusões só são permitidas no corpo do manuscrito (ex: P. Andrade, co-municação pessoal).

As abreviaturas usadas na nomeação das revistas devem ser as utilizadas pelo National Library of Medicine (NLM) *Title Journals Abbreviations* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>

**Notas:** Não indicar mês da publicação.

Nas referências com 6 ou menos Autores devem ser nomeados todos. Nas referências com 7 ou mais autores devem ser nomeados os 6 primeiros seguidos de "et al".

Seguem-se alguns exemplos de como devem constar os vários tipos de referências.

#### Artigo:

Apelido Iniciais do(s) Autor(es). Título do artigo. Título das revistas [abreviado]. Ano de publicação;Volume: páginas.

1. Com menos de 6 autores

Miguel C, Mediavilla MJ. Abordagem actual da gota. *Acta Med Port.* 2011;24:791-8.

2. Com mais de 6 autores

Norte A, Santos C, Gamboa F, Ferreira AJ, Marques A, Leite C, et al. Pneumonia Necrotizante: uma complicação rara. *Acta Med Port.* 2012;25:51-5.

#### Monografia:

Autor/Editor AA. Título: completo. Edição (se não for a primeira). Vol.(se for trabalho em vários volumes). Local de publicação: Editor comercial; ano.

1. Com Autores:

Moore, K. *Essential Clinical Anatomy*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

2. Com editor:

Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. *Operative obstetrics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.

#### Capítulo de monografia:

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

#### Relatório Científico/Técnico:

Lugg DJ. *Physiological adaptation and health of an expedition in Antarctica: with comment on behavioural adaptation*. Canberra: A.G.P.S.; 1977. Australian Government Department of Science, Antarctic Division. ANARE scientific reports. Series B(4), Medical science No. 0126

#### Documento electrónico:

1. CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB. *Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

2. Monografia da Internet

Van Belle G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley TS. *Biostatistics: a methodology for the health sciences [e-book]*. 2nd ed. Somerset: Wiley InterScience; 2003 [consultado 2005 Jun 30]. Disponível em: Wiley InterScience electronic collection

3. Homepage/Website

Cancer-Pain.org [homepage na Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01; [consultado 2002 Jul 9]. Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/>.

#### Provas tipográficas

Serão da responsabilidade do Conselho Editorial, se os Autores não indicarem o contrário. Neste caso elas deverão ser feitas no prazo determinado pelo Conselho Editorial, em função das necessidades editoriais da Revista. Os autores receberão as provas para publicação em formato PDF para correcção e deverão devolvê-las num prazo de 48 horas.

#### Errata e Retracções

A Acta Médica Portuguesa publica alterações, emendas ou retracções a um artigo anteriormente publicado. Alterações posteriores à publicação assumirão a forma de errata.

#### Nota final

Para um mais completo esclarecimento sobre este assunto aconselha-se a leitura do *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* do International Committee of Medical Journal Editors, disponível em <http://www.ICMJE.org>.