

**RODRIGO BEZERRA DE MENEZES REIFF**

**Reparo de defeito osteocondral no joelho de coelhos  
utilizando centrifugado de medula óssea autóloga**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

Programa de: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo José Hernandez

**São Paulo**

**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Reiff, Rodrigo Bezerra de Menezes

Reparo de defeito osteocondral no joelho de coelhos utilizando centrifugado de medula óssea autóloga / Rodrigo Bezerra de Menezes Reiff. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Arnaldo José Hernandez.

Descritores: 1.Cartilagem articular 2.Coelhos 3.Células-tronco mesenquimais  
4.Medula óssea 5.Centrifugação 6.Joelho/anatomia & histologia

USP/FM/DBD-214/10

## **DEDICATÓRIAS**

---

A **Deus**, pela vida.

À minha esposa **Juliana**, e aos meus filhos **Theo** e **Alice**,  
pelo amor.

Aos meus pais, **Plauto** e **Heloisa**, pelo exemplo.

Aos meus irmãos, **Roberta**, **Mônica** e **João**, pela  
amizade.

# **AGRADECIMENTOS**

---

Aos Profs. Drs. Arnaldo Valdir Zumiotti, Olavo Pires de Camargo e Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, pela confiança.

Ao Prof. Dr. Arnaldo José Hernandez, pela orientação nesta tese de doutoramento. Sua história e seus valores são referência para os seus discípulos.

Ao Prof. Dr. Alberto Tesconi Croci, ao Dr. Jorge dos Santos Silva e à Dra. Márcia Uchôa de Rezende, membros da banca de qualificação, pelas correções e orientações fundamentais para o término desta tese.

Ao Prof. Dr. Marco Martins AmatuZZi e sua esposa Maria Luiza Lotumulo AmatuZZi, pelo incentivo.

Ao Dr. André Capaldo Amaral e Dr. Rogério Lustri e às alunas Fernanda Natulini Costa e Marília Cristina Romani Pedro Antônio, pela inesgotável força de trabalho.

À Dra. Márcia Uchoa de Rezende, ao Dr. Eduardo Benegas, ao Dr. Marcelo Filardi, ao Dr. Carlos Eduardo Sanchez Vaz e ao Mst. Caio D'Elia, pelo apoio irrestrito.

Ao Prof. Carlos Alberto Ribeiro Diniz, pela análise estatística.

Ao Dr. Luiz Fernando Montechi Rosa, médico veterinário, pelo suporte técnico.

Ao Prof. Rodrigo Ciciliano, pela tradução e revisão gramatical.

Ao Prof. Carlos Benatti Neto e ao tecnólogo José Antonio Sampaio Zuanon, pela análise histológica.

A Srta. Diva da Silva Godoy, pelo auxílio na editoração e elaboração das referências bibliográficas.

## **NORMALIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese de doutoramento está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso e Valéria Vilhena. 2<sup>a</sup>. Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Nomina anatômica (1980) do XI Congresso Internacional de Anatomia, México, 1980.

# SUMÁRIO

---

**LISTA DE SÍMBOLOS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE QUADROS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE GRÁFICOS**

**RESUMO**

***SUMMARY***

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Objetivos .....	7
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	8
2.1. A Cartilagem .....	9
2.2. Lesão da cartilagem.....	13
2.3. Procedimentos para o reparo da cartilagem .....	16
2.4. Células mesenquimais .....	21
2.5. Isolamento das células mesenquimais.....	25
2.6. Medula óssea.....	28
2.7. Engenharia de tecidos .....	32
2.8. Escalas de avaliação .....	39
<b>3. MÉTODO</b> .....	42
3.1. Material .....	43
3.2. Procedimento anestésico.....	44
3.3. Procedimento cirúrgico .....	44
3.4. Concentração das células mesenquimais.....	47
3.5. Eutanásia .....	49
3.6. Preparo das peças .....	50
3.7. Análise estatística .....	51
<b>4. RESULTADOS</b> .....	53
4.1. Resultados gerais .....	54
4.2. Análise histológica .....	55
4.2.1. Avaliação histológica após oito semanas .....	55

4.2.2. Avaliação histológica após 16 semanas.....	57
4.2.3. Avaliação histológica após 24 semanas.....	59
4.3. Descrição dos dados.....	61
4.3.1. Gráfico conjunto <i>Box Plot</i> .....	61
4.3.2. Análise estatística .....	62
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>85</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>
<b>ANEXOS</b>	

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

---

cm	centímetro
mm	milímetro
$\mu\text{m}$	micrometro
Kg	quilograma
mg	miligrama
ml	mililitro
UI	unidade internacional
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
<i>g</i>	força da gravidade
RPM	rotações por minuto

## **LISTA DE FIGURAS**

---

FIGURA 1 – Posicionamento do coelho e anti-sepsia .....	44
FIGURA 2 – Em A: Visualização do defeito no sulco troclear do joelho. Em B: Dispositivo broca/condutor com limitador de profundidade .....	45
FIGURA 3 – Em A: Camada intermediária do aspirado medular após centrifugação (seta). Em B: Coágulo contendo as células mesenquimais....	47
FIGURA 4 – Em A: Defeito osteocondral preenchido por coágulo de células mesenquimais. Em B: Utilização do selante de fibrina sobre o defeito osteocondral preenchido pelo coágulo.....	48
FIGURA 5 – Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 3, coelho 2, Grupo Estudo, sacrifício com oito semanas. Em A: ampliação de 40x, verificando-se osso novo trabecular (seta). Em B: ampliação de 100x, com integração do tecido de reparo à cartilagem adjacente (seta). .....	55
FIGURA 6 – Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 1, coelho 1, Grupo Controle, sacrifício com oito semanas. Em A: ampliação de 40x, notando-se tecido osteóide proveniente de ossificação endocondral (seta). Em B: ampliação de 100x, verificando- se osteoclastos na região de reabsorção do osso trabecular (seta).....	56
FIGURA 7 – Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 2, coelho 8, Grupo Estudo, sacrifício com 16 semanas. Em A: ampliação de 40x, verificando-se área de ossificação em meio ao tecido de reparo (seta). Em B: ampliação de 100x, com a presença de lacunas vazias na borda da cartilagem sadia adjacente (seta). .....	57

FIGURA 8 – Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 5, coelho 7, Grupo Controle, sacrifício com 16 semanas. Em A: ampliação de 40x, evidenciando o infiltrado de células mesenquimais, permeado por vasos sanguíneos (seta). Em B: ampliação de 100x, verificando-se ilhas de tecido calcificado em meio ao tecido de reparo (seta).....	58
FIGURA 9 – Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 3, coelho 10, Grupo Estudo, sacrifício com 24 semanas. Em A: ampliação de 40x, verificando-se infiltrado de tecido fibrociatrical em direção ao osso subcondral (seta). Em B: ampliação de 100x, evidenciando a zona de cisalhamento na borda da lesão (seta). .....	59
FIGURA 10 – Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 4, coelho 12, Grupo Controle, sacrifício com 24 semanas. Em A: ampliação de 40x, evidenciando a formação de ninhos celulares em direção à falha (seta). Em B: ampliação de 100x, verificando-se boa integração do tecido de reparo à cartilagem adjacente (seta). .....	60

## **LISTA DE QUADROS**

---

Quadro 1 – Escala de graduação histológica (máximo = 16 pontos).....52

Quadro 2 – Resultados da pontuação histológica.....54

## **LISTA DE TABELAS**

---

TABELA 1 – Estatística descritiva da média, diferença, valor da estatística “t” e p-valor, relativa à comparação do escore histológico entre os grupos Estudo e Controle, nos períodos de oito, 16 e 24 semanas, pelo Teste t-student pareado, com nível de confiança de 5% ( $\alpha=0,05$ ).	63
TABELA 2 – Estatística descritiva do grau de liberdade (g.l.), da estatística F e do p-valor, pelo Teste ANOVA, utilizando os parâmetros de intercepto e erro para a comparação dos escores histológicos do Grupo Estudo através do tempo, com nível de confiança de 5% ( $\alpha=0,05$ ).	64
TABELA 3 – Estatística descritiva do grau de liberdade (g.l.), da estatística F e do p-valor, pelo Teste ANOVA, utilizando os parâmetros de intercepto e erro para a comparação dos escores histológicos do Grupo Controle através do tempo, com nível de confiança de 5% ( $\alpha=0,05$ ).	64

## **LISTA DE GRÁFICOS**

---

Gráfico 1 – <i>Box Plot</i> da Escala de graduação histológica dos Grupos Estudo e Controle em três períodos de tempo. Ordenadas: pontuação por escala histológica. Abscissas: tempo em semanas .....	62
Gráfico 2 – Comparação Múltipla dos níveis de Semanas na variável Grupo Estudo.....	65
Gráfico 3 – Comparação Múltipla dos níveis de Semanas na variável Grupo Controle .....	65

**RESUMO**

---

Reiff RBM. *Reparo de defeito osteocondral no joelho de coelhos utilizando centrifugado de medula óssea autóloga* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 100 p.

A cartilagem articular, por sua natureza avascular, apresenta uma capacidade limitada de regeneração. Uma abordagem terapêutica para o tratamento de defeitos da cartilagem consiste na utilização de células ou tecidos aplicados ao local da lesão. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de centrifugado de medula óssea autóloga em lesões osteocondrais no joelho de coelhos, em comparação com um grupo controle de lesões osteocondrais sem preenchimento, analisando o comportamento histológico destes grupos em função do tempo. Foram utilizados doze coelhos da raça Nova Zelândia, albinos, machos, adultos, submetidos a uma lesão osteocondral, de 4 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade, em ambos os joelhos, na região da tróclea femoral. Nos joelhos direitos, que constituíram o Grupo Estudo, o defeito osteocondral foi preenchido por um coágulo de células mesenquimais, obtidas por centrifugação de um aspirado da medula óssea e selado com cola de fibrina. Nos joelhos esquerdos, que constituíram o Grupo Controle, o defeito osteocondral não recebeu qualquer preenchimento. Os animais foram divididos em três grupos de quatro coelhos, estudados após oito, 16 e 24 semanas. Os resultados foram descritos com base em uma escala de pontuação histológica que avaliou a morfologia celular, a reconstrução do osso subcondral, o aspecto da matriz, o preenchimento do defeito, a regularidade da superfície e a conexão das margens. A análise estatística foi realizada pelo Teste t-student para dados pareados na comparação entre Grupo Estudo e Grupo Controle. Para as comparações através do fator temporal, utilizou-se o Teste ANOVA *one way*. Com 5% de confiança, rejeitou-se a hipótese de igualdade entre os Grupos Estudo e Controle. Notou-se uma distância decrescente entre os escores dos Grupos Estudo e Controle com o aumento do tempo, bem como uma tendência crescente do valor da escala para o Grupo Controle. Concluiu-se que a aplicação de centrifugado de medula óssea em defeitos osteocondrais no joelho de coelhos mostrou melhor resultado na avaliação histológica, em comparação ao Grupo Controle. Analisando a evolução dos grupos através do tempo, houve uma aproximação de seus escores histológicos, sobretudo pelo aumento observado no Grupo Controle.

Descritores: 1. Cartilagem articular 2. Coelhos 3. Células-tronco mesenquimais 4. Medula óssea 5. Centrifugação 6. Joelho / anatomia & histologia

## ***SUMMARY***

---

Reiff RBM. *Repair of osteochondral defect in the knee of rabbits using autologous bone marrow centrifuged* [Thesis]. São Paulo: Medical School, University of São Paulo; 2010. 100 p.

The articular cartilage, due to its avascular nature, presents a limited regeneration capacity. A therapeutical approach to the treatment of cartilage defects consists of the utilization of cells or tissues applied to the lesion site. The aim of this study was to evaluate the effect of applying autologous bone marrow centrifuged in osteochondral lesions in the knees of rabbits, compared to a control group of osteochondral lesions without any filling, analyzing the behavior of these groups in terms of time. Twelve adult albino male New Zealand rabbits were used being submitted to an osteochondral lesion of 4 mm in diameter and 3 mm deep in both knees, at the femoral trochlea area. On the right knees, which comprised the Study Group, the osteochondral defect was filled by a clot of mesenchymal cells, obtained by centrifugation of an aspirate from bone marrow and sealed with fibrin glue. On the left knees, which comprised the Control Group, the osteochondral defect did not get any filling. The animals were divided into 3 groups of 4 rabbits, and studied after eight, 16 and 24 weeks. The results were described based on a histological grading scale which took into account the cell morphology, the subchondral bone reconstruction, the matrix staining, the filling of the defect, the surface regularity and the bonding of the edges. The statistical analysis was made by the t-student Test for paired data in the comparison between the Study Group and the Control Group. For the comparisons made by the time factor, it was used the ANOVA Test one way. With 5% level of confidence, the hypothesis of equality between the Study and Control Groups was rejected. It was observed a decreasing distance between scores of the Study and Control Groups as time increased, as well as an increasing tendency of the scale value for the Control Group. It was concluded that the application of autologous bone marrow centrifuged in osteochondral defects in the knees of rabbits showed better result in histological evaluation, in comparison to the Control Group. By analyzing the evolution of the groups through time, there was an approach of their histological scores, especially by the increase observed in the Control Group.

Descriptors: 1. Articular cartilage 2. Rabbits 3. Mesenchymal stem cells 4. Bone marrow 5. Centrifugation 6. Knee / anatomy & histology

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa relativa ao reparo da cartilagem apresentou um expressivo crescimento nos últimos dez anos, impulsionada pelo desenvolvimento de novas tecnologias.

A cartilagem articular é um tecido que possui alta capacidade de absorção de choques e baixo coeficiente de fricção. As células que compõem a cartilagem são denominadas condrócitos. Sua função primária é a de sintetizar e manter sua matriz extracelular. A matriz é composta por fluido intersticial e macromoléculas. A água responde por 60 a 80% do peso líquido da cartilagem hialina. A principal macromolécula da matriz é o colágeno, sendo mais freqüente o colágeno tipo II (95% do colágeno da cartilagem articular), e os remanescentes divididos entre os tipos VI, IX, X e XI (ANGEL et al., 2003).

A cartilagem é um exemplo de tecido com baixo ciclo celular e pouca capacidade de regeneração. A cartilagem é definida como um tecido incapaz de regenerar por si mesma, acima de tudo por sua natureza avascular (CAPLAN et al., 1997).

A verdadeira regeneração requer a restauração de todos os componentes da superfície articular, de forma que o novo tecido seja semelhante ao normal. O reparo, ao contrário da regeneração, envolve a

formação de um tecido funcional que preencha o defeito inicial, mas que não seja completamente idêntico ao tecido original (O' DRISCOLL, 2001).

Diferentes métodos cirúrgicos têm sido descritos para o tratamento de lesões cartilaginosas. A decisão sobre a modalidade a ser utilizada depende da idade e atividade do paciente, bem como da profundidade, tamanho e localização da lesão (SELLARDS et al., 2002).

Os procedimentos cirúrgicos atualmente em uso para o tratamento das lesões cartilaginosas podem ser divididos em quatro modalidades: (1) lavagem com ou sem desbridamento; (2) procedimentos de estímulo da medula do osso subcondral; (3) reparo pela utilização de células ou tecidos e (4) reparo pela utilização de suportes biológicos e fatores de crescimento. Lavagem e desbridamento têm mostrado capacidade em promover alívio dos sintomas durante um período de tempo, configurando um efeito paliativo. Os procedimentos de estímulo da medula do osso subcondral procuram induzir as células com potencial condrogênico e osteogênico disponíveis no sítio da lesão a produzir um tecido de reparo funcional. As três técnicas mais populares de estímulo da medula do osso subcondral são a artroplastia abrasiva, a perfuração subcondral e a microfratura. Embora cada técnica tenha certas vantagens e desvantagens, o tecido de reparo formado tem características semelhantes. Por natureza é um tecido fibrocartilaginoso que eventualmente cede sob estresse crônico (D'LIMA & COLWELL, 2001).

A utilização de células ou tecidos aplicados ao local da lesão permite o reparo com um tecido mais durável que mimetiza a cartilagem hialina. Estes procedimentos incluem os enxertos de periósteo ou pericôndrio, o transplante osteocondral autógeno e alógeno e o transplante autógeno de condrócitos (IZUMI et al., 2000).

Os enxertos de periósteo ou pericôndrio consistem na sutura destes tecidos sobre a superfície do defeito condral. Ricos em células germinativas, estes tecidos promovem o reparo da lesão com a formação de cartilagem, porém com alta concentração de colágeno tipo X, indicando um potencial desfavorável de estímulo de ossificação endocondral (ISOGAI et al., 2000).

O transplante osteocondral autógeno é outra opção utilizada nos defeitos osteocondrais. Envolve o transplante de um enxerto osteocondral de uma região da articulação no sentido de restaurar o sítio de lesão. Evidências experimentais indicam que a porção óssea do enxerto permite a cicatrização preservando a zona calcificada e o osso esponjoso. Este procedimento é limitado pela quantidade de sítios doadores, sendo indicado em pacientes com defeitos focais e não muito profundos. O enxerto osteocondral alógeno envolve o transplante de cartilagem hialina madura obtida de cadáveres, podendo ser utilizado em lesões mais extensas e profundas. O aloenxerto fresco é preferível ao congelado, já que a viabilidade dos condrócitos é crítica para a produção de matriz extracelular. A possibilidade de reação imune e o risco de transmissão de doenças continuam constituindo as maiores desvantagens desta técnica (SELLARDS et al., 2002).

O objetivo do transplante autólogo de condrócitos é isolar condrócitos através de digestão enzimática, multiplicar as células em cultura *in vitro*, e implantá-las no defeito cartilaginoso, onde, após diferenciação terminal, ocorrerá a produção de tecido cartilaginoso (HENDERSON et al., 2005).

A engenharia de tecidos destinada ao reparo de lesões osteocondrais envolve a utilização de suportes biológicos e fatores de crescimento, dos quais o plasma rico em plaquetas recebe destaque na literatura.

Uma área de pesquisa que gera atualmente grande otimismo entre os cirurgiões ortopédicos é o uso de células mesenquimais para terapia em doenças humanas. Existem diversas fontes de células mesenquimais potencialmente disponíveis para a reparação de lesões teciduais. A medula óssea é o sítio mais acessível para a sua obtenção. As células da medula óssea podem sofrer dois processos de diferenciação em função de sua configuração nuclear, destacando-se as células mononucleares (indiferenciadas) e as multinucleares. Dentre as células mononucleares, existe a linhagem hematopoiética, que originará células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e a linhagem mesenquimal, que poderá originar células musculares, hepatócitos, osteócitos, tecido adiposo, condrócitos e estroma. As células mesenquimais são, portanto, células primitivas produzidas durante o desenvolvimento do organismo e que dão origem a outros tipos celulares (ZAGO E COVAS, 2006).

A relevância científica deste estudo baseia-se no grande potencial de diferenciação das células mesenquimais. Em comparação a outros procedimentos para o reparo de defeitos osteocondrais, as maiores vantagens deste método são a baixa agressão ao sitio doador, a ausência de reação imune por tratar-se de um transplante autólogo, a possibilidade de preparo de um concentrado celular com poder de diferenciação e a simplificação da técnica envolvendo o uso de células-tronco.

No diretório dos grupos de pesquisa do Brasil, cadastrados no CNPq, está o de Química Medicinal e Medicina Regenerativa, certificado pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA. Este projeto está inserido na linha de pesquisa “Medicina regenerativa no reparo osteocondral”. Outros dois trabalhos foram desenvolvidos dentro desta linha de pesquisa, sendo um Projeto de Iniciação Científica intitulado “Estudo comparativo de dois suportes bioativos para o reparo de lesão osteocondral em coelhos” e um Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Padronização de um protocolo de indução de lesão osteocondral em coelhos”.

Este estudo consiste na criação de lesões osteocondrais nos joelhos de coelhos e preenchimento do defeito com um coágulo rico em células mesenquimais, obtidas pela centrifugação de um aspirado de medula óssea sem a presença de gradiente de densidade e substância anticoagulante. A hipótese inicial é de que esta técnica tenha o potencial de promover a formação de um tecido de reparo de melhor qualidade em comparação ao grupo controle onde não foi utilizado o centrifugado de medula óssea para o preenchimento dos defeitos osteocondrais.

## **1.1 Objetivos**

- 1.1.1. Avaliar o efeito da aplicação de um centrifugado de medula óssea autóloga em lesões osteocondrais no joelho de coelhos, em comparação a um grupo controle de lesões osteocondrais sem a sua utilização.
- 1.1.2. Avaliar o aspecto histológico destes grupos em função do tempo.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

---

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. A cartilagem**

COTRAN et al. (2000) descrevem a cartilagem hialina como um tecido denso, translúcido, de consistência firme, com aspecto macroscópico branco-azulado, situado principalmente nas extremidades dos ossos longos que compõem as articulações diartrodiais.

A cartilagem hialina possui características físico-químicas especiais que garantem uma mobilidade com baixo atrito e durabilidade. Este tecido complexo varia em espessura, densidade celular, composição da matriz e propriedades mecânicas na mesma articulação, entre articulações e entre espécies. Entretanto, os componentes são os mesmos em todas as articulações sinoviais (BUCKWALTER; MANKIN, 1997a).

BUCKWALTER (2000) enfatiza que a principal função da cartilagem hialina é absorver e distribuir a carga recebida sobre o osso subcondral. Isto ocorre porque sua constituição cria um ambiente intra-articular de baixa fricção, com lubrificação, o que possibilita movimentos articulares repetitivos. Descreve que a cartilagem hialina compõe-se de condrócitos (em torno de 10%) e de uma densa matriz extracelular, constituída por fibras de colágeno tipo II (10-20%), proteoglicanos (10-15%) e água (60-80%). Por sua natureza avascular, a nutrição dos condrócitos ocorre por difusão, ou seja, a partir do líquido sinovial, passando pela matriz extracelular, até atingir os condrócitos.

Os condrócitos são responsáveis pela síntese dos inúmeros componentes da matriz, bem como por substâncias que a degradam. Comparativamente, estas células podem ser metabolicamente mais ativas do que um macrófago. Possuem uma taxa glicolítica similar às células de outros tecidos vascularizados. Estas células variam em tamanho, forma e atividade metabólica nas diferentes camadas do tecido. Todas contêm as organelas para a síntese de matriz incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Frequentemente possuem filamentos intracitoplasmáticos, lipídeos, glicogênio e vesículas secretoras. Algumas células possuem cílios estendendo-se à matriz. Os condrócitos envolvem-se de matriz extracelular e não mantêm contacto célula-célula. Na cartilagem de adultos, os condrócitos raramente se dividem. Com a idade, a densidade de condrócitos declina principalmente nas camadas superficiais. Sua capacidade de resposta biológica diminui, aumentando a probabilidade de degeneração (BRAY et al., 1996).

A matriz é composta por líquido tissular e uma rede estrutural de moléculas que conferem ao tecido forma e estabilidade. O líquido tissular é composto por água, gases, pequenas proteínas, metabólitos e alta concentração de cátions para contrabalançar os proteoglicanos carregados negativamente. As macromoléculas estruturais respondem por 20% do peso total do tecido. Deste percentual, o colágeno corresponde a 60%, proteoglicanos a 25% a 35% e proteínas não colágenas e glicoproteínas a 15% a 20%. A cartilagem articular contém múltiplos tipos geneticamente distintos de colágeno, especificamente tipos II, VI, IX, X e XI. A organização

destas fibrilas em uma forte rede que se estende por todo o tecido confere sua forma e resistência tênsil. O colágeno tipo II possui uma vida média de trezentos dias e está presente em maior quantidade na cartilagem articular normal (CHAMBERS et al., 2002).

GWYNN et al. (2002) realizam um estudo da estrutura da cartilagem hialina de coelhos, constatando que sua organização obedece a um padrão de divisão em camadas semelhante ao observado em humanos. Os autores afirmam que há pouca diferença entre a estrutura fundamental da cartilagem hialina entre as diferentes espécies de vertebrados.

PIERMATTEI et al. (2006) descrevem a subdivisão da cartilagem articular, para fins didáticos, em quatro zonas distintas:

**Zona Superficial:** Camada delgada (10-20% da espessura total), denominada de superfície de deslizamento, constituída por finas fibras de colágeno tipo II, situadas paralelas à superfície da cartilagem hialina, com condrócitos de forma achatada, dispostos paralelamente à superfície articular. Nessa camada há baixa concentração de proteoglicanos e água.

**Zona de Transição ou média:** Camada mais espessa, com 40-60% da espessura total. Os condrócitos têm forma arredondada e as fibras de colágeno têm maior diâmetro, dispostas aleatoriamente.

**Zona Profunda:** Camada com espessura equivalente a 30% da espessura total. Do mesmo modo que na zona anterior, as fibras de colágeno tipo II também têm grande diâmetro, porém aqui elas estão organizadas e dispostas perpendicularmente à superfície articular. Os condrócitos são arredondados e encontrados em maior número que na zona

de transição. Além disso, na zona profunda há maior concentração de proteoglicanos e menor teor de água, especialmente na sua camada mais profunda.

**Zona de Cartilagem Calcificada:** Composta por condrócitos pequenos e irregulares, esta pode ser considerada uma região de transição entre o tecido cartilaginoso, propriamente dito, e o osso subcondral. Por ser calcificada, ela é menos elástica que a cartilagem hialina e menos rígida que o osso subcondral, transferindo assim, de forma mais amena, as solicitações mecânicas da cartilagem articular para o osso subcondral.

LAVERTY (2006) descreve que modelos animais têm contribuído para o entendimento da biologia dos mecanismos de reparo da cartilagem articular. Por sua vez, muitos aspectos devem ser considerados antes de se eleger um modelo animal para o desenvolvimento de novas estratégias para o reparo da cartilagem. O modelo ideal deve ter semelhança com a estrutura humana, com relação à anatomia, biologia celular e mecanismo articular. Idealmente, animais adultos devem ser utilizados para mimetizar o meio articular do humano adulto. Na maioria dos modelos animais, a anatomia da articulação do joelho é semelhante à anatomia dos humanos. Por outro lado, as espécies quadrúpedes apresentam uma diferente mecânica articular. Da mesma forma, vale ressaltar que há considerável variação da espessura articular entre as espécies. Neste caso, animais de maior porte são preferíveis quando há necessidade de se estudar a estratégia terapêutica sem sacrifício do animal, seja por métodos de imagem ou por visualização artroscópica.

## 2.2. Lesão da cartilagem

RIBEIRO et al. (2004) descrevem que o fenômeno de cicatrização tecidual pode ser dividido em três fases naturais: necrose, inflamação e reparação. Os autores salientam que uma lesão restrita às camadas superficiais da cartilagem (defeito condral) não obedece inteiramente às três fases, justamente pela natureza avascular da cartilagem hialina. Por outro lado, na presença de um defeito osteocondral, com exposição do osso subcondral, todas as três fases ocorrem naturalmente.

A inflamação é definida por KUMAR et al. (2005) como uma reação de defesa do organismo, frente a uma agressão tecidual. Sua principal característica é a alteração vascular local, mediada por fatores químicos, derivados de proteínas ou células plasmáticas, que acarreta migração e ativação de leucócitos e acúmulo de fluidos ao redor da região afetada.

Nos processos artríticos, o metabolismo e degradação do colágeno estão elevados. As metaloproteases têm sido implicadas na degradação do agrecano e colágeno tipo XI. O colágeno tipo XI, embora seja responsável por um pequeno percentual do colágeno total, influencia a espessura das fibras no interior da matriz, ligando-se entre si e com o colágeno tipo II, mantendo a rede fibrilar. O colágeno tipo X associa-se ao colágeno tipo II e é abundante no tecido pericelular de condrócitos na zona hipertrófica, o que sugere um papel na manutenção da cartilagem em longo prazo. A transcrição do colágeno tipo X só foi encontrada em condrócitos na região da cartilagem calcificada. Contrastando com a meia-vida longa do colágeno,

as trocas de proteoglicanos são rápidas na cartilagem normal. A perda dos proteoglicanos nos processos inflamatórios é dada pela maior atividade das enzimas proteinases, metaloproteases e agrecanase (BRAY et al., 1996).

O'DRISCOLL, em 2001, afirma que o comportamento da lesão condral difere do comportamento da lesão osteocondral. O autor define três classes de lesões condrais e osteocondrais: (1) defeito de espessura parcial com a base composta por cartilagem; (2) defeito de espessura total, não ultrapassando o limite do osso subcondral; e (3) defeito osteocondral, que ultrapassa o limite do osso subcondral.

SELLARDS et al. (2002) descrevem a classificação de Outerbridge, para lesões da cartilagem, baseada nas alterações articulares: **Grau 0**: normal; **Grau I**: lesão articular branda; **Grau II**: lesões são caracterizadas por fibrilação, com fissuras menores que 1.5 cm de diâmetro; **Grau III**: lesões com fissuras profundas até o osso subcondral; **Grau IV**: lesões são diferenciadas por expor o osso subcondral.

Na maioria das situações clínicas, a articulação pode reparar a lesão que não perturbe a integridade da superfície articular. Uma interrupção mecânica da superfície da cartilagem estimula a atividade de síntese condral, mas raramente resulta em reparo da lesão. Nas lesões osteocondrais, por sua vez, pode ser observado um mecanismo de estímulo para o reparo ósseo e condral, mas incapaz de reproduzir as propriedades mecânicas e biológicas da cartilagem articular normal (BUCKWALTER, 2002).

A experiência clínica sugere que tanto a fratura condral como a osteocondral sejam consequência de um mesmo mecanismo de trauma na articulação. Enquanto as fraturas condrais geralmente ocorrem em indivíduos esqueleticamente maduros, as fraturas osteocondrias tipicamente ocorrem em indivíduos esqueleticamente imaturos ou adultos jovens (O'DRISCOLL, 2001).

No caso específico de uma lesão com envolvimento do osso subcondral, o sangue proveniente dos vasos lesados forma um hematoma que preenche temporariamente o sítio da lesão. Um coágulo de fibrina contínuo preenche o defeito ósseo e estende-se até o defeito cartilaginoso. Ocorre a liberação de mediadores vasoativos e fatores de crescimento, incluindo o TGF- $\beta$ , a BMP e o IGF-1<sup>1</sup>. Estes fatores favorecem a invasão vascular e a migração de células indiferenciadas no interior do coágulo, estimulando suas atividades sintéticas e proliferativas, com a produção de uma nova matriz. Após duas semanas da lesão, as células mesenquimais indiferenciadas assumem a aparência de condrócitos, iniciando a síntese de matriz que contém colágeno do tipo II e altas concentrações de proteoglicanos. Estas células produzem um tecido que mimetiza a cartilagem hialina. Ocasionalmente, este tecido neoformado persiste inalterado formando uma superfície articular funcional. Com o tempo, no entanto, há uma tendência de depleção dos proteoglicanos da matriz, com fragmentação e fibrilação do tecido e diminuição do número de células com aparência de condrócitos (BUCKWALTER, 2002).

1. Transforming Growth Factor- $\beta$ , Bone Morphogenetic Protein e Insulin Growth Factor-1, respectivamente.

### **2.3. Procedimentos para o reparo da cartilagem**

O processo de cicatrização da cartilagem hialina pode ser compreendido através de modelos de reparação de defeitos osteocondrais produzidos artificialmente.

MITCHELL & SHEPARD (1976), por exemplo, realizam experimento no côndilo femoral do joelho de 25 coelhos. Ambos os joelhos são submetidos à curetagem. Em um deles são realizadas 20 perfurações com 1 mm de diâmetro cada. Após o período de seguimento (um, dois, quatro, oito e doze meses), os animais são sacrificados, seguidos de análise histológica. Os autores verificam que no lado em que é realizada a curetagem associada à perfuração do osso subcondral, os defeitos são preenchidos por tecido fibrocartilaginoso, o que não ocorre no lado submetido apenas à curetagem. Atribuem estes achados à falta de aporte vascular na região em que foi realizada somente a curetagem.

O'DRISCOLL et al. (1988) também produzem defeitos osteocondrais no sulco troclear de coelhos adolescentes (com um a dois meses de vida), seguidos de preenchimento com periósteo autólogo. Após a cirurgia, os animais são divididos em dois grupos. Em um grupo, os coelhos têm o membro operado imobilizado por quatro semanas. No outro grupo, o membro operado é submetido à movimentação passiva contínua por duas semanas. Os autores concluem que há crescimento tecidual semelhante ao tecido cartilaginoso em ambos os grupos, observando-se melhor qualidade e maior durabilidade nos animais submetidos à movimentação passiva contínua.

Ainda utilizando coelhos, MOW et al. (1991) realizam defeito osteocondral de 4 mm no côndilo medial do fêmur de 55 animais e subsequente preenchimento com periósteo autólogo. Segundo os autores, em 70% dos animais, os implantes apresentam propriedades biomecânicas e bioquímicas semelhantes à cartilagem articular normal, porém os resultados não se mantêm ao longo do tempo.

BREINAN et al. (1997) investigam o efeito da cultura autóloga de condrócitos no processo de reparo da cartilagem articular em cães adultos. Os autores realizam defeitos osteocondrais de 4 mm de diâmetro, no sulco troclear de 14 animais, dividindo-os em três grupos. No primeiro grupo o defeito é deixado vazio. No segundo grupo, um enxerto de periósteo é suturado na cartilagem hialina ao redor do defeito. No terceiro grupo, os autores aplicam cultura autóloga de condrócitos abaixo do enxerto de periósteo após a sutura. Os animais são seguidos por quatro, 12 e 18 semanas. Os autores concluem não haver diferença significativa nos três grupos em relação à qualidade do reparo.

ISOGAI et al. (2000) estudam a capacidade de formação de tecido ósseo pela associação de uma cultura de células de periósteo e cola de fibrina. Esta associação é implantada no tecido subcutâneo de ratos. Após 12 semanas, observa-se a formação de tecido ósseo nos animais submetidos ao composto de células e cola de fibrina, o que não é observado no grupo que recebe apenas a cola de fibrina. Com este estudo, os autores sustentam a capacidade de formação tecidual pelas células de periósteo, bem como o potencial de suporte desempenhado pela cola de fibrina.

IZUMI et al. (2000) descrevem a utilização de uma suspensão de condrócitos cultivados em agarose como alternativa para o tratamento de defeitos osteocondrais. Os autores comparam as características desta suspensão com a cultura isolada de condrócitos em monocamada. Após duas semanas de cultura, os condrócitos suspensos em agarose expressam mais colágeno tipo II em comparação ao grupo controle, bem como uma maior presença de glicosaminoglicanos na coloração por safranina-O.

COSTA et al. (2001) produzem defeitos de 3,5 mm diâmetro e 5,0 mm de profundidade nos joelhos direito e esquerdo de 15 coelhos adultos, com os objetivos de avaliar a utilização da matriz óssea desmineralizada no processo de reparação das lesões osteocondrais, analisar a capacidade de neoformação óssea e integração com o tecido ósseo subcondral adjacente e analisar sua capacidade de indução condrogênica. Em um membro, o defeito é preenchido com matriz óssea desmineralizada de cadáveres humanos. No lado contralateral, o defeito permanece vazio. Os animais são seguidos por duas, quatro e seis semanas de pós-operatório. A análise dos dados demonstra que há predomínio de formação de tecido de reparação e preenchimento total da lesão, com características planas e regulares no grupo que utiliza a matriz óssea desmineralizada. No grupo controle, os autores observam a produção de um tecido de reparo que preenche parcialmente a lesão.

OCHI et al. (2001) desenvolvem uma técnica baseada no transplante autólogo de condrócitos para o reparo de lesões da cartilagem. Neste estudo, os condrócitos autólogos são cultivados em um gel de atelocolágeno

por três semanas previamente à sua implantação. Os autores defendem que, através deste modelo, há uma maior probabilidade de manutenção do fenótipo dos condrócitos e adequada distribuição celular no defeito osteocondral.

CHIANG et al. (2005) avaliam o preenchimento de defeitos osteocondrais com 7 mm de diâmetro, produzidos em 48 cêndilos femorais de joelhos de porcos adultos, seguidos por um período de seis meses. Os defeitos são preenchidos com gel de colágeno contendo condrócitos, aplicados sob sutura de periósteo e cola de fibrina. A análise histológica evidencia a presença de tecido fibroso nas bordas do defeito.

HENDERSON et al. (2005) estudam a eficácia do transplante autólogo de condrócitos no reparo de lesões focais da cartilagem em humanos. São avaliados 52 pacientes através de análise clínica, radiológica e histológica, com bons resultados após 24 meses do procedimento.

HUNTLEY et al. (2005) comparam dois métodos de colheita de enxertos osteocondrais para mosaicoplastia. Os autores enfatizam que a viabilidade dos condrócitos é determinante para o sucesso clínico do enxerto osteocondral e o instrumento utilizado para a realização dos cortes tem impacto direto sobre a viabilidade celular. Neste estudo, os autores desenvolvem um dispositivo de ressecção de um enxerto osteocondral, comparando-o com um instrumento já disponível no mercado. A conclusão é favorável para o uso do dispositivo desenvolvido pelos autores.

MALININ et al. (2006) utilizam enxertos osteocondrais alógenos imersos em soro bovino fetal, conservados sob refrigeração entre 4°C e 6°C, para preencher defeitos osteocondrais nos côndilos femorais de 16 bugios adultos. Os animais são subdivididos em grupos, em função do tempo de conservação dos enxertos. Os resultados documentam uma progressiva deterioração do tecido cartilaginoso com o decorrer do tempo de conservação dos enxertos. Os autores sugerem a utilização de enxertos osteocondrais autólogos refrigerados até um tempo máximo de 14 dias.

STEINWACHS et al. (2008) discutem o papel dos procedimentos de estímulo da medula óssea no tratamento das lesões condrais e osteocondrais. Os autores chamam a atenção para dificuldades desta modalidade terapêutica em virtude de certos aspectos técnicos, como a idade do paciente, a área da lesão e sua localização. A piora da qualidade do tecido de reparo observada com o tempo reforça o conceito da limitação desta técnica, a despeito de sua simplicidade e baixo custo.

## 2.4. Células mesenquimais

As células mesenquimais estão presentes em praticamente todos os tecidos humanos normais e são fundamentais para sua manutenção. De acordo com BIANCO et al. (2001), estas células são a fonte de todos os tecidos novos formados pelos sistemas de reparo e remodelação. Sua atividade é modulada por sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência.

Segundo BERESFORD (1989), a célula-tronco é um tipo especial de célula que tem a capacidade única de se auto-renovar e dar origem a células especializadas, permanecendo em seu estado indiferenciado até que receba um sinal para se transformar em uma célula especializada.

Existem vários tipos de células-tronco: (1) Totipotentes – podem produzir todas as células embrionárias e extra-embrionárias; (2) Pluripotentes – podem produzir todos os tipos celulares do embrião; (3) Multipotentes – podem produzir células de várias linhagens; (4) Oligopotentes – podem produzir células dentro de uma única linhagem e (5) Unipotentes – produzem somente um único tipo celular maduro. Um exemplo de células-tronco pluripotentes são as embrionárias, células indiferenciadas de embrião que têm potencial para se tornarem uma variedade de tipos celulares especializados de qualquer órgão ou tecido do organismo. Por outro lado, as células-tronco adultas constituem um exemplo de células multipotentes, ou seja, células indiferenciadas encontradas em um tecido diferenciado, que podem renovar-se e diferenciar-se para produzir

o tipo de célula especializado do tecido do qual se origina. As células-tronco mesenquimais têm a capacidade de diferenciação em uma grande variedade de tecidos, como osso, cartilagem, tendão, músculo e tecido adiposo. O isolamento destas células de tecidos adultos aumentou a oportunidade de desenvolvimento de novas terapias celulares, sem as implicações éticas associadas ao uso de células-tronco embrionárias. A melhor caracterização de células-tronco mesenquimais são aquelas obtidas do estroma da medula óssea (MURPHY et al., 2003; HASSAN & EL-SHEEMY, 2004; VATS et al., 2004).

Apesar do grande potencial formador de órgãos e tecidos das células-tronco embrionárias, a alta demanda técnica para sua obtenção e cultura, o difícil controle de sua proliferação, os problemas de histocompatibilidade e os aspectos éticos e religiosos de sua utilização direcionaram o interesse dos pesquisadores para as células-tronco multipotentes adultas (GRIFFITH & NAUGHTON, 2002).

WAKITANI et al. (1994) utilizam células aderentes da medula óssea e células provenientes do periósteo para o tratamento de lesões osteocondrais. As células são cultivadas *in vitro*, distribuídas em um suporte composto por colágeno tipo I e transplantadas em defeitos de espessura total no côndilo femoral medial do joelho de coelhos. Os autores relatam que o cultivo *in vitro* não altera a capacidade de diferenciação celular. Concluem não haver diferença entre os dois tipos celulares, quanto à sua capacidade de condrogênese.

BARRY (2003) defende o conceito de que células mesenquimais obtidas da medula óssea têm a capacidade de diferenciação em células do tecido conectivo. Na prática ortopédica, é descrito o uso de células mesenquimais no reparo de tecido ósseo e cartilaginoso. O autor defende a premissa de que diversos aspectos devem ser considerados na aplicação clínica envolvendo terapias celulares, como os mecanismos de sustentação das células, as características do tecido hospedeiro e seus fatores de crescimento.

As células-tronco adultas podem ser encontradas em virtualmente todos os tecidos, mas as fontes mais conhecidas são as reservas endógenas teciduais, o sangue periférico, a placenta, o sangue do cordão umbilical, as células perivasculares e a medula óssea. Dentre estas, a medula óssea tornou-se a mais pesquisada e utilizada, devido a sua disponibilidade imediata e reserva praticamente ilimitada (MUSCHLER et al., 2004).

ALHADLAQ et al. (2004) investigam a possibilidade de criação de um côndilo femoral artificial pelo revestimento de um suporte de hidrogel baseado em poli-etileno-glicol revestido por células mesenquimais obtidas da medula óssea de ratos. As células-tronco são colhidas, expandidas em cultura e tratadas com suplementos osteoindutores ou condroindutores. A distribuição dos fatores de crescimento é realizada em duas camadas distintas. Após quatro semanas, os autores encontram expressão gênica para marcadores osteogênicos e condrogênicos, de acordo com a

estratificação prévia dos fatores de crescimento. Os achados reforçam o potencial das células mesenquimais para o reparo de defeitos articulares.

AROSARENA (2005) publica uma revisão dos avanços na medicina regenerativa, assinalando as limitações de técnicas recentemente descritas e áreas que necessitam mais pesquisas. O estado da arte no reparo de tecido músculo-esquelético é discutido. O uso de suportes bioativos, células progenitoras e fatores de crescimento são descritos como importante oportunidade de pesquisa para o melhor entendimento dos princípios da engenharia de tecidos.

BONAB et al. (2006) descrevem o papel das células mesenquimais na engenharia de tecidos. Os autores enfatizam que a pequena população deste tipo celular requer sua expansão *in vitro* previamente ao seu uso. No entanto, em culturas de longo prazo, com duração de aproximadamente quatro meses, os autores notam que as células desenvolvem um processo natural de senilidade com diminuição de seu potencial de diferenciação celular.

## **2.5. Isolamento das células mesenquimais**

VAZ (2006), em tese de doutorado realizada nesta Instituição, avalia a eficácia de um centrifugado osteogênico de medula óssea para estimular a consolidação de osteotomias na fíbula de coelhos. O material proveniente da aspiração da medula óssea é centrifugado a 400 *g*, durante 10 minutos, a 20°C. O sobrenadante é descartado pela utilização de pipeta estéril, sendo retirada uma amostra da camada intermediária para contagem e teste de viabilidade celular antes de ser administrada no local das osteotomias. O autor conclui que a administração de centrifugado de medula óssea favorece a consolidação de osteotomias experimentais em coelhos.

SANTOS (2007), em sua dissertação de mestrado realizada nesta Instituição, utiliza plasma rico em plaquetas na osteointegração de enxertos ósseos criopreservados em coelhos. O autor descreve diferentes protocolos simplificados de centrifugação para a obtenção do plasma rico em plaquetas, que variam em função do modo de centrifugação, do tipo de anticoagulante e do resultado alcançado.

KAWASAKI-OYAMA et al. (2008) descrevem a implantação de técnicas de isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais do sangue de cordão umbilical humano, com e sem uso de gradiente de densidade Ficoll-Paque. No método sem a sua utilização, as células mononucleares são isoladas por centrifugação a 1000 RPM, durante 10 minutos. A seguir são realizadas duas lavagens com meio de cultura por centrifugação a 1000 RPM, durante 8 minutos. O número de células nucleadas é estimado após

contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão pelo azul de Tripan. Os autores concluem que o isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais pelo método sem o uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque é mais eficiente.

PEREIRA et al. (2008) avaliam a aplicabilidade de células-tronco mesenquimais adultas obtidas de tecido lipoaspirado de coelhos. A técnica é descrita através da coleta da massa de tecido adiposo, seguida de fragmentação, lavagem e digestão enzimática. A suspensão de células obtida é centrifugada durante 5 minutos a 2000 RPM, sendo desprezado o sobrenadante. A zona de transição contendo as células mesenquimais é novamente suspendida em meio de cultura para posterior cultivo celular. Os autores concluem que o protocolo utilizado é factível para a obtenção de células mesenquimais a partir de tecido adiposo.

TOGNOLI et al. (2009) promovem o isolamento das células mesenquimais para aplicação em lesões de córneas em cães. O aspirado de medula óssea é disposto em tubos com gradiente de densidade na proporção 1:1, seguido de centrifugação a 678 g por 30 minutos à temperatura ambiente, processo que proporciona a separação das células mononucleares, visíveis na forma de um halo na suspensão. Após esse procedimento, com uma pipeta manual, o halo contendo as células mononucleares é aspirado e submetido a três lavagens e centrifugações com soro fetal bovino e meio de suspensão a 678 g por 10 minutos, com o objetivo de remover o gradiente de densidade da solução. Os autores concluem que a aplicação de células mononucleares administradas por via

subconjuntival não auxiliam no processo de cicatrização corneana da úlcera induzida experimentalmente.

D'ELIA (2009), em dissertação de mestrado realizada nesta Instituição, promove estudo randomizado prospectivo comparando o efeito da aplicação de enxerto autólogo de ilíaco *versus* plasma rico em plaquetas associado a medula óssea no processo de consolidação das osteotomias de abertura de cunha na tíbia de humanos. A obtenção das plaquetas é realizada utilizando-se separador celular automático. O sangue periférico é puncionado de veia da fossa cubital e, após o seu fracionamento, um analisador de refração ótica individualiza a camada plaquetária. A obtenção do aspirado de medula óssea é obtido por punções sucessivas na crista ilíaca, não excedendo 2 ml por aspiração, sendo o material anticoagulado com citrato de sódio. O autor conclui que o enxerto ósseo biológico, formado pelo aspirado de medula e o plasma rico em plaquetas foi efetivo no processo de consolidação óssea.

## 2.6. Medula óssea

A medula óssea pode ser vista como um órgão composto por dois sistemas principais, que originam linhagens celulares distintas: o sistema hematopoiético propriamente dito e seu estroma de suporte (BIANCO et al., 2001). Durante o desenvolvimento embrionário, as células da camada mesodérmica no embrião trilaminar originam vários tipos de tecidos mesenquimais, incluindo osso, cartilagem, tendões, músculos e gordura. Conforme demonstram BRUDER & FOX (1999), estas células, conhecidas como células-tronco mesenquimais, também estão presentes no organismo adulto, sendo encontradas no estroma da medula óssea e em alguns tecidos diferenciados, como o perióstio, músculo e tecido adiposo.

Segundo OWEN (1985), as evidências de que existe no estroma um sistema de células-tronco capaz de originar diversas linhagens e fenótipos celulares, fazem da medula óssea o único órgão conhecido onde dois sistemas distintos de células-tronco e tecidos interligados não só coexistam, mas também cooperem funcionalmente. Assim, foram definidos dois grupos de células-tronco na medula óssea: células-tronco hematopoiéticas, que dão origem às células sanguíneas e às do sistema imune, e as células-tronco do estroma (mesenquimais), que podem formar osso, cartilagem, gordura, músculo cardíaco e músculo esquelético.

CONOLLY (1995) chama a atenção para a grande versatilidade das células mesenquimais no processo de reparo osteogênico. O autor descreve sua experiência na utilização de células-tronco obtidas por aspiração da

medula óssea no reparo de defeitos ósseos, salientando que a eficiência das células obtidas da medula óssea pode ser aumentada por uma centrifugação adequada, bem como pela associação com fatores de crescimento.

De acordo com MUSCHLER & MIDURA (2002), o reconhecimento desta ampla distribuição de células-tronco adultas pluripotentes na medula óssea e virtualmente em todos ou outros tecidos conectivos representa um avanço significativo no campo da engenharia tecidual voltada para a ortopedia. Esta descoberta oferece várias fontes potenciais de células-tronco que podem ser retiradas, manipuladas e projetadas para aprimorar o tratamento de lesões cartilaginosas.

Apesar das pesquisas iniciais utilizarem culturas de células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea, este processo é complexo, caro e envolve um procedimento realizado em três etapas: obtenção das células, desenvolvimento da cultura e implantação (GREENBAUM & KANAT, 1993). Frente a este problema, alguns pesquisadores passaram a empregar aspirados de medula óssea administrados diretamente no local pretendido. Como as técnicas para contagem e separação de cada tipo celular isolado demandam procedimentos muito complexos, o termo células progenitoras do tecido conectivo foi adotado para descrever a população heterogênea de células-tronco mesenquimais existente nos aspirados de medula óssea, capazes de proliferação e diferenciação (MUSCHLER et al., 1997; MUSCHLER & MIDURA, 2002).

De acordo com MUSCHLER et al. (1997), o aspirado de medula óssea é a forma mais acessível de obtenção de células-tronco mesenquimais pluripotentes adultas, contendo uma média de quarenta milhões de células nucleadas por mililitro. Dentre estas, aproximadamente duas mil são células progenitoras conectivas, ou uma célula progenitora de tecido conectivo para cada vinte mil células nucleadas.

IM et al. (2001) realizam experimento em 16 coelhos brancos. Células mesenquimais são aspiradas da medula óssea, cultivadas em monocamada e implantadas em defeitos osteocondrais no sulco troclear do mesmo coelho. Outros 13 animais servem como grupo controle. A cicatrização do defeito é investigada histologicamente utilizando hematoxilina e eosina e coloração por safranina-O. Imunohistoquímica é utilizada para a detecção de colágeno tipo II. Os autores utilizam a escala de PINEDA et al. (1992) para a avaliação de seus resultados. O escore histológico semiquantitativo é maior no grupo experimental, sugerindo que a implantação de cultura de células mesenquimais melhora os resultados do processo de reparo da cartilagem.

Em 2006, NISHIMORI et al. também utilizam a cultura de células mesenquimais obtidas por aspiração da medula óssea para o reparo de lesão osteocondral em ratos. Quatro semanas após a criação de um defeito osteocondral, os animais são divididos em três grupos: o grupo controle que recebe apenas a aplicação intra-articular de uma solução salina; o grupo submetido a um procedimento de estímulo da medula óssea mais a aplicação da solução salina; e o grupo submetido a procedimento de estímulo da medula óssea mais aplicação intra-articular de cultura de células

mesenquimais. O escore histológico é maior no terceiro grupo em comparação aos demais.

SAW et al. (2009) realizam um estudo envolvendo cabras com o objetivo de determinar se a aplicação de um centrifugado de medula óssea autóloga intra-articular no joelho após perfuração subcondral, resulta em um melhor resultado histológico de reparo de cartilagem. Os autores realizam defeitos osteocondrais de 4 mm de diâmetro nos joelhos de 15 cabras, dividindo os animais em três grupos. No grupo A, definido como controle, os animais são submetidos à perfuração do osso subcondral e não recebem injeção intra-articular. No grupo B, após a perfuração do osso subcondral, os animais são submetidos a uma aplicação intra-articular de hyaluronato de sódio, uma vez por semana, durante três semanas. No grupo C, juntamente com a aplicação de hyaluronato de sódio, as cabras recebem 2 ml de um centrifugado de medula óssea autóloga, obtida por aspiração da medula óssea. Os animais são sacrificados após 24 semanas e examinados macroscopicamente e histologicamente. A avaliação histológica mostra melhor resultado obtido pela injeção intra-articular de hyaluronato de sódio associado ao centrifugado de medula óssea autóloga.

## 2.7. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar de pesquisa, centrada na regeneração e restauração funcional de órgãos. É baseada na implantação de células ou tecidos em um suporte biológico ou sintético, capaz de produzir uma construção tridimensional funcionalmente semelhante ao tecido danificado. Os materiais de suporte utilizados na engenharia de tecidos devem respeitar pré-requisitos, como ausência de toxicidade, biocompatibilidade, ausência de carcinogenicidade e capacidade de moldagem. Devem permitir adesão celular e potencial para distribuição de fatores de crescimento e material genético. Materiais de suporte biológicos incluem matrizes acelulares, colágenos, glicosaminoglicanos e fibrina. Polímeros sintéticos incluem os ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos e diversos tipos de hidrogel (KNIGHT & EVANS, 2004).

A utilização de materiais biológicos ou sintéticos para o preenchimento de defeitos osteocondrais tem sido descrita na literatura.

MESSNER & GILLQUIST (1993), comparam o desempenho de polímeros de poliéster e poliuretano tetrafluoretileno (PTFE) no preenchimento de defeitos osteocondrais produzidos no côndilo femoral dos joelhos de 30 coelhos adultos. Ao final de três meses, os autores observam a presença de sinovite e frouxidão do implante em relação às bordas do defeito osteocondral.

HASEGAWA et al. (1999), por outro lado, avaliam o desempenho biológico de um implante osteocondral tridimensional, composto de polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM) e hidroxiapatita pulverizada em sua superfície. Defeitos osteocondrais são produzidos no sulco troclear dos joelhos de coelhos adultos, sendo preenchidos pelo implante biológico. O membro contralateral é utilizado como controle. Os animais são divididos em cinco grupos, em função do tempo de sacrifício. Segundo os autores, a firme fixação dos implantes, proporcionada pela presença da hidroxiapatita, favorece a formação de tecido ósseo adjacente ao osso subcondral.

A qualidade do reparo osteocondral com o uso de enxerto composto por coral foi avaliada por SHAHGALDI (1998). O autor produz 48 defeitos osteocondrais, de 4 mm de diâmetro, no sulco troclear do joelho de 24 coelhos adultos. Após doze semanas, a análise histológica revela reabsorção gradativa do coral, com preenchimento de tecido ósseo no local do defeito osteocondral.

Em 2000, DIDUCH et al. preenchem defeitos osteocondrais realizados nos côndilos femorais dos joelhos de doze coelhos adultos, com três diferentes suportes embebidos por células-tronco mesenquimais: agarose, alginato de cálcio e colágeno tipo I. Após seguimento de oito semanas, os autores relatam aumento na concentração de proteoglicanos e de fibras de colágeno tipo II nas suspensões de agarose e alginato de cálcio, em comparação com o suporte de colágeno tipo I.

MIERISCH et al. (2002) testam um suporte de alginato de cálcio contendo diferentes concentrações de TGF- $\beta^1$  para o tratamento de defeitos osteocondrais no sulco troclear dos joelhos de 32 coelhos. Após seis ou 12 semanas, os joelhos são analisados através de escala macroscópica e histológica. Os resultados mostram melhor qualidade do tecido de reparo com menores concentrações de TGF-  $\beta$ .

Também utilizando coelhos como animais de experimentação, COHEN et al. (2003) avaliam o reparo de um defeito osteocondral experimental. Os defeitos são produzidos no sulco troclear de joelhos de 30 coelhos jovens, sendo preenchidos com suspensão de condrócitos, sobre duas matrizes poliméricas: uma composta por ácido poliláctico/alginato de cálcio e outra por ácido poliglicólico/alginato de cálcio. Segundo os autores, o alginato de cálcio, por ser um carreador, estimula a regeneração da cartilagem articular ao facilitar o acesso dos condrócitos ao foco de lesão.

LEE et al. (2004) descrevem conceitos da engenharia de tecidos baseados na utilização de suportes, células e fatores de crescimento. Os autores definem os aspectos ligados à condrogênese a partir de células tronco mesenquimais, com relação aos fatores de crescimento da família TGF<sup>2</sup>. Neste estudo, um modelo de reconstrução articular em joelhos de coelhos utilizando células-tronco mesenquimais é analisado através de suas propriedades biomecânicas, histológicas e bioquímicas. Após 12 semanas, os autores confirmam diferenciação condrogênica no sítio da lesão.

1. Transforming Growth Factor- $\beta$ . 2. Transforming Growth Factor.

FRENKEL et al. (2005) investigam aplicação de dois implantes multifásicos no reparo de defeitos osteocondrais em coelhos. Os implantes contemplam tanto as propriedades maleáveis da cartilagem hialina, bem como as características de rigidez do osso subcondral. A região óssea de ambos os implantes é composta por uma combinação de ácido polilático e hyaluronato. Um complexo de hidrogel e quitosana compõe a região cartilaginosa do primeiro implante. No segundo implante, esta camada é composta por um suporte de colágeno tipo I. São realizados defeitos osteocondrais nos joelhos de 18 coelhos, que são divididos em dois grupos de nove coelhos. Um grupo recebe o implante de hidrogel e quitosana e o outro grupo o suporte de colágeno tipo I. O membro contralateral permanece sem preenchimento. A porcentagem de cartilagem hialina formada é maior no grupo do implante de colágeno tipo I, enquanto no grupo do complexo de hidrogel e quitosana, observa-se melhor reconstituição do osso subcondral e conexão das margens. Os autores defendem que os implantes constituem-se adequado veículo para o transplante de células-tronco e condrócitos.

KONDO et al. (2005) avaliam, através deste estudo, o comportamento de um composto de  $\beta$ -tricalciofosfato implantado na região condilar de joelhos de ratos. Os espécimes são avaliados por análise histológica, histoquímica e por marcadores protéicos. Os autores concluem, após 28 dias, que o composto tem boa biocompatibilidade, uma vez que tanto a formação como reabsorção óssea têm início num estágio imediato após a implantação.

RUDERT et al. (2005) comparam três diferentes suportes contendo condrócitos alogênicos para o tratamento de defeitos osteocondrais de três milímetros de diâmetro no sulco troclear de joelhos de 33 coelhos Nova Zelândia. São analisados suportes de dura-máter liofilizada, de ácido poliláctico e um composto de poliglactina/polidioxanona. Os defeitos são analisados por suas características macroscópicas, histológicas, imunohistoquímicas e por microscopia eletrônica, após seis semanas, seis meses e doze meses. Os autores não encontram diferença significativa entre os três suportes analisados.

Já UEMATSU et al. (2005), implantam ácido poli-láctico glicólico embebido por células-tronco mesenquimais em defeitos osteocondrais produzidos no sulco troclear de joelhos de 20 coelhos adultos. Após doze semanas, os resultados evidenciam a formação de um tecido branco, liso e brilhante, macroscopicamente semelhante à cartilagem articular.

SHAO et al. (2006) também utilizam células-tronco mesenquimais sobre suporte de polímero em coelhos. Após oito semanas, os resultados são semelhantes aos relatados por UEMATSU et al. (2005), mas após seis meses de seguimento, os implantes mostram área de fissura em sua estrutura e perda da integração com a margem de cartilagem articular vizinha.

KANDEL et al. (2006) desenvolvem um modelo de construção de um suporte bifásico para o tratamento de lesões osteocondrais de 4 mm de diâmetro na tróclea de joelhos de cabras, composto de tecido cartilaginoso

ancorado em um substrato de cerâmica porosa. Os autores comparam os resultados com um grupo controle de suportes compostos apenas por cerâmica. Após quatro meses, o grupo controle apresenta a formação de tecido predominantemente fibroso. Por outro lado, o implante contendo o tecido cartilaginoso leva a formação de um reparo com proporção adequada de colágeno tipo II. Após nove meses, há um aumento significativo da concentração de colágeno nos joelhos submetidos ao implante bifásico, sugerindo que o tecido cartilaginoso tem o potencial de maturação após a implantação *in vivo*.

ISHII et al. (2007) investigam o potencial de reparo de um carreador composto de cola de fibrina e fator de crescimento em defeitos cilíndricos de 5 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade na tróclea femoral de joelhos de coelhos. Os espécimes são avaliados após oito semanas do procedimento cirúrgico, através de escala histológica semiquantitativa. Os resultados mostram que a implantação do composto formado pela cola de fibrina e o fator de crescimento induz a cicatrização do defeito osteocondral. Os autores concluem que este método de suporte é útil para a promoção de reparo em defeitos articulares.

Mais recentemente, NAKAMURA & WOO (2009) caracterizam um método de engenharia tecidual baseado na construção de um composto de células mesenquimais derivadas de tecido sinovial, livres de suporte, para o reparo das lesões condrais no côndilo femoral medial de suínos. Após seis meses, os autores notam que, embora haja um padrão aceitável de reparo, o

tecido fibroso ainda predomina. O plasma rico em plaquetas é descrito como uma fonte potencial de fatores de crescimento favoráveis à condrogênese.

Ainda em 2009, CHIANG & JIANG, publicam uma extensa revisão das técnicas de engenharia celular destinadas ao reparo das lesões de cartilagem, dividindo a evolução das mesmas em quatro gerações. A primeira geração envolve a cultura autóloga de condrócitos, com o auxílio da sutura de perióstio como arcabouço para o confinamento e condução celular. Na segunda geração, os condrócitos são expandidos e cultivados em suportes bioabsorvíveis previamente à sua implantação. A terceira geração é caracterizada por um avanço da qualidade dos suportes, com propriedades condro-indutivas e condro-condutivas, e mudança das condições de cultura para melhorar as propriedades físicas da relação célula-suporte. Na quarta geração, a biotecnologia é introduzida à engenharia de tecidos. A terapia gênica aplicada aos condrócitos visa auxiliar o processo de condrogênese. Células-tronco de várias origens são utilizadas para substituir os condrócitos. Os fatores de crescimento são adicionados aos meios contendo condrócitos ou células-tronco para direcionar a condrogênese. Melhora a tecnologia dos suportes, incluindo o conceito de afinidade celular.

## **2.8. Escalas de avaliação:**

Em 1988, O'DRISCOLL et al. utilizam enxerto de periósteo tibial para o preenchimento de defeitos na cartilagem do sulco troclear de joelhos de coelhos. Os animais são aleatoriamente divididos em três grupos em função do tratamento pós-operatório. Em um grupo, os coelhos têm o joelho imobilizado durante quatro semanas. Em outro grupo, os animais realizam movimentação intermitente em suas gaiolas. No terceiro grupo, os coelhos são submetidos à movimentação passiva contínua durante duas semanas. Após um ano do procedimento cirúrgico, o tecido regenerado de cada animal é estudado por análise macroscópica, histológica, histoquímica e bioquímica. Os autores utilizam uma escala de graduação histológica e histoquímica, com pontuação máxima de 24 pontos, divididos em quatro categorias. A natureza do tecido predominante é avaliada pela morfologia celular e coloração da matriz por safranina-O. As características estruturais são descritas pela regularidade da superfície, integridade estrutural, largura do preenchimento e conexão das margens. As alterações degenerativas do tecido de reparo são avaliadas pela hipocelularidade e agrupamento de condrócitos. As alterações da cartilagem adjacente são analisadas pela celularidade, agrupamento celular e coloração da matriz. Os autores encontram melhores resultados no grupo submetido à movimentação passiva contínua (19,2 pontos) em comparação com o grupo submetido à movimentação ativa intermitente (11,2 pontos) e aquele submetido à imobilização (12,9 pontos).

PINEDA et al. (1992) desenvolvem uma escala semiquantitativa para graduação do processo natural de cicatrização de defeitos na cartilagem articular. A escala é composta de quatro parâmetros: porcentagem de preenchimento do defeito, reconstituição da junção osteocondral, coloração da matriz e morfologia celular. A escala tem pontuação que varia de 0 a 14, tendo sido desenvolvida para avaliar a cicatrização de defeitos por perfuração na cartilagem do joelho de coelhos com dois, 14, 30, 60 e 120 dias após a cirurgia. Foram realizados defeitos de 2,7 mm e 1,5 mm, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre as duas dimensões de defeitos. Por outro lado, a diferença nos escores observados entre os espécimes em função do tempo foi significativa. Os autores recomendam o uso da escala para a comparação de resultados em pesquisas envolvendo o processo de reparo da cartilagem articular.

CAPLAN et al. (1997) apresentam uma abordagem experimental para a regeneração tecidual recapitulando os eventos desencadeados pela utilização de células mesenquimais. O reparo e a regeneração da cartilagem articular são o foco do estudo. Os autores realizam defeitos de profundidade total na cartilagem do côndilo medial do fêmur distal do joelho de coelhos. Os animais são distribuídos em três grupos, sendo os defeitos preenchidos por células mesenquimais ou enxerto alógeno de condrócitos. O terceiro grupo não recebe preenchimento e serve como controle. Os resultados são expressos por análise histológica através de uma escala de pontuação desenvolvida pelos autores.

A Sociedade Internacional para o Reparo da Cartilagem, através de seu Comitê de Análise Histológica, desenvolveu um sistema de pontuação para a avaliação de resultados envolvendo o reparo da cartilagem. A principal característica da escala é a indicação de sua utilização apenas em humanos. As recomendações são a sua aplicação a pequenos fragmentos de biópsia, a utilização de parâmetros visuais através da comparação com uma série de imagens catalogadas e a possibilidade de ser combinada com sistemas de graduação adicionais. São analisados seis parâmetros: superfície, matriz, distribuição celular, viabilidade celular, osso subcondral e mineralização da cartilagem. A escala tem variação mínima de 0 pontos e máxima de 18 pontos, sendo este aplicado ao resultado de reparo ideal (MAINIL-VARLET et al., 2003).

Embora a maioria dos procedimentos para o reparo de defeitos utilize a análise histológica ou histoquímica para uma melhor compreensão dos resultados, HATTORI et al. (2005) desenvolvem um método de avaliação do reparo de lesões osteocondrais, por análise por ultrassonográfica. Os autores avaliam procedimentos para o reparo de lesões de cartilagem em coelhos, concluindo que a ultrassonografia pode ser uma ferramenta no diagnóstico de regeneração da cartilagem.

## **3. MÉTODO**

---

### **3. MÉTODO**

Os procedimentos a seguir descritos estão em conformidade com a lei número 6.638 de 08 de maio de 1979, que estabelece as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo sob o protocolo número 917/05 (Anexos).

#### **3.1. Material:**

Foram utilizados quinze coelhos da raça Nova Zelândia, com seis meses de vida, albinos, machos, adultos, com peso médio de 3,1 Kg, que foram obtidos junto ao Biotério da Universidade Estadual Paulista (UNESP) *Campus* Botucatu e mantidos no Biotério da Universidade de Araraquara (UNIARA). Os animais foram previamente examinados por médico veterinário para confirmar suas perfeitas condições de saúde e ficaram acondicionados em gaiolas metálicas individuais de 70 x 70 x 70 cm. A alimentação constou de ração industrial, balanceada e peletizada, e água “ad libitum”. O ambiente de experimentação permaneceu iluminado com luz artificial por 12 horas contínuas diárias. A temperatura e o nível de ruído foram mantidos estáveis.

### 3.2. Procedimento anestésico:

Utilizou-se o protocolo de anestesia preconizado pelo Canadian Council of American Care. Cada animal recebeu aplicação intramuscular de uma solução contendo 40 mg/Kg de quetamina a 10%, associada a 5 mg/Kg de cloridrato de xilazina a 2%, na região proximal do membro pélvico. O tempo médio de indução anestésica com esta técnica foi de 5 a 10 minutos, proporcionando uma duração de aproximadamente 50 minutos. Os coelhos foram identificados com numeração na orelha realizada com marcador em brasa, logo após a indução anestésica.

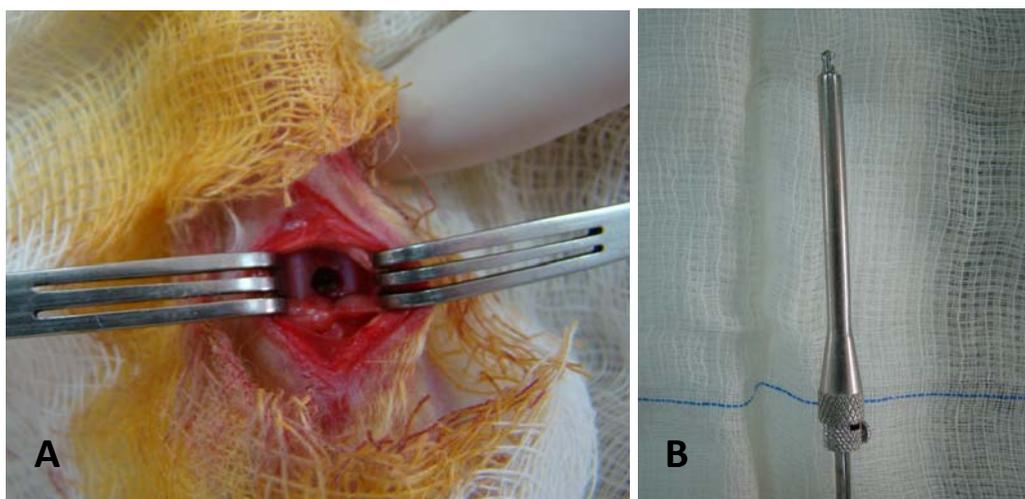
### 3.3. Procedimento cirúrgico:

O animal permaneceu em decúbito dorsal horizontal em mesa operatória apropriada. Realizou-se tricotomia dos joelhos direito e esquerdo. A seguir, foram realizadas a assepsia e anti-sepsia com solução degermante Laboriodine<sup>®</sup>, com 10% de iodopovidona e solução iodopovidona tópica Riodeine<sup>®</sup>, com 10% de iodo ativo (Figura 1).



**FIGURA 1:** Posicionamento do coelho e anti-sepsia

O campo cirúrgico foi montado com campos fenestrados estéreis, ficando expostas somente as regiões a serem operadas. Realizou-se via de acesso longitudinal medial sobre o joelho, estendendo-se do pólo inferior da patela em direção à tuberosidade anterior da tíbia, dissecção de pele e subcutâneo e exposição do tendão patelar. Realizou-se incisão na porção central do tendão patelar, no sentido longitudinal, por toda a sua extensão, desde o pólo inferior da patela até a tuberosidade anterior da tíbia. Procedeu-se o afastamento da gordura infra-patelar em direção caudal, com subsequente visualização do sulco troclear do joelho. O defeito osteocondral foi realizado na região central da tróclea femoral, utilizando-se um condutor e uma broca de 4 mm de diâmetro, acoplada a um perfurador dotado de baixa velocidade de rotação. A profundidade de 3 mm do defeito osteocondral foi controlada pela presença de um limitador de profundidade implantado no conjunto broca/condutor (Figura 2).



**FIGURA 2:** Em A: Visualização do defeito osteocondral no sulco troclear do joelho. Em B: Dispositivo broca/condutor com limitador de profundidade

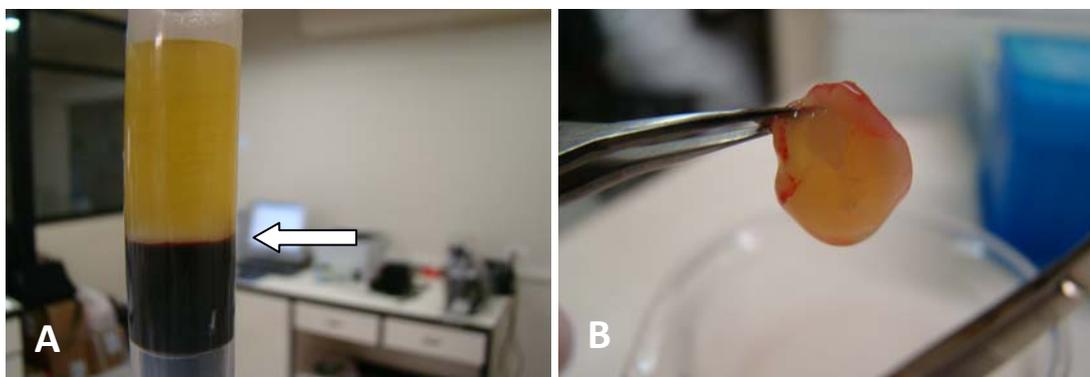
Ambos os joelhos foram submetidos a uma perfuração óssea na face anterior da tíbia, com auxílio de uma broca de 1,5 mm de diâmetro, no limite superior da tuberosidade anterior da tíbia. Realizou-se aspiração de 1 ml de sangue da medula óssea de ambas metáfises proximais da tíbia, bem como 1 ml de sangue medular de ambos defeitos osteocondrais. Este volume de 4 ml foi centrifugado para dar origem ao concentrado de células mononucleares utilizado no preenchimento do defeito osteocondral dos joelhos direitos, que constituíram o **Grupo estudo**. Os joelhos esquerdos, que constituíram o **Grupo controle**, não receberam qualquer preenchimento em seu defeito osteocondral.

Realizou-se o fechamento por planos da ferida operatória, utilizando-se fio de sutura de poliglactina incolor, absorvível, sintético, marca vicryl® 3.0 para o tendão patelar e fio de sutura não absorvível, composto de nylon mononylon Ethicon® 4.0 para a sutura da pele.

Imediatamente após o término do procedimento cirúrgico, o animal foi acondicionado em um cesto apropriado, aquecido e isolado dos demais. Foi administrada uma dose de 0,5 ml por via intramuscular de pencivet® ppu, antibacteriano e antiinflamatório, contendo em 100 ml do frasco-ampola as penicilinas G benzatina (10.000.000 UI) e procaína (10.000.000 UI), sulfato de dihidroestreptomicina (10.500 mg) e piroxicam (1.000 mg). Após recuperação anestésica total, o coelho foi devolvido à sua gaiola no biotério, recebendo água e ração à vontade. A carga total nos membros operados foi permitida imediatamente, sem qualquer tipo de restrição ou imobilização.

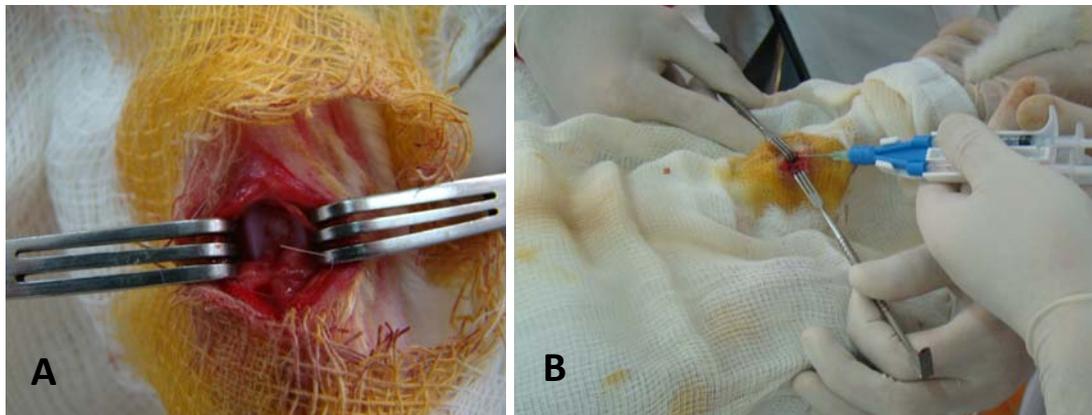
### 3.4. Concentração das células mesenquimais

O material aspirado da medula óssea foi processado em condições estéreis em câmara com fluxo laminar marca Quimis<sup>®</sup>, preparada 30 minutos antes do início do procedimento. A amostra de 4 ml da seringa plástica foi transferida para um tubo neutro estéril, por meio de agulha calibre 19-gauge. Este material foi levado a uma centrífuga da marca Marconi<sup>®</sup>, modelo MA872, sendo centrifugado a 400 g durante 10 minutos, à temperatura ambiente (VAZ, 2006). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado com pipeta Pasteur estéril. Como o material foi processado sem a presença de substância anticoagulante, houve a formação de um coágulo na camada de estratificação das células mononucleares, ou seja, a camada intermediária entre o plasma descartado e as células sedimentadas no fundo do tubo compostas por hemácias, com maior densidade (Figura 3). Testes preliminares foram realizados com o objetivo de caracterizar a formação do coágulo na zona intermediária.



**FIGURA 3:** Em A: Camada intermediária do aspirado medular após centrifugação (seta). Em B: Coágulo contendo as células mesenquimais.

Este coágulo contendo as células mesenquimais foi implantado juntamente com 0,2 ml do selante de fibrina Beriplast®, no defeito osteocondral do joelho direito, constituindo o **Grupo Estudo** (figura 4). Nos joelhos esquerdos, que constituíram o **Grupo Controle**, o defeito osteocondral não recebeu qualquer preenchimento.



**FIGURA 4:** Em A: Defeito osteocondral preenchido por coágulo de células mesenquimais. Em B: Utilização do selante de fibrina sobre o defeito osteocondral preenchido pelo coágulo.

No decorrer do experimento, dois coelhos foram a óbito e um coelho foi sacrificado, em função de automutilação. O sacrifício foi realizado através do protocolo de eutanásia descrito no capítulo 3.4.. Os doze coelhos restantes foram divididos em três grupos de quatro animais, em função do tempo decorrido entre o procedimento cirúrgico e a eutanásia. Constituíram-se, assim, os grupos **Estudo** (joelhos direitos) e **Controle** (joelhos esquerdos), estudados após oito, 16 e 24 semanas.

### **3.5. Eutanásia**

A eutanásia foi realizada seguindo-se a resolução de número 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 2002, que estabelece as normas sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, sendo conduzida por médico veterinário habilitado. Os animais foram sacrificados após oito, 16 e 24 semanas do procedimento cirúrgico. A definição dos grupos foi realizada através de sorteio. A eutanásia foi realizada em sala separada, longe dos outros animais. Realizou-se anestesia com a aplicação intramuscular, na região proximal do membro pélvico, de uma solução contendo 120 mg/Kg de quetamina a 10%, associada a 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina a 2%, seguida da administração intra-cardíaca de solução de cloreto de potássio a 20%. Após a retirada das peças anatômicas para o estudo histológico, o descarte das carcaças dos animais foi realizado em local apropriado, conforme as normas de biossegurança expressas na resolução número 5, de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Os joelhos foram removidos por osteotomia realizada no fêmur e desinserção dos ligamentos com a tíbia. As peças foram submetidas à limpeza cuidadosa, retirando-se o excesso de partes moles, colocadas em recipientes adequados com solução de formol a 10% e identificados com o número do coelho e o lado do membro posterior (direito ou esquerdo) correspondente.

### 3.6. Preparo das peças

O processamento das peças anatômicas, assim como sua análise histológica, foi realizado no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Araraquara (UNESP). As lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram analisadas por microscopia óptica convencional pelo patologista responsável. Utilizamos a tramitação laboratorial padrão para a coloração hematoxilina/eosina, processo que se estendeu por 60 dias e incluiu os seguintes passos:

- ✓ Fixação em solução de formol a 10% durante 24 horas;
- ✓ Lavagem em água corrente por 24 horas;
- ✓ Desmineralização em solução de Morse (ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20% em partes iguais) por 45 dias;
- ✓ Neutralização da solução de formol com solução de sulfato de sódio a 5% por 4 dias;
- ✓ Lavagem em água corrente por 24 horas;
- ✓ Desidratação com álcool absoluto através de 6 banhos com duração de 1 hora cada;
- ✓ Três banhos de xylol com duração de 1 hora cada;
- ✓ Inclusão em parafina em estufa à vácuo a 60°C por 24 horas;
- ✓ Cortes de 3 µm de espessura, em sentido coronal, em micrótomo rotatório Spencer<sup>®</sup>, modelo 820;
- ✓ De cada bloco foram obtidos cinco cortes histológicos, com distância entre si de 75 µm, corados com solução de eosina/hematoxilina.

Os parâmetros histológicos foram mensurados com ampliação de 40 e 100 vezes em um microscópio Olympus® BX 51 acoplado a uma câmera Olympus® CAMEDIA 5060. De cada peça anatômica, foram obtidos cinco cortes histológicos, recebendo uma numeração de 1 a 5, do sentido anterior para posterior. Desta forma, cada lâmina histológica foi identificada pela numeração do coelho, pelo lado (direito ou esquerdo) e pelo número do corte coronal. Os resultados foram interpretados por análise cega através de escala histológica semiquantitativa (Quadro 1), levando em consideração uma pontuação em função da morfologia celular, reconstrução do osso subcondral, aspecto da matriz, preenchimento do defeito, regularidade da superfície e conexão das margens (CAPLAN et al., 1997).

### **3.7. Análise estatística:**

A análise estatística foi realizada pelo teste de t-student para dados pareados na comparação entre **Grupo Estudo** e **Grupo Controle**. O tamanho amostral foi validado pelo programa de cálculos estatísticos ESB Stats® com base nos dados de delineamento do projeto. Mesmo com a perda de três animais, pudemos manter a probabilidade de erro ao rejeitar a hipótese de nulidade em 5% ( $\alpha=0,05$ ). Para as comparações através do fator temporal, utilizamos o Teste ANOVA *one way* (BUSSAB & MORETTIN, 2003).

**Quadro 1 - Escala de graduação histológica (máximo = 16 pontos)**

ESCALA	PONTOS
<b>Morfologia celular</b>	
Normal	4
Predominância de cartilagem hialina	3
Misto de cartilagem hialina e fibrocartilagem	2
Predominância de fibrocartilagem	1
Alguma fibrocartilagem	0
<b>Reconstrução do osso subcondral</b>	
Normal	3
Reduzida	2
Mínima	1
Nenhuma	0
<b>Coloração da Matriz</b>	
Normal	4
Levemente reduzida	3
Reduzida	2
Significativamente reduzida	1
Não visualizada	0
<b>Preenchimento do defeito</b>	
100%	2
50% ou 150%	1
0%	0
<b>Regularidade da superfície</b>	
Regular	1
Irregular	0
<b>Integração das margens</b>	
Duas margens integradas	2
Apenas uma margem integrada	1
Nenhuma integração	0

Fonte: Caplan et al. (1997)

## **4. RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resultados gerais

De cada peça anatômica, foram obtidos cinco cortes histológicos de 3  $\mu$ m, com 75  $\mu$ m de distância entre si. Os resultados da pontuação histológica são demonstrados no Quadro 2.

**Quadro 2:** Resultados da pontuação histológica

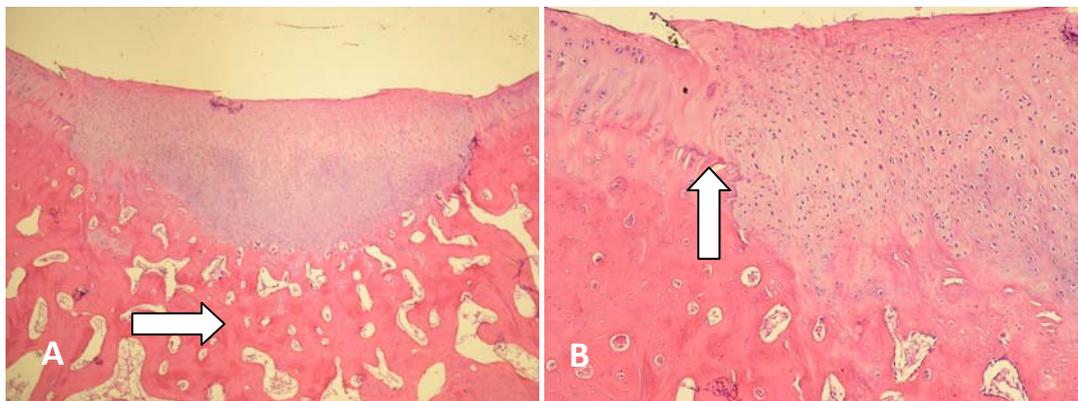
	Coelhos	Grupos	Corte 1	Corte 2	Corte 3	Corte 4	Corte 5
Análise 8 semanas	Coelho 1	Grupo Estudo	11	11	11	10	11
		Grupo Controle	5	5	5	5	5
	Coelho 2	Grupo Estudo	11	11	11	11	11
		Grupo Controle	6	6	6	6	6
	Coelho 3	Grupo Estudo	10	11	10	10	10
		Grupo Controle	6	5	5	5	5
	Coelho 4	Grupo Estudo	11	12	12	12	11
		Grupo Controle	6	6	6	5	6
Análise 16 semanas	Coelho 5	Grupo Estudo	10	10	10	10	10
		Grupo Controle	8	7	8	8	8
	Coelho 6	Grupo Estudo	10	10	10	10	11
		Grupo Controle	7	7	7	7	7
	Coelho 7	Grupo Estudo	10	10	10	10	10
		Grupo Controle	6	6	6	6	6
	Coelho 8	Grupo Estudo	9	9	9	8	9
		Grupo Controle	7	7	7	7	7
Análise 24 semanas	Coelho 9	Grupo Estudo	10	9	10	10	10
		Grupo Controle	9	9	9	9	9
	Coelho 10	Grupo Estudo	10	9	9	9	9
		Grupo Controle	9	10	9	9	9
	Coelho 11	Grupo Estudo	10	10	10	10	10
		Grupo Controle	10	10	10	10	9
	Coelho 12	Grupo Estudo	10	9	10	10	9
		Grupo Controle	8	8	8	8	8

Fonte: Dados da pesquisa

## 4.2. Análise histológica

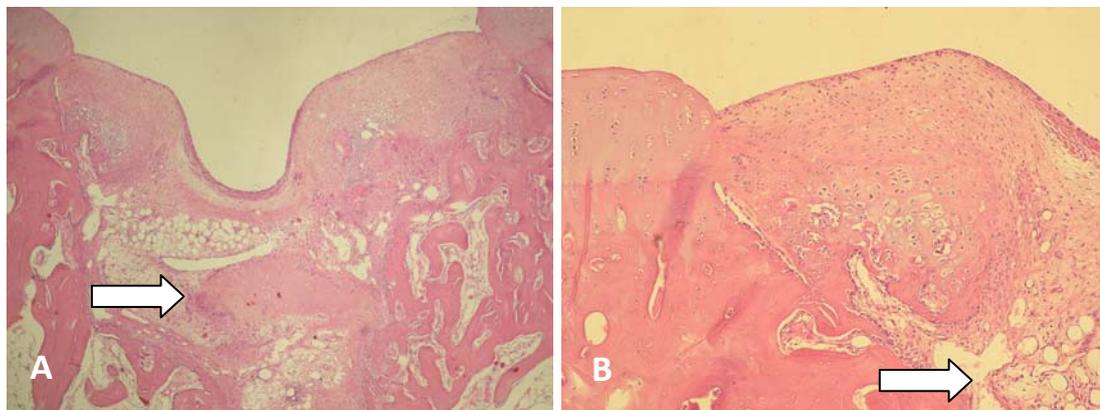
### 4.2.1. Avaliação histológica após oito semanas

Na análise histológica das peças do **Grupo Estudo** de oito semanas (GE8), o tecido de reparação tinha aspecto de cartilagem hialina e, junto às laterais e ao fundo das falhas, verificou-se a presença de osso novo trabecular, formado nas áreas providas de vascularização e, predominantemente, a partir de ossificação endocondral. O tecido de reparação mostrou boa integração com a cartilagem adjacente (Figura 5). Em dois dos quatro animais deste grupo, verificou-se que as laterais e o fundo da falha eram constituídos por osso subcondral compacto, pouco vascularizado, não se observando reabsorção óssea.



**FIGURA 5:** Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 3, coelho 2, Grupo Estudo, sacrifício com oito semanas. Em A: ampliação de 40x, verificando-se osso novo trabecular (seta). Em B: ampliação de 100x, com integração do tecido de reparo à cartilagem adjacente (seta).

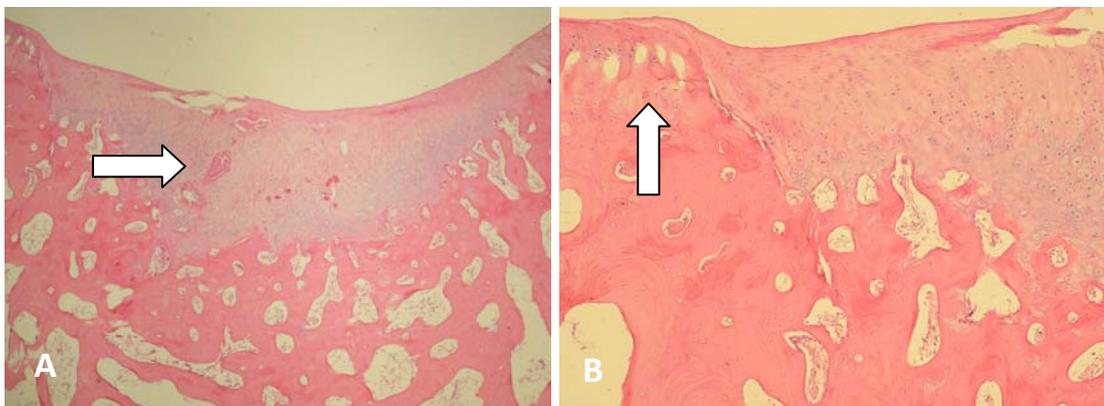
Na análise do **Grupo Controle** de oito semanas (GC8), a integração com o tecido de reparação foi observada somente em um animal, sendo freqüente a formação de fendas entre os dois tecidos nos demais. Foram visualizados osteoclastos reabsorvendo o osso trabecular necrótico adjacente à linha de fratura osteocondral, que ainda estava evidente em vários pontos (Figura 6). No fundo da falha, observou-se osteóide oriundo de formação intramembranosa e de ossificação endocondral. Em um animal, o fundo e as laterais da falha osteocondral constituíam-se de osso compacto com poucos vasos sanguíneos, sem túneis vasculares comunicando-se com a falha, e o tecido de reparação encontrava-se apenas sobreposto ao osso adjacente.



**FIGURA 6:** Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 1, coelho 1, Grupo Controle, sacrifício com oito semanas. Em A: ampliação de 40x, notando-se tecido osteóide proveniente de ossificação endocondral (seta). Em B: ampliação de 100x, verificando-se osteoclastos na região de reabsorção do osso trabecular (seta).

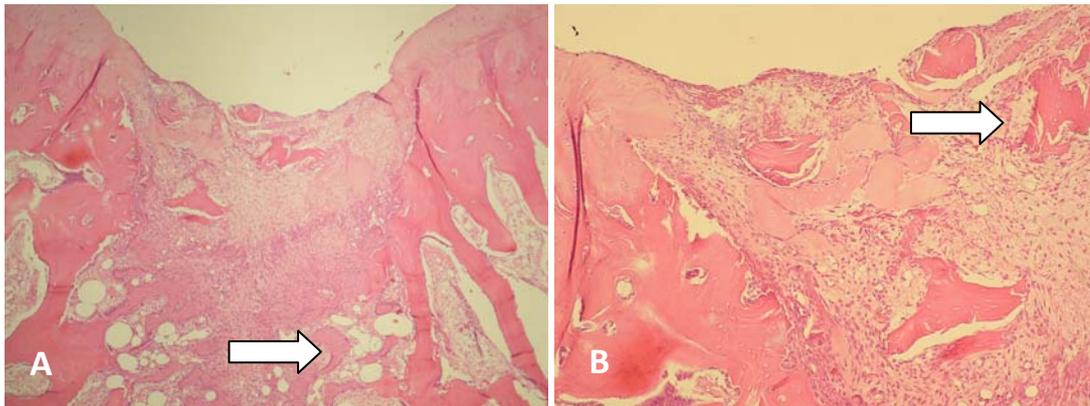
#### 4.2.2. Avaliação histológica após 16 semanas

Na análise histológica do **Grupo Estudo** de 16 semanas (GE16), a cartilagem de reparação encontrava-se menos diferenciada que a observada nas falhas que tinham as bordas mais vascularizadas e a matriz era mais acidófila, apresentando algumas áreas com discreta basofilia. Dois animais do grupo apresentaram vacúolos de diferentes tamanhos na cartilagem hialina de reparação. Em um animal, notou-se a presença de ossificação na região cartilaginosa acima da zona calcificada. A cartilagem articular adjacente à falha estava aparentemente normal, embora ainda fossem observadas lacunas vazias e raros clones condroblásticos. (figura 7).



**FIGURA 7:** Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 2, coelho 8, Grupo Estudo, sacrifício com 16 semanas. Em A: ampliação de 40x, verificando-se área de ossificação em meio ao tecido de reparo (seta). Em B: ampliação de 100x, com a presença de lacunas vazias na borda da cartilagem sadia adjacente (seta).

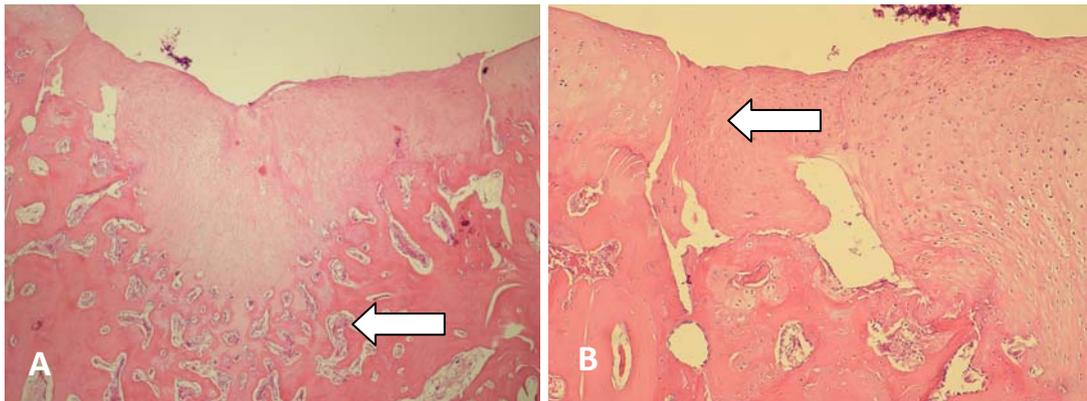
Na análise histológica das peças do **Grupo Controle** de 16 semanas (GC16), o tecido observado preenchendo a falha osteocondral tinha aspecto de tecido de granulação, constituído por uma rede de colágeno infiltrada por células mesenquimais, permeado por vasos sanguíneos no fundo da falha. Foram observados focos de tecido cartilaginoso, geralmente na periferia, com matriz extracelular basófila e condrócitos no interior de lacunas, que se apresentavam hipertrofiados nas proximidades dos vasos sanguíneos. Em meio ao tecido de reparo, foram notadas algumas ilhas de tecido calcificado (Figura 8).



**FIGURA 8:** Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 5, coelho 7, Grupo Controle, sacrifício com 16 semanas. Em A: ampliação de 40x, evidenciando o infiltrado de células mesenquimais, permeado por vasos sanguíneos (seta). Em B: ampliação de 100x, verificando-se ilhas de tecido calcificado em meio ao tecido de reparo (seta).

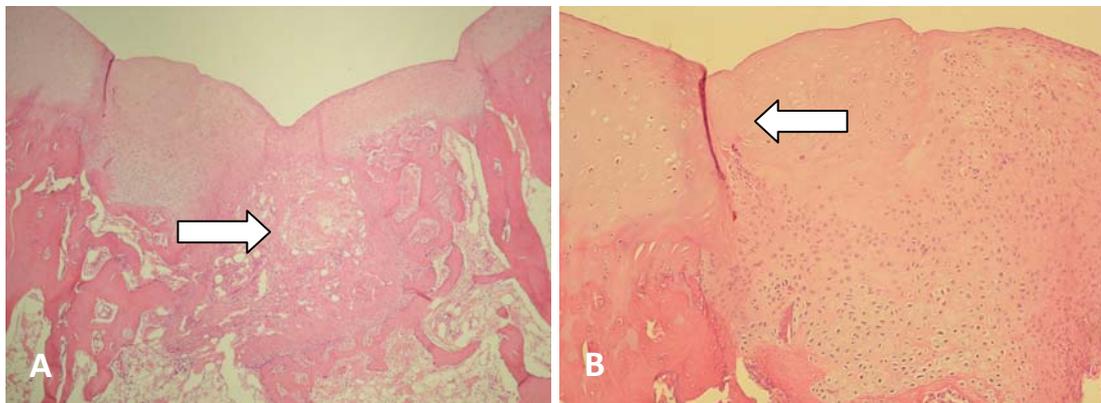
#### 4.2.3. Avaliação histológica após 24 semanas

Na análise do **Grupo Estudo** de 24 semanas (GE24), observou-se reabsorção das trabéculas ósseas e presença de um infiltrado de tecido fibrocatricial em direção ao osso subcondral. O tecido de reparação mostrava zona de cisalhamento nas bordas da lesão (Figura 9). Dois animais apresentaram as falhas preenchidas, predominantemente, por fibrocartilagem, sendo que em um havia organização colunar dos condrócitos na camada radial.



**FIGURA 9:** Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 3, coelho 10, Grupo Estudo, sacrifício com 24 semanas. Em A: ampliação de 40x, verificando-se infiltrado de tecido fibrocatricial em direção ao osso subcondral (seta). Em B: ampliação de 100x, evidenciando a zona de cisalhamento na borda da lesão (seta).

Na análise do **Grupo Controle** de 24 semanas (GC24), a reabsorção óssea das bordas da falha estava restrita a poucas áreas onde havia vasos sangüíneos, ocorrendo pobre integração do tecido de reparação com o osso subcondral nestes pontos. A cartilagem articular remanescente na borda da falha apresentava diminuição da celularidade nas áreas adjacentes à linha de fratura osteocondral. Houve perda da organização colunar dos condrócitos na zona radial, formação de ninhos celulares ou clones condroblásticos e encurvamento das colunas de células em direção à falha. Foi possível observar integração entre o tecido de reparação e a cartilagem remanescente na borda da falha (Figura 10).



**FIGURA 10:** Corte histológico coronal, corado por hematoxilina/eosina, corte 4, coelho 12, Grupo Controle, sacrifício com 24 semanas. Em A: ampliação de 40x, evidenciando a formação de ninhos celulares em direção à falha (seta). Em B: ampliação de 100x, verificando-se boa integração do tecido de reparo à cartilagem adjacente (seta).

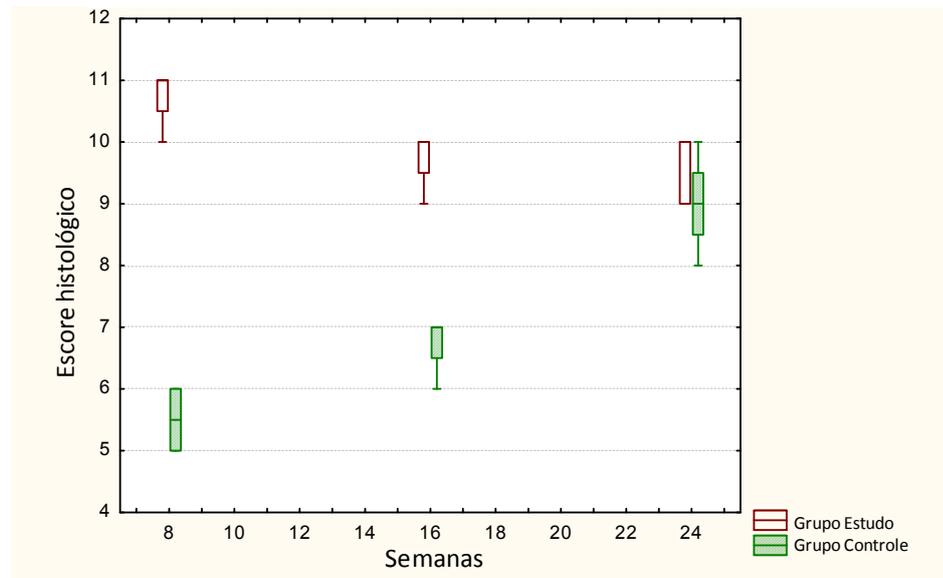
### 4.3. Descrição dos dados

Neste estudo, o valor da escala de graduação histológica foi medido em três períodos de tempo: oito, 16 e 24 semanas. Em cada período de tempo, foram analisados os joelhos direito e esquerdo de quatro coelhos, os quais foram submetidos a cinco cortes histológicos, com distância entre si de 75  $\mu\text{m}$ . No total, foram estudados 12 coelhos, 24 joelhos e 120 cortes histológicos. O joelho direito foi submetido a um tratamento (**Grupo Estudo**) e o joelho esquerdo foi observado como controle (**Grupo Controle**).

O objetivo da análise estatística foi comparar o valor da escala de graduação histológica de joelhos de coelhos durante três períodos: oito, 16 e 24 semanas.

#### 4.3.1. Gráfico conjunto *Box Plot*

A análise tem início com uma breve descrição dos dados através de um gráfico conjunto *Box Plot*. Observa-se no **Gráfico 1** uma distância decrescente entre os escores do **Grupo Estudo** e **Grupo Controle** com a evolução do tempo. Nota-se, ainda, uma tendência crescente do valor da escala do **Grupo Controle** ao longo do tempo. Para o período de 24 semanas, o valor da escala tende para uma média em torno de nove para ambos os joelhos.



**Gráfico 1:** *Box Plot* da Escala de graduação histológica dos Grupos Estudo e Controle em três períodos de tempo. Ordenadas: pontuação por escala histológica. Abscissas: tempo em semanas.

#### 4.3.2. Análise estatística

Como os dados estão disponíveis de forma pareada, comparamos os valores dos **Grupos Estudo** e **Controle** em cada período através de um Teste t-student pareado. A hipótese testada  $H_0$  foi: a média da diferença entre os valores do **Grupo Estudo** e **Grupo Controle** é igual a zero. Na **Tabela 1** estão dispostos os valores das estatísticas t e seus respectivos p-valores para cada período testado.

Com 5% de confiança, rejeitamos a hipótese de que a média da diferença entre os grupos é igual a zero para todos os períodos, ou seja, rejeitamos a hipótese de que o **Grupo Estudo** possui média igual ao **Grupo Controle**. Ainda podemos afirmar que o **Grupo Estudo** possui médias significativamente maiores que o **Grupo Controle** em todos os períodos.

**TABELA 1** – Estatística descritiva da média, diferença, valor da estatística “t” e p-valor, relativa à comparação do escore histológico entre os grupos Estudo e Controle, nos períodos de oito, 16 e 24 semanas, pelo Teste t-student pareado, com nível de confiança de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

Período	Grupo	Média	Diferença	t	p-valor
8 Semanas	Estudo	10,9	5,4	35.485	<0,001*
	Controle	5,5			
16 Semanas	Estudo	9,75	2,8	13.161	<0,001*
	Controle	6,95			
24 Semanas	Estudo	9,65	0,65	3.577	0,002*
	Controle	9,0			

Fonte: Dados da pesquisa

t-student \* p < 0,05

A seguir, analisamos o efeito do fator Semanas (oito, 16 ou 24) nos **Grupos Estudo e Controle**, utilizando o Teste ANOVA.

As **Tabelas 2 e 3** mostram os parâmetros do modelo ANOVA, seus graus de liberdade (g.l.) e a estatística F para averiguar a significância dos parâmetros e os valores-p associados.

Pelas **Tabelas 2 e 3**, o Fator Semanas apresenta efeito significativo em ambas variáveis, variável **Grupo Estudo** (valor-p < 0,001) e variável **Grupo Controle** (valor-p < 0,001), sugerindo que existem diferenças significativas entre as categorias de Semanas em relação às escalas estudadas.

**TABELA 2:** Estatística descritiva do grau de liberdade (g.l.), da estatística F e do p-valor, pelo Teste ANOVA, utilizando os parâmetros de intercepto e erro para a comparação dos escores histológicos do Grupo Estudo através do tempo, com nível de confiança de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

Parâmetro	g.l.	F	p-valor
Intercepto	1	17356.93	<0.001*
Semana	2	27.37	<0.001*
Erro	57		

Fonte: Dados da pesquisa ANOVA \* p < 0,05

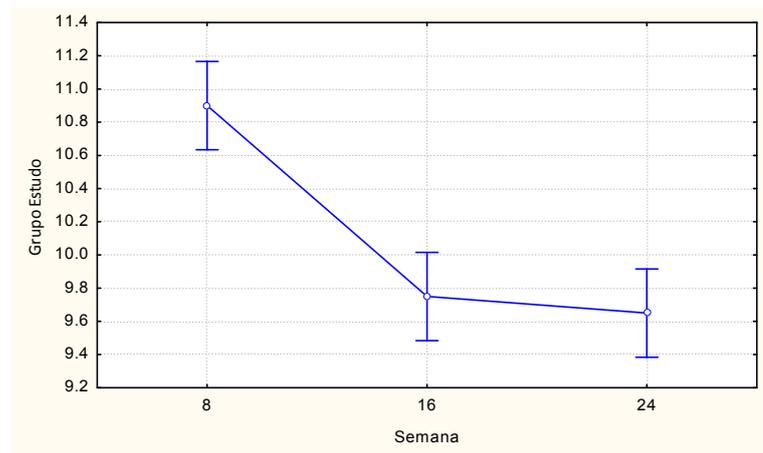
**TABELA 3:** Estatística descritiva do grau de liberdade (g.l.), da estatística F e do p-valor, pelo Teste ANOVA, utilizando os parâmetros de intercepto e erro para a comparação dos escores histológicos do Grupo Controle através do tempo, com nível de confiança de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

Parâmetro	g.l.	F	p-valor
Intercepto	1	7300.165	<0.001*
Semana	2	147.200	<0.001*
Erro	57		

Fonte: Dados da pesquisa ANOVA \* p < 0,05

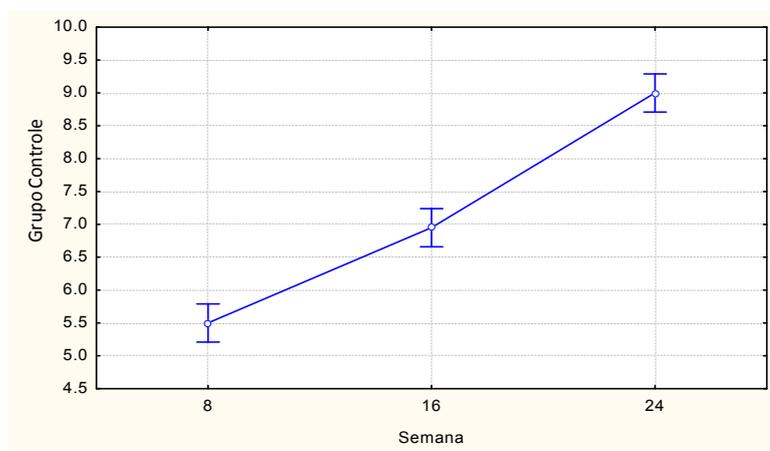
Como o efeito do fator Semanas foi significativo, o passo natural a se seguir foi a Comparação Múltipla dos níveis de Semanas, ou seja, analisamos cada nível do fator Semanas, verificando se poderiam ser considerados significativamente diferentes uns dos outros.

Pelo resultado apresentado no **Gráfico 2**, na variável **Grupo Estudo**, o Fator Semana foi significativo devido ao fato da semana oito ser significativamente diferente das semanas 16 e 24, enquanto que nas comparações duas a duas ocorreram igualdades estatísticas.



**Gráfico 2:** Comparação Múltipla dos níveis de Semanas na variável Grupo Estudo.

Na variável **Grupo Controle**, representado pelo **Gráfico 3**, o Fator Semana foi significativo por haver diferença estatística entre os três períodos, mesmo nas comparações duas a duas.



**Gráfico 3:** Comparação Múltipla dos níveis de Semanas na variável Grupo Controle.

Os dois modelos ANOVA construídos foram devidamente satisfeitos pelas suposições de homocedasticidade e normalidade observadas no **Grupo Estudo** e no **Grupo Controle** (Anexos).

Observou-se diferença significativa entre a escala de graduação dos **Grupos Estudo e Controle** nos períodos de oito, 16 e 24 semanas. Um Teste ANOVA revelou que com a evolução do tempo houve variação nos resultados do **Grupo Estudo** e do **Grupo Controle**.

## **5. DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

Desde os primeiros estudos sobre a morfologia articular, realizados por Hunter no século XVIII, questiona-se a capacidade regenerativa da cartilagem hialina. Mudanças importantes no entendimento da fisiologia articular ocorreram no início da década de 60, quando se iniciaram as investigações sobre o processo de degradação da matriz cartilaginosa (BOLLET & NANCE, 1966). Essas novas informações mostraram que a cartilagem não é um tecido inerte e que sua degradação está mais relacionada a um processo químico do que mecânico.

O fenômeno do reparo envolve os processos de indução de uma resposta inflamatória à lesão inicial, proliferação e migração de células teciduais parenquimatosas e conjuntivas, formação de novos vasos sanguíneos, síntese de matriz extracelular e deposição de colágeno, remodelação tecidual, contração da ferida e aquisição de resistência mecânica. Nem todos esses eventos ocorrem em toda reação de reparação. Este processo é influenciado por fatores que incluem o ambiente, a extensão do dano tecidual e a intensidade e duração do estímulo.

Didaticamente, é possível subdividir o processo de regeneração de um tecido em três fases: necrose, inflamação e reparo (MANKIN, 1982). Assim sendo, torna-se nítida a capacidade limitada da cartilagem hialina em se restabelecer, por ser este tecido avascular e não possibilitar a instalação do processo inflamatório no foco de lesão.

Lesões superficiais da cartilagem hialina que não atinjam o osso subcondral, normalmente não cicatrizam. Nesse tipo de lesão, a degeneração da cartilagem hialina ocorre a partir da zona superficial. Com o tempo, a progressão do dano produz um aspecto macroscópico irregular e sem brilho (FRENKEL et al., 2005).

Por outro lado, o reparo do defeito da cartilagem hialina que atinge a região do osso subcondral difere da anterior por desencadear um processo inflamatório, mediado por células presentes na corrente sangüínea, já que a região atingida é ricamente vascularizada. Defeitos osteocondrais são preenchidos imediatamente por sangue, que evoluem para a formação de um coágulo de fibrina, com hemácias, leucócitos, plaquetas e outras células da medula óssea. A população de células mesenquimais e indiferenciadas multiplicam-se, a fim de formar um tecido fibrovascular. Esse tecido rico em fibras de colágeno e brotos vasculares evolui para tornar-se um tecido fibrocartilaginoso e, eventualmente, dependendo dos estímulos mecânicos e biológicos, um tecido cartilaginoso. Na base do defeito, na região em contato com o osso subcondral, ocorre neoformação óssea, que se estende na direção da articulação. Por razões ainda não esclarecidas, a formação de tecido ósseo geralmente é interrompida na zona de transição, permitindo que o defeito remanescente seja preenchido com o tecido fibrocartilaginoso (MANKIN, 1982; BUCKWALTER, 2000).

Esse tecido neoformado, que preenche o defeito osteocondral, difere significativamente do tecido cartilaginoso normal em relação à sua composição, bem como na disposição dos elementos no seu interior

(HUNTLEY et al., 2005). Apesar do condrócito sintetizar novas moléculas de proteoglicanos, estas apresentam menor peso molecular do que o naturalmente encontrado. Do mesmo modo, as fibras de colágeno do tipo II têm menor diâmetro e disposição mais irregular. Esse arranjo, associado ao fato de não haver perfeita integração do tecido neoformado com o tecido cartilaginoso, favorece a permeabilidade à água. Além disso, o tecido fibrocartilaginoso neoformado apresenta menor módulo de elasticidade, quando comparado ao tecido cartilaginoso (HENDERSON et al., 2005; HATTORI, 2005).

Diferentes espécies animais têm sido utilizadas em pesquisas para o estudo do processo de reparação da cartilagem articular. Na literatura encontram-se diversos trabalhos que utilizam coelhos (O`DRISCOLL et al., 1988; MOW et al., 1991; MESSNER & GILLQUIST, 1993; SHAHGALDI, 1998; HASEGAWA et al., 1999; DIDUCH et al., 2000; COSTA et al., 2001; MIERISCH et al., 2002; RUDERT et al., 2005).

A articulação do joelho foi escolhida por ser uma articulação que sofre elevada solicitação mecânica e por apresentar características anatômicas, que facilitam a sua abordagem cirúrgica e a avaliação do desempenho de implantes. Optou-se pelo sulco troclear, e não pela região dos côndilos femorais, pela facilidade de abordagem do primeiro, tornando deste modo o procedimento cirúrgico seguro e reprodutível. Além disso, a região troclear também está sujeita a solicitações mecânicas repetidas durante a marcha do coelho, do mesmo modo que a região dos côndilos.

Na literatura consultada, constatou-se que tanto a região dos côndilos femorais (MOW et al., 1991; MESSNER & GILLQUIST, 1993; KONDO et al., 2005; CHIANG et al., 2005; MALININ et al., 2006) como a região do sulco troclear (BREINAN et al., 1997; SHAHGALDI, 1998; HASEGAWA et al., 1999; COHEN et al., 2003; UEMATSU et al., 2005; RUDERT et al., 2005; KANDEL et al., 2006), foram sede para estudos de reparo de cartilagem.

O estudo bilateral tem a vantagem de permitir a utilização de um número menor de animais e ainda permitir uma comparação direta entre os grupos. Nos estudos unilaterais, o animal pode utilizar preferencialmente o membro não operado, causando alterações na dinâmica articular.

A opção pelo diâmetro de 4 mm do defeito osteocondral levou em consideração o conhecimento de que diâmetros inferiores a 3 mm tendem a ser reparados espontaneamente por tecido fibrocartilaginoso (RUDERT et al., 2005). Desse modo, procurou-se diminuir a interferência da capacidade de reparação intrínseca do próprio animal.

Na avaliação histológica, a aparência morfológica da cartilagem, em geral, reflete o seu estado funcional e a sua viabilidade. Para que essa avaliação possa ser feita de forma organizada e padronizada, existem na literatura algumas escalas que quantificam ou pontuam determinados parâmetros morfológicos (O'DRISCOLL et al., 1988; PINEDA et al., 1992; CAPLAN et al., 1997; MAINIL-VARLET et al., 2003).

O maior problema em relação ao uso destas escalas é a reprodutibilidade entre as avaliações por diferentes observadores, o que levou a “International Cartilage Repair Society” (ICRS), a determinar algumas recomendações para um novo sistema de classificação. Um dos pontos levantados por essa sociedade foi que, em geral, a avaliação feita em humanos é mais difícil, por envolver fragmentos pequenos de cartilagem, diferentemente dos ensaios em animais em que se pode ter toda a articulação para estudo. Uma das considerações feita pela ICRS é de que quanto mais simples for a análise histológica e quanto mais ela se basear em padrões visuais e menos em padrões verbais, essa avaliação tenderá a ser mais reprodutível (MAINIL-VARLET et al, 2003).

Alguns autores (NISHIMORI et al., 2006; ISHII et al., 2007) utilizam a escala descrita por PINEDA et al. (1992), através de um sistema de pontuação histológica que leva em consideração o preenchimento do defeito, a reconstituição do osso subcondral, a coloração da matriz e a morfologia celular. Entendemos que parâmetros como a conexão das margens e a regularidade da superfície tenham importância na manutenção da função do tecido de reparo da lesão osteocondral. Por esta razão, optamos pela escala semiquantitativa descrita por CAPLAN et al. (1997), baseada em seis critérios para a análise da cartilagem articular: morfologia celular, reconstrução do osso subcondral, aspecto da matriz, preenchimento do defeito, regularidade da superfície e conexão das margens.

Neste estudo, realizamos a mensuração do valor da escala de graduação histológica de joelhos de coelhos durante três períodos de tempo: oito, 16 e 24 semanas. Em cada período de tempo, foram estudados quatro coelhos, totalizando doze coelhos. O joelho direito de cada coelho foi submetido a um tratamento (**Grupo Estudo**) e o joelho esquerdo foi observado como **Controle**.

Para atingir os objetivos descritos, utilizamos o Teste de t-student para dados pareados e ANOVA *one way*. O Teste de t-student para dados pareados é uma alternativa para amostras dependentes (forma pareada), ou seja, as duas variáveis em estudo são observadas no mesmo indivíduo. O Teste de ANOVA *one way* é uma alternativa não-paramétrica para ANOVA entre grupos. O Teste ANOVA *one way* assume que a variável sobre consideração é contínua e que foi medida pelo menos numa escala ordinal. O teste considera a hipótese de que as diferentes amostras em comparação são provenientes da mesma distribuição ou de distribuições com a mesma mediana. Portanto, a característica do Teste ANOVA *one way* reside no fato de ser baseado em valores de média (BUSSAB & MORETTIN, 2003).

A regeneração de lesões osteocondrais não ocorre espontaneamente em mamíferos adultos. Os defeitos evoluem desde mudanças degenerativas iniciais até uma perda completa da superfície articular. Diferentes técnicas cirúrgicas têm sido relatadas em animais e humanos, mas o padrão ouro da terapia de reparo de defeitos da superfície articular ainda não existe.

Os procedimentos cirúrgicos inicialmente descritos para o tratamento de lesões da cartilagem articular tinham como objetivo estimular o processo natural de reparo tecidual, e incluíam a artroplastia por abrasão e as técnicas de perfuração do osso subcondral. Os resultados desfavoráveis da condroplastia por abrasão confirmaram a baixa atividade intrínseca dos condrócitos, levando a uma subsequente série de publicações de técnicas de estímulo medular (STEINWACHS et al., 2008). As perfurações múltiplas visavam promover a revascularização no sitio da lesão, ao invés de recrutar células progenitoras. O coágulo não permanecia no defeito e somente um tecido cicatricial esparsos era observado. A técnica de microfratura permitia um maior acúmulo de células da medula óssea no defeito da cartilagem. Entretanto, o tecido formado era fibrocartilagenoso, com diferentes propriedades biomecânicas em comparação com a cartilagem hialina (OCHI et al., 2001).

Estratégias mais recentes visam reparar o defeito articular com enxertos. Os aloenxertos de cartilagem têm problemas com armazenamento e manutenção da viabilidade dos condrócitos. Se implantados a fresco, os aloenxertos podem experimentar uma reação imune proveniente do líquido sinovial (SELLARDS et al., 2002).

Mais promissores são os autoenxertos osteocondrais. A mosaicoplastia apresenta os melhores resultados clínicos, quando comparada com todas as outras técnicas descritas para o tratamento das lesões osteocondrais. Esta técnica proporciona uma boa integração do enxerto ao osso subcondral. Não são necessárias técnicas de fixação do

enxerto, como suturas ou quaisquer dispositivos. Infelizmente, a aplicação da mosaicoplastia é limitada pela extrema escassez de fontes doadoras no corpo humano. Para defeitos de grande diâmetro, portanto, outras técnicas devem ser consideradas (SELLARDS et al., 2002).

O perióstio tem se mostrado como fonte alternativa para o revestimento de lesões da cartilagem. As células progenitoras encontradas na camada interna do perióstio são estimuladas pelos fatores ambientais do sítio da lesão a se diferenciarem em tecido cartilaginoso, servindo o próprio perióstio como suporte para o crescimento destas células. No entanto, problemas como uma hipertrofia tecidual tardia devido a formação de colágeno tipo X colocam em dúvida a eficácia deste método (ISOGAI et al., 2000).

De certa forma, esta experiência clínica contribuiu para o desenvolvimento de técnicas envolvendo a expansão *in vitro* de células previamente à sua implantação nas lesões de cartilagem, no sentido de vencer o inadequado suprimento de cartilagem autógena. O transplante autólogo de condrócitos foi introduzido na década de 90. Através desta técnica, uma pequena quantidade de cartilagem autógena fornece condrócitos para expansão *in vitro* e posterior implantação nos defeitos articulares, com o auxílio de um suporte biodegradável. O transplante autólogo de condrócitos combina os conceitos de terapia celular e engenharia de tecidos, estando em evidência na literatura recente destinada ao reparo da cartilagem.

Os condrócitos, quando cultivados em monocamada, podem perder o seu fenótipo. Como solução, foram desenvolvidos protocolos de cultura sobre matrizes tridimensionais, baseadas em géis de agarose, colágeno e alginato. As desvantagens dessa técnica incluem, além da morbidade da biópsia de cartilagem, cultura *in vitro* prolongada com risco de infecção, características de crescimento variável na cultura primária de condrócitos e o elevado preço da terapia (IZUMI et al., 2000).

As células isoladas da medula óssea também podem ser expandidas em cultura, mantendo a sua capacidade de diferenciação, quando submetidas a estímulos adequados. Assim, segundo OCHI et al. (2004) e LEE et al. (2004), as células-tronco mesenquimais são células promissoras para o tratamento terapêutico das lesões osteocondrais. As vantagens apresentadas pelas células-tronco mesenquimais, quando comparadas com os condrócitos diferenciados, demonstram que essas possuem uma maior capacidade proliferativa, dependendo das características do meio em que se encontram.

A medula óssea é composta por duas linhagens celulares distintas e dependentes, a hematopoiética e o estroma associado, que formam um sistema cooperativo. As células do estroma medular, também conhecidas como células mesenquimais, estão relacionadas à manutenção de um microambiente de preservação das células-tronco hematopoiéticas, sendo que a progênie já diferenciada recebe os sinais necessários para a maturação celular (SCHWINDT et al., 2005).

A existência de células-tronco não-hematopoiéticas na medula óssea foi comprovada pelos achados de FRIEDENSTEIN et al. (1966). Os autores encontraram em uma cultura de células da medula óssea uma população celular aderida ao plástico, em formato de fuso e semelhante a fibroblastos. Observaram também que essas células estavam dispostas em colônias derivadas de uma única célula precursora, conhecidas como Unidade Formadora de Colônia Fibroblásticas.

Mas nem todas as Unidades Formadoras de Colônia Fibroblásticas da medula óssea apresentam de fato característica multipotencial. Analisando-se as colônias individualmente, nota-se a heterogeneidade da população em cultura relacionada à taxa de proliferação e à morfologia. Assim, sugere-se que a medula óssea seja composta pela mistura de células progenitoras diferenciadas e indiferenciadas. É importante distinguir as células mesenquimais dos muitos tipos de células progenitoras, de forma que as primeiras se auto-renovam por toda a vida de um organismo, enquanto as progenitoras possuem auto-renovação e potencialidade limitadas. O isolamento e conseqüente caracterização das variedades celulares presentes é dificultado pela ausência de marcadores antigênicos específicos bem estabelecidos (SCHWINDT et. al., 2005).

As células mesenquimais são alvo de muito interesse em pesquisas por não apresentarem barreiras éticas, pela facilidade de obtenção e ainda por serem utilizadas em transplantes autólogos, sendo a medula óssea a maior fonte para utilização (HUANG et al., 2004).

Acrescente-se que a epífise proximal da tibia também tem sido utilizada como fonte de células mesenquimais. IM et al. (2001) em estudo de reparo osteocondral com células mesenquimais em coelhos, realizam a colheita da medula por incisão de 1 cm na face medial da tibia proximal, seguida pela criação de um orifício ósseo de 2 mm e aspiração de 2 ml de medula óssea com seringa contendo anticoagulante.

Optamos pela aspiração de 2 ml de medula óssea em cada joelho, sendo 1 ml proveniente do defeito osteocondral e 1 ml da metáfise proximal da tibia, devido a esta quantidade permitir facilidade de manuseio e processamento da amostra, conforme demonstrado por MUSCHLER et al. (1997). Os autores afirmam que limitar a quantidade de aspirado a 2 ml ou menos reduz a diluição com sangue periférico que pode ocorrer no momento da aspiração e aumenta proporcionalmente a concentração de células-tronco mesenquimais obtidas no aspirado. Assim, segundo sua avaliação, o ideal seria a realização de múltiplas punções, limitadas a 2 ml ou menos cada uma.

CONNOLLY et al. (1995) recomendam que o êmbolo da seringa não seja utilizado sob pressão negativa, já que a quantidade de sangue que flui para a agulha de aspiração pode levar à diluição da amostra. Ainda, segundo LOKIEC et al. (1996), o aumento na proporção medula/sangue está relacionado à coagulação prematura da amostra. Portanto, quando volumes maiores forem necessários, devem ser realizadas aspirações sucessivas e em locais espaçados. MUSCHLER et al. (1997) e CONNOLLY et al. (1995) reconhecem o risco de coagulação da amostra quando não se utiliza

anticoagulante, mas não são coincidentes sobre a necessidade, ou maneira de uso da mesma durante a aspiração. A descrição sobre o volume do anticoagulante é variada, assim como as formas de uso, existindo o consenso entre esses autores sobre a possibilidade do anticoagulante lesar as células medulares.

Optamos pela obtenção de células-tronco mesenquimais através de um centrifugado de aspirado de medula óssea, sem a presença de substância anticoagulante. Desta forma, obtivemos um coágulo que englobou a camada intermediária rica em células progenitoras entre o plasma e as hemácias. Este coágulo facilitou o preenchimento do defeito osteocondral em função de sua configuração tridimensional, tornando desnecessária a presença de um suporte celular. Por outro lado, este molde não permitiu, tecnicamente, que realizássemos procedimentos de contagem e viabilidade celular.

Com relação à utilização do aspirado de medula óssea como fonte de células precursoras condrogênicas, fatores como técnica de aspiração, concentração das células disponíveis e uso de carreadores podem influenciar a sua eficácia na reparação da cartilagem.

Com a intenção de aumentar o número de células precursoras condrogênicas a serem aplicadas nas lesões osteocondrais, realizamos a centrifugação do aspirado da medula óssea, conforme método descrito por VAZ (2006). Em seu estudo, o autor obtém células nucleadas viáveis e em número adequado após centrifugação.

As limitações relacionadas à utilização de células-tronco adultas incluem a falta de marcadores para sua caracterização e a sua baixa concentração. Estima-se que uma de cada 20.000 células nucleadas de medula óssea seja uma célula estromal mesenquimal, representando 0,005% de células nucleadas (BONAB et al., 2006).

Outra dificuldade na administração local de aspirados de medula óssea é a tendência do material se difundir amplamente, às vezes até mesmo para pontos distantes do local da lesão condral. Buscando solucionar este problema, utilizamos a cola de fibrina como fator de fixação do aspirado ao defeito, permitindo uma presença prolongada do centrifugado de medula óssea no local da lesão osteocondral.

A cola de fibrina é uma matriz fisiologicamente conveniente. Seu principal componente, a fibrina, tem um papel fundamental no processo de formação do coágulo sanguíneo e cicatrização da ferida. Formada através de um composto de fibrinogênio e trombina, mostra-se um veículo biológico apropriado para o transplante de células, uma vez que apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de adesão celular. O fator XIII contido na cola de fibrina permite a migração de células mesenquimais indiferenciadas, aumentando sua capacidade de proliferação (ISOGAI ET AL., 2000).

O uso da cola de fibrina, como suporte para a sedimentação das células-tronco nos defeitos osteocondrais, elimina a necessidade do uso de suportes tridimensionais. Embora diferentes suportes tenham sido

aprovados para uso clínico por instituições governamentais, há um questionamento acerca de sua segurança. Polímeros sintéticos podem apresentar problemas em potencial relacionados à retenção ou degradação *in situ*, enquanto materiais biológicos estão relacionados aos riscos potenciais de transmissão de doenças ou reações imunológicas (ISHII et al., 2007).

As células mesenquimais de medula óssea, quando transplantadas em tecidos danificados, atuam como uma fonte celular autóloga com o potencial de diferenciação, sendo uma alternativa terapêutica para melhorar a resposta articular ao dano. O potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo*, incluindo osso, cartilagem, tendão, músculo e tecido adiposo. As células-tronco mesenquimais com potencial condrogênico podem ser isoladas a partir de vários tecidos, incluindo perióstio, músculo esquelético, tecido adiposo, medula óssea e membrana sinovial (BARRY, 2003).

Diferentes protocolos de isolamento e cultivo de células mesenquimais já foram empregados com sucesso, todos envolvendo uma etapa inicial de separação de células mononucleares, por meio de gradiente de densidade. Apesar dos resultados positivos observados por esses grupos, alguns estudos relatam dificuldades no isolamento, cultivo e manutenção dessas células *in vitro* (TOGNOLI et al., 2009). A maioria dos protocolos de cultivo de células mesenquimais tem início com uma etapa de isolamento de células mononucleares que requer várias passagens por centrifugação e manipulação do material, o que aumenta custos e o risco de

contaminação do mesmo. A possibilidade de isolar e cultivar células mesenquimais sem uso de gradientes de densidade, que é sabidamente tóxico, torna o procedimento mais seguro e rápido (KAWASAKI-OYAMA et al., 2008).

O cultivo *in vitro* de células-tronco mesenquimais previamente à sua implantação oferece outro método para introduzir uma nova população celular nos defeitos osteocondrais. Embora estudos tenham confirmado a superioridade da terapia com células-tronco mesenquimais expandidas em culturas em relação à utilização dos aspirados de medula óssea, estas culturas aumentam substancialmente custos e riscos. Complicações como contaminação com bactérias e vírus e depleção da capacidade proliferativa das células-tronco mesenquimais antes de sua implantação têm sido relatadas. Além disso, a preferência pela seleção *in vitro* das células com maior potencial proliferativo poderia causar a escolha de células com mutações, com maior risco carcinogênico (BARRY, 2003).

Neste estudo, demonstramos que células mesenquimais condroprogenitoras, quando colocadas em uma lesão osteocondral, diferenciam-se posteriormente em condrócitos, regenerando parcialmente a cartilagem articular. De forma semelhante, alguns trabalhos científicos demonstram que células mesenquimais indiferenciadas, colocadas em defeitos na cartilagem articular, sobrevivem e produzem em um novo tecido similar ao hialino (BUCKWALTER, 2002; WAKITANI et al., 1994). Esta modalidade de engenharia tissular *in situ* é utilizada para compensar a deficiência em número ou função das células progenitoras (MUSCHLER et

al., 2004; AROSARENA, 2005). No entanto, a análise histológica do grau de reparo articular utilizando transplante autólogo de células mesenquimais, obtidas por aspirado de medula óssea, demonstrou que não foi possível promover uma regeneração total da lesão articular através deste modelo experimental.

Em nossos resultados, notamos uma tendência de aproximação dos escores da análise histológica entre os **Grupos Estudo** e **Controle**, em função da progressão do número de semanas. No entanto, a variação de pontuação entre os grupos não ocorreu necessariamente nos mesmos parâmetros analisados. Enquanto no **Grupo Estudo** houve uma diminuição do escore histológico em função da irregularidade da superfície articular e da integração das margens, no **Grupo Controle** houve um aumento da pontuação pela melhora da maturação da matriz, reconstrução do osso subcondral e morfologia celular.

Como crítica a este estudo, podemos citar o fato de não ter havido procedimento de contagem celular e testes de viabilidade celular. Baseamos, no entanto, pela descrição de CONNOLLY (1995), que indica que o processo de centrifugação do aspirado de medula tem o potencial de duplicar ou triplicar o número de células precursoras quando comparado ao aspirado em sua forma original, mantendo a viabilidade celular. Outro julgamento pertinente diz respeito à necessidade de se realizar uma avaliação mais completa das características do tecido regenerativo produzido. O uso de outras colorações histológicas, como a safranina-O, nos permitiria melhor avaliar as condições da matriz. A imunohistoquímica seria

uma alternativa para a identificação de certas proteínas da matriz, bem como para a caracterização do tipo de colágeno produzido.

Procuramos, com este estudo, contribuir para pesquisas futuras buscando alternativas ao emprego de terapias mais custosas para o tratamento de lesões da cartilagem, bem como encontrar caminhos diversos ao da utilização de culturas *in vitro* de células-tronco mesenquimais, cuja complexidade e custo, praticamente inviabilizam sua utilização em larga escala e na prática diária do ortopedista. A preparação do material obtida por centrifugação simples de aspirados de medula óssea é um método de fácil reprodução, rápido e que não demanda equipamentos caros nem mão de obra especializada. O uso desta fração em tratamento de lesões ortopédicas tem a vantagem de poder ser realizada no momento do procedimento cirúrgico, com menor tempo de preparo e custos. No entanto, deve-se salientar que esta é uma mistura heterogênea de tipos celulares.

Apesar de seu uso experimental no reparo de defeito osteocondral, de forma isolada, não ter atingido uma pontuação histológica semelhante a da cartilagem hialina saudável, acreditamos no potencial das células mesenquimais obtidas de aspirado de medula óssea. Entendemos que outras associações devam ser exploradas, sobretudo com relação a fatores de crescimento.

## **6. CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

- 6.1. A aplicação de centrifugado de medula óssea autóloga em defeitos osteocondrais no joelho de coelhos mostrou melhor resultado por avaliação histológica, em comparação ao **Grupo Controle**.
- 6.2. Analisando a evolução dos grupos através do tempo, houve uma aproximação de seus escores histológicos, sobretudo pelo aumento observado no **Grupo Controle**.

## **7. REFERÊNCIAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS

- ALHADLAQ, A.; ELISSEEFF, J.; HONG, L.; WILLIAMS, C.; CAPLAN, A.L.; SHARMA, B.; KOPHER, R.A.; TOMKORIA, S.; LENNON, D.P.; LOPEZ, A.; MAO, J.J. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle. **Ann Biomed Eng**, v. 32, p. 911-923, 2004
- ANGEL, M.J.; RAZZANO, P; GRANDE, D.A. Defining the challenge. The basic science of articular cartilage repair and response to injury. **Sports Med Arthro**, v. 11, p. 168-181, 2003
- AROSARENA, O. Tissue engineering. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 13 (4), p. 233-241, 2005
- BARRY, F.P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Birth Defects Research**, v. 69 (part C), p. 250-256, 2003
- BERESFORD, J.N. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone marrow. **Clin Orthop Relat Res**, v. 240, p. 270-280, 1989
- BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBNEY, P.G. Bone marrow stem cells: Nature, biology and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180-192, 2001
- BOLLET A.J.; NANCE, J.L. Biochemical findings in normal and osteoarthritic articular cartilage. **J Clin Invest**, v. 45 (7), p. 1170-1177, 1966

- BONAB, M.M.; ALIMOGHADDAM, K.; TALEBIAN, F.; GHAFFARI, S.H.; GHAVAMZADEH, A.; NIKBIN, B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biol**, v. 10, p. 7-14, 2006
- BRAY, R. C.; FRANK, C. B.; MINIACI, A. The structure and function of diarthrodial joints. In: MCGINTY, J. B. ed. **Operative arthroscopy**. 2.ed. Philadelphia: Lippincot- Raven, 1996. Cap. 10, p.105-143.
- BREINAN, H.A.; MINAS, T.; HSU, H.; NEHRER, S; SLEDGE, C.B.; SPECTOR, M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. **J Bone Joint Surg**, v. 79, p. 1439-1451, 1997
- BRUDER, S.P.; FOX, B.S. Tissue engineering of bone: Cell based strategies. **Clin Orthop Relat Res**, v. 367 (supl), p. 68-83, 1999
- BUCKWALTER, J.A., Orthopaedic Basic Science – Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System – American Academy of Orthopaedic Surgeons – 2<sup>nd</sup> Edition – 2000
- BUSSAB & MORETTIN. Estatística Básica. Editora Saraiva – 5<sup>a</sup> edição – 2003
- CAPLAN, A.; ELYADERANI, M.; MOCHIZUKY, Y.; WAKITANI, S.; GOLDBERG, V. Overview principles of cartilage repair and regeneration: principles of cartilage repair and regeneration. **Clin Orthop Relat Res**, v. 342, p. 254-269, 1997

- CHAMBERS, M. G.; KUFFNER, T.; COWAN, S. K.; CHEAH, K.S.; MASON, R. M. Expression of collagen and aggrecan genes in normal and osteoarthritic murine knee joints. **Osteoarthritis Cartilage**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 51-61, 2002.
- CHIANG, H. KUO, T.F.; TSAI, C.C.; LIN, M.C.; SHE, B.R.; HUANG, Y.Y.; LEE, H.S.; SHIEH, C.S.; CHEN, M.H.; RAMSHAW, J.A.M.; WEIRKMEISTER, J.A.; TUAN, R.S.; JIANG, C.C. Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. **J Orthop Research**, v. 23, p. 584-593, 2005
- CHIANG, H.; JIANG, C.C. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. **J Formos Med Assoc**, v. 108, n. 2, p. 87-101, 2009
- COHEN, S.B.; MEIRISCH, C.M.; WILSON, A.; DIDUCH, D.R. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. **Biomaterials**, v. 24, p. 2653-2660, 2003
- CONNOLLY, J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. **Clin Orthop Relat Res**, v. 313, p. 8-18, 1995
- COSTA, A.L.D.; OLIVEIRA, C.R.G; LEOPIZZI, N.; AMATUZZI, M.M. O uso da matriz óssea desmineralizada na reparação de lesões osteocondrais. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortop Bras**, v. 9, p. 27-38, 2001
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional. Editora Guanabara 6ª Ed – Rio de Janeiro, 2000

- D'ELIA, C. O. Comparação entre o uso do plasma rico em plaquetas associado com aspirado de medular óssea ao enxerto autólogo de ílaco na consolidação das osteotomias da tíbia proximal: estudo prospectivo randomizado [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009
- DIDUCH, D.R.; JORDAN, L.C.M.; MIERISCH, C.M.; BALIAN,G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. **Arthroscopy: J Relat Surg**, v. 16, p. 571-577, 2000
- D'LIMA, D.D.; COLWELL, C.W. Clinical objectives for cartilage repair. **Clin Orthop Relat Res**, n. 391S, p. S402-S405, 2001
- FRENKEL, S.R.; BRADICA, G.; BREKKE, J.H. Regeneration of articular cartilage – Evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, p. 798-807, 2005
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v.16, n.3, p.381-390, 1966.
- GREENBAUM, M.A.; KANAT, I.O. Current concepts in bone healing: Review of the literature. **J Am Podiatr Med Assoc**, v. 1, p. 31-112, 1993
- GRIFFITH, L.G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. **Science**, v. 295, p. 1009-1014, 2002

- GWYNN, I.; WADE, S.; ITO, K.; RICHARDS, R. G. Novel aspects to the structure of rabbit articular cartilage. **European Cells and Materials**, v. 4, p. 18-29, 2002
- HASEGAWA, M.; SUDO, A.; SHIKINAMI, Y.; UCHIDA, A. Biological performance of a three-dimensional fabric as artificial cartilage in the repair of large osteochondral defects in rabbit. **Biomaterials**, v. 20, p. 1969-1975, 1999
- HASSAN, H.T.; EL-SHEEMY, M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. **J R Soc Med**, v. 97, p. 465-471, 2004
- HATTORI, K. Novel ultrasonic evaluation os tissue-engineering cartilage for large osteochondral defects – non invasive judgment of tissue-engineering cartilage. **J Orthop Res**, v. 23, p. 1179-1183, 2005
- HENDERSON, I.; FRANCISCO, R.; OAKES, B; CAMERON, J. Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal chondral defects of the knee – a clinical, arthroscopic, MRI and histologic evaluation at 2 years. **The Knee**, v. 12, p. 209-216, 2005
- HUNTLEY, J.S.; McBIRNIE, J.M.; SIMPSON, A.H. Cutting-edge design to improve cell viability in osteochondral grafts. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, p. 665-671, 2005
- IM, G.I.; KIM, D.Y., SHIN, J.H.; HYUN, C.W.; CHO, W.H. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. **J Bone Joint Surg**, v.83-B, n.2, p.289-294, 2001

- ISHII, I.; MIZUTA, H.; SEI, A.; HIROSE, J.; KUDO, S.; HIRAKI, Y. Healing of full-thickness defects of the articular cartilage in rabbits using fibroblast growth factor-2 and a fibrin sealant. **J Bone Joint Surg**, v.89-B, n.5, p.693-670, 2007
- ISOGAI, N.; LANDIS, W.J.; MORI, R.; GOTOH, Y.; GERSTENFELD, L.C.; UPTON, J.; VACANTI, J.P. Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultures periosteal cells. **Plast Reconstr Surg**, v. 105 (3), p. 953-963, 2000
- IZUMI, T.; TOMINAGA, T.; SHIDA, J.; ONISHI, F.; ITOMAN, M. Chondrocyte transplantation for osteochondral defects with the use of suspension culture. **Cell Tissue Bank**, v. 1 (3), p. 207-212, 2000
- KANDEL, R.A.; GRYNPAS, M., PILLIAR, R.; LEE, J.; WANG, J.; WALDMAN, S.; ZALZAL, P.; HURTIG, M. Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a sheep model. **Biomaterials**, v. 27, p. 4120-4131, 2006
- KAWASAKI-OYAMA, R. S.; BRAILE, D. M.; CALDAS, H. C.; LEAL, J. C. F.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; PAVARINO-BERTELLI, E. C.; ABBUD FILHO, M.; SANTOS, I. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. **Rev Bras Cir Cardiovasc** v. 23(1), p. 29 – 34, 2008
- KNIGHT, M.A.; EVANS G.R. Tissue Engineering: progress and challenges. **Plast Reconstr Surg**, v. 114 (2), p. 26E-37E, 2004

- KONDO, N.; OGOSE, A.; TAKUNAGA, K. Bone formation and resorption of highly purified  $\beta$ -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. **Biomaterials**, v. 26, p. 5600-5608, 2005
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Bases patológicas das doenças. Elsevier Editora LTDA – 7ª Edição – 2005
- LAVERTY, S. The Pros and Cons of studies of animal joints to improve articular cartilage regeneration. **European Cells and Materials**, v. 12 suppl. 1, p. 31, 2006
- LEE, J.W.; KIM, Y.H.; KIM, S.H.; HAN, S.H.; HAHN, S.B. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. **Yonsei Med J**, p. 41-47, 2004
- LOKIEC, F., EZRA, E., KHERMOSH, O. Simple bone cysts treated by percutaneous autologous marrow grafting. **J Bone Joint Surg**, v. 78 B, n. 6, p. 934-937, 1996
- MAINIL-VARLET, P.; AIGNER, T.; BRITTBERG, M.; BULLOUGH, P.; HOLLANDER, A.; HUNZIKER, E.; KANDEL, R.; NEHRER, S.; PRITZKER, K.; ROBERTS, S.; STAUFFER, E.; ICRS. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society. **J Bone Joint Surg (Am)**, v. 85-A, suppl. 2, p. 45-57, 2003
- MALININ, T.; TEMPLE, H.T.; BUCK, B.E. Transplantation of osteochondral allografts after cold storage. **J Bone Joint Surg**, v. 88, p. 762-770, 2006

- MANKIN, H. J. The reaction of articular cartilage to mechanical injury. **N Engl J Med**, v. 291, p. 1285-1292, 1974
- MANKIN, H. J. The response of articular cartilage to a mechanical injury. **J Bone Joint Surg**, v. 64-A, p. 460-466, 1982
- MESSNER, K.; GILLQUIST, J. Synthetic implants for the repair os osteochondral defects of the medial femoral condyle: a biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. **Biomaterials**, v. 14, p. 513-520, 1993
- MIERISCH, C.; COHEN, S.B.; JORDAN, L.C.; ROBERTSON, P.G.; BALIAN, G.B.; DIDUCH, D.R. Transforming growth factor- $\beta$  in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. **Arthroscopy**, v. 18, p. 892-900, 2002
- MITCHELL, N.; SHEPARD, N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforation through the subchondral bone. **J Bone Joint Surg (Am)**, v. 58 (2), p. 230-233, 1976
- MOW, V.C.; RACTLIFFE, A.; ROSENWASSER, M.P.; BUCKWALTER, J.A. Experimental studies on repair of large osteochondral defects at a high weight bearing area of the knee joint: A tissue engineering study. **J Biomechanics Engineering**, v. 113, p. 193-207, 1991
- MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B.; BARRY, F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, p. 3464-3474, 2003

- MUSCHLER, G.F.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitors cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume. **J Bone Joint Surg**, v. 79A, p. 1699-1709, 1997
- MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J. Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. **Clin Orthop Relat Res**, v. 395, p. 66-80, 2002
- MUSCHLER, G F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L.G. Engineering principles of clinical cells-based tissue engineering. **J Bone Joint Surg (Am)**, v. 86 (7), p. 1541-1557, 2004
- NISHIMORI, M.; DEIE, M.; KANAYA, A.; EXHAM, H.; ADACHI, N.; OCHI, M. Repair of chronic osteochondral defects in the rat. A bone marrow stimulating procedure enhanced by culture allogenic bone marrow mesenchymal stromal cells. **J Bone Joint Surg**, v.88-B, n.9, p.1236-1244, 2006
- NAKAMURA, N.; WOO, S.L.Y. Future of sports medicine: application of stem cells to restore chondral surface. Isakos Newsletter Summer 2009, at <http://www.isakos.com/assets/newsletter/sum09.pdf>
- NETER, J. **Applied linear statistical models**. 4.ed. Chicago : Irwin, 1996. p.111
- OCHI, M.; UCHIO, Y.; TOBITA, M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. **Artif Organs**, v. 25, p. 172-179, 2001

- O'DRISCOLL, S.W.; KELLY, F.W.; SALTER, R.B. Durability of regenerated articular produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. **J Bone Joint Surg (Am)**, v. 68 (7), p. 1017-1035, 1988
- O'DRISCOLL, S.W. Preclinical cartilage repair. Current status and future perspectives. **Clin Orthop Relat Res**, n. 391S, p. S397-S401, 2001
- OWEN, M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. **Bone Miner Res**, v. 3, p. 1-25, 1985
- PEREIRA, I. S. O.; PONTES, P.; EÇA, L. P.; FERREIRA, A. T.; MAZZETTI, P. M. V.; SILVA, L.; SOUZA, F. C. Protocolo piloto de separação e quantificação de células tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **Acta Orl**, v. 26 (3), p. 11 – 16, 2008
- PIERMATTEI, D.; FLO, G.L.; DeCAMP, C.E. – Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair. Saunders – 4<sup>th</sup> Edition – 2006
- PINEDA, S.; POLLACK, A.; STEVENSON, S.; GOLDBERG, V.; CAPLAN, A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. **Acta Anat (Basel)** v, 143, p. 335-340, 1992
- RIBEIRO, J.L.; CAMANHO, G.L.; TAKITA, L.C. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. **Acta Orthop Bras**, v. 12, p. 16-21, 2004

- RUDERT, M.; WILMS, U.; HOBERG, M.; WIRTH, C.J.; Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 125, p. 598-608, 2005
- SANTOS, L.A.U. Efeito da utilização de plasma rico em plaquetas na osteointegração dos enxertos ósseos homólogos criopreservados: estudo histomorfométrico em coelhos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007
- SAW, K.Y.; HUSSIN, P.; LOKE, S.C.; AZAM, M.; CHEN, H.C.; TAY, Y.G.; LOW, S.; WALLIN, K.L.; RAGAVANAIDU, K. Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic Acid: an experimental study in a goat model. **Arthroscopy**, v. 25 (12), p. 1391-1400, 2009
- SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.13-19, 2005.
- SELLARDS, R.A.; NHO, S.J.; COLE, B.J. Chondral injuries. **Curent Opinion in Rheumatology**, v. 14, p. 134-141, 2002
- SHAHGALDI, B.F. Coral graft restoration of osteochondral defects. **Biomaterials**, v. 19, p. 205-213, 1998

- SHAO, X.X.; HUTMACHER, D.W.; HO, S.T. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load bearing osteochondral defects in rabbits. **Biomaterials**, v. 27, p. 1071-1080, 2006
- STEINWACHS, M.R.; GUGGI, T.; KREUZ, P.C. Marrow stimulation techniques. **Injury**, v. 39 (suppl 1), p. S26-31, 2008
- TOGNOLI, G. K.; OLSSON, D. C.; MARTINS, D. B.; SANTOS JUNIOR, E. B.; SALBEGO, F. Z.; OLIVEIRA, G. K.; BRAGA, F. V. A.; RAISER, A. G.; DEZENGRINI, R.; CRUZ, F. S. F.; CASTRO, M. B.; ROSA, M. C.; CARREGARO, A. B.; PIPPI, N. L. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39 (1), p. 148-155, 2009
- UEMATSU, K; HATTORI, K.; ISHIMOTO, Y.; YAMAGUCHI, J.; HABATA, T.; TAKAKURA, Y.; OHGUSHI, H.; FUKUCHI, T.; SATO, M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. **Biomaterials**, v.26, p. 4273-4279, 2005
- VATS, A.; TOLLEY, N.S.; BUTTERY, L.D.K.; POLAK, J.M. The stem cell in orthopaedic surgery. **J Bone Joint Surg (Br)**, v. 86-B, p. 159-164, 2004
- VAZ, C. E. S. Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006

- WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.J.; YOUNG, R.G.; MANSOUR, J.M.;  
CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. Mesenchymal cell-based repair of  
large, full-thickness defects of articular cartilage. **J Bone Joint Surg  
(Am)**, v. 76 (4), p. 579-592, 1994
- ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Seminário Instituto Fernando Cardoso: Células-  
tronco, a nova fronteira da medicina – São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

**ANEXOS**

---

Aprovação do projeto pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq.



Ao

Departamento de Ortopedia e Traumatologia

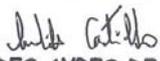
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.11.05 tomou conhecimento da execução do Protocolo de Pesquisa nº 917/05, intitulado: "Reparo de Defeito Articular no Joelho de Coelhos Utilizando Células-Tronco Mesenquimais Autólogas".

No que tange a sua parte empírica, será desenvolvido na "Universidade Federal de São Carlos", que deverá ser a responsável pela execução do protocolo.

Pesquisador Responsável: Dra. Márcia Uchoa Rezende

Pesquisador Executante: Dr. Rodrigo Bezerra de Menezes Reiff

CAPPesq, 09 de Novembro de 2005.

  
PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO  
Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Orientador: Prof. Arnaldo José Hernandez  
5/11/05

De acordo

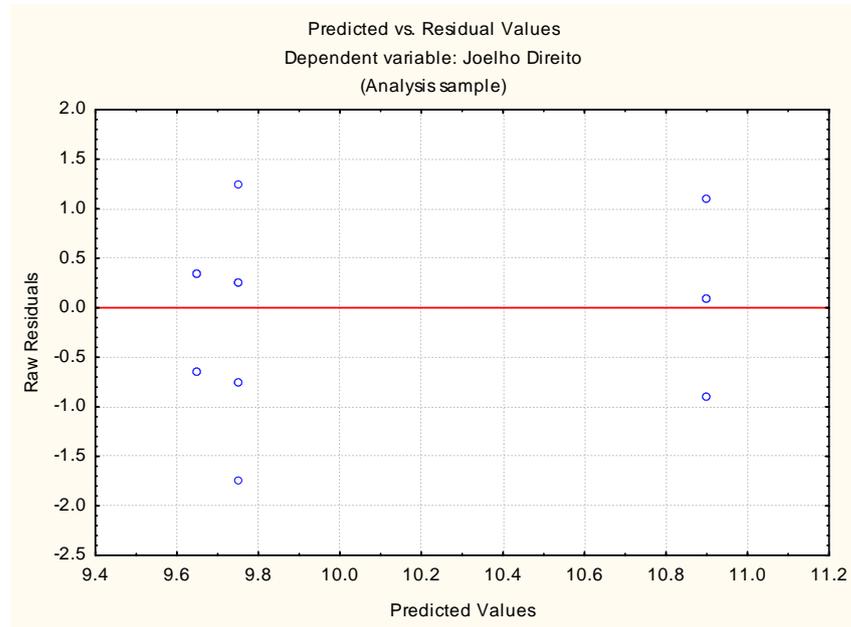


PROF. OLAVO PIRES de CAMARGO  
Coordenador da Área Ortopedia e Traumatologia

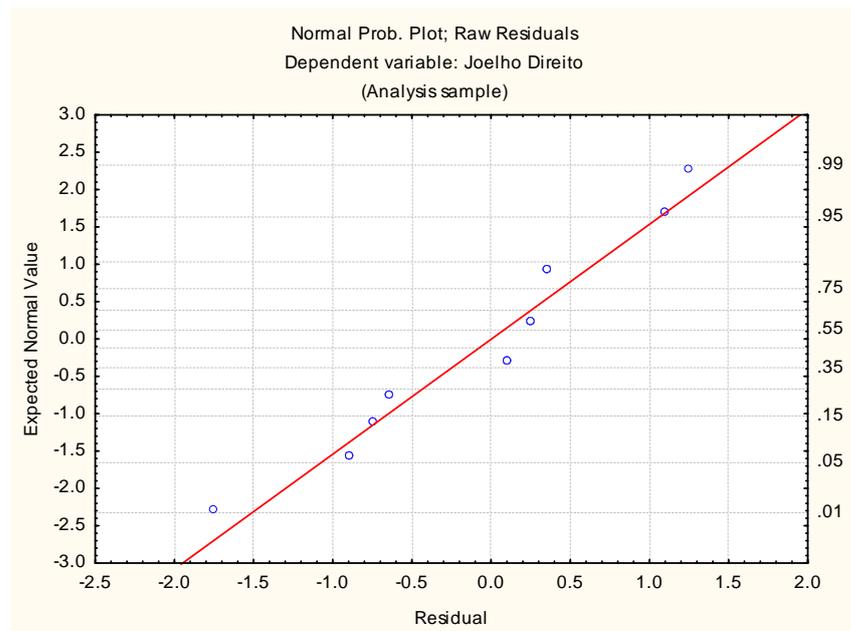
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP  
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP  
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail : [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br) / [secretariacappesq@hcnet.usp.br](mailto:secretariacappesq@hcnet.usp.br)

## Verificação de suposições do modelo ANOVA para o Grupo Estudo.

### Suposição de Homocedasticidade:

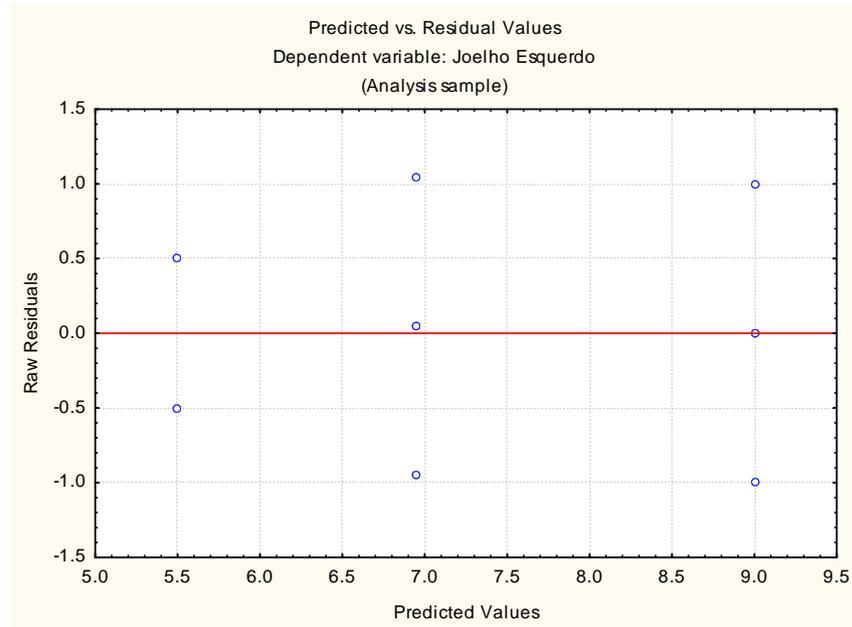


### Suposição de Normalidade:



## Verificação de suposições do modelo ANOVA para o Grupo Controle.

### Suposição de Homocedasticidade:



### Suposição de Normalidade:

