

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

MAURÍCIO PORTAL LONGARAY

**RESTAURAÇÃO DA CARTILAGEM HIALINA ARTICULAR COM
USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, HIDROGEL DE
COLÁGENO TIPO II E CONDROBLASTOS EM LESÃO TROCLEAR
DO JOELHO**

Modelo Experimental em Coelhos

PORTO ALEGRE
2019

MAURÍCIO PORTAL LONGARAY

**RESTAURAÇÃO DA CARTILAGEM HIALINA ARTICULAR COM
USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, HIDROGEL DE
COLÁGENO TIPO II E CONDROBLASTOS EM LESÃO TROCLEAR
DO JOELHO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao PPG
Fisiologia como requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz

PORTO ALEGRE
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Longaray, Maurício Portal
RESTAURAÇÃO DA CARTILAGEM HIALINA ARTICULAR COM
USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, HIDROGEL DE
COLÁGENO TIPO II E CONDROBLASTOS EM LESÃO TROCLEAR DO
JOELHO / Maurício Portal Longaray. -- 2019.

85 f.

Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva.

Coorientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. células tronco-mesenquimais (CTM). 2.
cartilagem. 3. condroblastos. 4. colágenos. 5.
medicina regenerativa. I. da Silva, Ilma Simoni Brum,
orient. II. Paz, Ana Helena da Rosa, coorient. III.
Título.

DEDICATÓRIA

A Deus pela Vida,

Aos meus pais, Cloecy e Teresinha , pelo estímulo e investimento nos estudos, e por me fazerem acreditar nos meus sonhos;

Aos meus irmãos, Márcio e Débora , pela presença e exemplos;

À minha esposa Karina pela cumplicidade , amor e dedicação a família;

Aos meus amados filhos, Sofia , Samuel e João Gabriel, pelo existência, motivação e ensinamentos diários. Vocês são a força motriz da evolução pessoal.

“Tente mover o mundo- o primeiro passo será mover a si mesmo”.

Platão

AGRADECIMENTOS

A todos professores da Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia, pelos ensinamentos.

A UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pelo ensino de excelência; ao Fundo de Incentivo à pesquisa e Eventos do Hospital de clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) pelo financiamento do projeto e disponibilidade de toda estrutura de experimentação animal. Sem fomento à pesquisa e criação dos meios de execução, este projeto se tornaria impossível de se realizar.

A equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA – HCPA) , Tuane Nerissa Alves Garcez, Daniela Campagnol e Marta J. Giotti Cioato por todo auxílio nas etapas de elaboração de projeto, preparação de materiais cirúrgicos e cuidados com os animais nesses vários meses.

À toda equipe da Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UPE –HCPA), especialmente a bióloga Dra. Emily Ferreira Salles Pilar e a técnica Flávia Rejane Giusti, pelo auxílio em toda confecção do material histopatológico que nos possibilitou a análise dos resultados.

Aos professores da Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia (PPGO) da Faculdade de Medicina da UFRGS – HCPA, que durante a Disciplina de Métodos de Pesquisa em Reprodução que colaboraram com sugestões e observações para a melhoria da metodologia do projeto, em especial aos professores Edison Capp, Lúcia Kliemann e Helena Von Eye Corleta.

Ao professor David Brand, Ph.D da University of Tennessee Health Science Center (UTHSC), pelos ensinamentos e doação de colágeno tipo II para confecção dos scaffolds.

A toda equipe do LABIMET (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral), a Dra. Lolita Pizzolato Schneider, a Dra. Elvira Cordero, pelas sugestões, observações e ensinamentos, em especial a Gabriela Sant'Anna pela disponibilidade de auxílio em diversas etapas do projetos com os animais e células.

Aos alunos de iniciação científica do LABIMET em pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos, em especial a Dieni Sirena, IC da UAMP pela importante colaboração das culturas das células e diferenciação.

A Profa. Dra. Ana Helena da Rosa Paz, coorientadora, por toda importantíssima participação metodológica, culturas celulares na UAMP e avaliação dos reparos tanto nas escalas morfológicas e histológicas.

Um agradecimento mais do que especial a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, que após transcorridos quinze anos entre a iniciação científica e o retorno ao mestrado acadêmico no Labimet-Fisiologia-ICBS, aceitou orientar a dissertação. Agradeço imensamente ter me aproximado de tantos pesquisadores capacitados e professores que colaboraram em diversas etapas, sem as quais, a execução desse projeto não seria possível. Disponível, atenta e com olhar ímpar para os fundamentos de pesquisa fizeram desta difícil caminhada, um momento especial de desenvolvimento tanto pessoal quanto profissional.

RESUMO

O dano a cartilagem articular é um grande desafio para médicos e todos os demais profissionais envolvidos no atendimento a saúde, bem como a todos os pacientes. Diversos fatores estão relacionados a lesão condral. Essas lesões podem se manifestar com dor, incapacidade funcional, edema ou derrames articulares, frequentemente o afastamento de atividades laborais ou atividades do cotidiano, e quando inadequadamente tratadas ou ao longo da evolução natural da doença, contribuem para perda significativa da qualidade de vida. Os tratamentos cirúrgicos mais utilizados na prática médica como o debridamento articular, a microfratura ou até mesmo o implante autólogo de condrócitos são ainda insuficientes para reparo e manutenção da capacidade tecidual existente antes da lesão. Nas pesquisas clínico-cirúrgicas de cartilagem, os modelos experimentais mais utilizados são as culturas de células e tecidos (pesquisa *in vitro*) e os utilização de modelo animal (pesquisa *in vivo*), ambas utilizadas neste trabalho. O objetivo deste trabalho foi avaliar três tratamentos para lesão condral troclear completa nos joelhos de coelhos quanto a sua capacidade de restauração utilizando-se as escalas de avaliações da ICRS (International Cartilage Repair Society) para animais quanto aos aspectos macroscópicos e histológicos, após 8 e 16 semanas de seguimento, e também avaliar as diferenças de reparo nos indivíduos pertencentes a um mesmo grupo de tratamento, apenas diferenciado-os pelo tempo de observação. Foram utilizados um total de 30 coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, com idade acima de 7 meses, submetidos a lesões cirúrgicas circunferenciais na tróclea femural do joelho de 4 mm de diâmetro por 4 mm de profundidade, bilateralmente. Todos coelhos foram distribuídos entre os 3 grupos tratamentos e o grupo controle. Os grupos tratamentos foram compostos da seguinte forma: Grupo A, com 7 coelhos que tiveram suas lesões preenchidas com células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas de placenta humana; Grupo B, com 7 coelhos que tiveram suas lesões preenchidas com hidrogel de colágeno tipo II; Grupo C com 7 coelhos, preenchido com condroblastos, que foram obtidos após aplicação de protocolo de diferenciação, a partir das células-tronco mesenquimais derivadas de placenta humana. O Grupo D com 9 coelhos, sem preenchimento algum, formou o controle. O reparo tecidual obtidas na área de lesão troclear dos animais dos quatro grupos foram avaliadas após 8 e 16 semanas de acompanhamento. Para avaliação morfológica grosseira (macroscópica) foram observados os seguintes aspectos: o grau de reparo do defeito, a integração à zona das bordas e aparência macroscópica. Para avaliação histológica visual (microscópica) foram observados os seguintes aspectos: continuidade de superfície, predomínio de matriz, distribuição de células, viabilidade de população celular, remodelamento do osso subcondral, mineralização da cartilagem calcificada. Após transcorridos 16 semanas, a melhora observada no escore global macroscópico,

integridade à zona de bordas e aparência macroscópica do grupo A (CTMs) comparativamente ao grupo D (controle) foi estatisticamente significativa, obtendo-se um de $p=0,004$, $p=0,020$ e $p=0,006$, respectivamente. A microscopia, não observamos melhora histológica dos aspectos analisados entre os tratamentos e o grupo controle. Internamente nos grupos , sob a variável temporal 8 e 16 semanas, foi observado no grupo mesenquimal, uma melhora microscópica no escore total ($p=0,004$), continuidade de superfície ($p=0,015$), predomínio de matriz ($p=0,002$), remodelamento do osso subcondral ($p=0,015$) mineralização da cartilagem calcificada ($p=0,015$), o que nos mostra um efeito parácrino importante, tempo-dependente até 16 semanas, o que não foi observado nos demais grupos, nos mesmos intervalos. Concluimos que o tratamento com células mesenquimais apresenta uma melhora macroscópica significativa e que os demais tratamentos são satisfatórios no reparo.

ABSTRACT

Cartilage damage is a major challenge for physicians and all other healthcare professionals, as well as to all patients. Several factors are related to chondral injury. These injuries can manifest with pain, functional disability, edema or joint effusions, often the withdrawal from work or daily activities, and when inadequately treated or along the natural course of the disease, contribute to a significant loss of quality of life. The most widely used surgical treatments in medical practice such as joint debridement, microfracture or even autologous chondrocyte implantation are still insufficient to repair and maintain the existing tissue capacity before the injury. In clinical and surgical cartilage research, the most used experimental models are cell and tissue cultures (*in vitro* research) and the use of animal models (*in vivo* research), both used in this work. The aim of this study was to evaluate three treatments for complete chondral lesion in rabbit knees for restoration capacity using the International Cartilage Repair Society (ICRS) rating scales for macroscopic and histological aspects after eight and sixteen weeks of follow-up, and also to assess the differences in repair in individuals belonging to the same treatment group, only differentiated by the time of observation. All rabbits were distributed between the three treatment groups and the control group. The treatment groups were composed as follows: Group A, with 7 rabbits that had their lesions filled with mesenchymal stem cells (MSCs) derived from human placenta; Group B, with 7 rabbits that had their lesions filled with type II collagen hydrogel; Group C with 7 rabbits, filled with chondroblasts, which were obtained after a differentiation protocol was applied from the human placenta-derived mesenchymal stem cells. Group D with 9 rabbits, without any padding, formed the control. A total of 30 adult male New Zealand rabbits, aged over 7 months, submitted to circumferential surgical injuries to the knee femoral trochlea of 4 mm diameter by 4 mm deep, bilaterally, were used. All rabbits were distributed between the 3 treatment groups and the control group. The treatment groups were composed as follows: Group A, with 7 rabbits that had their lesions filled with mesenchymal stem cells (MSCs) derived from human placenta; Group B, with 7 rabbits that had their lesions filled with type II collagen hydrogel; Group C with 7 rabbits, filled with chondroblasts, which were obtained after a differentiation protocol was applied from the human placenta-derived mesenchymal stem cells. Group D with 9 rabbits, without any padding, formed the control. Tissue repair obtained in the area of trochlear injury of the animals of the four groups was evaluated after 8 and 16 weeks of follow-up. For gross morphological evaluation (macroscopic) the following aspects were observed: the degree of

defect repair, integration with the edge zone and macroscopic appearance. For visual histological evaluation (microscopic) the following aspects were observed: surface continuity, matrix predominance, cell distribution, cell population viability, subchondral bone remodeling, calcified cartilage mineralization. After sixteen weeks, the improvement in macroscopic overall score, border zone integrity and macroscopic appearance of group A (MSCs) compared to group D (control) was statistically significant, with $p = 0.004$, $p = 0.020$, and $p = 0.006$, respectively. At microscopy, we did not observe histological improvement of the analyzed aspects between the treatments and the control group. Internally in the groups, under the temporal variable 8 and 16 weeks, it was observed in the mesenchymal group, a microscopic improvement in the total score ($p = 0.004$), surface continuity ($p = 0.015$), matrix predominance ($p = 0.002$), remodeling. subchondral bone ($p = 0.015$) mineralization of calcified cartilage ($p = 0.015$), which shows us an important paracrine effect, time-dependent up to 16 weeks, which was not observed in the other groups at the same intervals. We conclude that mesenchymal cell treatment has a significant macroscopic improvement and that the other treatments are satisfactory in repair.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Camadas Histológicas da Cartilagem Hialina e disposição esquemática das fibras de colágeno e dos condrócitos	21
FIGURA 2	Função das articulações diartrodiais e estruturação bioquímica e correlação histológica	22
FIGURA 3	Figura esquemática de defeitos condrais pequenos X grandes (bem contido vs mal contido) ; fisiopatologia (trauma prévio, dor articular, predisposição genética, desvios de alinhamentos, atividades, carga, torções, impactos, obesidade, lesões ligamentares e lesões meniscais) e possíveis tratamentos	24
FIGURA 4	Ilustração esquemática demonstrando abordagens condrais cirúrgicas baseados em células	30
FIGURA 5	Células-Tronco Mesenquimais em placa de cultura com confluência elevada e coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.)	36
FIGURA 6	Demonstração de adipócitos diferenciados a partir de CTM mediante protocolo de diferenciação por 10 dias. Coloração utilizada de Red Oil, conferindo tom avermelhado as células de gordura	37
FIGURA 7	Demonstração de osteócito diferenciados a partir de CTM mediante protocolo de diferenciação o por 14 dias. Coloração utilizada de Red Alzerin	37
FIGURA 8	Demonstração de Condroblasto diferenciados a partir de CTM mediante protocolo de diferenciação o por 21 dias. Coloração utilizada de Alcian Blue	37
FIGURA 9	Imagem da anatomia cirúrgica da tróclea femural alongada de coelho (média de 18-20 mm de comprimento)	40
FIGURA 10	Imagem da anatomia cirúrgica da tróclea femural alongada, porém com largura de máximo 6 -7 mm	40
FIGURA 11	Imagem de exposição do sulco troclear de um joelho esquerdo, com afastamento de estruturas articulares e identificação de lesão ostecondral cilíndrica com diâmetro de 4 mm e	41

	profundidade de 4 mm, centralizada entre as cristas trocleares	
FIGURA 12	Fotografia de Trefina 4 mm de diâmetro e limitador (“stop”) confeccionado mediante usinagem em torno mecânico para garantir limitação de profundidade e uniformidade	42
FIGURA 13	Curativo pós-cirúrgico imediato. Curativo meticuloso para proteção cirúrgica de manipulações orais pelo próprio animal	42
FIGURA 14	Fotos dos joelhos de estudo, imediatamente após eutanásia e preparação de peças anatômicas. Todas fotos A-D, joelhos após 16 semanas de seguimento	50
FIGURA 15	Imagens A e B: Demonstração de microscopia de coelho grupo A- CTM. Mostrada continuidade superficial, integração de bordas, boa celularidade e remodelamento ósseo adequado	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Tabela dos Pesquisadores e valores encontrados nos Coeficientes de fricção da articulação testada	22
TABELA 2	Tabela dos Pesquisadores e valores encontrados nos Coeficientes de fricção da articulação testada	23
TABELA 3	Tabela resumida dos principais vantagens e desvantagens entre tratamentos Conservadores e Cirúrgicos.	32
TABELA 4	Tabela resumida dos principais vantagens e desvantagens entre tratamentos Conservadores e Cirúrgicos	46
TABELA 5	Escala de Avaliação Microscópica (Histológica Visual) da ICRS e suas pontuações preconizadas	47
TABELA 6	Tabela dos Pesquisadores e valores encontrados nos Coeficientes de fricção da articulação testada	54
TABELA 7	Tabela dos Pesquisadores e valores encontrados nos Coeficientes de fricção da articulação testada	55

LISTA DE ABREVIATURAS:

AAOS - American Academy of Orthopedic Surgeons (Academia Americana de Cirurgiões Ortopedistas)

ACI – Autologous Chondrocytes Implantation - Implante Autólogo de Condrócitos

ACR - American College of Rheumatology (Colégio Americano de Reumatologia)

AINEs - Anti-inflamatórios não-esteroides

CTG - Centro de Terapia Gênica

CTM - Célula-Tronco Mesenquimal

ECRs – Ensaio Clínicos Randomizado

FGF = Fator de Crescimento dos Fibroblastos

FIPE-HCPA - Fundo de Incentivo à pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

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

IGF = Fator de Crescimento Semelhante a Insulin

LABIMET - Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral

MACI - (Matrix-induced Autologous Chondrocytes implantation) - Implante de condrócitos autólogos induzidos por matriz

mm – milímetro

MSC - Mesenquimal Stem Cell

OA - Osteoartrose

OARSI- Osteoarthritis Research Society International (Sociedade Internacional de Pesquisa da Osteoartrite)

p = valor - p (chamado de nível descritivo ou probabilidade de significância)

PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas

pH = símbolo do potencial Hidrogeniônico – escala logarítmica

TGF- β = Fator de transformação do crescimento beta

UEA - Unidade de Experimentação Animal

UAMP - Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP)

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UTHSC - University of Tennessee Health Science Center

• SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. A CARTILAGEM.....	17
2.2. FORMAÇÃO DA CARTILAGEM HIALINA	18
2.3. FISIOPATOLOGIA DA DEGENERAÇÃO DA CARTILAGEM HIALINA	22
2.4. TRATAMENTO CLÍNICO.....	24
2.5. TRATAMENTOS CIRÚRGICOS	27
2.6. ENGENHARIA DE TECIDOS	30
3. HIPÓTESES OPERACIONAIS (Ho) E HIPÓTESE CONCEITUAIS (Hc).....	32
4. OBJETIVOS.....	33
4.1 - OBJETIVO GERAL.....	33
4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. MÉTODOS	34
5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	34
5.2. LOCAIS DE EXECUÇÃO.....	34
5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
5.4. MODELO ANIMAL	37
5.5. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	42
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5.7. ASPECTOS ÉTICOS.....	43
5.8. MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA.....	43
5.9. ESCALAS DE RESPOSTA REGENERATIVA	44
6. RESULTADOS	47
6.1. AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS GROSSEIRAS (MACROSCÓPICAS)	48
6.1.1. Macroscopia após 8 semanas.....	49
6.1.2. Macroscopia após 16 semanas	50
6.2. AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA VISUAL (MICROSCÓPICAS).....	50
6.2.1 Microscopia após 8 semanas.....	50
6.2.2. Microscopia após 16 semanas	51
6.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO TEMPORAL NOS MESMOS GRUPOS.....	53
7. DISCUSSÃO	56
8. CONCLUSÕES	62
9. PERSPECTIVAS.....	63
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	76
12.1. Tabela de Avaliações após 8 semanas de seguimento	76
12.2. Tabela de Avaliações após 16 semanas de seguimento	77
Anexo - Histologia	79

1. INTRODUÇÃO

As lesões condrais são um grande desafio para ortopedistas, reumatologistas e clínicos plantonistas em todo o mundo. Quando essas lesões condrais se manifestam, causam dificuldades de mobilização articular, afastamento do trabalho, uso excessivo de analgésicos e contribuem para importante baixa da qualidade de vida das pessoas.

Tratamento conservador não-invasivo, alicerçado em repouso articular, gelo, analgésicos ou anti-inflamatórios, fisioterapia e fortalecimento musculares são na imensa maioria das vezes o tratamento de eleição inicial.

Os tratamentos cirúrgicos, por outro lado, são indicados quando o tratamento conservador obtém respostas insatisfatórias ou quando o grau de lesão prevê que o resultado não será adequado se mativer a linha conservadora. O tratamentos cirúrgicos ortopédicos evoluíram muito nos últimos 40 anos e foram fundamentais para desenvolvimento de diversas terapias com capacidade de melhora de uma variedade de patologias articulares condrais.

Artroplastias totais de quadril e joelho foram responsáveis por uma melhora significativa da qualidade de vida em pacientes com quadros degenerativos avançados, sendo indicada em quadros no qual todas as demais terapias não demonstraram respostas.

Os tratamentos cirúrgicos artroscópicos primordiais, desenvolvidas no início dos anos 70, foram fundamentais para o acesso das articulações como joelho, quadril, ombro e tornozelo. Serviram para observar *in vivo*, na prática clínica, os problemas visualizados por muitos anos exclusivamente pelo exame físico e indiretamente pelo raio x.

Durantes os anos 90, com a popularização das vídeoartroscopias em diversas áreas cirúrgicas, as cartilagens foram exponencialmente melhor compreendidas e tratadas. Quando o exame da ressonância nuclear magnética aparece como ferramenta de complementação diagnóstica de imagem, a possibilidade de avaliações de doenças condrais em fase pré-clínica, quando na total ausência de sintomas, ou na fase inicial de sintomas mas sem intervenção cirúrgica faz com que a compreensão da história natural das doenças como artrose, artrites de causas reumatológicas, artrites infecciosas, lesões focais iniciais pudessem ser entendidas.

A Medicina, com sua evolução contínua, foi sendo capazes responder a muitas perguntas, porém, até mesmo os tratamentos considerados padrão-ouro hoje, ainda são insuficientes para adequada recuperação articular, não conseguindo-se a tão sonhada regeneração da cartilagem hialina articular.

A medicina regenerativa busca a recuperação dos tecidos e órgãos através de

diferentes tipos de biomateriais, terapias celulares , fatores de crescimentos e medicações para obter um tecido regenerado. Focada neste campo de estudos, aparece a engenharia de tecidos estuda as possibilidades do uso dessas estratégias com a participação de equipes multidisciplinares onde médico assistente, engenheiro de materiais, biomédicos, hematologistas, imunologistas , farmacêuticos entre outros participem do desenvolvimento de novos métodos e terapias de reparo tecidual.

A relevância científica deste estudo baseia-se no tratamento das lesões osteocondrais com o uso de células-tronco mesenquimais , condroblastos (células já diferenciadas previamente a partir de células-tronco mesenquimais) e hidrogel de colágeno tipo II , reconhecidos como potencializadores da condrogênese em joelhos de coelhos.

Os animais serão submetidos a lesões osteocondrais em sulco troclear femoral completa , ultrapassando as 4 camadas histológicas condrais, bilateralmente, e que serão preenchidos com : células-tronco mesenquimais , condroblastos e hidrogel de colágeno tipo II. Serão avaliados os três tratamentos para lesão condral troclear completa nos joelhos de coelhos quanto a sua capacidade de restauração utilizando-se as escalas de avaliações da ICRS (International Cartilage Repair Society) para animais quanto aos aspectos macroscópicos e histológicos, após 8 e 16 semanas de seguimento, e também avaliar as diferenças de reparo nos indivíduos pertencentes a um mesmo grupo de tratamento, apenas diferenciado-os pelo tempo de observação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A CARTILAGEM

Cartilagem hialina é uma estrutura aneural, avascular, alinfática e hipocelular (BUCKWALTER & MANKIN, 1997). Os gases e nutrientes difundem-se dos vasos do tecido conjuntivo vizinho ou do líquido sinovial das articulações. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Os condrócitos estão adaptados à baixa tensão de oxigênio (por exemplo, realizam glicólise, que é anaeróbica) e mais do que isso: a baixa tensão de oxigênio provoca diferenciação das células mesenquimais em condroblastos (OVALLE & NAHIRNEY, 2008).

Os condrócitos ocupam 5% a 10% do volume total da cartilagem e apresentam um metabolismo lento, devido à pequena proporção de células em relação ao volume do tecido cartilaginoso. Estas células são consideradas metabolicamente ativas, visto que em seu citoplasma são encontradas estruturas anabólicas como complexo de Golgi e retículos endoplasmáticos que são responsáveis pela produção de macromoléculas de colágeno, de proteoglicanos e glicoproteínas, constituintes da matriz cartilaginosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A matriz cartilaginosa renova-se constantemente, sendo que a atividade metabólica destas células é influenciada pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A matriz apresenta um pH de 7.4 e variações no pH podem perturbar a estruturação da cartilagem (CHEN, FRENKEL & DI CESARE, 1999). Ainda influenciam nessa atividade: as interleucinas, medicações e estímulos físicos mecânicos pela variação da pressão hidrostática da cartilagem.

Na cartilagem 95% dos colágenos são do tipo II e os tipos IX e XI formam um “cross-link” com o colágeno do tipo II, aumentando a insolubilidade dessa matriz. O colágeno tipo VI ancora os condrócitos na matriz e o colágeno tipo X atua na mineralização das camadas mais profundas da cartilagem. Na matriz da cartilagem ainda se observa o colágeno tipo V, em menor quantidade (McGINTY, 1996). Os proteoglicanos, presentes na matriz cartilaginosa, são moléculas hidrofílicas que geram a afinidade da cartilagem pela água e são ligadas ao ácido hialurônico, que por ser uma molécula de cadeia longa, atua como um esqueleto para as demais moléculas. As glicosaminoglicanas menores da matriz da cartilagem

são: Queratan Sulfato, Dermatan Sulfato e Condroitina 4 e 6 Sulfato. Juntos formam um polímero de ânions de proteínas de alta viscosidade e com alto peso molecular e hidrofílico.

Os condrócitos variam de tamanho, forma e atividade nas diferentes camadas do tecido. Os condrócitos envolvem-se com matriz extra-celular mas não mantêm contato célula-célula (CHEN , FRENKEL , DI CESARE,1999). Na cartilagem adulta raramente os condrócitos se dividem. Com o envelhecimento a resposta biológica deste tecido diminui, sua densidade diminui, aumentando a probabilidade de degeneração (BRAY, FRANK, MINIACI,1996).

2.2. FORMAÇÃO DA CARTILAGEM HIALINA

O mecanismo de formação da cartilagem envolve a origem de células totipotentes do mesoderma. O mesoderma é o folheto intermediário do embrião.

As células mesenquimais se diferenciam em condroblastos, quando dá-se o início da produção em massa da matriz sinovial e na sua maturidade quando essas células se tornam preenchidas por uma matriz intersticial circundando suas periferias, elas necessitam passar por um processo de amadurecimento, tornando-se células que passam a modelar a renovação da matriz cartilaginosa de modo balanceado e nessa fase adulta são denominados de condrócitos. O mecanismo que leva a essa diferenciação ainda não é bem elucidado, mas se sabe que os nutrientes e as substâncias químicas que fazem parte do meio em que essas células totipotentes se encontram, são responsáveis por essa diferenciação. As células mesenquimais originárias do mesoderma seguem caminhos diferentes na diferenciação para formação das articulações, dos demais tecidos, conjuntivo e muscular, e das células do sangue e dos vasos sanguíneos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A cartilagem hialina tem um aspecto branco-perolado, ligeiramente transparente quando visualizada a fresco. Com HE, o pericôndrio e a matriz próxima, por causa do colágeno, são eosinófilos, enquanto a matriz em torno dos condrócitos, devido aos glicosaminoglicanos, é basófila. Os condrócitos estão adaptados à baixa tensão de oxigênio (por exemplo, realizam glicólise, que é anaeróbica) e mais do que isso: a baixa tensão de oxigênio provoca diferenciação das células mesenquimais em condroblastos. (OVALLE & NAHIRNEY, 2008).

A diferenciação da célula mesenquimal indiferenciada em fibroblastos e condroblastos que inicia a formação da cartilagem (GROSS, 1952; SCHUBERT, 1952); esse princípio oferece base de estudos para reprodução do tecido cartilaginoso pela bioengenharia a partir de células mesenquimais (CAPLAN, 2000; MARTIN et al., 2001; SCAPINELLI et

al., 2002).

Na maturidade dos condroblastos quando já ocorreu à deposição da matriz cartilaginosa e depois para manterem a renovação constante e a organização final do tecido cartilaginoso, os condroblastos transformam-se em células mais maduras e passam a se chamar de condrócitos.

Nelson e Cox (2006) relatam a formação dos órgãos esqueléticos à partir do potencial de células embrionárias que ocorre sob domínio programado de mortes celulares, denominado “apoptose”. Esse é o mecanismo que possibilita a grande quantidade de células embrionárias de o tecido mesenquimal constituírem do corpo embrionário sem forma, segmentação articulada como ocorre com os dedos. Os mecanismos reguladores que desencadeiam apoptose envolvem algumas das mesmas proteínas que regulam o ciclo celular, sendo que os produtos monoméricos da degradação de proteínas e do DNA (aminoácidos e nucleotídeos) são liberados em um processo controlado que permite que eles sejam captados e recusados pelas células vizinhas. A apoptose, dessa forma, permite que o organismo elimine uma célula sem desprezar seus componentes (NELSON, COX, 2006).

A quantidade e a orientação dos colágenos, proteoglicanos, água e células variam de acordo com o nível ou a camada da cartilagem. As diferenças na composição entre a superfície e a placa subcondral do osso. As diferenças dão origem a quatro zonas separadas em camadas (Figura 1):

-Zona Superficial (10- 20%), 1 zona: zona superior, primeiramente uma zona sem células, formada por camadas fibrilares finas, a chamada “*lâmina splendens*” de altíssima viscosidade que protege a cartilagem contra atritos, logo abaixo dela, encontra-se uma *camada tangencial* com condrocitos dispersos e alongados paralelos a superfície refletindo a dispersão tangencial das fibra.

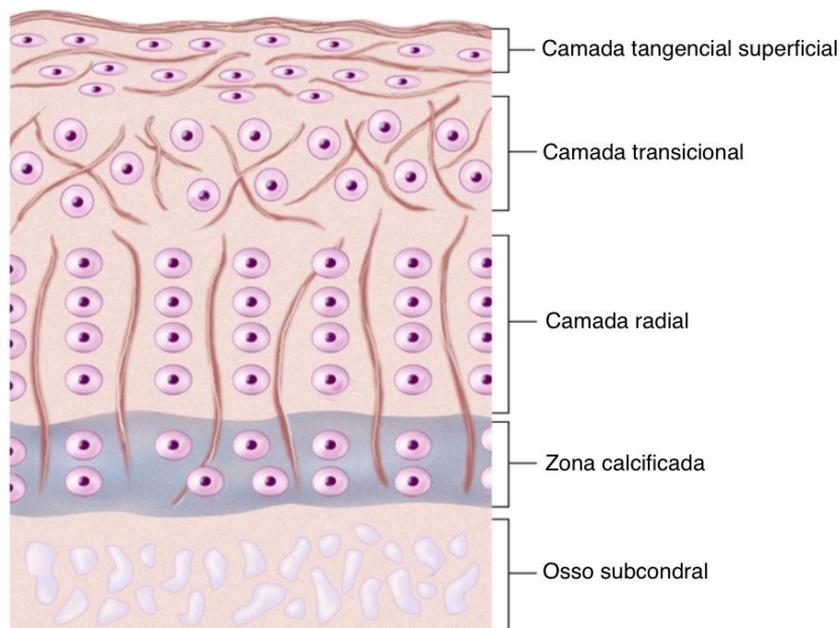
-Zona de transição (40-60%), 2 zona: com fibras de colágenos em disposição oblíquo; os condrócitos apresentam-se arredondadas e maiores e acompanham essa disposição randomicamente distribuídos acompanhando as fibras de colágeno.

-Zona radial (30% da cartilagem), 3 zona: com as fibras de colágenos em disposição perpendicular à superficial sugerindo a função de suportar carga também e no final dela, os condrócitos são ainda maiores e arrançados tipicamente em colunas , profundamente a esta zona , aparece uma linha demarcatória chamada de “*Tide mark*” (“*marca da maré*”) que separa essa camada da próxima , mais profunda e tem uma especial afinidade por colorações básica (ex. Azul de Toluidina).

-Zona Calcificada, 4 zona: uma importante zona de transição para uma menos

resiliente de osso subcondral. Por um longo período, esta foi considerada uma zona inativa, até que Hunziker (1992) percebeu que os condrócitos aqui poderiam captar e incorporar (35S) sulfato na matriz pericelular e territorial. Hunziker especulou que, após o trauma, a atividade metabólica torna-se temporariamente prejudicada.

Figura. 1. Camadas Histológicas da Cartilagem Hialina e disposição esquemática das fibras de colágeno e dos condrócitos.



Modificada de Britteberg, Mats. *Cartilage Surgery : an operative manual* / Mats Britteberg, Wayne K.Gersoff. 1st ed. Philadelphia , PA. Elsevier, 2011.

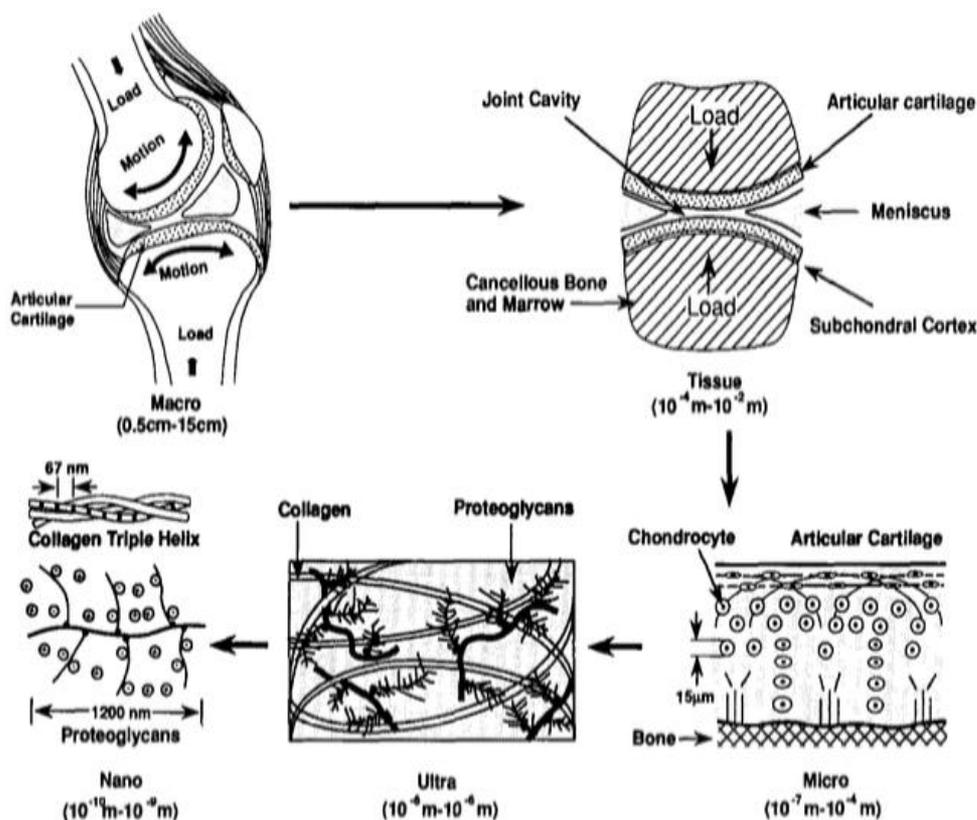
A cartilagem regenerada requer ser estruturalmente e bioquimicamente idêntica a cartilagem nativa (CAPLAN AI 2000). O reparo, ao contrário da regeneração, envolve a formação de um tecido funcional que preencha o defeito inicial, mas que não seja completamente idêntico ao tecido original (O'DRISCOLL e FITZSIMMONS 2001).

Lesões na cartilagem estão presentes em cerca de 10-12% de todos os indivíduos. Quando sintomáticos, lesões condrais manifestam-se com dor, edema e a perda da cartilagem pode ser parcial ou completa, podendo afetar uma ou mais localizações. A história natural se não tratada provavelmente resultará em progressão para perda condral difusa (CHEN, FRENKEL E DI CESARE 1999), podendo levar a desestruturação e perda de função com desarranjo articular

Cartilagem hialina cobre as superfícies articulares diartrodiais (articulações que apresentam movimento livre) com uma superfície de baixa fricção, resiliência, rigidez compressiva e , sob condições normais, resistência ao desgaste. (MOW, RATCLIFFE &

POOLE, 1992). Suas características fisio-químicas conferem a mobilidade com a capacidade de baixo atrito e durabilidade. Varia em espessura, densidade celular, propriedades mecânicas na mesma articulação e entre espécies. (BUCKWALTER E MANKIN 1997).

Figura 2. Função das articulações diartrodiais e estruturação bioquímica e correlação histológica.



Fonte: Mow, V. C., Ratcliffe, A., & Robin Poole, A, 1992.

O primeiro relato de medidas de coeficientes de fricção e uso foram realizados por Jones em 1936 (Jones, 1936), muitos outros foram publicados mais tarde na literatura (ver tabela 1) provê alguns coeficientes de fricção sem lubrificante de alguns materiais de engenharia para comparação.

Tabela 1 – Tabela dos Pesquisadores e valores encontrados nos Coeficientes de fricção e a articulação testada.

Investigador	Coefficiente de Fricção	Articulação Testada
J. Charnley 1960	0.005 – 0.02	Joelho humano
C.W.McCutchen 1962	0.02 - 0.35	Ombro de porco
F.C. Linn 1968	0.005- 0.01	Tornozelo canino
A. Unsworth 1975	0.01 - 0.04	Quadril humano
L.L.Malcolm 1976	0.002 - 0.03	Ombro bovino

Modificada de MOW, RATCLIFFE & POOLE, 1992

Tabela 2 – Tabela de diferentes materiais e valores dos coeficientes de fricção entre as interfaces.

Materiais	Coefficiente de fricção
Ouro no ouro	2.8
Alumínio no alumínio	1.9
Prata na prata	1.5
Aço no aço	0.6-0.8
Latão no aço	0.35
Vidro no vidro	0.9
Madeira na madeira	0.25-0.5
Nylon no nylon	0.2
Grafite no aço	0.1
Gelo no gelo	0.01-0.1

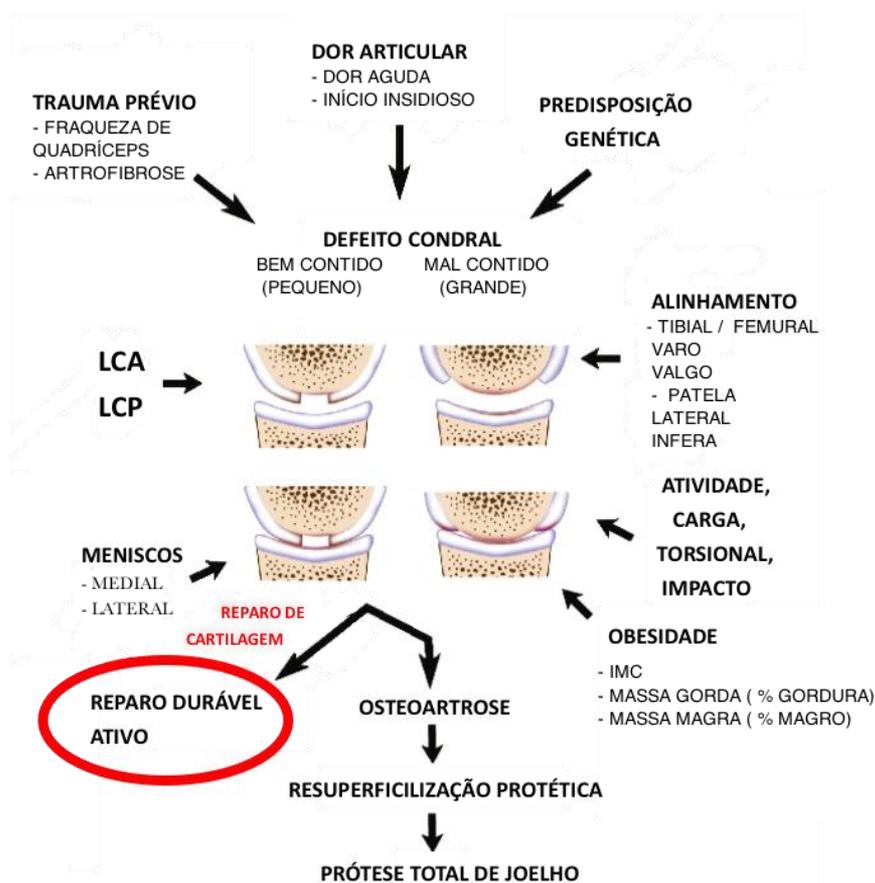
Modificada de MOW, RATCLIFFE & POOLE, 1992

Com base nesses índices podemos facilmente compreender a importância da continuidade superficial para pleno funcionamento das articulações diartrodiais onde uma superfície movimenta-se em oposição a outra.

2.3. FISIOPATOLOGIA DA DEGENERAÇÃO DA CARTILAGEM HIALINA

A lesão da cartilagem articular hialina pode ser traumática ou degenerativa; na doença degenerativa, conhecida como osteoartrose, a elasticidade e a viscosidade do líquido sinovial estão comparativamente diminuídas, em relação à cartilagem normal e é considerada uma osteoartrite degenerativa. Uma vez iniciada, clinicamente é lenta e insidiosa (ALTMAN & LOZADA, 1998).

Figura 3. Figura esquemática de defeitos condrais pequenos X grandes (bem contido vs mal contido); fisiopatologia (trauma prévio, dor articular, predisposição genética, desvios de alinhamentos, atividades, carga, torções, impactos, obesidade, lesões ligamentares e lesões meniscais) e possíveis tratamentos



Fonte: Modificado de Minas, T. 2001.

Minas, T. A primer in cartilage repair and joint preservation of the knee. 2001.

A evolução para artrose e a tradicional superficilização protética já são uma realidade há muitos anos e funcionam com um sucesso bastante alto. A confecção de reparos duráveis e ativos são o objetivo do estudo da cartilagem e da medicina regenerativa na atualidade com objetivo de prevenir ou retardar ao máximo a evolução para processos degenerativos difusos ou não contidos.

A osteoartrose pode atingir qualquer tipo de articulação e ocorre após alterações nos condrócitos, provocando uma quebra na produção da matriz e a consequente fragilização dessa cartilagem (BOS et al. 2002); além de uma diminuição na concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial, assim como, a diminuição do peso molecular dessas moléculas (BELCHER et al. 1977).

Portanto, a osteoartrose é uma doença que resulta da ação conjunta de vários fatores que provocam uma lenta degradação da cartilagem (MORELAND 2003).

A degradação da cartilagem é estimulada por atividades de enzimas conhecidas como proteinases, que podem estar presentes tanto no meio intracelular quanto no extracelular. Quatro classes de proteinases podem ser distinguidas com base na sua ação catalítica,

incluindo-se as proteinases aspártica e cisteína, que são ativadas em pH ácidos e as serinas e metaloproteinases, que são ativadas em pH neutro ou alcalino. A ação das metaloproteinases é dependente do zinco. Por serem dependentes do metal zinco para sua interação, essas proteinases são chamadas de metaloproteinases (BRAY, FRANK & MINIACI, 1996).

Tallheden et al. (2005) demonstraram *in vitro* que o condrócito na osteoartrite apresenta uma importante diminuição na sua capacidade de produção de matriz, enquanto Bland e Cooper (1984) confirmaram que na presença do ácido hialurônico, o condrócito melhora sua capacidade de produzir matriz.

2.4. TRATAMENTO CLÍNICO

2.4.1. Controle Ponderal - Manejo do peso

Várias diretrizes internacionais concordam que a redução de peso desempenha um papel fundamental no tratamento de todos os pacientes com OA. A obesidade está fortemente associada a um risco aumentado de desenvolver OA, a necessidade de artroplastia e incapacidade física (WLUKA, LOMBARD & CICUTTINI 2013).

Estudos recentes comprovaram o significado da modificação de peso: evidências mostram que a dor no joelho é reduzida em mais de 50% após a redução ponderal em cerca de 10%; e a redução de peso pode diminuir o risco de desenvolver osteoartrose do joelho sintomática em 50% (FELSON et al 1992).

2.4.2. Exercício

O exercício visa reduzir a dor e melhorar a mobilidade geral e a função articular; Um exercício mais intensivo pode fortalecer o músculo ao redor da articulação. Não há recomendação quanto ao tipo de exercício a ser realizado, sugerindo que ele tem menor eficácia na redução da dor e incapacidade em comparação com a perda de peso. O exercício é agora universalmente recomendado pelas outras diretrizes internacionais (KAN et al 2019).

Verificou-se que o exercício baseado em água tem benefícios de curto prazo para a função articular, mas menores benefícios para a dor (BARTELS et al 2016). É sugerido para pacientes com limitações funcionais ou de mobilidade.

2.4.3. Paracetamol

Embora amplamente utilizado como analgésico de primeira linha na OA, há crescentes dúvidas, a partir de metanálises recentes, sobre a eficácia analgésica do

paracetamol. Uma revisão Cochrane sobre paracetamol na OA, realizada há mais de uma década, encontrou uma redução significativamente superior na dor em comparação com placebo de sete ECRs, embora com um tamanho de efeito pequeno (TOWHEED et al 2006).

Em uma análise subsequente ajustando a qualidade dos estudos, quando os cinco ECRs de alta qualidade e controlados por placebo foram considerados isoladamente a segurança do paracetamol no tratamento da dor foi ainda menor (ZHANG et al 2010). Este estudo, sugeriu que o paracetamol não teve efeito significativo sobre a rigidez ou melhora da função física.

Em recente revisão sistemática e metanálise, o paracetamol foi encontrado para fornecer benefício mínimo a curto prazo para pessoas com osteoartrose (MACHADO et al 2015). Em uma meta-análise de rede em 2017 de medicamentos analgésicos para o tratamento da dor em OA de joelho e quadril, os autores concluíram, com base nos dados disponíveis, que não há papel para o paracetamol de agente único no tratamento da osteoartrose (DA COSTA et al 2017).

As diretrizes da OARSI recomendam que o paracetamol seja administrado em doses e durações conservadoras, pois há um risco crescente de perturbação gastrointestinal e insuficiência de múltiplos órgãos. (CRAIG et al, 2012).

2.4.4. Anti-inflamatórios não esteróides

As diretrizes da OARSI sugerem AINEs como o tratamento farmacológico de primeira linha preferido, porque revisões sistemáticas descobriram que os AINEs são superiores ao paracetamol para dor em repouso e geral. (TOWHEED et al, 2006.)

Embora AINEs são recomendados em pacientes sem risco, o OARSI é reservado em sua recomendação para uso de AINEs em pacientes com alto risco de co-morbidades. (CHOU et al, 2006).

Os AINEs não seletivos têm maiores riscos gastrointestinais associados, enquanto os AINEs seletivos têm mais efeitos colaterais cardiovasculares, como o infarto do miocárdio; Além disso, ambos os AINEs seletivos e não seletivos causam efeitos colaterais como hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e toxicidade renal.

As recomendações da AAOS sobre os AINEs são inconclusivas e sugerem fortemente que os AINEs tópicos (por exemplo, diclofenaco tópico) sejam considerados como uma opção para a OA de joelho, mas sua aplicabilidade para múltiplos. (KAN et al, 2019).

2.4.5. Esteróides intra-articulares

As diretrizes da ACR e OARSI recomendam que os esteróides sejam usados apenas nas exacerbações agudas da inflamação das articulações, pois o uso frequente pode resultar em danos nas cartilagens ou articulações e aumentar o risco de infecção. A recomendação da AAOS sobre este tópico é inconclusiva.

2.4.6. Ácido hialurônico intra-articular

As diretrizes AAOS e ACR não recomendam o uso de ácido hialurônico por causa da falta de dados de ensaios clínicos randomizados sobre seus benefícios ou segurança. A recomendação da OARSI também é incerta por causa dos resultados inconclusivos de metanálises recentes. Uma meta-análise com estudos cegos encontrou apenas pequenos benefícios para a dor (RUTJES et al. 2012).

2.4.7. Glucosamina

Todas as diretrizes internacionais recomendam fortemente contra o uso de glucosamina, pois recentes ensaios randomizados controlados mostraram efeitos semelhantes ao placebo, com estudos independentes mostrando efeitos menores do que os financiados comercialmente (Zhang et al 2010).

2.4.8. Opióides

Analgésicos opiáceos são considerados se o paracetamol for inadequado e os AINEs forem contra-indicados, ineficazes ou mal tolerados. O ACR também sugeriu que os opioides podem ser uma alternativa na terapia inicial falhada. No entanto, com referência às diretrizes internacionais para o manejo da OA, devemos considerar a utilidade global a longo prazo dos opióides. Embora tenham benefícios para dor e função física, comparados com aqueles que não são, os pacientes que tomam opioides têm uma chance de efeitos adversos de retirada que é 4 vezes maior e um risco de desenvolver eventos colaterais sérios, incluindo fraturas e eventos cardiovasculares, que é 3 vezes maior (DA COSTA et al. 2014). Diretrizes internacionais fornecem uma recomendação semelhante, AAOS faz uma recomendação inconclusiva, e OARSI é incerto sobre o uso de opiáceos por causa do aumento do risco de efeitos colaterais.

2.4.9. Duloxetina

O uso de duloxetina não é sugerido pelas diretrizes de Hong Kong LLOA ou AAOS. No entanto, OARSI e AAOS sugerem que a depressão coexistente e a dor neuropática contribuem para a síndrome global da dor, uma vez que a dor sentida na OA é multifatorial.

Um estudo mostrou que a duloxetina tem benefícios na redução da dor em comparação ao placebo. (CHAPPELL et al 2011) Portanto, é recomendada como um potencial adjunto ao tratamento convencional da OA para a redução da dor. (YU et al, 2015).

2.5. TRATAMENTOS CIRÚRGICOS

Atualmente existem várias técnicas propostas para reparo de lesões focais ou artrósicas de cartilagem hialina em grandes articulações como:

2.5.1. Debridamento

Originalmente descrito por Magnuson (1941), era um termo amplo que compreendia curetagem articular, meniscectomia, remoção de osteófitos e corpos livres, abrasões condrais e ainda sinovectomia.

2.5.2. Microfratura

Uma modificação do método de perfuração de PRIDIE (1959); com o advento da artroscopia e a utilização da videoartroscopia, tornou-se o método mais usado e a primeira linha no tratamento de defeitos condrais sintomáticos. Como método cirúrgico isolado é atribuído a STEADMAN et al. em 1997 sua descrição.

2.5.3. Debridamento e microfratura

RODRIGO et al. em 1994), reportaram uma melhora importante nos desfechos de função de pacientes com defeito condral quando da associação de debridamento e microfratura.

2.5.4. Mosaicoplastia (Transplante Osteocondral)

Mosaicoplastia foi descrita originalmente por MATSUSUE (1993) e desde então tem sido amplamente usada para tratar lesões condrais e osteocondrais. Nesta técnica, plugs cilíndricos são coletados da área doadora e preenchem os defeitos cavitários. Os enxertos obtidos da área coletora são colocados de maneira perpendicular a cartilagem.

2.5.5. Medicina Regenerativa e Abordagens Baseadas em Células

A primeira abordagem para a regeneração cartilaginosa, o implante autólogo de condrócitos (ACI), foi desenvolvido por BRITTBURG et al 1994, e envolve a colheita de pequenos pedaços da própria cartilagem do paciente, seguida da expansão dos condrócitos em laboratório e subsequente injeção dos condrócitos cultivados no defeito. As células injetadas foram originalmente cobertas com um adesivo periosteal autólogo colhido do osso, que

impede a saída de células injetadas na cavidade articular e facilita a formação de novo tecido (McCARTHY & ROBERTS, 2013). Posteriormente, na ACI de segunda geração, as membranas de colágeno biodegradáveis substituem o patch periosteal (McCARTHY & ROBERTS, 2013; GOYAL et al 2013), evitando a invasão da colheita periosteal e a extensa hipertrofia dos condrócitos que às vezes ocorre em associação com o periósteo (KREUZ et al 2007). Em comparação com a microfratura ou a condroplastia em mosaico, o ACI permite reparar defeitos de cartilagem maiores (DEVITT et al 2017; BRITTEBERG 2018). As principais limitações desta abordagem incluem seu alto custo (DERRET et al 2005; MISTRY et al 2017), bem como a invasividade da colheita e, em particular, a formação de fibrocartilagem que ocorre devido a desdiferenciação dos condrócitos durante a expansão. Interessantemente, no caso de pequena a médias lesões, ACI e microfratura apresentam resultados comparáveis (KNUTSEN et al 2016), quando apresentam acometimento do osso subcondral ou fraturas prévia, os aloenxertos osteocondrais são frequentemente a melhor escolha (LI et al 2017; LAMPLOT, SCHAFER & MATAVA, 2018).

Na cartilagem hialina, os condrócitos residem dentro de uma matriz extracelular rica em colágeno e fibras que suportam a resistência à tração, bem como dentro de complexos proteoglicanos que fornecem resistência à compressão (ZANASI, BRITTEBERG & MARCACCI, 2006). Assim, o desenvolvimento e a implementação clínica da terapia celular baseada na matriz para tratamento de lesões condrais foi uma derivação lógica de ACI (YIN et al 2018). Implante de condrócitos autólogos induzidos por matriz (MACI) envolve o transplante de um scaffold tridimensional especial composto de condrócitos autólogos (expandido anteriormente) inseridos no defeito da cartilagem. Nos dois primeiros anos após a cirurgia, obtiveram-se resultados satisfatórios similares a microfratura ou ACI, mas após 5 anos MACI apresenta resultados significativamente melhores (BRITTEBERG et al 2018).

Figura 4 - Ilustração demonstrando abordagens condrais cirúrgicas baseados em células.

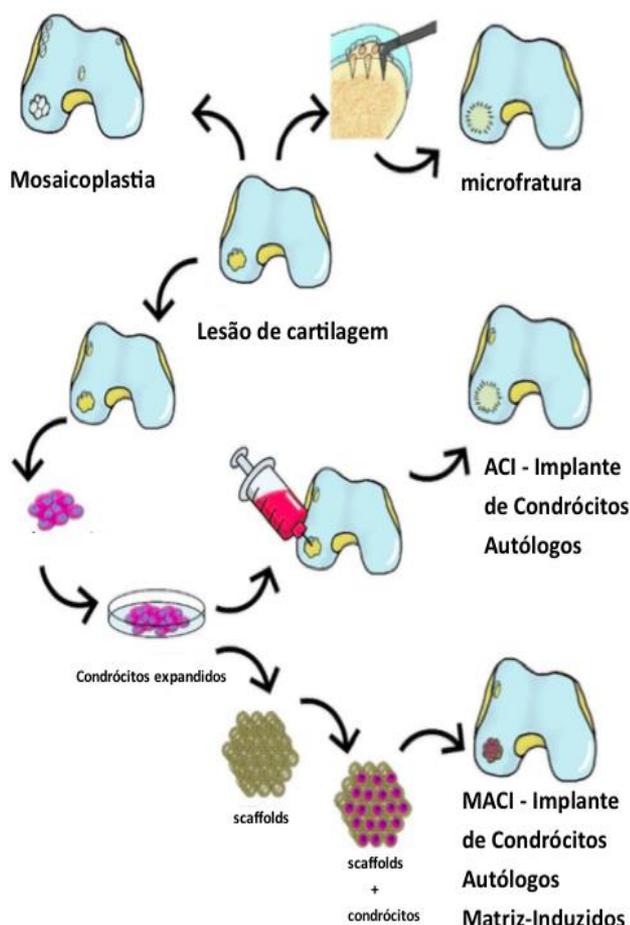


Ilustração de Tratamentos Clínicos Aprovados para Restauração de Tecido Cartilaginoso
 Medvedeva EV, Grebenik EA, Gornostaeva SN, Telpuhov VI, Lychagin AV, Timashev PS, Chagin AS.
 Int J Mol Sci. 2018 Aug 11;19(8). pii: E2366. doi: 10.3390/ijms19082366. Review.

Fonte: Modificado de Medvedeva et al, 2018.

2.5.6. Células-Tronco Mesenquimais

Células-tronco mesenquimais (CTMs) de diferentes fontes, como a medula óssea, tecido adiposo, membrana sinovial, sangue do cordão umbilical, periósteo e músculo, são empregadas para tratar defeitos na cartilagem articular (OGATA et al, 2015; PITTENGER et al. 1999). De fato, a fácil disponibilidade, o amplo potencial para diferenciação e proliferação e as propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (WANG, DING & XU, 2016) dessas células são promissoras em relação à terapia celular. A capacidade de se diferenciar em condrócitos varia entre as CTMs obtidas de diferentes fontes, com CTMs sinoviais demonstrando o maior potencial de diferenciação em condrócitos articulares (YOSHIMURA et al 2007). No entanto, o transplante de CTMs geralmente dá origem a uma mistura de tecidos hipertróficos, cartilagosos e fibrosos, o que não é particularmente sustentável e, a

longo prazo, leva à perda do tecido de reparo (STECK et al 2009). Assim, um desenvolvimento adicional de protocolos de cultura / diferenciação é necessário antes que as CTMs possam ser utilizadas com sucesso para o reparo da articulação.

Todos os tratamentos de defeitos na cartilagem articular têm suas limitações. O tratamento de lesões maiores (> 4,5 cm²) com abordagens regenerativas (ou seja, ACI / MACI) produz resultados mais favoráveis do que com uma microfratura (DEVITT et al 2017; BRITTBERG et al 2018) que é mais comumente usada no momento. No entanto, nenhuma terapia de reparo atual recria cartilagem hialina nativa e proporciona restauração a longo prazo (LAMPLOT, SCHAFER & MATAVA, 2018; GRACITELLI et al 2016) devido principalmente à formação de fibrocartilagem e / ou propriedades pobres da matriz. A combinação de diferentes abordagens, incluindo membranas avançadas, condrócitos eficientemente diferenciados, impressão 3D de construções projetadas, lubrificação adequada e abordagens que afetam o ambiente pró-inflamatório, pode melhorar muito a regeneração da cartilagem articular.

2.6. ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar de pesquisa, centrada na regeneração e restauração funcional de órgãos ou tecidos. 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. A engenharia de tecidos objetiva o reparo de lesões osteocondrais, envolve a utilização de suportes biológicos e fatores de crescimento, associados a cultura celular. Biomateriais utilizados podem ser na forma de biomateriais naturais ou sintéticos. O arcabouço tridimensional poroso, deve conter propriedades bioativas e biodegradáveis, que servem de molde para a formação do novo tecido (LIU & MA 2004). Eles mimetizam os meios físicos e químicos do tecido saudável, para guiar a migração, diferenciação e proliferação tecidual (WANG et al 2006 , TAYLOR et al 2009).

Tabela 3. Tabela resumida dos principais vantagens e desvantagens entre tratamentos Conservadores e Cirúrgicos.

Tratamento Conservador	Vantagens	Desvantagens
Controle do Peso	Não invasivo Diminuir sobrecarga no tecido lesado	Não trata a causa da lesão
Exercícios Físicos	Não invasivo Melhora dos sintomas Fortalecimento muscular	Não trata a causa da lesão
Fisioterapia	Não invasivo Melhora dos sintomas Fortalecimento muscular	Não trata a causa da lesão
Analgésicos (paracetamol)	Alívio de sintomas	Não trata a causa da lesão Efeitos colaterais
Analgésicos - AINES	Alívio de sintomas	Não trata a causa da lesão Efeitos colaterais
Esteróides intra-articulares	Alívio de sintomas	Não trata a causa da lesão Efeitos colaterais Risco de degeneração condral
Ácido Hialurônico	Alívio de sintomas	Não trata a causa da lesão
Glucosaminas e Condroitinas	Alívio de sintomas	Não trata a causa da lesão
Opióides	Alívio de sintomas	Não trata a causa da lesão Efeitos colaterais Risco de dependência
Duloxetina	Alívio de sintomas Efeito modulador de dor	Não trata a causa da lesão Efeitos colaterais Avaliação psiquiátrica complementar
Tratamento Cirúrgico	Vantagens	Desvantagens
Debridamento	Resposta tecidual satisfatória por curto período (até 5 anos)	Invasivo
Microfratura	Resposta tecidual satisfatória por curto período (até 5 anos)	Invasivo Riscos de osteófitos em foco de lesão
Mosaicoplastia (Transplante ostecondral)	Resposta tecidual estruturada	Invasivo Lesão em Sítio doador
Terapias celulares ACI (Implante autólogo de condrócitos) MACI (Implante autólogo de condrócitos matriz induzidos)	Aperfeiçoamento da resposta tecidual	Invasivo Custos elevados Dificuldades técnicas
Células-Tronco Mesenquimais	Aperfeiçoamento da resposta tecidual	Invasivo Custos elevados Dificuldades técnicas

3. HIPÓTESES OPERACIONAIS (H₀) E HIPÓTESE CONCEITUAIS (H_c)

3.1 Ho: a resposta tecidual obtida em lesões completas da cartilagem articular do joelho com tratamento de terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) cultivadas em laboratório (grupo A) é igual a resposta tecidual obtida na lesão da cartilagem do joelho no grupo sem tratamento (grupo D – grupo controle) , após 8 e 16 semanas de seguimento.

Hc: a resposta tecidual obtida em lesões completas da cartilagem articular do joelho com tratamento de terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) cultivadas em laboratório (grupo A) é superior a resposta tecidual obtida na lesão da cartilagem do joelho no grupo sem tratamento (grupo D – grupo controle) , após 8 e 16 semanas de seguimento.

3.2 Ho: a resposta tecidual obtida em lesões completas da cartilagem articular do joelho com tratamento com membrana de hidrogel de colágeno tipo II (grupo B) é igual a resposta tecidual obtida na lesão da cartilagem do joelho no grupo sem tratamento (grupo D – grupo controle) , após 8 e 16 semanas de seguimento.

Hc: a resposta tecidual obtida em lesões completas da cartilagem articular do joelho com tratamento com membrana de hidrogel de colágeno tipo II (grupo B) é superior a resposta tecidual obtida na lesão da cartilagem do joelho no grupo sem tratamento (grupo D – grupo controle) , após 8 e 16 semanas de seguimento.

3.3 Ho: a resposta tecidual obtida em lesões completas da cartilagem articular do joelho com tratamento de terapia celular com condroblastos , obtidos a partir de protocolo de diferenciação de células-tronco mesenquimais (CTM) em laboratório (grupo C) é igual a resposta tecidual obtida na lesão da cartilagem do joelho no grupo sem tratamento (grupo D – grupo controle) , após 8 e 16 semanas de seguimento.

Hc: a resposta tecidual obtida em lesões completas da cartilagem articular do joelho com tratamento de terapia celular com condroblastos obtidos a partir de protocolo de diferenciação de células-tronco mesenquimais (CTM) em laboratório (grupo C) é superior a resposta tecidual obtida na lesão da cartilagem do joelho no grupo sem tratamento (grupo D – grupo controle) , após 8 e 16 semanas de seguimento.

4. OBJETIVOS

4.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar os três tratamentos propostos para lesão condral troclear completa nos joelhos de coelhos quanto a sua capacidade de regeneração comparativamente ao grupo controle.

4.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Avaliar a regeneração comparativamente ao grupo controle utilizando as escalas de avaliações da ICRS para animais quanto aos aspectos macroscópicos e histológicos em 8 e 16 semanas.

B) Comparar a regeneração no mesmo grupo de tratamento nos dois tempos avaliados (8 e 16 semanas), utilizando as escalas de avaliações da ICRS para animais quanto aos aspectos macroscópicos e histológicos.

5. MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental *in vitro* e *in vivo*.

5.2. LOCAIS DE EXECUÇÃO

Os experimentos de culturas celulares, bem como as soluções e reagentes necessários para estes, foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LABIMET), localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul; e na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e no Centro de Terapia Gênica (CTG) localizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os experimentos cirúrgicos nos animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) localizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

As preparações das análises histológicas foram realizadas na Unidade de Patologia Experimental localizada no hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

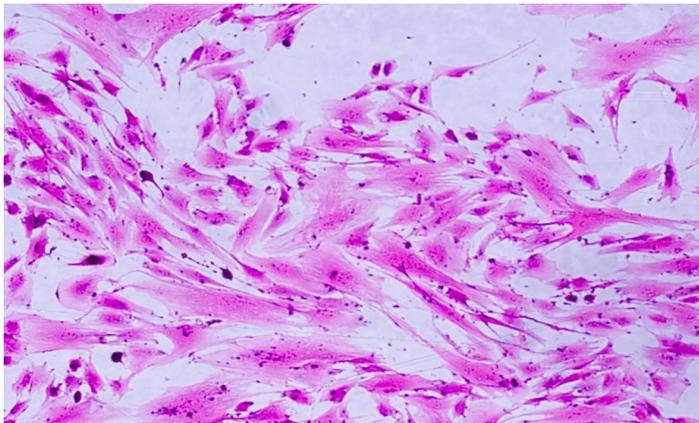
5.3.1. Isolamento e cultura das CTM

As Células-Tronco Mesenquimais (CTM) ou, do inglês, Mesenchymal Stem Cells (MSCs) derivadas de placenta humana foram fornecidas pelos projetos previamente aprovados pelo CEP HCPA para a utilização destas células para pesquisa (11-0616 e 13-0451). As CTMs doadas encontravam-se em na quinta passagem (P5). As CTM foram mantidas em cultivo com meio DMEM low glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100un/ml de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina (PS; Gibco, NM, USA). As células foram cultivadas em garrafas de cultura incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Quando a cultura apresentava 80% de confluência, as células foram expandidas através de sua remoção com uma solução de 0,25% Tripsina-EDTA (Gibco, NM, USA). O meio de cultura foi trocado a cada dois a três dias.

5.3.2. Caracterização das CTM

De acordo com o Consenso publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006), as CTM utilizadas nesse trabalho foram caracterizadas por morfologia, imunofenotipagem e diferenciações *in vitro*.

Fig. 5. Células-Tronco Mesenquimais em placa de cultura com confluência elevada e coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.)



5.3.3. Imunofenotipagem

A caracterização da população celular é baseada no fenótipo das CTM no que se refere às proteínas de superfície. As células em cultura foram avaliadas quanto à presença dos marcadores CD73, CD90 e CD105 (positivos para CTM), e também CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR (negativos para CTM) por citometria de fluxo na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) em citômetro de fluxo (Attune, Applied Biosystems) e avaliado em software específico.

5.3.4. Diferenciação Celular

No ensaio de diferenciação celular, as CTMs foram induzidas, através de meios de cultivo específicos, à diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. O meio de cultivo para diferenciação osteogênica foi composto por DMEM 15 mM HEPES, suplementado com 0,1 μ M de Dexametasona (Sigma, MO, USA), 50 μ M de Ácido Ascórbico 2-Fosfato (Sigma, MO, USA) e 10 mM de β -Glicerolfosfato (Sigma MO, USA). Na diferenciação adipogênica, as MSCs foram cultivadas em DMEM 15 mM HEPES, 1 μ M de Dexametasona (Sigma, MO, USA), 10 μ g/mL de Insulina, 200 μ M de Indometacina e 0,5mM de Isobutyl Methylxantine (Sigma, MO, USA). Na diferenciação condrogênica, foi utilizado meio DMEM 15mM suplementado com HEPES, 6,25 μ g/ml Insulina, 10 ng/mL TGF- β 1 e 50nM ácido ascórbico 2-fosfato. O protocolo de cultura de CTM com os meios de diferenciação tiveram duração de 10 dias para adipócitos, 14 dias para osteócitos e 21 dias para condrócitos. A detecção da diferenciação foi realizada por coloração especial com os corantes Oil Red, Alizarin Red e Alcian Blue que marcam respectivamente, vesículas de gordura, depósitos de cálcio e glicosaminoglicanos da matriz extracelular.

Figura 6. Demonstração de adipócitos diferenciados a partir de CTM mediante protocolo de diferenciação por 10 dias. Coloração utilizada de Red Oil, conferindo tom avermelhado as células de gordura.

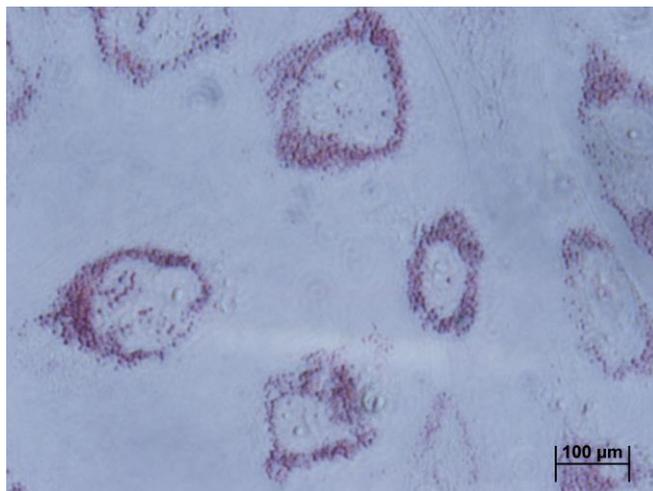


Figura 7 . Demonstração de osteócito diferenciados a partir de CTM mediante protocolo de diferenciação o por 14 dias. Coloração utilizada de Red Alzerin .

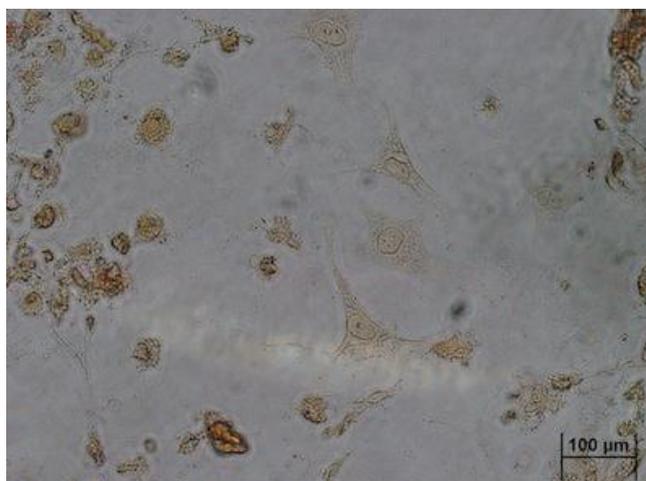
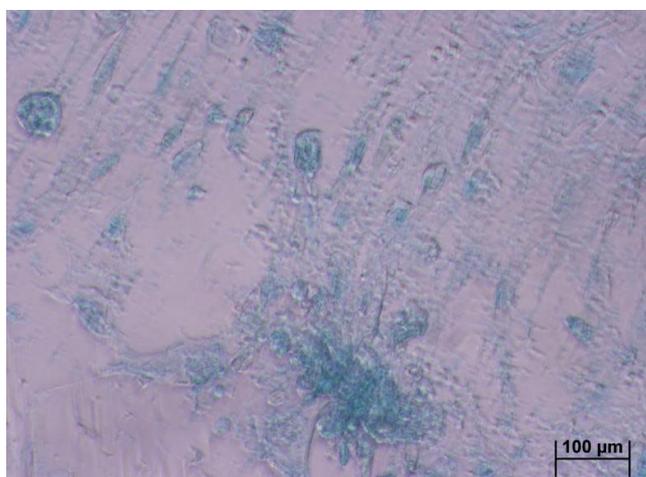


Figura 8. Demonstração de Condroblasto diferenciados a partir de CTM mediante protocolo de diferenciação o por 21 dias. Coloração utilizada de Alcian Blue.



5.3.5. Viabilidade celular em cultura

A viabilidade das células foi avaliada a cada procedimento de passagem celular com o objetivo de calcular a porcentagem de células viáveis. Para essa avaliação usamos o corante azul de Tripán 0,4% em solução salina. As células mortas apresentam alteração na permeabilidade da membrana permitindo que o corante penetre na célula. Dessa forma, é possível diferenciar a microscopia as células viáveis das não-viáveis. As células não viáveis ficam com coloração azulada pela incorporação do corante azul de Tripán. Nossa utilização de células foi da ordem de 5×10^5 células viáveis aplicadas para tratamentos nas lesões nos grupos A (CTMs) e grupo C (condroblastos). Foram ressuspendidas para aplicação na lesão em soro bovino fetal.

5.3.6. Preparo dos Hidrogel de Colágeno

O colágeno tipo II liofilizado extraído de articulações bovina fetais, foi obtido por doação. Foi extraído e purificado por método próprio descrito na literatura por Brand et. al. Foram solubilizados em água destilada estéril com 0,01% de ácido acético (5 mM). A concentração dos hidrogéis de colágeno foi de 2 mg/ml da solução.

Para implantes do hidrogel de colágeno do tipo II nas lesões cartilagosas, foi utilizada cola de fibrina sobre o nível acima das bordas de preenchimento da lesão para dar aderência do material no local de implante nos grupos tratamentos.

5.4. MODELO ANIMAL

5.4.1. Período de Aclimação

A chegada dos coelhos ao Unidade de Experimentação Animal (UEA) ocorreu em 10 de outubro de 2018. No dia do recebimento, todos os animais foram submetidos a exame físico e tratados com ivermectina (Ivomec), como antiparasitário profilático. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas alocadas em ambiente específico para a espécie, com temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (40-60%) controladas, sistema de exaustão de ar e ciclo claro:escuro de 12:12 horas. O fornecimento de ração (padrão para a espécie) e água foi ad libitum. Verduras e frutas foram oferecidos em duas porções diárias.

5.4.2. Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos ocorreram nas datas de 16, 17 e 29 de outubro de 2018. Coelhos foram submetidos a procedimentos cirúrgicos conforme as datas e números adotados

da seguinte forma: Em 16/10/18 – 4 coelhos grupo CONTROLE – GRUPO D e 7 coelhos grupo CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS – GRUPO A. Em 17/10/18 – 3 coelhos grupo CONTROLE – GRUPO D e 7 coelhos grupo HIDROGEM DE COLÁGENOS TIPO II – GRUPO B. Em 29/10/18 – 7 coelhos grupo CONDRÓBLASTO – GRUPO C e 2 coelhos grupo CONTROLE – GRUPO D . A opção de uso de sequência contínua no grupos justificou-se para que a manipulação das células retiradas da cultura trouxessem menos riscos de contaminação , perda de viabilidade e diminuição de aderência ao plástico, no caso das células mesenquimais após técnica de tripsinização.

Após 7 dias de habituação, os animais foram premedicados com cetamina (20 mg/kg), midazolam (1 mg/kg) e morfina (3 mg/kg) pela via IM. Após 15 minutos, foi realizada a cateterização da veia marginal da orelha para a administração de fármacos intra-operatórios e fluidoterapia (Ringer Lactato 3 mL/kg/h). A anestesia foi complementada com isoflurano via máscara facial até a perda do reflexo interdigital. Após dessensibilização da glote com lidocaína, os animais foram intubados com técnica às cegas e conectados a circuito sem reinalação (baraka). O fluxo de oxigênio foi mantido em 2 L/min e o isoflurano, ajustado para manter plano cirúrgico de anestesia (ausência de reflexo palpebral; ausência de resposta motora e cardiorrespiratória ao estímulo doloroso; e PAM entre 60-90 mmHg). A analgesia intra-operatória foi complementada com doses intermitentes de fentanil (7 mcg/kg IV a cada 20-30 min). Para evitar redução acentuada da temperatura corpórea, os animais foram mantido sobre colchão térmico. Monitor multiparamétrico foi utilizado para monitoração da pressão arterial não invasiva (PAM), eletrocardiograma (ECG), saturação periférica de oxigênio (SpO₂) e concentração expirada de CO₂ (ETCO₂). Em caso de depressão respiratória (apneia ou CO₂ acima de 45 mmHg), os animais foram ventilados manualmente. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal , realizada tricotomia peri-articular de ambos os joelhos, realizada técnica de antisepsia com clorexidina solução alcoólica a 0,5% e colocação de campos fenestrados estéreis em ambos os joelhos.

Figura 9. Imagem da anatomia cirúrgica da tróclea femural alongada de coelho (média de 18-20 mm de comprimento) .



Figura 10. Imagem da anatomia cirúrgica da tróclea femoral alongada, porém com largura de máximo 6 - 7 mm .



Utilizou-se a abordagem longitudinal ao nível da articulação do joelhos com afastamento de pele e subcutâneo. Após artrotomia para-patelar medial , foi realizada a

luxação lateral da patela para a exposição do sulco troclear , componente articular do joelho escolhida para avaliação da reparação da lesão osteocondral.

Figura 11. Imagem de exposição do sulco troclear de um joelho esquerdo, com afastamento de estruturas articulares e identificação de lesão osteocondral cilíndrica com diâmetro de 4 mm e profundidade de 4 mm, centralizada entre as cristas trocleares



A lesão osteocondral foi realizada com instrumental de trefina preparada pelo pesquisador para limitação da perfuração (“stop”) quando atingida uma perfuração central no sulco troclear, cilíndrica com medidas de 4 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade, em ambos os joelhos. Com isso , objetivamos realizar um modelo de lesão completa (lesão das quatro zonas histológicas demonstradas na revisão da literatura , figura 1), ou seja , atinja a camada óssea subcondral, porém sem invadir excessivamente a estrutura óssea esponjosa, limite de 4 mm pelo limitador.

Figura 12. Fotografia de Trefina 4 mm de diâmetro e limitador (“stop”) confeccionado mediante usinagem em torno mecânico para garantir limitação de profundidade e uniformidade entre grupos. Colaboração Cloecy Buchorn Longaray.



Os tratamentos de preenchimentos : Grupo A – células-tronco mesenquimais; Grupo B – colágeno tipo 2 e Grupo C condroblastos foram inseridos na cavidade com uso de pipeta e o fechamento (vedação após completada o preenchimento da área vazia cilíndrica) com cola de fibrina . observamos a secagem ultra rápida da fibrina ao nível superior das bordas condrais do sulco troclear, mediante observação direta pelo cirurgião pesquisador. As células foram utilizadas encontravam-se na 5ª passagem (P5).

Ao final do preenchimento a patela foi reposicionada no sulco troclear (reduzida) e procedemos ao fechamento da cápsula e subcutâneo com Vicryl 2.0 (fio absorvível) e da pele com Mononylon 3.0, bem como realização de curativo protetor.

Figura 13. Curativo pós-cirúrgico imediato . Curativo meticuloso para proteção cirúrgica de manipulações orais pelo próprio animal.



5.4.3. Seguimento pós operatório

Após o término do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em incubadora para aquecimento e oxigenação e foram extubados somente após a recuperação do reflexo laringotraqueal. No período pós-operatório foram administrados terramicina (20 mg/kg IM, duas doses com intervalo de 3 dias) e enrofloxacina (10 mg/kg SC SID por 7 dias), como antibioticoterapia, e cetoprofeno (1 mg/kg SC SID por 3 dias, SC) e tramadol (15 mg/kg SC BID por 6 dias), para analgesia pós-operatória.

Os animais foram monitorados diariamente quanto ao grau de alerta mental, mobilidade espontânea, interesse/consumo pelo alimento e água, além de outros comportamentos normais a espécie. Semanalmente os animais foram pesados e submetidos à avaliação ortopédica. Eutanásia antecipada foi realizada em caso de prejuízo ao bem-estar animal.

5.4.4. Intercorrências e óbitos / eutanásias

Os animais foram acompanhados por períodos de 8 semanas e 16 semanas. Após esses períodos de seguimento foram submetidos a eutanásia para avaliação das respostas regenerativas.

Dois animais vieram a óbito nas primeiras 48 horas de pós-operatório, devido a complicações respiratórias. Apesar dos demais animais não manifestarem sinais clínicos de doença respiratória, por serem provenientes de criadouro convencional (microbiota indefinida), optou-se por administrar 7 dias de enrofloxacina em todos eles (10 mg/kg SC SID). Um animal foi eutanasiado após 22 dias por contaminação extensa da articulação e perda de peso superior a 15% (finalização humanitária).

5.5. CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho amostral de 28 coelhos foi validado pelo programa de cálculos estatísticos WIN.PEPI versão 11.43, baseado em Reiff 2010 (22), com base nos dados de delineamento do projeto. Houve a aquisição de 2 coelhos a mais com indicação do Comitê de ética em pesquisa como procedimento cirúrgico “piloto” da técnica cirúrgica e preparação do pesquisador na manipulação dos joelhos animais, para evitar aumento de sofrimento animal por má prática da técnica ou desconhecimento da fragilidade osteocondral do modelo animal.

Para obtenção de significância de 5% ($p=0,05$) e poder de 90%, o tamanho de efeito

de 3 desvios-padrão entre os grupos, obteve-se um total , mínimo de 6 coelhos por grupo, considerando-se 20% de perdas , seria recomendável 7 unidades por grupo.

O tamanho de efeito de 3 desvios-padrão entre os grupos (tratamento e controle) utilizado foi a pontuação final obtida na escala histológica de ICRS (morfologia grosseira e visual de reparação) no grupo tratamento comparativamente ao grupo controle.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram descritas por mediana e amplitude de variação devido as características ordinais das mesmas. Para comparar os grupos quanto a morfologia e histologia visual em ambos os tempos o teste de Kruskal-Wallis em conjunto com teste de Dunn foi aplicada.

Na comparação entre os 2 períodos de tempo em cada grupo o teste de Mann-Whitney foi aplicado. O nível de significância foi de 5% e as análises foram realizadas no programa SPSS verso 21.0.

5.7. ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA). Os procedimentos foram realizados em concordância com os preceitos da Lei n. 11.794/2008 e pelo Decreto n. 6.899/2009, de 15 de julho de 2009 que regulamentam a utilização de animais na pesquisa científica. Os cuidados e manipulação dos animais seguiram as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA – Resolução Normativa 30, 2016, CONCEA) e os protocolos científicos, a Resolução Normativa 33/2016 do CONCEA sobre Procedimentos com roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. A eutanásia dos animais seguiu a Diretriz da Prática de Eutanásia (Resolução Normativa 37, 2018, CONCEA).

5.8. MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA

No estudo foram aplicadas as Normas de Segurança e Procedimentos de Boas Práticas de Laboratório. As medidas de proteção necessárias foram asseguradas aos pesquisadores, tanto na manipulação dos animais, quanto no trabalho de bancada em laboratório. Para o manuseio dos animais, foram utilizadas luvas de látex e jalecos limpos obrigatoriamente; os experimentos foram executados por um grupo previamente treinado e familiarizado com as

técnicas. Já para os experimentos em laboratório, o uso de luvas e jaleco tornaram-se indispensáveis. Para proteção contra reagentes químicos foram utilizadas uma capela de exaustão, e, para evitar contato cutâneo e inalação, o pesquisador utilizou luvas, roupas apropriadas, máscara com filtro e óculos de segurança. As carcaças dos animais foram armazenadas em sacos próprios para esse fim e, em seguida, acondicionados em freezer a uma temperatura de - 20°C, até o recolhimento. O descarte dos resíduos biológicos e químicos seguiram as normas do HCPA.

5.9. ESCALAS DE RESPOSTA REGENERATIVA

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 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.

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 ICRS, 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 (MAINILVARLET et al., 2003).

No presente estudo optamos por utilizar as escalas da ICRS, morfológica grosseira e histológica visual.

Tabela 4. Escala de Avaliação Macroscópica da ICRS e suas pontuações preconizadas.

ESCALA DE AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA da ICRS	PONTOS
<p>GRAU DE REPARO DO DEFEITO</p> <ul style="list-style-type: none"> • AO NÍVEL DA CARTILAGEM DO ENTORNO • 75% REPARO DA PROFUNDIDADE DO DEFEITO • 50% REPARO DA PROFUNDIDADE DO DEFEITO • 25% REAPRO DA PROFUNDIDADE DO DEFEITO • 0% DE REPARO DA PROFUNDIDADE DO DEFEITO 	<p>4 3 2 1 0</p>
<p>INTEGRAÇÃO À ZONA DAS BORDAS</p> <ul style="list-style-type: none"> • COMPLETA INTEGRAÇÃO COM A CARTILAGEM NO ENTORNO • BORDAS DEMARCADAS < 1 MM • 3/4 DO ENXERTO INTEGRADO • 1/4 UMA BORDA IDENTIFICAVEL COM > 1 MM SEM CONTATO • ATE 1/4 DE TECIDO INTEGRADO COM A CARTILAGEM DO ENTORNO 	<p>4 3 2 1 0</p>
<p>APARÊNCIA MACROSCÓPICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SUPERIFÍCIE INTACTA LISA • SUPERIFÍCIE FIBRILADA PEQUENAS • PEQUENAS FISSURAS DISPERSAS OU FRATURAS • MUITAS e PEQUENAS OU POCOS e GRANDES FISSURAS • DEGENERAÇÃO TOTAL DA ÁREA DE ENXERTIA 	<p>4 3 2 1 0</p>
<p>AVALIAÇÃO GERAL GRAU I – NORMAL GRAU II - QUASE NORMAL GRAU II - ANORMAL GRAU IV - BASTANTE ANORMAL</p>	<p>12 8-11 4-7 3-1</p>

Tabela 5. Escala de Avaliação Microscópica (Histológica Visual) da ICRS e suas pontuações preconizadas.

ESCALA DE AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	
<i>CARACTERÍSTICA</i>	<i>PONTOS</i>
I- SUPERFÍCIE LISA/CONTÍNUA DISCONTÍNUA/ IRREGULARIDADES	3 0
II- MATRIZ HIALINA MISTURA: HIALINA/FIBROCARILAGEM FIBROCARILAGEM TECIDO FIBROSO	4 3 2 1
III- DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS COLUNAR MISTA/ CLUSTERS COLUNAR CLUSTERS CÉLULAS INDIVIDUAIS / DESORGANIZADAS	4 3 2 1
IV- VIABILIDADE DE POPULAÇÃO CELULAR VIÁVEL PREDOMINANTE PARCIALMENTE VIÁVEL < 10% VIÁVEL	3 1 0
V- OSSO SUBCONDRA NORMAL REMODELAMENTO AUMENTADO NECROSE ÓSSEA/ TECIDO DE GRANULAÇÃO DESTACADO/ FRATURA/ CALO NA BASE	3 2 1 0
VI- MINERALIZAÇÃO DA CARTILAGEM CALCIFICADA NORMAL ANORMAL/ LOCALIZAÇÃO INAPROPRIADA	3 0

6. RESULTADOS

Os animais foram acompanhados por períodos de 8 e 16 semanas. Ao final do período observacional foram submetidos a eutanásia para avaliação dos resultados teciduais regenerativos .

Um total de 11 coelhos foi avaliado após as 8 semanas (3 coelhos grupo A – Células Tronco Mesenquimais ; 3 coelhos no grupo B – Hidrogel de Colágeno tipo II; 2 coelhos no grupo C – Condroblastos ; e 3 coelhos grupo D – Controle).

A randomização inicialmente planejada foi modificada próximo ao período de término do seguimento dos coelhos da série temporal de 8 semanas. Optamos por eutanasiar animais deste seguimento temporal (8 semanas) que já haviam apresentado alguma complicação clínica no curso destas semanas de pós-anestésico e pós-operatório como: infecção de vias aéreas superiores (Pasteurelose) , sarna auricular ou quadro inflamatório em joelhos com claudicação na marcha sustentada apesar de cuidados de analgesia e antibioticoterapia. Nosso objetivo foi de privilegiar coelhos que gozassem de melhor saúde para o segundo grupo de seguimento temporal (16 semanas). Com isso , esperávamos que diminuíssemos consideravelmente o risco de óbitos ou necessidade de eutanásia para alívio de sofrimento e obtivéssemos um adequada resposta tecidual nos grupos tratamento e controle maiores.

Um total de 15 coelhos foi avaliado após as 16 semanas (3 coelhos grupo A – Mesenquimais ; 4 coelhos grupo B – Membrana de Colágeno tipo II; 3 coelhos grupo C – Condroblastos; e 5 coelhos grupo D - Controle.

Os animais foram submetidos a eutanasia mediante técnica descrita previamente (item 5. Métodos) e procedeu-se a verificação da resposta regenerativa das lesões dos joelhos.

Os coelhos foram posicionados em decúbito dorsal e realizou-se a artrotomia para exposição de área de estudo articular.

A análise das manifestações macroscópica, com a escala de pontuação da ICRS foi realizada nos 2 joelhos, direito e esquerdo, dos animais em estudo, por um examinador , que não participou dos procedimentos cirúrgicos nem das culturas celulares.

Esta avaliação macroscópica consta de 3 subitens (Tabela 3. página 45) a serem avaliados com escores de 0 a 4 pontos. São eles :

1º subitem: Grau de reparo do defeito que define uma pontuação específica com as características do tipo de reparo;

2º subitem: Integração às zonas de bordas que define pontuação desde menos de ¼ de tecido integrado até completa integração;

3º subitem: Aparência macroscópica que define uma pontuação desde aspecto liso , passando por fraturas, até degeneração total da área de enxertia.

6.1. AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS GROSSEIRAS (MACROSCÓPICAS)

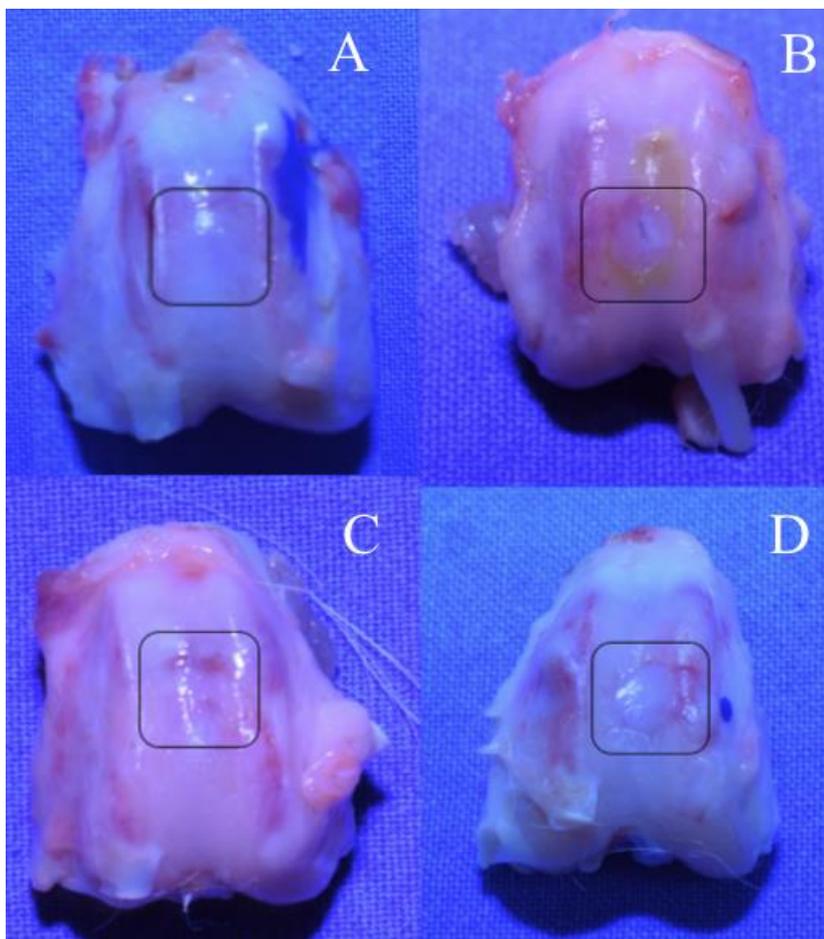
Algumas das apreciações não puderam ser realizadas imediatamente e foram exaustivamente fotografadas para apreciação pela mesma examinadora e aferição das pontuações da escala. Vale ressaltar que o aspecto visual a fresco é difícil de documentar em fotos mas colaboram com a melhor “impressão” que o pesquisador observou em especial no grupo onde utilizamos células-tronco mesequimais (CTM), porém quando analisada estritamente sob óptica da classificação não se demonstra em números superiores.

A preparação das peças de joelhos bilateralmente dissecadas, foram armazenadas em formol por 48 horas para fixação. Após este período, procedemos ao processo de descalcificação com ácido nítrico a 10%, conforme protocolo de descalcificação sugerido pela Unidade de Patologia Experimental (UPE) do HCPA. Após esta etapa , realizamos a preparação dos blocos e confecção das lâminas sob coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.)

Após finalizadas, as lâminas correspondentes aos 2 joelhos, direito e esquerdo, dos animais em estudo foram apresentadas a mesma observadora que procedeu a análise da macroscopia, com a escala de pontuação da ICRS. Foi atribuída uma nota (pontuação conforme critérios de avaliação), para cada peça.

De posse desses números, realizamos a elaboração de banco de dados e submetemos os números a análise estatística. Os escores obtidos são apresentados nas tabelas em 11. Anexos (11.1 – 8 semanas).

Fig 14. Fotos dos joelhos de estudo , imediatamente após eutanásia e preparação de peças anatômicas. Todas fotos A-D, joelhos após 16 semanas de seguimento. Vista superior da tróclea femoral. identificação em quadrado sobre área de reparo. Imagem A – coelho 8 , CTM , identificamos ótima integração de bordos e aspecto de difícil percepção de limites entre reparo. Característica hialina preservada com matriz condral branca-perolada a visualização direta. Imagem B – coelho 17, hidrogel de colágeno tipo II , bom preenchimento, identificação de e com bom reparo e preenchimento , porém leve afundamento central e observação de menor absorção de cola de fibrina (identificável com coloração amarela) sobre área de cartilagem hialina preservada do articulação. Imagem C- coelho 28, condroblasto com bom preenchimento e bordas. Identifica-se fibrilações superficiais em área de reparo destacada. Imagem D – coelho 11, grupo controle . Bom preenchimento com reparo em branco perolado hialino , mas bordos demarcados, menor nível de preenchimento.



De posse desses números, realizamos a elaboração de banco de dados e submetemos os números a análise estatística. Os escores obtidos são apresentados nas tabelas em 11. Anexos (11.1 – 8 semanas).

6.1.1. Macroscopia após 8 semanas

Quando avaliamos o processo regenerativo obtido nos diferentes grupos (A, B, C e D), após transcorridos 8 semanas, sob os critérios macroscópicos da ICRS, não observamos diferenças significativas no escore global final, nem quando observados os sub-itens de integridade à zona de bordas e aparência macroscópica. Com isso mantemos a hipótese de nulidade.

Vale destacar que houve um efeito de melhor preenchimentos de defeito no grupo controle quando comparado com o grupo condroblasto (grupo C), obtendo-se um $p = 0,043$ no período de 8 semanas; o mesmo efeito não foi demonstrado em relação aos grupos mesenquimais ou colágeno II. Assim sendo, acreditamos que faça parte apenas do processo regenerativo mais retardado quando na presença do condroblasto nesse intervalo de tempo

que no grupo controle. Para explicar tal fato, hipotetizamos que as células humanas no modelo animal apresentem apenas um retardo nesse intervalo de tempo de 8 semanas, mas que emparelhem as respostas ao longo das próximas 8 semanas (quando observadas por 16 semanas) pois tal efeito não se repetiu num tempo mais prolongado.

6.1.2. Macroscopia após 16 semanas

Quando avaliamos os diferentes grupos (A, B, C e D) após transcorridos 16 semanas nos critérios regenerativos sob a escala de avaliação dos macroscópicos da ICRS, observamos diferenças significativas no escore global final quando avaliamos o efeito do grupo A (mesenquimais) comparativamente ao grupo D (controle), obtendo um $p=0,004$. Esses resultados nos negam a hipótese de nulidade e confirmam a hipótese alternativa de que os tratamentos propostos pudessem nos aproximar de uma melhor resposta regenerativa do modelo de lesão condral utilizado.

Detalhadamente nos 3 sub-itens da avaliação macroscópica de preenchimentos de defeito, integridade à zona de bordas e aparência macroscópica, podemos pormenorizar que integridade à zona de bordas e aparência macroscópica grupo A (células mesenquimais) mostrou-se superior ao grupo controle (grupo D) , obtendo um $p=0,020$ e $p= 0,006$, respectivamente. O único subitem que não demonstrou favorecimento do grupo mesenquimal (grupo A) sobre o grupo controle (grupo D) foi o preenchimentos de defeito.

6.2. AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA VISUAL (MICROSCÓPICAS)

6.2.1 Microscopia após 8 semanas

Quando avaliamos o processo regenerativo obtido nos diferentes grupos (A, B, C e D), após transcorridas 8 semanas, sob os critérios microscópicos da ICRS, não observamos diferenças significativas no escore global final do estudo.

Detalhada a avaliação histológicas, observamos que os critérios superfície e mineralização, no grupo C (condroblasto) apresentaram melhor resposta que o grupo A (células tronco mesenquimais), obtendo um $p=0,049$ e $p=0,037$, respectivamente. Mesmo efeito não ocorreu em relação a outros grupos (B e D). Tal efeito parece apenas nos demonstrar que entre os dois tratamentos propostos há diferenças de comportamento regenerativo no intervalo de 8 semanas quanto a estes 2 critérios exclusivos.

Quando avaliado o sub-item de organização do osso subcondral observamos que o grupo controle apresentou melhor resposta que os demais tratamentos. Sob este aspecto

podemos concluir que no período inicial da organização do osso subcondral os tratamentos interferem negativamente sobre a resposta óssea.

Matriz, distribuição de células e viabilidade celular foram os critérios restantes avaliados que não diferiram entre os grupos.

6.2.2. Microscopia após 16 semanas

Quando avaliamos os diferentes grupos (A, B, C e D) após transcorridos 16 semanas nos critérios regenerativos microscópicos da ICRS, não observamos diferenças significativas no escore global final do estudo.

Pudemos observar um efeito superior das células tronco mesenquimais (grupo A) sobre o tratamento com colágeno tipo II (grupo B), obtendo-se um $p= 0,008$. O mesmo não ocorrendo em relação ao grupo controle. Com isso refutamos as hipóteses alternativas sugeridas no trabalho e mantemos a hipótese de nulidade.

As avaliações pormenorizadas microscópicos da ICRS, ainda que refute as hipóteses alternativas sugeridas no trabalho e mantenha a hipótese de nulidade, traz algumas peculiaridades entre os grupos tratamentos.

Quanto aos sub-itens superfície, mineralização e viabilidade celular não verificamos diferenças significativas.

Sub-item matriz grupo A (mesenquimais) mostrou-se superior ao tratamento do grupo C (condroblasto) obtendo $p= 0,021$.

Distribuição de células e osso subcondral: grupo A (células tronco mesenquimais) mostrou-se superior ao tratamento grupo B (colágeno tipo II) obtendo $p= 0,043$ e $p= 0,016$ respectivamente.

Figura 15 - Imagens A e B: Demonstração de microscopia de coelho grupo A- CTM . mostrada continuidade superficial , integração de bordas, boa celularidade e remodelamento ósseo adequado.

Imagens C e D: Demonstração de microscopia grupo B – colágeno tipo 2. Continuidade superficial , porém com menor celularidade, tecido com características de fibrocartilaginoso , boa celularidade mas desorganização óssea subcondral.

Imagens E e F: Grupo C – condroblasto. Organização tecidual adequada , boa estruturação subcondral e celularidade . características similares a grupo A e D.

Imagens G e H : grupo D - controle. Organização e estruturação osteocondral muito boa. A discrepância entre achados nesses grupo do nosso estudo e demonstração de demais achados de literatura é motivo de surpresa.

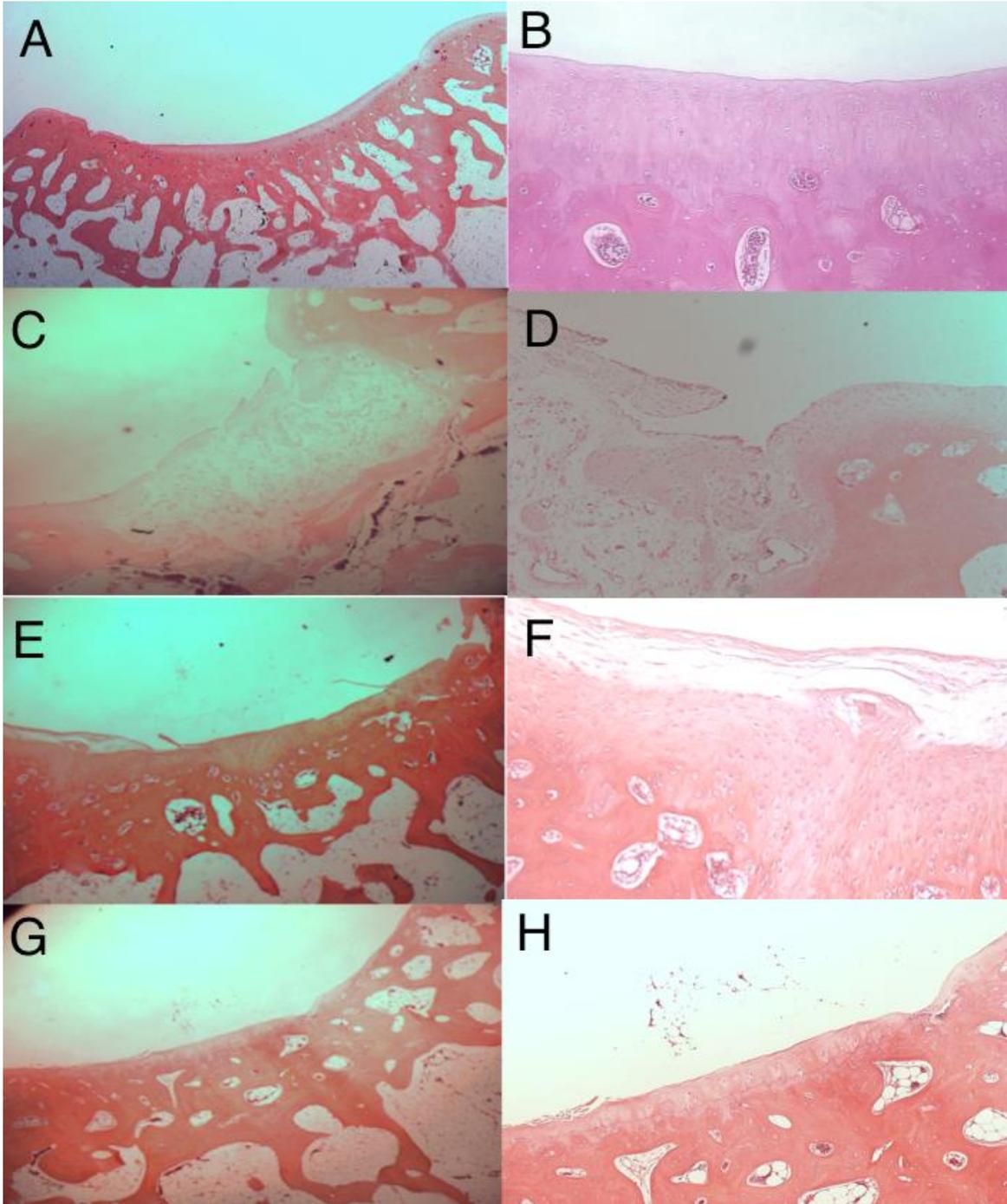


Tabela 6. Escores obtidos por grupos A, B,C e D. Tempos de 8 e 16 semanas de seguimento.

Variáveis	Grupo A MSC Md (Mín – Máx)	Grupo B Colágeno II Md (Mín – Máx)	Grupo C Condroblasto Md (Mín – Máx)	Grupo D Controle Md (Mín – Máx)	p*
8 semanas					
Morfologia Grosseira	(Macroscopia)				
Defeito	4 (0 – 4) ^{ab}	3 (1 – 4) ^{ab}	3 (1 – 3) ^a	4 (4 – 4) ^b	0,043
Bordas	4 (0 – 4)	1 (0 – 4)	2 (0 – 3)	3 (3 – 3)	0,083
Aparência	3,5 (0 – 4)	1 (0 – 4)	2 (0 – 2)	3 (2 – 3)	0,108
<i>Escore Total (0-12 pts)</i>	<i>11,5 (0 – 12)</i>	<i>4,5 (1 – 11)</i>	<i>7 (1 – 8)</i>	<i>10 (9 – 10)</i>	<i>0,064</i>
Histologia visual	(Microscopia)				
Superfície	0 (0 – 3) ^a	3 (0 – 3) ^{ab}	3 (3 – 3) ^b	3 (0 – 3) ^{ab}	0,049
Matriz	2 (0 – 2)	2 (0 – 3)	2 (2 – 2)	2 (2 – 3)	0,359
Distribuição de células	1 (1 – 3)	2 (0 – 3)	1 (1 – 1)	2 (1 – 3)	0,232
Viabilidade celular	2 (1 – 3)	3 (0 – 3)	3 (3 – 3)	3 (3 – 3)	0,149
Osso subcondral	2 (1 – 3)	2 (1 – 2)	2 (2 – 2)	3 (2 – 3)	0,050
Mineralização	0 (0 – 3) ^a	3 (0 – 3) ^{ab}	3 (3 – 3) ^b	1,5 (0 – 3) ^{ab}	0,037
<i>Escore Total (0-18 pts)</i>	<i>7 (3 – 17)</i>	<i>15 (1 – 17)</i>	<i>14 (14 – 14)</i>	<i>13 (12 – 16)</i>	<i>0,201</i>
16 semanas					
Morfologia Grosseira	(Macroscopia)				
Defeito	4 (4-4)	4 (0 – 4)	3,5 (3 – 4)	3,5 (3 – 4)	0,257
Bordas	4 (4-4) ^b	3 (0 – 4) ^{ab}	3 (2 – 4) ^{ab}	3 (2 – 4) ^a	0,020
Aparência	4 (4-4) ^b	3 (1 – 4) ^{ab}	3 (1 – 4) ^{ab}	3 (2 – 3) ^a	0,006
<i>Escore Geral (0-12 pts)</i>	<i>12 (12 – 12)^b</i>	<i>10,5 (1 – 12)^{ab}</i>	<i>9,5 (6 – 12)^{ab}</i>	<i>9 (7 – 11)^a</i>	<i>0,004</i>
Histologia visual	(Microscopia)				
Superfície	3 (3 – 3)	3 (0 – 3)	3 (3 – 3)	3 (0 – 3)	0,381
Matriz	3 (3 – 3) ^b	2 (1 – 3) ^{ab}	2 (1 – 3) ^a	3 (0 – 3) ^{ab}	0,021
Distribuição de células	3 (2 – 3) ^b	1,5 (1 – 3) ^a	2 (1 – 3) ^{ab}	2 (0 – 3) ^{ab}	0,043
Viabilidade celular	3 (3 – 3)	3 (3 – 3)	3 (1 – 3)	3 (0 – 3)	0,571
Osso subcondral	3 (3 – 3) ^b	1,5 (0 – 3) ^a	2 (1 – 3) ^{ab}	2 (0 – 3) ^{ab}	0,016
Mineralização	3 (3 – 3)	3 (0 – 3)	3 (3 – 3)	3 (0 – 3)	0,359
<i>Escore Total (0-18 pts)</i>	<i>18 (16 – 18)^b</i>	<i>14 (6 – 17)^a</i>	<i>15 (12 – 18)^{ab}</i>	<i>16 (0 – 18)^{ab}</i>	<i>0,008</i>

^{a,b} Letras iguais não diferem pelo teste de Dunn a 5% de significância; * teste de Kruskal-Wallis

6.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO TEMPORAL NOS MESMOS GRUPOS

Entre os 4 grupos, fizemos a avaliação temporal comparativa de 8 e 16 semanas, com objetivo de avaliar resposta modificada pelo tempo de seguimentos.

Utilizamos o teste de Mann-Whitney para avaliação estatística entre os grupos.

Tabela 7. Segue a tabela dividida por grupo nos intervalos 8 e 16 semanas de seguimento.

Variáveis	8 semanas Md (Min – Max)	16 semanas Md (Min – Max)	p*
MSC			
Morfologia Grosseira			
Defeito	4 (0 – 4)	4 (4 – 4)	0,699
Bordas	4 (0 – 4)	4 (4 – 4)	0,394
Aparência	3,5 (0 – 4)	4 (4 – 4)	0,180
Geral	11,5 (0 – 12)	12 (12 – 12)	0,180
Histologia visual			
Superfície	0 (0 – 3)	3 (3 – 3)	0,015
Matriz	2 (0 – 2)	3 (3 – 3)	0,002
Distribuição de células	1 (1 – 3)	3 (2 – 3)	0,093
Viabilidade celular	2 (1 – 3)	3 (3 – 3)	0,180

Osso subcondral	2 (1 – 3)	3 (3 – 3)	0,015
Mineralização	0 (0 – 3)	3 (3 – 3)	0,015
Total	7 (3 – 17)	18 (16 – 18)	0,004
<u>Colágeno II</u>			
Morfologia Grosseira			
Defeito	3 (1 – 4)	4 (0 – 4)	0,662
Bordas	1 (0 – 4)	3 (0 – 4)	0,345
Aparência	1 (0 – 4)	3 (1 – 4)	0,142
Geral	4,5 (1 – 11)	10,5 (1 – 12)	0,345
Histologia visual			
Superfície	3 (0 – 3)	3 (0 – 3)	0,852
Matriz	2 (0 – 3)	2 (1 – 3)	0,950
Distribuição de células	2 (0 – 3)	1,5 (1 – 3)	0,852
Viabilidade celular	3 (0 – 3)	3 (3 – 3)	0,345
Osso subcondral	2 (1 – 2)	1,5 (0 – 3)	0,491
Mineralização	3 (0 – 3)	3 (0 – 3)	0,852
Total	15 (1 – 17)	14 (6 – 17)	0,950
<u>Condroblasto</u>			
Morfologia Grosseira			
Defeito	3 (1 – 3)	3,5 (3 – 4)	0,114
Bordas	2 (0 – 3)	3 (2 – 4)	0,067
Aparência	2 (0 – 2)	3 (1 – 4)	0,067
Geral	7 (1 – 8)	9,5 (6 – 12)	0,067
Histologia visual			
Superfície	3 (3 – 3)	3 (3 – 3)	1,000
Matriz	2 (2 – 2)	2 (1 – 3)	0,762
Distribuição de células	1 (1 – 1)	2 (1 – 3)	0,038
Viabilidade celular	3 (3 – 3)	3 (1 – 3)	0,762
Osso subcondral	2 (2 – 2)	2 (1 – 3)	0,762
Mineralização	3 (3 – 3)	3 (3 – 3)	1,000
Total	14 (14 – 14)	15 (12 – 18)	0,114
<u>Controle</u>			
Morfologia Grosseira			
Defeito	4 (4 – 4)	3,5 (3 – 4)	0,118
Bordas	3 (3 – 3)	3 (2 – 4)	1,000
Aparência	3 (2 – 3)	3 (2 – 3)	0,958
Geral	10 (9 – 10)	9 (7 – 11)	0,428
Histologia visual			
Superfície	3 (0 – 3)	3 (0 – 3)	0,713
Matriz	2 (2 – 3)	3 (0 – 3)	0,263
Distribuição de células	2 (1 – 3)	2 (0 – 3)	0,875
Viabilidade celular	3 (3 – 3)	3 (0 – 3)	0,792
Osso subcondral	3 (2 – 3)	2 (0 – 3)	0,313
Mineralização	1,5 (0 – 3)	3 (0 – 3)	0,220
Total	13 (12 – 16)	16 (0 – 18)	0,093

- Teste de Mann-Whitney

Os coelhos submetidos ao tratamentos com células-tronco mesenquimais (coelhos do grupo A) forma submetidos a análise estatística de resultados como grupos independentes mas modificados pela variavel de estudo no momento, que foi : o tempo de seguimento. Quando comparada a macroscopia, não demonstrou diferenças entre os seguimentos de 8 e 16 semanas. Quando avaliamos a pontuação obtidos na microscopia, encontramos diferenças significativas no Escore Global (p= 0,004) e nos sub-itens de: superfície contínua (p=0,015) ;

matriz ($p= 0,002$), osso subcondral ($p=0,015$) , mineralização da camada calcificada ($p=0,004$).

Os grupos colágeno tipo II (grupo B) e grupo controle grupo D não apresentam diferenças estatísticas significantivas. Concluimos assim que a variável de tempo de seguimento e resposta regenerativa não apresentou melhora, nem piora com tempo adicional de 8 semanas para recuperação tecidual.

O grupo condroblasto apresentou um resultado isolado do sub-item: distribuição de células, $p=0,038$. Tal pode explicar-se isoladamente pela melhora exclusiva desse item com maior tempo de seguimento.

7. DISCUSSÃO

A falta de uniformidade das descrições das lesões condrais como: tamanho da lesão ou diâmetro (ou área total em cm^2 ou mm^2), a tamanho (pré ou pós-desbridamento) e modalidade de definição (ressonância nuclear magnética, visualização artroscópica ou artrotomia aberta), bem como a morfologia da lesão (condrais, osteocondrais ou ambas) ainda dificultam a padronização dos trabalhos para análise clínica.

Some-se a isso, as inúmeras classificações que existem para documentar o grau de lesão não cumpre sua função de diminuir essas variações entre os trabalhos e desfavorecem a análise dos artigos (OUTERBRIDGE, 1961; INSALL, 1984; GOODFELLOW et al, 1976; FICAT & HUNGERFORD, 1979 ; CASSCELLS, 1978; BARBER-WESTIN & NOYES, 1999; DOUGADOS et al, 1994; NOYES & STABLER 1989; e BRITTEBERG 1998).

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. Assim sendo a correta descrição da morfologia por vezes pode trazer expectativas de resultados de grandezas diferentes. Lesões por exemplo que não atingem a placa subcondral , teoricamente trazem maiores dificuldades de reparo quando comparadas com osteocondrais.

Dados de desfechos clínicos no tratamento de lesões da cartilagem articular do joelho foram identificados em uma revisão sistemática envolvendo 113 artigos. Em todos os estudos, os locais das lesões foram descritos anatomicamente usando 1 de 5 categorias: 1- côndilo femoral medial (CFM), 2- côndilo femoral lateral (CFL) , 3- patela , 4- tróclea e 5- platô tibial . Destes 113 artigos , 85,8% dos artigos relataram pacientes com lesões envolvendo o côndilo femoral medial ; 81,4% relataram lesões envolvendo o côndilo femoral lateral ; 25,7% patela, 52,2% tróclea e 53,9% platô tibial (JONES et al, 2019).

Em outro estudo , lesões condrais ou osteocondrais (de qualquer tipo) foram encontradas em 61% dos pacientes. Defeitos focais condrais ou osteocondrais foram encontrados em 19% dos pacientes. O principal defeito condral focal ou osteocondral foi encontrado no côndilo femoral medial em 58%, patela em 11%, tibia lateral em 11%, côndilo femoral lateral em 9%, tróclea em 6% e tibia medial em 5% (HJELLE et al, 2002). Em adição , um estudo diferente mostrou 63% de presença de lesões em 19.827 artroscopias, que a patela foi uma das localizações mais frequentes das lesões cartilaginosas observadas durante os procedimentos (CURL et al.,1997 ; WIDUCHOWSKI et al., 2008).

Quando delineamos o projeto e transferimos as informações da pesquisa da parte clínica para o modelo experimental, a decisão pelo compartimento patelofemural em detrimento do compartimento femurotibiais ocorreu porque julgamos tratar-se de um compartimento desfavorecido do ponto de vista biológico quando ocorre uma lesão. 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, componente do compartimento patelofemural, (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. Lembramos que a articulação patelofemoral é caracterizada por um grande cisalhamento de forças durante a biomecânica articular normal do joelho (GRELSAMER & KLEIN, 1998). Diferentemente dos compartimentos femurotibiais que se caracterizam por maior carga compressiva na marcha e uma área de estresse menor com participação dos meniscos para diminuição de pressão no tecido. Mesmo a decisão a condição técnica de manipulação cirúrgica com ampla exposição e ótimo acesso cirúrgico a preservação da capacidade de carga durante a deambulação do animal foi considerada.

A maior parte da pesquisa na área básica é empreendida nos animais de pequeno porte (camundongo, rato, hamster, cobaio, ou o gerbil) e compreendem quase 90% do total das espécies utilizadas nos laboratórios (FAGUNDES & TAHA, 2004.; COOPER & JOHNSON, 1991).

Definir o modelo ideal não é tarefa fácil. Quanto mais se aproxima, em suas características fisiológicas, anatômicas e orgânicas ao ser humano, maior a aplicabilidade das conclusões obtidas. O estudo da anatomia comparada dos animais vertebrados, fundamentado na escala filogenética (BRADLEY, 1959; COUPIN, 1910). O custo para aquisição de animais, não obstante variável de acordo com sua procedência, fornecedor e característica.

A inclusão de múltiplos grupos de controle é essencial para avaliar a hipótese de que certo tratamento é superior. Desta forma, o valor relativo de uma terapia pode ser avaliado, mas com tradução limitada para os seres humanos. No entanto, isso nem sempre é viável porque os tratamentos simultâneos bilaterais podem não ser eticamente ou fisiologicamente sólidos para o modelo de reparo. A duração do experimento necessário para confirmar a resistência do reparo da cartilagem e a prevenção da osteoartrite geralmente é proibitiva em termos de custos.

Modelos de roedores (ratos , hamsters) estão associados com cicatrização intrínseca espontânea da cartilagem não vista em modelos animais maiores e humanos. Os roedores mantêm fisionomia aberta com contínua ossificação endocondral ao longo da vida (Dawson, 1925). 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). Chama-se atenção em alguns trabalhos e painéis de especialistas que

O uso de periósteo para tratar defeitos condrais de espessura total sob a influência de movimento passivo contínuo foi investigado em modelo de coelho (O'DRISCOLL & SALTER, 1986). A tradução deste modelo para demonstrar a comprovação de princípios em humanos não foi completamente realizada (ANGERMANN et al, 1998; MADSEN et al, 2000). Se o coelho é capaz de uma resposta cicatrizante invulgarmente robusta e se as diferenças técnicas na metodologia experimental são responsáveis por resultados imprevisíveis nos pacientes, não são conhecidos.

A técnica de implante autólogo de condrócitos tem sido controversa. Grande parte da controvérsia aparentemente se deve aos resultados conflitantes com dois modelos animais diferentes. O modelo sueco foi baseado em um estudo piloto realizado em defeitos condrais patelares em coelhos (GRANDE et al, 1989). O modelo de coelho mostrou que os condrócitos implantados marcados in vitro foram os principais responsáveis pelo tecido de reparo desenvolvido para preencher defeitos condrais. O tecido de reparação foi superior ao periósteo sozinho.

Quando o experimento foi concluído em um modelo canino utilizando o sulco femoral, os resultados comparando defeitos vazios, periósteo e periósteo com condrócitos autólogos foram semelhantes no período pós-operatório imediato (<6 meses), mas foram uniformemente osteoartríticos a longo prazo (12- 18 meses). Nenhuma diferença de tratamento pôde ser detectada. Com isso, uma clara diferença comparativa entre as espécies de coelhos e cães foi observada aos 12 meses. (BREINAN et al, 1997).

Uso de animais de maior porte também foram verificados em um trabalho com preenchimento de lesões condrais com CTM obtidos de tecido adiposo humano em ovelhas. O efeito parácrino das MSCs apresentado na cicatrização superior das lesões condrais de espessura parcial em relação aos grupos controle, em modelo ovino adulto (ZORZI, 2015; ORTH et al, 2013). O uso transplante autólogo de condrócitos também demonstrou-se um tratamento satisfatório em lesões em toda espessura de suínos (CHIANG et al 2005). Custo

envolvendo o trabalho ainda estão entre as maiores dificuldades apresentadas para utilização desse modelo animal. O uso de equinos, ainda de maior porte e maior custo, tornam-se modelos também estudados de lesões osteocondrais em grupos de pesquisa que trabalham com suporte assistencial de medicina veterinária. Ainda assim, lesões do carpo do cavalo são mais estudadas que o joelho, devida a alta incidência de lesões osteocondrais, principalmente no animal competidor (MCILWRAITH et al, 2011).

A definição do modelo de lesão troclear de 4 mm de diametro de 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. Optados por 4 mm x 4 mm, onde violamos a placa subcondral, e para evitarmos profundidades maiores, utilizamos um “stop” na broca para conferência de profundidade e evitar profundidades maiores.

As CTMs são células progenitoras não hematopoiéticas multipotentes de origem estromal. Utilização de fatores de crescimento podem induzir a diferenciação em linhagens celulares adiposas, osteogênicas e condrogênicas. Eles estão presentes em muitos tecidos que têm potencial como fontes de colheita. A aspiração por agulha da medula óssea do osso íliaco tem sido o método mais utilizado para obtenção de CTMS.

CTM são isoladas da medulla óssea (BIANCO et al, 2013; FRIEDENSTEIN et al.,1996; PITTENGER et al.,1999), sangue periférico (KUZNETSOV et al., 2001; ROCHEFORT et al., 2006, TONDREAU et al., 2005) , cordão umbilical (GIRDLESTONE et al., 2009; ROSADA et al., 2003; TONDREAU et al. 2005), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001; YOSHIMURA et al., 2007) , polpa dentária e tecido periodontal (BAKOPOULO et al. , 2001; HUANG et al., 2009; HUANG, GRONTHOS, & SHI, 2009; MIURA et al., 2003; SHI & GRONTHOS, 2003), mucosa oral (MARYNKA-KALMANI et al. , 2012, liquido amniotico (IN'T ANKER et al., 2004), tecido adiposo (YOSHIMURA et al., 2007; ZUK et al . 2002) cérebro, pele, curacao, rins e fígado (CRISAN et al., 2008).

A comparação com outros resultados na literatura é difícil devido à variabilidade dos protocolos. O uso de CTMs indiferenciadas foi testado anteriormente em alguns estudos, com resultados discrepantes. O uso de CTM de medula óssea indiferenciadas semeadas em um gel de colágeno para tratar lesões osteocondrais no joelho de coelho, mas este estudo foi incapaz de demonstrar um resultado superior comparado ao grupo controle (MATSUMOTO et al, 2010). Outro estudo, usaram CTMs indiferenciadas diretamente injetadas com um veículo de fibrina em defeitos de espessura total no joelho de seis equinos jovens; As CTMs melhoraram

a resposta de cura precoce avaliada macroscopicamente por avaliação artroscópica 30 dias após o implante, mas não aumentaram a aparência histológica de longo prazo em comparação com o grupo controle após oito meses, de acordo com um sistema de escore histológico semi-quantitativo realizados por 2 avaliadores cegados. (WILKE et al, 2007).

O resultado mais importante que obtivemos no presente estudo foi a melhora estatisticamente significativa nos aspectos macroscópicos após transcorridas 16 semanas, com o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) na lesão osteocndral ($p=0,004$). Objetivamente esse efeito de melhora estatisticamente significativa macroscópica, contempla a medida primeira que se busca no tratamento na clínica ortopédica. Resposta macroscópica é a aquela que se acessada por artroscopia nos permite imaginar estarmos correspondendo aos anseios do paciente. É a resposta que podemos observar na clínica-ortopédica com uso de exames complementares de imagem (principalmente no caso de ressonância nuclear magnética do joelho). Extrapolar informações de estudos clínicos de que, possivelmente, obtenhamos maior sobrevidade livre de artrose ou retardo da evolução da doença seja obtida quando um segmentos de maior tempo.

Ainda que sem uma correspondência histológica entre o tratamento com células-tronco mesenquimais e grupo controle é um dado muito significativo para vislumbrar em estudos futuros na prática clinica a utilização de células-tronco mesenquimais como um potencializador da resposta tecidual ao tratamento da microfratura. Sugere-nos esse achados que o efeito parácrino das CTMs possam ajudar o tecido do entorno nessa recuperação em comparação aos grupos colágeno tipo II, condroblasto e controle, a exemplo dos trabalhos de Zorzi (2015) e Orth et al. (2013) que foram realizados em ovinos.

Estudos que nos baseamos demonstram um modelo de lesão onde o controle (sem tratamento) apresenta uma resposta de reparo muito pobre tanto visualmente quanto sob avaliações de outras escalas histológicas O mesmo resultado de pobre preenchimento da lesão a macroscopia identificamos nos grupos controle dos trabalhos de (O`DRISCOLL et al., 1988; MOW et al., 1991; REIFF 2010, JIA et al 2019)

Embora inicialmente a idéia de avaliar os resultados em dois tempos diferentes e independentes entre si tenha nos atraído, quando feitas as avaliações dentro de um único grupo, o grupo de tratamento com células-tronco mesenquimais apresentou uma melhora significativa entre os 2 tempos. Neste grupo, foi observamos que os resultados obtidos com a escala de avaliação histológica visual da ICRS, apresentaram diferenças significativas no Escore Global ($p= 0,004$) e nos sub-itens de: Superfície Contínua ($p=0,015$); Matriz ($p= 0,002$), Osso Subcondral ($p=0,015$) , Mineralização da Camada Calcificada ($P=0,004$).

Os índices histológicos melhoraram com maior tempo de seguimentos, sugerindo que talvez os efeitos histológicos que hipotetizamos na primeira Hc (hipótese conceitual), possam ser identificados com maior tempo de seguimento, talvez 6 ou 12 meses como identificados em alguns trabalhos da literature, onde o maior tempo é avaliado (REIFF 2010; JIA et al 2019; ZORZI, 2015; ORTH et al, 2013). A correspondência para aplicação na clínica médica é de avaliações em 6 até 18 meses através de novo procedimento artroscopia ou com exame de imagem de ressonância magnética (NEHRER, SPECTOR & MINAS 1999; MESSNER & MALETIUS 1996).

As avaliações comparativas entre os grupos, após seguimento de 8 semanas não demonstraram efeito dos tratamentos sobre o grupo controle, mantendo a hipótese de nulidade (H_0).

A microscopia, não observamos melhora histológica dos aspectos analisados entre os tratamentos e o grupo controle. Apesar de as CTMs sugerirem uma organização histológica melhor aos observadores após 16 semanas em relação aos grupos B, C e D, os critérios pré-definidos pela ICRS em variáveis ordinárias descritivas, não traduz esta “impressão”. Um tanto discrepante dos resultados observados em outros trabalhos, encontramos uma resposta surpreendentemente satisfatória grupo controle – grupo D, o que ainda merece uma compreensão maior do motivo. Quando analisamos os grupos tratamentos sob a variável temporal 8 e 16 semanas, observamos no grupo mesenquimal, uma melhora substancial na avaliação histológica: score total ($p=0,004$), continuidade de superfície ($p=0,015$), predomínio de matriz ($p=0,002$), remodelamento do osso subcondral ($p=0,015$) mineralização da cartilagem calcificada ($p=0,015$), o que nos mostra um efeito paracrine importante dependente de tempo não observado nos demais grupos nos mesmos intervalos.

A comparação entre os grupos, no tempo 8 semanas, não refutou nenhuma das hipóteses de nulidade elaboradas inicialmente, porém observamos uma melhora do grupo controle sobre a grupo condroblasto no aspecto de preenchimento de defeito à macroscopia ($p=0,043$).

Cabe ressaltar que o modelo experimental animal, mesmo com o ótimo e permanente acompanhamento da equipe de veterinárias da UEA, traz muitos desafios ao pesquisador nos manejos pós-operatórios. Dentre os desafios podemos citar: ocorrência de processo inflamatório ou infeccioso, estresse do animal com a presença do pesquisador, presença de pêlos no entorno da articulação, tornando o processo de uso de modelo animal desafiador e até mesmo mais difícil que o equivalente na prática médica.

8. CONCLUSÕES

As três opções utilizadas neste estudo para o de tratamento para modelo de lesão em tróclea dos joelhos de coelhos, células-tronco mesenquimais indiferenciadas, células-tronco mesenquimais diferenciadas em condroblastos e hidrogel de colágeno tipo II são possíveis de utilização para o reparo da lesão.

O grupo tratado com células-tronco mesenquimais apresentou uma melhora significativa nos aspectos macroscópicos aliados pelo escore global final, integridade à zona de bordas e aparência macroscópica após transcorridas 16 semanas.

Avaliações em tempos inferiores a 16 semanas não parecem ser efetivas para comparar a regeneração da lesão no mesmo grupo de tratamento, utilizando as escalas de avaliações da ICRS para animais, quanto aos aspectos macroscópicos e histológicos.

Estes resultados trazem muitas oportunidades e questionamentos para investigações futuras buscando aplicabilidade clínica em humanos.

9. PERSPECTIVAS

A manutenção das demais Ho elaboradas, ainda assim, devem ser melhor avaliadas em outros modelos experimentais (animais de maior porte) ou no modelo humano no futuro, para definitivamente refutarmos as Hc especuladas.

A avaliações qualitativas das respostas histológicas com imuno-histoquímica, caracterização bioquímica da matriz condral com concentração de colágeno tipo II, colágeno tipo I e Sox-9 (fator de transcrição dos condrócitos) devem refinar nossa avaliação da resposta regenerativa e detalhar ainda mais as diferenças entre os grupos de tratamentos e a surpreendente resposta positiva do grupo controle.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altman RD, Lozada CJ. Practice Guidelines in the Management of Osteoarthritis Cartilage. 1998; suppl A: 22-4.
2. Angermann P, Riegels-Nielsen P (1994) Osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation: a preliminary clinical study of 14 cases. *Orthop Int* 2: 425–428
3. Bannuru RR, Dasi UR, McAlindon TE. Reassessing the role of acetaminophen in osteoarthritis: systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(Suppl 2):S250.
4. Barber-Westin, S. D.; Noyes, F. R.; McCloskey, J. W.: Rigorous statistical reliability, validity, and responsiveness testing of the Cincinnati Knee Rating System in 350 subjects with uninjured, injured, or anterior cruciate ligament-reconstructed knees. *Am J Sports Med* 27:402–416, 1999.
5. Bartels EM, Juhl CB, Christensen R, et al. Aquatic exercise ^[1]_[SEP]for the treatment of knee and hip osteoarthritis. *Cochrane* ^[1]_[SEP]Database Syst Rev 2016;(3):CD005523
6. Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss M, Doherty M. Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Ann Rheum Dis*. 1977; 56:229-307.
7. Bianco, P., Cao, X., Frenette, P. S., Mao, J. J., Robey, P. G., Simmons, P. J., & Wang, C. Y. (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine*, 19(1), 35–42. doi:10.1038/nm.3028
8. Bland JH, Cooper SM. Osteoarthritis: a review of the cell biology involved and evidence for reversibility. Management rationally related to known genesis and pathophysiology. *Semin Arthritis Rheum*. 1984; 14:106-133.
9. Bos PK, Degroot J, Budde M, Verhaar JA, van Osch GJ. Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: Implications for integrative cartilage repair. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr; 46(4):976-85
10. Bradley OC. *Topographical Anatomy of the Dog*, 6ed, London, Oliver and Boyd, p.43-52, 1959.
11. Bray DF, Frank CB, Bray RC. Cytochemical evidence for a proteoglycan-associated filamentous network in ligament extracellular matrix. *J Orthop Res*. 1990; 8:1-12.
12. Bray RC, Frank CB, Miniaci A. The Structure and Function of Diarthrodial Joints. In John B. McGinty. *Operative Arthroscopy*, 2.ed, Philadelphia, USA: Lippincott-Raven,

- 1996, cap. 10, p. 105-143.
13. Breinan, H. A., Minas, T. , Hsu, H. , Nehrer, S. , Shortkroff, S. and Spector, M. (2001), Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J. Orthop. Res.*, 19: 482-492.
 14. 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
 15. Brittberg M, Peterson L. Introduction to an articular cartilage classification. *ICRS Newsletter* 1998;1:8-8.\
 16. Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994, 331, 889–895. [CrossRef] [PubMed] ^[1]_[SEP]
 17. Brittberg, M.; Recker, D.; Ilgenfritz, J.; Saris, D.B.F. Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Am. J. Sports Med.* 2018. [CrossRef] [PubMed]
 18. Brittberg, M.; Recker, D.; Ilgenfritz, J.; Saris, D.B.F. Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Am. J. Sports Med.* 2018. [CrossRef] [PubMed] ^[1]_[SEP]
 19. Britteberg, Mats. *Cartilage Surgery : an operative manual / Mats Britteberg, Wayne K.Gersoff.* 1st ed.Philadelphia , PA. Elsevier, 2011. Capt. 1, página 3
 20. Buckwalter JA, Mankin HJ (1997) Articular cartilage: Part I: tissue design and chondrocytes matrix interactions. *J Bone Joint Surg*, 79-A, 600–611
 21. Caplan AI. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Eng.* 2000; 6:1-7.
 22. Casscells SW. Gross pathological changes in the knee joint of the aged individual: A study of 300 cases. *Clin Orthop* 132: 225-232, 1978
 23. Chappell AS, Desai D, Liu-Seifert H, et al. A double- blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy and safety of duloxetine for the treatment of chronic pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain Pract* 2011;11:33-41.
 24. Chen ES, Frenkel SR, Di Cesare PE (1999). Repair of articular cartilage defects: Part I. Basic science of cartilage healing. *Am J. Orthop*, 28, 31–33
 25. 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.
26. Chou R, Helfand M, Peterson K, Dana T, Roberts C. Comparative effectiveness and safety of analgesics for osteoarthritis. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2006.
 27. Cohen, S.B.; Meirisch, C.M.; Wilson, A.; Diduch, D.R. The use of absorbable copolymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*, v. 24, p. 2653-2660, 2003
 28. Cooper AJ; Johnson CD. Animal experimentation. *Br J Surg* 1991;78:1409-11.
 29. 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
 30. Coupin M. Atlas de dissection zoologiques. Paris, Vigot Freres 1910, p.13.
 31. Craig DG, Bates CM, Davidson JS, Martin KG, Hayes PC, Simpson KJ. Staggered overdose pattern and delay to hospital presentation are associated with adverse outcomes following paracetamol-induced hepatotoxicity. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73: 285-94.
 32. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
 33. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 1997;13(4):456-460.
 34. da Costa BR, Nüesch E, Kasteler R, et al. Oral or transdermal opioids for osteoarthritis of the knee or hip. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;(9): CD003115.
 35. Da Costa BR, Reichenbach S, Keller N, Nartey L, Wandel S, Juni P, et al. Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: a network meta-analysis. *Lancet*. 2017;390 (10090):e21–33.
 36. Dawson AB. The age order of epiphyseal union in the long bones of the albino rat. *Anat Res* 1925;31:1–17
 37. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*, 44(8), 1928-1942.

38. Derrett, S.; Stokes, E.A.; James, M.; Bartlett, W.; Bentley, G. Cost and health status analysis after autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: A retrospective comparison. *Int. J. Technol. Assess. Health Care* 2005, 21, 359–367. [CrossRef] [PubMed]
39. Devitt, B.M.; Bell, S.W.; Webster, K.E.; Feller, J.A.; Whitehead, T.S. Surgical treatments of cartilage defects of the knee: Systematic review of randomised controlled trials. *Knee* 2017, 24, 508–517. [CrossRef] [PubMed]
40. Devitt, B.M.; Bell, S.W.; Webster, K.E.; Feller, J.A.; Whitehead, T.S. Surgical treatments of cartilage defects of the knee: Systematic review of randomised controlled trials. *Knee* 2017, 24, 508–517. [CrossRef] [PubMed] ^[1]_{SEP}
41. 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
42. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4): 315-7.
43. Dougados M1, Ayrat X, Listrat V, Gueguen A, Bahuaud J, Beaufils P, Beguin JA, Bonvarlet JP, Boyer T, Coudane H, et al. The SFA system for assessing articular cartilage lesions at arthroscopy of the knee. *Arthroscopy*. 1994 Feb;10(1):69-77.
44. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso ^[1]_{SEP} corrente. *Acta Cir Bras* 2004;19
45. Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1992;116: 535-9.
46. Ficat RP, Philippe J, Hungerford DS. Chondromalacia patellae. A system of classification *Clin Orthop* 144. 55-62, 1979.
47. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381-90.
48. Girdlestone, J., Limbani, V. A., Cutler, A. J., & Navarrete, C. V. (2009). Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions.
49. Goodfellow J, Hungerford DS, Woods C Patellofemoral joint mechanics and

- pathology; part 2 chondromalacia patellae *J Bone Joint Surg* 58B 291-299, 1976
50. Goyal, D.; Goyal, A.; Keyhani, S.; Lee, E.H.; Hui, J.H.P. Evidence-Based Status of Second- and Third-Generation Autologous Chondrocyte Implantation Over First Generation: A Systematic Review of Level I and II Studies. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* 2013, 29, 1872–1878. [CrossRef] [PubMed]
 51. Gracitelli, G.C.; Moraes, V.Y.; Franciozi, C.E.; Luzo, M.V.; Belloti, J.C. Surgical interventions (microfracture, drilling, mosaicplasty, and allograft transplantation) for treating isolated cartilage defects of the knee in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016, 9, CD010675.
 52. Grande, D. A., Pitman, M. I., Peterson, L. , Menche, D. and Klein, M. (1989), The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J. Orthop. Res.*, 7: 208-218. doi:10.1002/jor.1100070208
 53. Gross, J. Structure and Biological Reactivity of Connective Tissue. In Ashford, M. *The Muskuloeskeletal System*, 1a. ed, 1952, The Macmillan Co, New York.
 54. 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
 55. Hjelle K1, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 2002 Sep;18(7):730-4.
 56. Huang GT1, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):792-806. doi: 10.1177/0022034509340867.
 57. Huang, GTJ, Sonoyama, W, Chen, J et al. 2006; In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 324: 225– 236.
 58. Hunziker E. Articular Cartilage Structure in humans and experimental animals. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, eds. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York: Raven Press; 1986: 1983-199.
 59. In 't Anker PS1, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004;22(7):1338-45. Yoshimura et al., 2007;
 60. Insall JN. Disorders of the patella, in *Surgery of the Knee*. Ch 11 New York, Churchill Livingstone, 1984, pp 191-260
 61. Jacobi, M.; Villa, V.; Magnussen, R.A.; Neyret, P. MACI—A new era? *Sports Med.*

- Arthrosc. Rehabil. Ther. Technol. 2011, 3, 10. [CrossRef] [PubMed]
62. Jia Z, Zhu F, Li X, Liang Q, Zhuo Z, Huang J, Duan L, Xiong J, Wang D. Repair of osteochondral defects using injectable chitosan-based hydrogel encapsulated synovial fluid-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Jun; 99:541-551. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.115. Epub 2019 Jan 26.
 63. Jones KJ, Sheppard WL², Arshi A, Hinckel BB³, Sherman SL³. Articular Cartilage Lesion Characteristic Reporting Is Highly Variable in Clinical Outcomes Studies of the Knee. *Cartilage.* 2019 Jul;10 (3):299-304.
 64. Jones, E.S, Joint Lubrification. *Lancet* 1936, 230, 1043-1044
 65. Junqueira, Luiz Carlos Ucho. *Histologia básica : texto e atlas.* 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538 p.il.
 66. Kan HS, Chan PK, Chiu KY, Yan CH, Yeung SS, Ng YL, Shiu KW, Ho T. *Hong Kong Med J.* 2019 Apr;25(2):127-133. doi: 10.12809/hkmj187600. Epub 2019 Mar 28. Review
 67. Kan HS, Chan PK, Chiu KY, Yan CH, Yeung SS, Ng YL, Shiu KW, Ho T. *Hong Kong Med J.* 2019 Apr;25(2):127-133. doi: 10.12809/hkmj187600. Epub 2019 Mar.
 68. Kandel, R.A.; Grynepas, 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
 69. Knutsen, G.; Drogset, J.O.; Engebretsen, L.; Grøntvedt, T.; Ludvigsen, T.C.; Løken, S.; Solheim, E.; Strand, T.; Johansen, O. A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture. *J. Bone Jt. Surg.* 2016, 98, 1332–1339. [CrossRef] [PubMed]
 70. Kondo, N. Ogose, A.; Takunaga, K. Bone formation and resorption of highly purified -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials*, v. 26, p. 5600-5608, 2005.
 71. Kreuz, P.C.; Steinwachs, M.; Erggelet, C.; Krause, S.J.; Ossendorf, C.; Maier, D.; Ghanem, N.; Uhl, M.; Haag, M. Classification of graft hypertrophy after autologous chondrocyte implantation of full-thickness chondral defects in the knee. *Osteoarthr. Cartil.* 2007, 15, 1339–1347. [CrossRef] [PubMed]
 72. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):1133-40.
 73. Lamplot, J.D.; Schafer, K.A.; Matava, M.J. Treatment of Failed Articular Cartilage Reconstructive Procedures of the Knee A Systematic Review. *Orthop. J. Sports Med.*

- 2018, 6, 2325967118761871. [CrossRef] [PubMed]
74. Lamplot, J.D.; Schafer, K.A.; Matava, M.J. Treatment of Failed Articular Cartilage Reconstructive Procedures of the Knee A Systematic Review. *Orthop. J. Sports Med.* 2018, 6, 2325967118761871.
 75. Li, L.; Newton, P.T.; Boudierlique, T.; Sejnohova, M.; Zikmund, T.; Kozhemyakina, E.; Xie, M.; Krivanek, J.; Kaiser, J.; Qian, H.; et al. Superficial cells are self-renewing chondrocyte progenitors, which form the articular cartilage in juvenile mice. *FASEB J.* 2017, 31, 1067–1084. [CrossRef] [PubMed] ^[1]_[SEP](LI et al 2017)
 76. Liu XI, Ma Px. Polymeric scaffold for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2004 Mar; 32 (3):477-86
 77. Machado GC, Maher CG, Ferreira PH, Pinheiro MB, Lin CW, Day RO, et al. Efficacy and safety of paracetamol for spinal pain and osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *BMJ.* 2015;350:h1225.^[1]_[SEP]
 78. Madsen, B. L., Noer, H. H., Carstensen, J. P., & Nørmark, F. (2000). Long-term results of periosteal transplantation in osteochondritis dissecans of the knee. *Orthopedics*, 23(3), 223-226.
 79. Magnuson PB (1941) Joint debridement, surgical treatment of degenerative arthritis. *Surg Gynecol Obstet*, 73, 1–9.
 80. 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
 81. Martin I, Shastri VP, Padera RF, Yang J, Mackay AJ, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three- dimensional polymer foams. *J Biomed Mater Res.* 2001; 55:229-235.
 82. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, Pitaru S. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells.* 2010 May. doi: 10.1111/jcpe.12016. Epub 2012 Nov 8.
 83. Matsumoto, T.; Okabe, T.; Ikawa, T.; Iida, T.; Yasuda, H.; Nakamura, H.; Wakitani, S. ^[1]_[SEP]Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. *J. Cell. Physiol.* 2010, 225, 291–295.
 84. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama M (1993). Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*, 9, 318–321.
 85. McCarthy, H.S.; Roberts, S. A histological comparison of the repair tissue formed

- when using either Chondrogide® or periosteum during autologous chondrocyte implantation. *Osteoarthr. Cartil.* 2013, 21, 2048–2057. [CrossRef] [PubMed]
86. McGinty JB. *Operative Arthroscopy*. Lippincott-Raven. 1996. Second edition: 109.
87. McIlwraith CW1, Fortier LA2, Frisbie DD1, Nixon AJ2. Equine Models of Articular Cartilage Repair. *Cartilage*. 2011 Oct;2(4):317-26. doi: 10.1177/1947603511406531.
88. Messner K, Maletius W. The long term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta orthop Scand.* 1996; 67(2):165-168
89. Messner, K.; Gillquist, J. Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: a biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee. *Biomaterials*, v. 14, p. 513-520, 1993.
90. Mierisch, C.; Cohen, S.B.; Jordan, L.C.; Robertson, P.G.; Balian, G.B.; Diduch, D.R. Transforming growth factor- β in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. *Arthroscopy*, v. 18, p. 892-900, 2002
91. Mistry, H.; Connock, M.; Pink, J.; Shyangdan, D.; Clar, C.; Royle, P.; Court, R.; Biant, L.C.; Metcalfe, A.; Waugh, N. Autologous chondrocyte implantation in the knee: Systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* 2017, 21, 1–294. [CrossRef] [PubMed]
92. Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hy treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2): 54-67.
93. Mow, V. C., Ratcliffe, A., & Robin Poole, A. (1992). Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*, 13(2), 67–97. doi:10.1016/0142-9612(92)90001-5
94. 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
95. Nehrer S, Spector M, Minas T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop Relat Res.* 1999; (365):149-162
96. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 4a ed, Sarvier. 2006. Cap. 12 468-470
97. Noyes FR, Stabler CL. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med* 1989;17: 505-513
98. O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001 Oct; 391 Suppl: S190-207.

99. O'driscoll, S.W.; Salter, R.B. The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. *Clin. Orthop.*, n.208, p.131-40, 1986.
100. Ogata, Y.; Mabuchi, Y.; Yoshida, M.; Suto, E.G.; Suzuki, N.; Muneta, T.; Sekiya, I.; Akazawa, C. Purified Human Synovium Mesenchymal Stem Cells as a Good Resource for Cartilage Regeneration. *PLoS ONE* 2015, 10, e0129096. [CrossRef] [PubMed]
101. Meyer HL, Goebel L, Eldracher M, Ong MF, Cucchiarini M, Madry H. Improved repair of chondral and osteochondral defects in the ovine trochlea compared with the medial condyle. *J Orthop Res.* 2013 Nov;31(11):1772-9. doi: 10.1002/jor.22418. Epub 2013 Jun 27.
102. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg BR.* 1961;43:752-7.
103. Ovalle, William K, Nahirney, Patrick C. *Netter bases da histologia.* 2. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2008.
104. Pittenger MF¹, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
105. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284, 143–147.
106. Pridie KH, Gordon G. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg.* 1959;41(3):618–619
107. Reiff, R.B.M. Reparo de defeito osteocondral no joelho de coelhos utilizando centrifugado de medula óssea autóloga. 2010. 62-66 fl. Tese (Doutorado em Medicina) - Programa de Ortopedia e Traumatologia, Universidade de São Paulo , São Paulo, 2010.
108. Rochefort, G. Y., Delorme, B., Lopez, A., Héroult, O., Bonnet, P., Charbord, P., ... & Domenech, J. (2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(10), 2202.
109. Rodrigo JJ, Steadman JR, Silliman JF, Fulstone HA (1994) Improvement of full thickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion. *Am J Knee Surg*, 7, 109–116.
110. Ronald P. Grelsamer, John R. Klein. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998;28(5):286-298

111. Rosada, C., Justesen, J., Melsvik, D., Ebbesen, P., & Kassem, M. (2003). The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcified Tissue International*, 72(2), 135-142.
112. 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
113. Rutjes AW, Jüni P, da Costa BR, Trelle S, Nüesch E, Reichenbach S. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012;157:180-91.
114. Scapinelli R, Aglietti P, Baldovin M, Girom F, Tritge R. Biologic of the patella: current status. *Clin Sports Med* 2002 Jul; 21(3): 547-73
115. Shahgaldi, B.F. Coral graft restoration of osteochondral defects. *Biomaterials*, v. 19, p. 205-213, 1998
116. Shubert, M. *Chemistry of Connective Tissue. The Muskuloeskeletal System*, 1952, The Macmillan Co, New York.
117. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK (1997) Microfracture technique for full thickness chondral defects: technique and clinical results. *Oper Tech Orthop*, 7, 300–304
118. Steck, E.; Fischer, J.; Lorenz, H.; Gotterbarm, T.; Jung, M.; Richter, W. Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: Restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev*. 2009, 18, 969–978.
119. Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjögren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, Brittberg M, Lindhal A. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7(3): R560-R568.
120. Taylor D.W, Ahmed N, Gan L, Gross, A. E, Kandel, RA. Proteoglycan and Collagen Accumulation by Passaged Chondrocytes Can Be Enhanced Through Side-by-Side Culture with Primary Chondrocytes. *Tissue Engineering Part A*. October 2009, 16(2): 643-651.
121. Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., ... & Lagneaux, L. (2005). Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem cells*, 23(8), 1105-1112.
122. Towheed TE, Maxwell L, Judd MG, Catton M, Hochberg MC, Wells G.

- Acetaminophen for osteoarthritis. The Cochrane data- base of systematic reviews. 2006;(1): CD004257.
123. Towheed TE, Maxwell L, Judd MG, Catton M, Hochberg MC, Wells G. Acetaminophen for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(1): CD004257.
124. 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.
125. Wang YI, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. stem Cell-based tissue engineering with silk biomaterial. *Biomaterials*, 2006 dec; 27(36):6064-82
126. Wang, Q.; Ding, G.; Xu, X. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells and possible mechanisms. *Histol. Histopathol.* 2016, 31, 949–959.
127. Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, et al. Isolated full thickness chondral injuries: prevalence and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2008;75(5):382-386
128. Wluka AE, Lombard CB, Cicuttini FM. Tackling obesity in knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:225-35.
129. Yin, L.; Wu, Y.; Yang, Z.; Denslin, V.; Ren, X.; Tee, C.A.; Lai, Z.; Lim, C.T.; Han, J.; Lee, E.H. Characterization and application of size-sorted zonal chondrocytes for articular cartilage regeneration. *Biomaterials* 2018, 165, 66–78. [CrossRef] [PubMed]
130. Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell and tissue research*, 327(3), 449-462.
131. Yoshimura, H.; Muneta, T.; Nimura, A.; Yokoyama, A.; Koga, H.; Sekiya, I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007, 327, 449–462.
132. Yu SP, Hunter DJ. Managing osteoarthritis. *Aust Prescr* 2015;38:115-9.
133. Zanasi, S.; Brittberg, M.; Marcacci, M. Basic science, clinical repair and reconstruction of articular cartilage defects: Current status and prospects. In *Immunohistochemical and Biochemical Analysis of Cartilage Repair Tissue Biopsies*; Timeo Editore: Rastignano, Italy, 2006; pp. 705–710. [SEP]
134. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III:

- Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartil.* 2010;18(4):476–99.
135. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:476-99.
136. Zorzi, A.R.; Amstalden, E.M.I.; Plepis, A.M.G.; Martins, V.C.A.; Ferretti, M.; Antonioli, E.; Duarte, A.S.S.; Luzo, A.C.M.; Miranda, J.B. Effect of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells on the Regeneration of Ovine Articular Cartilage. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 26813-26831 .
137. Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13(12), 4279–4295. doi:10.1091/mbc.e02-02-0105.

ANEXOS

12.1. Tabela de Avaliações após 8 semanas de seguimento

		DEFEITO	BORDAS	APARÊNCIA	GERAL	SUPERFÍCIE	MATRIZ	DISTR.	VIA.	OSSO	MINERALI	GERAL
GRUPO A		A	B	C	SCORE	I	II	III	IV	V	VI	SCORE
2A	DIREITO	0	0	0	0	0	2	1	3	2	0	8
2B	ESQUERDO	4	4	4	12	0	2	1	1	2	0	6
3A	DIREITO	4	4	3	11	1	1	1	1	2	0	5
3B	ESQUERDO	4	4	4	12	0	0	1	1	1	0	3
7A	DIREITO	4	3	3	11	0	2	3	3	1	0	9
7B	ESQUERDO	4	4	4	12	3	2	3	3	3	3	17
GRUPO B												
15A	DIREITO	2	0	0	2	3	2	2	3	2	3	15
15B	ESQUERDO	1	0	0	1	3	2	2	3	2	3	15
16A	DIREITO	4	3	4	11	3	3	3	3	2	3	17
16B	ESQUERDO	4	1	2	7	3	2	2	3	2	3	15
19A	DIREITO	4	4	3	11	3	2	1	1	2	3	12
19B	ESQUERDO	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0	1
GRUPO C												
23A	DIREITO	1	0	0	1	3	2	1	3	2	3	14
23B	ESQUERDO	3	2	2	7	3	2	1	3	2	3	14
25A	DIREITO	3	2	2	7	3	2	1	3	2	3	14
25B	ESQUERDO	3	3	2	8	3	2	1	3	2	3	14
GRUPO D												
1A	DIREITO	4	3	3	10	0	3	3	3	2	3	14
1B	ESQUERDO	4	3	3	10	0	2	2	3	2	3	12
14A	DIREITO	4	3	2	9	3	2	2	3	3	0	13
14B	ESQUERDO	4	3	2	9	3	2	2	3	3	0	13
9A	DIREITO	4	3	3	10	3	2	2	3	3	3	16

9B	ESQUERDO	4	3	3	10	3	2	1	3	3	0	12
----	----------	---	---	---	-----------	---	---	---	---	---	---	-----------

12.2. Tabela de Avaliações após 16 semanas de seguimento

		DEFEITO	BORDAS	APARÊNCIA	GERAL	SUPERFICIE	MATRIZ	DISTR.	VIA.	OSSO	MINERAL.	GERAL
GRUPO A		A	B	C	ESCORE	I	II	III	IV	V	VI	ESCORE
4A	DIREITO	4	4	4	12	3	3	2	3	3	3	17
4B	ESQUERDO	4	4	4	12	3	3	3	3	3	3	18
6A	DIREITO	4	4	4	12	3	3	3	3	3	3	18
6B	ESQUERDO	4	4	4	12	3	3	3	3	3	3	18
8A	DIREITO	4	4	4	12	3	3	3	3	3	3	18
8B	ESQUERDO	4	4	4	12	3	3	3	3	3	3	18
GRUPO B												
17A	DIREITO	1	0	1	2	0	1	1	3	1	0	6
17B	ESQUERDO	0	0	1	1	0	1	1	3		0	6
18A	DIREITO	4	3	4	11	3	3	3	3	2	3	17
18B	ESQUERDO	4	3	4	11	3	2	1	3	1	3	13
20A	DIREITO	4	4	4	12	3	3	2	3	2	3	16
20B	ESQUERDO	4	4	3	10	3	2	1	3	1	3	13
21A	DIREITO	4	4	3	11	3	2	2	3	2	3	15
21B	ESQUERDO	4	3	3	10	3	2	2	3	3	3	15
GRUPO C												
26A		4	4	3	11	3	2	2	3	3	3	16
26B		4	4	4	12	3	3	3	3	3	3	18
27A	DIREITO	3	3	3	9	3	1	3	3	2	3	15

27B	ESQUERDO	3	3	3	9	3	2	2	3	2	3	15
28A	DIREITO	3	2	1	6	3	2	2	1	1	3	12
28B	ESQUERDO	4	3	3	10	3	1	1	3	2	3	15
GRUPO D												
11A	DIREITO	3	2	2	7	3	3	2	3	2	3	16
11B	ESQUERDO	3	3	3	9	3	3	2	3	3	3	17
12A	DIREITO	4	4	3	11	3	3	3	3	3	3	18
12B	ESQUERDO	3	3	3	9	3	3	2	3	3	3	17
13A	DIREITO	4	3	3	10	3	2	2	3	3	3	16
13B	ESQUERDO	4	3	3	10	0	2	1	3	2	3	11
22A	DIREITO	4	3	2	9	3	3	3	3	1	3	16
22B	ESQUERDO	3	3	3	9	3	3	2	3	2	3	16
30A	DIREITO	3	3	2	8	0	0	0	0	0	0	0
30B	ESQUERDO	4	3	3	10	3	2	3	3	2	3	16

ESCALA MORFOLÓGICA GROSSEIRA

DEFEITO =

BORDAS =

APARÊNCIA =

GERAL = PONTUAÇÃO GERAL

ESCALA HISTOLÓGICA VISUAL

SUPERFÍCIE =

MATRIZ =

DISTR. = DISTRIBUIÇÃO

VIA. = VIABILIDADE CELULAR

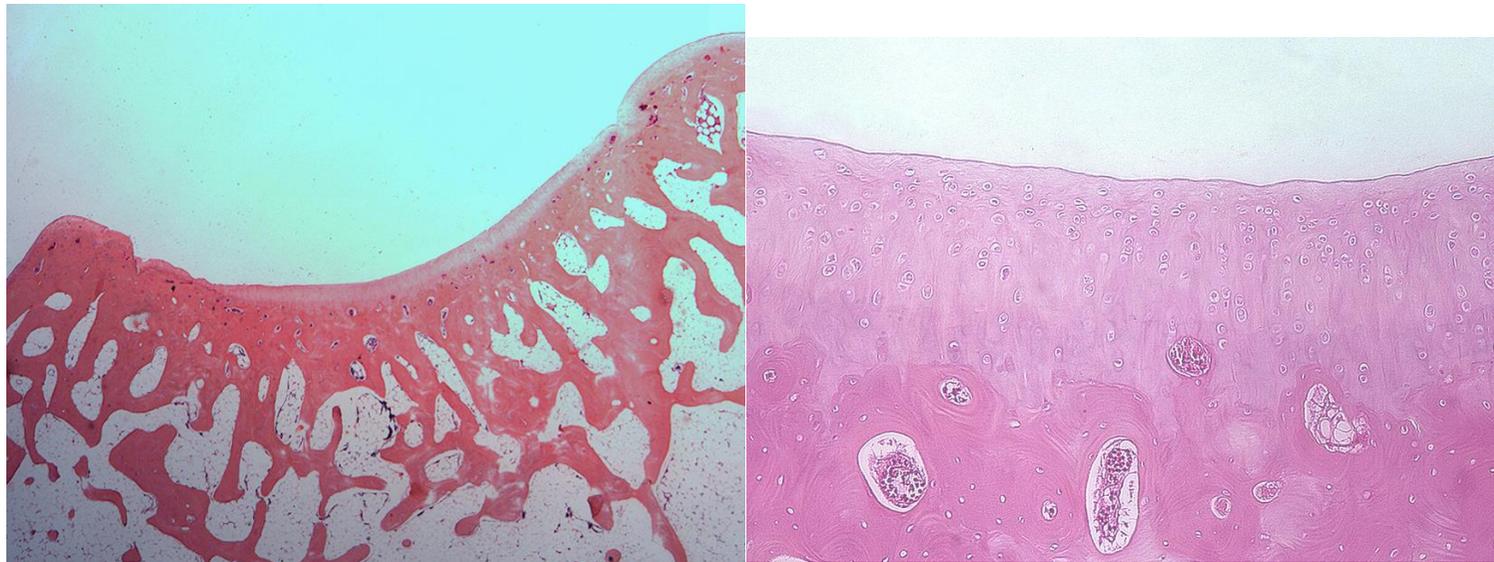
OSSO = OSSO SUBCONDRA

MINERAL. = MINERALIZAÇÃO

GERAL = PONTUAÇÃO GERAL

Anexo – Histologia

Anexo histologia 1- Grupo A – CTM



Imagens. Figuras (Superior) Grupo A, CTM, 16 semanas , aumento 10 x. (Inferior) Grupo A, CTM, 16 semanas , aumento 200 x.

Percebe-se boa continuidade de tecido em área de meia lua. Tecido condral superior com bom preenchimento e manutenção de bordos contínuos. Visualiza-se transição condral e óssea com “tide mark” marca da maré adequada e boa celularidade em orientação radial dos condroblastos .

Anexo histologia 2 - Grupo B – Colágeno tipo II

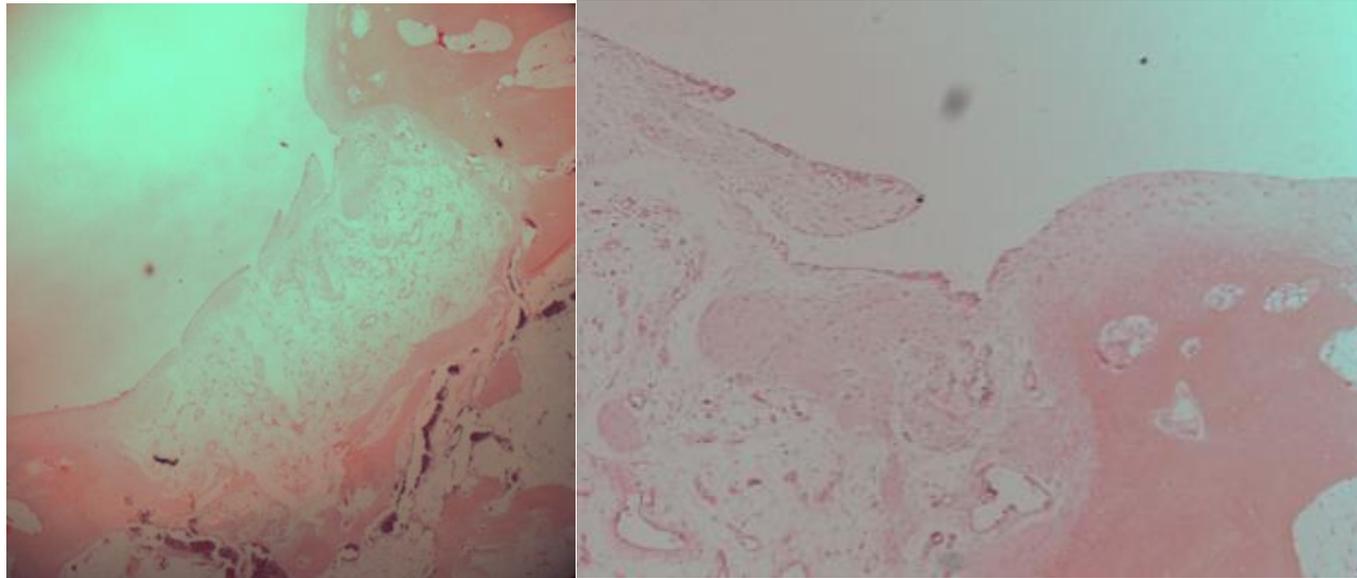
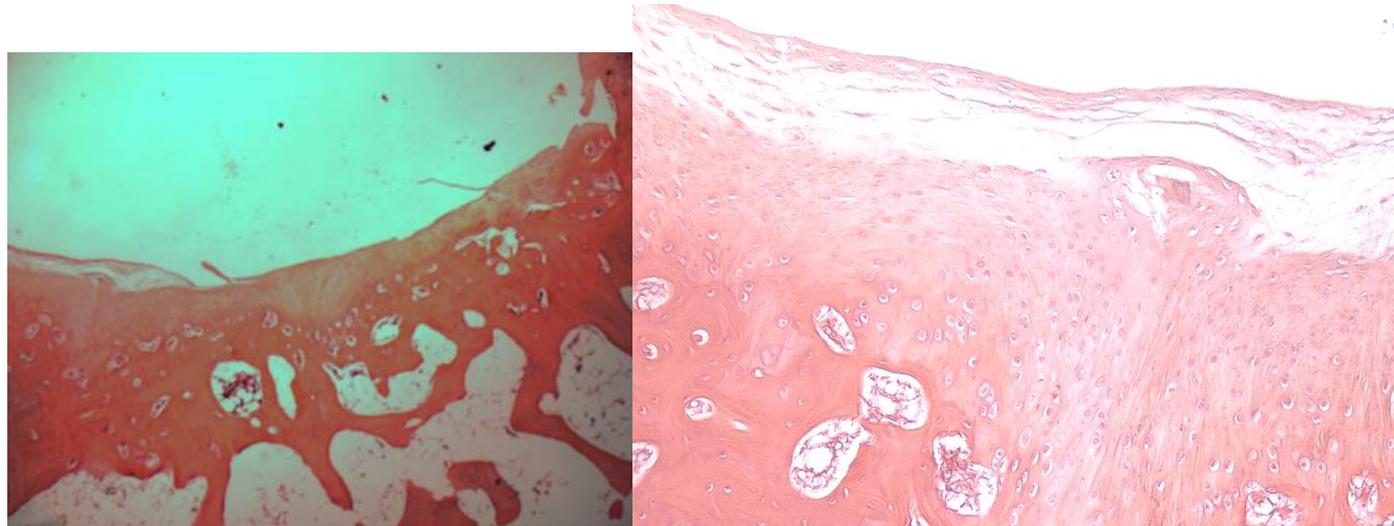


Imagem (superior) grupo B, colágeno tipo II , hidrogel , 16 semanas aumento 10 x
(Inferior) grupo B, colágeno tipo II , hidrogel , 16 semanas aumento 100x

Percebe-se preenchimento de tecido em área de meia lua. Tecido condral superior sem organização das camadas e sem o aspecto de manutenção da “tide mark”/marca da maré , apesar de boa celularidade. Transição para a camada calcificada sem organização.

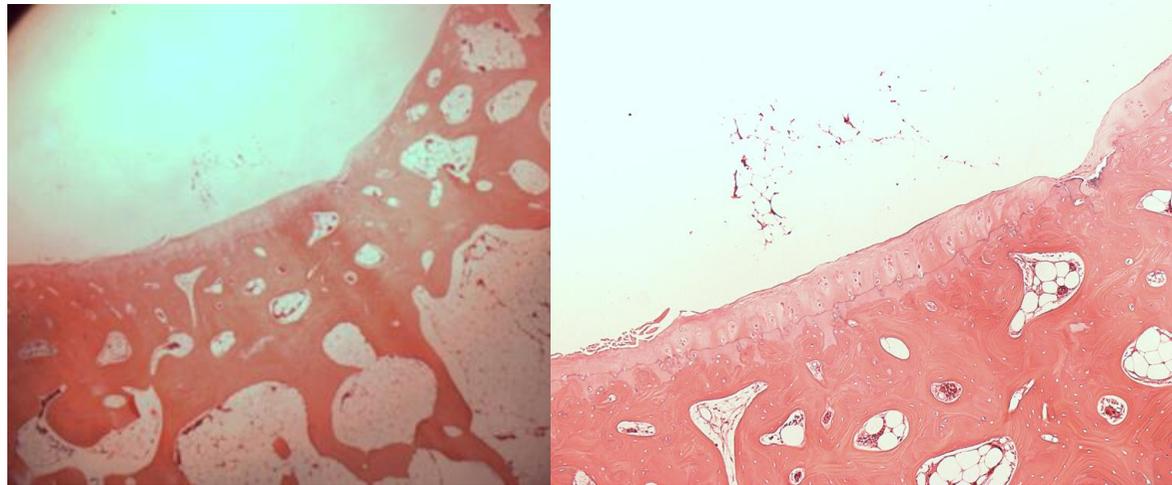
Anexo Histologia 3. Grupo C- Condroblasto



Imagens. Figuras (Superior) Grupo C, condroblasto , 16 semanas , aumento 10 x. (Inferior) Grupo C, condroblasto , 16 semanas , aumento 100 x.

Percebe-se boa continuidade de tecido em área de meia lua. Tecido condral superior com bom preenchimento e manutenção de bordos contínuos (pouco mais frágeis nas preparações) . Visualiza-se transição condral e óssea com “tide mark” marca da maré adequada e boa celularidade em orientação radial dos condroblastos. Menor organização do remodelamento e transição condral e óssea.

Anexo Histologia 4- Grupo D - Grupo Controle



Imagens. Figuras (Superior) Grupo D, controle , 16 semanas , aumento 10 x. (Inferior) Grupo D, controle , 16 semanas , aumento 100 x.

Percebe-se boa continuidade de tecido em área de meia lua. Tecido condral superior com bom preenchimento e manutenção de bordos contínuos. Visualiza-se transição condral e óssea com “tide mark” marca da maré adequada e boa celularidade em orientação radial dos condroblastos . controle, sugere uma celularidade e organização um pouco menor que gurpo CTM.