RAFAEL GONÇALVES HAYASHI

Tratamento de Lesões de Cartilagem Articular de Coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com Células Progenitoras Associadas ou Não Associadas a Membrana de Colágeno

São Paulo

2020

RAFAEL GONÇALVES HAYASHI

Tratamento de Lesões de Cartilagem Articular de Coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com Células Progenitoras Associadas ou Não Associadas a Membrana de Colágeno

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof^ª. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira
Nishiyama

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3941
FMVZ

Hayashi, Rafael Gonçalves
Tratamento de lesões de cartilagem de articular de coelhos Nova Zelândia
(*Oryctolagus cuniculus*) com células progenitoras associadas ou não associadas a
membrana de colágeno / Rafael Gonçalves Hayashi. – 2020.
68 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama.

1. Chondro-gide. 2. Joelho. 3. Engenharia tecidual. 4. Lagomorfo. 5. Células tronco. I.
Título.

São Paulo, 24 de março de 2020
CEUA N [1215180216](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Phelipe De Oliveira Favaron

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "Tratamento de lesões de cartilagem articular de coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com células progenitoras associadas ou não associadas a membrana de colágeno".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 006010)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 17/fevereiro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Foi solicitada alteração do responsável do projeto em pedido de atualização de emenda e solicitamos apenas adequação do título, pois não houve alteração na execução do projeto.".

Comentário da CEUA: "aprovada a alteração do título do projeto, sem mudanças em seu conteúdo experimental. ".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: HAYASHI, Rafael Gonçalves

Título: Tratamento de Lesões de Cartilagem de Articular de Coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com Células Progenitoras Associadas ou Não Associadas a Membrana de Colágeno.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais **Selma Cristina Hayashi e Natal Mitio Hayashi**, a minha tia avó **Maria Ignez Gonçalves** que sempre se dedicaram a me dar a possibilidade de me graduar e pós-graduar, além do mais importante, amor e carinho.*

*A minha namorada **Ana Carolina Silveira Rabelo**, que conheci e me apaixonei durante minha pós-graduação no departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.*

*A todos os meus **parentes e amigos** que de alguma maneira me ajudaram, desde tecnicamente para a realização deste projeto, psicologicamente ou até mesmo compreendendo minha ausência em diversos momentos.*

*E a **TODOS** os **ANIMAIS** que doaram seu tempo, sua liberdade, sua vida e seu corpo para que este projeto fosse realizado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais **Selma Cristina Hayashi** e **Natal Mitio Hayashi** e minha tia avó, **Maria Ignez Gonçalves**, que me apoiaram psicologicamente e financeiramente até os dias de hoje, e tenho certeza que sempre.

Ao meu primeiro orientador **Dr. Phelipe Oliveira Favaron** pela oportunidade que me foi dada.

À minha atual orientadora prof. **Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama** pela orientação, pela paciência, pela dedicação durante toda a execução do projeto.

À **Ana Carolina Silveira Rabelo** por toda ajuda tanto experimental desta tese, e obviamente, pela oportunidade de nos conhecermos e nos unirmos.

À minha “irmã mais velha” de pós graduação, **Jessica Borghesi**, e minha “prima” **Lara Carolina Mario** por toda companhia, dedicação, ajuda e paciência. Não existem palavras que gratifiquem a ajuda de vocês para que este projeto fosse executado.

À minha “prima distante” **Franceliusa Dellys (Natal)** por toda companhia, ajuda e momentos de risadas.

Agradeço a minha “irmã mais nova” de pós-graduação **Marcella Giancoli Cano Kato da Silva** por toda disposição e ajuda desde sua iniciação científica até nos tornarmos “irmãos” de pós-graduação.

À minha mais nova “irmã” de pós-graduação **Alice Marcela Sampaio Del Colleto** por se juntar a pós-graduação na reta final deste meu doutorado e se tornar tão acessível, e disposta a me ajudar.

À aluna de iniciação científica **Mariana Ferreira Lima** por toda ajuda e horas a mais no fluxo laminar.

Aos colegas amigos que fiz neste departamento:

Adriana Raquel de Almeida da Anunciação, Ana Clara Bastos, Ana Lúcia Jacintho Delgado, Antônio Lisboa Neto, Carla Carvalho, Dara Rúbia, Eduardo Amaro Lebre Junior, Gustavo Schiavi, Igor Smirnow, Júlia Bastos de Aquino, Kadija Santee, Luana Felix, Luciano César, Monica Duarte, Paula Fratini, Rafael Rodrigues Daniel, Rodrigo Barreto, Rose Eli Rici, Taís Sasahara, Tarley Santos, Túlio Yoshinaga.

Ao amigo **Arthur Alonso** pelos conselhos quanto a realização da pós-graduação

À amiga desde a graduação, pós-graduação, trabalho e na vida **Kátia de Oliveira Pimenta Guimarães.**

Ao **Rafael Garabet Agopian** que me trouxe a oportunidade da realização deste projeto de vida me apresentando este departamento.

Ao amigo **Mauricio Oliveira** pela ajuda neste departamento e fora dele.

À **Juliana Nhanharelli** que se tornou amiga de pós-graduação e de trabalho.

Ao técnico **Ronaldo Agostinho da Silva** pela paciência, disposição e ajuda.

A técnica de histologia do ICB Marta "**Martinha**", que sem o auxílio e paciência eu não teria conseguido evoluir em uma das partes mais importantes do projeto.

Às secretarias tanto do programa de anatomia dos animais domésticos, **Daura Vaz**, quanto da pós-graduação **Regina Valbom**, e do CEUA **Maria Aparecida Laet.**

A professora **Dra. Maria Angélica Miglino, Dr. José Roberto Kfourri e Dr. Antonio Chaves de Assis Neto**, por toda a ajuda, disponibilidade e incentivo.

À **Dra. Rose Eli Rici** pela disponibilidade e ajuda com a estrutura do CADI FMVZ/USP

Ao **CADI** (Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem) da FMVZ.

O presente trabalho foi realizado com apoio **da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** - Código de Financiamento 169317/2017-0

“Ninguém vai bater tão forte como a vida, mas não se trata de bater forte. Se trata de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente, o quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando. É assim que se consegue vencer. Agora se você sabe do teu valor, então vá atrás do que você merece, mas tem que estar preparado para apanhar. E nada de apontar dedos, dizer que você não consegue por causa dele ou dela, ou de quem quer que seja.”

Sylvester Stallone em Rocky Balboa (2007)

RESUMO

HAYASHI, R.G. Tratamento de Lesões de Cartilagem de Articular de Coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com Células Progenitoras Associadas ou Não Associadas a Membrana de Colágeno. 2020. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A osteoartrite é uma das doenças mais comuns presentes nas articulações sinoviais, ela é responsável por incapacitar milhares de pessoas, jovens, adultos e idosos ao redor do mundo, gerando perdas econômicas importantes a sociedade pois o indivíduo com problemas articulares, por muitas vezes não consegue gerar um saldo positivo à economia, mas sim gastos com saúde pública. As lesões presentes na cartilagem articular podem ter graduação variada, sendo que as mais brandas permitem uma recuperação completa e retorno funcional adequado da articulação, enquanto as lesões mais graves fazem com que a matriz extracelular presente nas articulações seja incapaz de absorver e dissipar as forças atuantes presentes nas articulações, além de perder a sua superfície lisa responsável por reduzir o atrito durante sua movimentação. Os tratamentos para as lesões de cartilagem articular podem ser medicamentosos ou através de procedimentos cirúrgicos, sendo que o primeiro deles é responsável por reduzir a dor do paciente, e evitar ou prorrogar a evolução da doença. Já os tratamentos cirúrgicos visam à reparação tecidual local e uma função articular mais próxima possível do tecido saudável. Apesar disso, nenhum tratamento até hoje conseguiu reestabelecer essas funções adequadamente, mas com o avanço da engenharia tecidual, a associação entre células progenitoras e scaffolds biológicos têm se tornado uma importante opção na pesquisa e tratamento dessas lesões. Para isso, tais ensaios são comumente realizados em modelos animais grandes o suficiente para realização da lesão, aplicação de tratamentos e avaliações macro e microscópicas, sendo que o coelho se encaixa em todos esses requisitos, além de apoiar a maior parte do seu peso nos membros pélvicos, sendo então, semelhante aos humanos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar, cultivar e caracterizar as células progenitoras provenientes da cartilagem articular de coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), como células progenitoras com características mesenquimais, e verificar seu potencial de aderência em um scaffold biológico de colágeno tipo I/III de suíno, e fazer o seu uso autólogo, associado e não associado a membrana de colágeno, em lesões de cartilagem realizadas cirurgicamente, para que, após um período de cicatrização de 100 dias fosse realizado a eutanásia destes animais e avaliação comparativa macro e microscópica dos tratamentos realizados, e por estes resultados

concluimos que as células progenitoras têm um papel e potencial importante na reparação da cartilagem articular junto à engenharia tecidual.

Palavras-chave: Chondro-gide. Joelho. Engenharia tecidual. Lagomorfo. Células tronco.

ABSTRACT

HAYASHI, R.G. **Cartilage lesions of New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) treated with progenitor cells associated or not with collagen scaffold.** 2020. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Osteoarthritis is one of the most common diseases present in synovial joints, it is responsible for incapacitating thousands of young, adults and elderly people around the world, generating important economic losses to society because the individual with joint problems, often cannot generate a positive balance for the economy, and keep spending on public health. The lesions present in the articular cartilage can have varying degrees, the milder ones allow a complete recovery and adequate functional return of the joint. However, the most serious injuries cause the extracellular matrix present in the joints inability to absorb and dissipate the acting forces present in the joints, in addition to losing its flat surface responsible for reducing friction during its movement. Treatments for articular cartilage injuries can be through medication or surgical procedures, the first one is responsible for reducing the patient's pain and preventing or prolonging the disease's progress. Surgical treatments aim at local tissue repair and a joint function as close as possible to healthy tissue. Despite this, no treatment to date has managed to reestablish these functions properly, but with the advancement of tissue engineering, the association between progenitor cells and biological scaffolds has become an important option for research and treatment of these lesions. Such tests are commonly performed on animal models large enough to perform the lesion, apply treatments and gross and microscopic evaluations. Thus, the rabbit fits in all these requirements, and in addition it support most of its weight on the pelvic limbs, like humans. And so, the objective of this study was to carry out the culture and characterization of progenitor cells from the articular cartilage of New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as progenitor cells with mesenchymal characteristics, to verify their adherence potential in a biological collagen type I/III scaffold of swine and do the autologous use these cells, with and without scaffold as treatment on cartilage lesions surgically performed. And then, after a healing period of 100 days, the euthanasia of these animals was performed the comparative evaluation, gross and microscopic, of these treatments, and thereby we concluded that the progenitor cells have an important role and potential in the repair of articular cartilage along with tissue engineering.

Keywords: Chondro-gide. Knee. Tissue engineering. Lagomorph. Stem cells.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivos Gerais	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	ARTIGO I – IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS PROGENITORAS DE CARTILAGEM ARTICULAR DE COELHOS NOVA ZELÂNDIA (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	18
3.2	INTRODUÇÃO	19
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.3.1	Animais Utilizados	20
3.3.2	Cultivo das Células Progenitoras da Cartilagem Articular	20
3.3.3	Análise Morfológica	21
3.3.4	Teste de Criopreservação	21
3.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	21
3.3.6	Ensaio Colorimétrico de Metabolismo Celular com MTT	21
3.3.7	Imunofluorescência	22
3.3.7	Citometria de Fluxo	22
3.3.9	Diferenciação Adipogênica e Osteogênica das Células	23
3.3.10	Diferenciação Condrogênica.....	23
3.3.11	Análise do Potencial Tumorigênico	24
3.4	RESULTADOS.....	24
3.4.1	Isolamento e Análise Morfológica das Células Progenitoras da Cartilagem Articular	24
3.4.2	Ensaio Colorimétrico de Metabolismo celular com MTT	25
3.4.3	Imunofluorescência	27

3.4.4 Citometria de Fluxo	28
3.4.5 Diferenciação Celular.....	29
3.4.6 Análise do Potencial Tumorigênico das Células <i>in vivo</i>	29
3.5 DISCUSSÃO	30
3.6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	33
4 ARTIGO II – UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS PROVENIENTES DA CARTILAGEM ARTICULAR NO TRATAMENTO DE LESÃO DE JOELHOS DE COELHOS NOVA ZELÂNDIA (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).....	38
4.2 INTRODUÇÃO	39
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.3.1 Células Progenitoras e Membrana de Colágeno	40
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	41
4.3.3 Animais Utilizados e Protocolo Experimental.....	41
4.3.4 Procedimento Cirúrgico	41
4.3.5 Análise Histológica.....	43
4.3.7 Análise Estatística	43
4.4 RESULTADOS.....	44
4.4.1 Aplicação das Células Progenitoras em Membrana de Colágeno	44
4.4.2 Análise Macroscópica.....	45
4.4.3 Análise Microscópica	48
4.5 DISCUSSÃO	56
4.6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	59
5 CONCLUSÃO FINAL.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A cartilagem hialina, possui a função de fazer com que o movimento articular seja com o mínimo de atrito, suporte, absorva e distribua o peso dos impactos. Quando ocorre um trauma nesta cartilagem, seja ele um processo inflamatório, crescimento ósseo periarticular ou alteração no osso subcondral, há um rompimento do equilíbrio entre as vias anabólicas e catabólicas, com consequente indução e/ou aumento da atividade de moléculas pró-inflamatórias seguida de degradação da cartilagem. O dano à cartilagem articular tem implicações clínicas importantes, uma vez que a cartilagem possui um potencial limitado de cicatrização intrínseca e tende a uma regeneração incompleta pelos condrócitos locais, acompanhada de uma formação de um tecido formado por fibrocartilagem com qualidade inferior. Sendo assim, dados recentes mostraram que 15 a 18% da população mundial sofrem com Osteoartrite (OA), fazendo com que esta seja considerada a terceira doença mais incapacitante mundialmente (HOFFMAN et al., 2010; CUCCHIARINI et al., 2014; TAFFETANI et al., 2015; CAMARERO-ESPINOSA et al., 2016; Osteoarthritis Research Society International, 2016; NARANDA et al., 2017; Global Alliance for Musculoskeletal Health, 2019).

Atualmente, não existem medicamentos farmacêuticos eficazes para terapia da OA, portanto, este tipo de tratamento tem fins apenas para alívio da dor a curto prazo (Jiang et al., 2019). Convencionalmente, tratamentos físicos podem aliviar a dor na fase inicial desta doença. No entanto, esses tipos de tratamentos são demorados e podem causar absenteísmo no trabalho, afetando drasticamente a vida do paciente (DEROGATIS et al., 2019; JIANG et al., 2019). Além disso, alguns fármacos anti-inflamatórios podem inibir a gravidade da inflamação, mas são, em sua maioria, medicamentos esteroidais e hormonais, que podem induzir dependência grave, turbulência endócrina e obesidade (REID et al., 2002; DEROGATIS et al., 2019; JIANG et al., 2019).

Por isso, a intervenção cirúrgica é, por muitas vezes necessárias, embora o reparo da cartilagem danificada seja muitas vezes insatisfatório e raramente restaure a função completa deste tecido (KERKER et al., 2008; NARANDA et al., 2017). Por isso, na última década, várias opções viáveis de regeneração da cartilagem foram introduzidas, e dentre elas a terapia com células-tronco mesenquimais/estromais (CTM), as quais possuem efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios, que induzem o estabelecimento de um microambiente pró-regenerativo no tecido lesionado (PARK et al., 2009; COLOMBINI et al., 2019). Contudo as pesquisas com essas células mesenquimais mostraram-se ainda insatisfatórias para esta lesão, o que nos levou a investigar o uso de células progenitoras, as quais possuem características de células

semelhantes a dos condrócitos presentes em tecidos saudáveis, sendo uma fonte alternativa de cultura celular para esta doença (MEIRELLES, et al., 2006; SEOL et al., 2012). Atualmente já se sabe que as células progenitoras são células precursoras, ou seja, parcialmente diferenciadas e comprometidas com uma determinada linhagem celular, sendo estas as primeiras descendentes das células tronco destinadas a formar um tecido específico, podendo, portanto, se diferenciar em linhagens celulares mais próximas do tecido desejado, facilitando os efeitos parácrinos das células nas regenerações específicas de cada tecido (AGGARWAL et al., 2013).

Além das técnicas de biologia celular, o uso da engenharia tecidual, vem sendo muito descrito como fonte alternativa de tratamentos (BAKHTINA et al., 2014; PARK et al., 2017). O campo da engenharia de tecidos da cartilagem articular, que visa reparar, regenerar e/ou melhorar a funcionalidade da cartilagem articular lesionada ou doente, despertou intenso interesse e possui grande potencial para melhorar a função após a cicatrização da articulação lesada (ZHANG et al., 2019). Desta forma, a utilização da engenharia tecidual tem crescido como alternativa no tratamento de lesões de cartilagem articular, tanto em humanos quanto em animais pelo uso de diversos tipos de scaffolds (arcabouços) (FU et al., 2018).

Portanto, sabendo da gravidade das doenças articulares e da falta de tratamentos eficazes, este trabalho visa por meio de um modelo experimental lagomorfo analisar diferentes tratamentos de lesões articulares com células oriundas de cartilagem articular, associadas e não associadas a membrana de colágeno, a fim de observar qual desses tratamentos apresentam um melhor prognóstico para estas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O Objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização das células progenitoras provenientes da cartilagem articular de modelo lagomorfo e verificar sua eficácia, através de aplicação autóloga e *in loco*, em lesões de cartilagem articular na tróclea do fêmur de lesões cirurgicamente realizadas, com células associadas ou não associadas a membrana de colágeno (Chondro-gide®).

2.2 Objetivos Específicos

Artigo I

- Cultivar as células provenientes da cartilagem articular de coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*);
- Verificar a capacidade de crescimento, proliferação e expansão das células provenientes da cartilagem articular de coelhos;
- Caracterizar as células provenientes da cartilagem articular de coelhos em relação à presença e ausência dos marcadores de células mesenquimais;
- Avaliar o potencial tumorigênico dessas células, a fim de verificar a possibilidade do seu uso para estudos *in vivo*.

Artigo II

- Avaliar a capacidade de aderência das células progenitoras à membrana de colágeno (Chondro-gide®);
- Avaliar a qualidade do processo de cicatrização após o uso autólogo das células progenitoras associadas ou não a membrana de colágeno como tratamento de lesões articulares na tróclea do fêmur de lesões realizadas através de artrotomia exploratória.

3 ARTIGO I – IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS PROGENITORAS DE CARTILAGEM ARTICULAR DE COELHOS NOVA ZELÂNDIA (*Oryctolagus cuniculus*)

Rafael Gonçalves Hayashi¹, Jéssica Borghesi¹, Lara Carolina Mario¹, Adriana Raquel de Almeida da Anunciação¹, Mariana Ferreira Lima¹, Maria Angélica Miglino¹, Phelipe de Oliveira Favaron¹, Ana Claudia Oliveira Carreira^{1,2}

¹Departament of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brazil.

²Cell and Molecular Terapy Center (NUCEL), School of Medicine, - University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*Submetido à Cytotherapy

RESUMO

O coelho Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculos*) é uma espécie que tem sido amplamente utilizada como modelo animal experimental para estudos *in vivo* de diversas doenças que acometem o homem devido sua semelhança no processo de placentação, seu baixo custo e fácil manuseio. Uma das utilizações desse modelo visa o estudo de doenças que acometem as cartilagens articulares, pois tais doenças geram um grande prejuízo econômico a sociedade, pois até hoje, não há um tratamento que faça com que este tecido cartilaginoso, quando lesado, consiga formar um tecido cicatricial com a mesma qualidade de absorção, dispersão de forças atuantes e movimento indolor da articulação que o tecido original ali antes presente. Isto faz com que o indivíduo, deixe de ter uma vida economicamente ativa e acabe gerando custos de saúde à sociedade. Portanto, o estudo da cartilagem e de células progenitoras provenientes da cartilagem desse modelo lagomorfo é de suma importância para a realização de uma adequada caracterização dessas células com característica mesenquimal, para avaliar seu possível uso em medicina regenerativa. Neste trabalho descrevemos o isolamento e caracterização de células provenientes de cartilagem de coelho visando a translação deste tipo celular em espécie específica para a Medicina regenerativa de joelho.

Palavras chave: Células-progenitoras, células-tronco mesenquimais, condrócitos, lagomorfo, cultivo

3.2 INTRODUÇÃO

A cartilagem hialina, também chamada de cartilagem articular, é um tecido conjuntivo especializado e está presente nas articulações sinoviais, também chamadas de diartroses, que compreendem as articulações móveis do ombro, cotovelo, joelho e quadril. Sua função é fazer com que o movimento articular suporte, absorva e distribua o peso dos impactos, diminuindo, portanto, o atrito (TAFFETANI et al., 2015; CAMARERO-ESPINOSA et al., 2016). Os principais constituintes da cartilagem articular são células especializadas chamadas de condrócitos, que ficam embebidos em uma matriz extracelular altamente hidratada e organizada, constituída predominantemente de fibras de colágeno e proteoglicanos (HOFFMAN et al., 2010). Essa estrutura organizada fornece a viscoelasticidade necessária para as propriedades mecânicas da cartilagem hialina que recobre as superfícies articulares dos ossos longos (PIERMATTEI, FLO E DECHAMP, 2009).

Diante de traumas na cartilagem, consequentes de processos inflamatórios, crescimento ósseo periarticular e alteração no osso subcondral, há um rompimento do equilíbrio entre as vias anabólicas e catabólicas, com consequente indução e/ou aumento da atividade de moléculas pró-inflamatórias e degradação da cartilagem (HOFFMAN et al., 2010; MAINIL-VARLET et al., 2010). O dano à cartilagem articular tem implicações clínicas importantes, uma vez que a cartilagem possui um potencial limitado de cicatrização intrínseca e tende a uma regeneração incompleta pelos condrócitos locais, acompanhada da formação de fibrocartilagem inferior (CUCCHIARINI et al., 2014; NARANDA et al., 2017).

A intervenção cirúrgica é frequentemente a melhor opção de tratamento, embora o reparo da cartilagem danificada seja muitas vezes insatisfatório e raramente restaure a função completa do tecido (KERKER et al., 2008; NARANDA et al., 2017). Na última década, várias opções viáveis de regeneração da cartilagem foram introduzidas na prática clínica, dentre elas a terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) (CAMARERO-ESPINOSA et al., 2016; NARANDA et al., 2017). As CTMs têm ganhado um interesse significativo, desencadeando o design de vários ensaios que comprovam a segurança e, ao mesmo tempo, fornecem resultados preliminares promissores de eficácia (COLOMBINI et al., 2019). As CTMs apresentam efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios, que induzem o estabelecimento de um microambiente pró-regenerativo no tecido lesionado (PARAROLINI et al., 2008; COLOMBINI et al., 2019). Estas células têm sido utilizadas através da implantação local; da aplicação sistêmica;

combinadas com a terapia gênica; e através da engenharia tecidual (BAKHTINA et al., 2014; PARK et al., 2017).

E o coelho é um animal comumente usado em modelos pré-clínicos para ortopedia, mais especificamente osso, cartilagem articular, reconstrução ligamentar e lesão em medula espinhal e até de medicina regenerativa cardiovascular (MAPARA et al. 2012; BAKHTINA et al., 2014). Embora as CTMs de coelho sejam investigadas para estes fins, elas não foram totalmente caracterizadas em termos de imunofenótipo e potencial de diferenciação. Dessa forma, neste estudo, características imunofenotípicas das células progenitoras oriundas de cartilagem articular de coelhos foram determinadas através de ensaios quali e quantitativos; também foi caracterizado o potencial de diferenciação multipotente das CTMs; além da avaliação do seu potencial tumorigênico.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Animais Utilizados

Todos os procedimentos realizados nesse projeto de pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) sob o protocolo nº1215180216. E foram utilizados dois coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com idade aproximada de um ano, machos, para a obtenção das células progenitoras oriundas de cartilagem articular. Para tal, foram isolados fragmentos de cartilagem, de aproximadamente 6 mm², das articulações úmero-radio-ulnar, escapulo-umeral, femoro-tibio-patelar, e coxo-femoral.

3.3.2 Cultivo das Células Progenitoras da Cartilagem Articular

Após a coleta, os fragmentos de cartilagem foram lavados três vezes em solução de fosfato salina (PBS) contendo 5% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Cat. 15140-122, Carlsbad, CA, USA) e, submetidas à digestão enzimática com collagenase (proporção de 1:10, Sigma-Aldrich, M9445-10UG) por 6 horas a 37°C. Passado esse período, as células foram centrifugadas a 400 xg por 3 minutos, e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi ressuspensionado em 3 meios de cultivo distintos, sendo estes: DMEM High Glucose (LGC Biotecnologia, Cat. BR30003-05, Cotia, SP), ALPHA MEM (LGC Biotecnologia, Cat. BR3007-05, Cotia, SP); e HAM's F-12 (LGC Biotecnologia, Cat. BR30004-05, Cotia, SP), suplementados com 15% de soro fetal bovino (SFB) (LGC, Biotecnologia, Cat. BR330110 01, Cotia, SP), 1% de aminoácidos essenciais (Cat BR30238-01; LGC Biotecnologia), e 1% de

penicilina/streptomicina. As placas foram mantidas em incubadora atmosférica úmida a 37°C e 5% de CO₂.

3.3.3 Análise Morfológica

Para descrição da morfologia das células derivadas do cultivo de cartilagem articular, as amostras foram avaliadas periodicamente e fotografadas em média a cada 3 dias através de um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100) para análise do crescimento das células.

3.3.4 Teste de Criopreservação

Para o teste de criopreservação, as células foram submetidas à digestão enzimática com tripsina 0,25% (LGC Biotecnologia, Cat. BR30042-01, Cotia, SP) por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, 1×10^6 células foram ressuspensas em 1mL de meio de congelamento (90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Cat 13-0091.01; LGC Biotecnologia) e distribuídas em criotubos (Corning Cat.430055, NY, USA). Estes criotubos foram acondicionados no aparelho Mister Froozen e mantidos em freezer -80°C por 24 horas. Em seguida, os tubos foram transferidos para nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados constituindo um banco de células, que quando necessário, foram submetidas ao descongelamento rápido no banho-maria a 37°C, e então, colocadas novamente no cultivo em placas aderentes de 100 mm.

3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), amostras das células foram colocadas em cultivo sobre lamínulas de vidro de 24mm. Após aderência nas lamínulas, as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, lavadas em tampão fosfato a 0,1M pH 7,4, e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de desidratações contínuas em álcool etílico. Por fim, as mesmas foram desidratadas a seco em ponto crítico (Balzers CPD 020), e posteriormente, as amostras foram colocadas em suporte metálico para revestimento em ouro (“sputtering” Emitech K550), e para análise dos resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435VP (CADI-FMVZ).

3.3.6 Ensaio Colorimétrico de Metabolismo Celular com MTT

O ensaio de metabolismo celular com MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) baseou-se no protocolo de Borghesi et al. (2017). Resumidamente, foram semeadas 1×10^3 células por poço em placa de 96 poços em 3 meios de cultivo distintos (DMEM High Glucose, ALPHA MEM, e HAM'S F12), conforme descrito acima. Após 24, 48

e 72 h, foram adicionados 10µL de MTT a 5 mg/mL (número de catálogo V-13154; Life Technology) e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após este tempo, a solução de MTT foi removida e 100µl de DMSO foram adicionados. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) ao comprimento de onda 540nm. Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico utilizando o programa GraphPad versão 5 (GraphPad Software, CA, USA)

3.3.7 Imunofluorescência

Para o ensaio com imunofluorescência uma placa de 24 poços foi preparada com lamínulas estéreis com células em passagem quatro de cultivo celular. Foram semeadas 1×10^4 células por poço e incubadas por 48 horas. Em seguida, o meio de cultivo foi retirado e as células fixadas em paraformaldeído 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. O protocolo foi o mesmo utilizado por Santos et al. (2017). Foram utilizados os anticorpos primários: Oct-4 (SC-4420, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Nanog (n-17, SC30331, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Vimentina (SC-73259, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), β -tubulina (SC47751, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), PCNA-3 (SC-46, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD105 (Abcam, ab53321, Cambrige, UK), CD34 (555824, BD Pharmingen, São Paulo, Brasil), CD90/Thy-1 (Abcam, ab225, Cambrige, UK), diluídos em PBS contendo 2% albumina sérica bovina na concentração de 1:50. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, e incubadas com os respectivos anticorpos secundários marcados com FITC durante 30 minutos. As células foram lavadas com PBSA, incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich, 32670-5MG-F) e, novamente lavadas e as lâminas foram montadas para visualização no microscópio de fluorescência LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) nas objetivas de 20x e 40x.

3.3.7 Citometria de Fluxo

A análise imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo. Para isso, 1×10^5 células, em passagem quatro de cultivo celular, foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, lavadas duas vezes em PBS e, a seguir, incubadas com os anticorpos primários (diluição 1:100) durante 30 minutos a 4°C. Após este período, as células foram incubadas com os anticorpos secundários (diluição 1:500) por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários para cada anticorpo primário por 30 minutos a temperatura ambiente, centrifugadas novamente e lavadas em PBS, e, então, ressuspendidas em PBS para serem analisadas por um citometro de fluxo BD

FACSAriaII (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), sendo que os controles foram realizados utilizando células não marcadas expostas apenas ou não ao anticorpo secundário não específico, e para cada amostra, 10.000 eventos foram coletados. Os anticorpos primários utilizados foram: Oct $\frac{3}{4}$ (SC-4420, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Nanog (n17, SC-30331, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) Vimentina (SC-73259, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), β -tubulina (SC-47751, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Citoqueratina 18 (SC-323291, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD34 (555824, BD Pharmingen, São Paulo, Brasil) CD73 (SC-14684, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD105 (ab53321, Cambrige, UK), CD117/c-kit (A4502, Agilent DAKO, US) e PCNA (SC-46, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe). Os dados foram analisados usando o software FlowJo versão 9.9.6.

3.3.9 Diferenciação Adipogênica e Osteogênica das Células

Aproximadamente 1×10^4 células (condição para diferenciação) e 5×10^3 (condição controle) foram cultivadas em placas de 24 poços, até a confluência 80%. Nesta ocasião, todo o meio de cultura foi removido e 1mL de meio de indução para diferenciação adipogênica (A1007001, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e diferenciação osteogênica (A1007201, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) foram adicionados nas células das condições teste e meio DMEM High Glucose acrescido de 15% SFB para células da condição controle. Após 14 dias, as células diferenciadas em adipócitos, osteócitos e seus controles tiveram seu meio removido e foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente.

As células submetidas à diferenciação adipogênica e seus controles foram coradas com a solução de Oil Red por 5 minutos, lavadas em álcool 70%, água corrente e depois contra-coradas com hematoxilina por 2 minutos. As células diferenciadas em osteócitos e os seus controles foram lavadas em água destilada e coradas com solução de nitrato de prata a 5% ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada, expostas a lâmpada de 100W por 60 minutos para coloração por Von Kossa e então, lavadas rapidamente com tiosulfato de sódio a 5% e então contra-coradas com hematoxilina.

3.3.10 Diferenciação Condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e aproximadamente 2×10^6 células ressuspensas em 2mL do meio de diferenciação condrogênica (A1007101, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Essas células foram

novamente centrifugadas e o agregado de células foi colocado na estufa. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana durante um período de 21 dias.

Após o período de diferenciação, as células foram lavadas com PBS e fixadas em 4% de paraformaldeído durante 2h. Em seguida, foram diafanizadas em banhos sucessivos de álcool etílico em concentrações crescentes (50, 70 e 90%), seguidos de 3 banhos em álcool 100% com duração de 10 minutos cada. Ao final, a amostra foi submetida a dois banhos de xilol com duração de 5 minutos, colocada em banho de paraplast líquida a 60°C em estufa seca por 30 minutos e incluídas em paraplast. Após inclusão, cortes de 5µm foram realizados em micrótomo automático e colocados sobre lâminas, e ao final, as amostras foram coradas com Tricrômio de Masson.

3.3.11 Análise do Potencial Tumorigênico

Para verificar a segurança na utilização das células derivadas da cartilagem articular, aproximadamente 1×10^6 células foram inoculadas via subcutânea no membro pélvico direito de dois camundongos Balb-c nudes machos (6-8 semanas de idade) durante 8 semanas. Semanalmente os animais foram avaliados para observar a possível formação tumoral. E Passado esse período foi realizada a eutanásia dos animais, e coletado amostras de coração, pulmão, fígado, rim e baço. Estas amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e após 48 horas, os tecidos foram processados e incluídos em parafina. Cortes de 5µm foram aderidos em lâminas histológicas e corados em hematoxilina e eosina (H.E.) e, então, analisadas no microscópio Olympus light microscope (CX 31 RBSFA).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Isolamento e Análise Morfológica das Células Progenitoras da Cartilagem Articular

Durante o cultivo primário, após 8 horas, mesmo com a digestão enzimática da cartilagem não foi possível que todo o material fosse digerido, restando *explantes* com células ainda sendo liberadas e, portanto, foram mantidos no cultivo primário.

Com 24 horas foi possível visualizar as primeiras células aderindo à placa de cultivo e, após 3 dias, visualizou-se a formação de colônias, com alta densidade de células progenitoras. As células apresentavam aspecto arredondado, e à medida que elas se posicionavam na periferia da colônia, obtinham formato mais alongado (Figura 1A).

Foi observado que as células possuíam um formato fibroblastóide, com citoplasma alongado e em algumas destas células, durante a análise morfológica foi possível notar processo de divisão celular evidenciado pela presença de dois núcleos em seu citoplasma (Figura 1B).

Após 5 dias de cultivo, as células atingiram 80% de confluência, sendo, então, congeladas e após 7 dias, foram descongeladas para verificação de sua viabilidade. E após o descongelamento as células não alteraram seu tempo de crescimento em cultivo (Figura 1C), além de manter os aspectos morfológicos fibroblastóides com citoplasma alongado e núcleo centralizado (Figura 1D). O cultivo foi expandido até a passagem sete, não apresentando nenhuma alteração em sua morfologia.

3.4.2 Ensaio Colorimétrico de Metabolismo celular com MTT

Através do ensaio com MTT foi possível eleger o meio de cultivo mais eficaz em termos de crescimento celular das células progenitoras da cartilagem articular. Dentre os meios avaliados, observou-se que o DMEM High Glucose foi o mais eficiente de todos, pois foi o que permitiu obter um crescimento contínuo e maior durante as 72 horas analisadas (figura 1E). Observou-se que o meio ALPHA MEM suplementado, promove um crescimento celular evidente nas primeiras 48 horas do cultivo, porém, após esse período, promove um retardo no crescimento celular (figura 1E). O HAM'S F-12 suplementado foi menos eficiente, pois teve uma taxa de crescimento celular inferior aos demais meios (Figura 1E).

Figura 1: Cultivo celular visualizado por microscopia de luz; microscopia eletrônica de varredura; e ensaio colorimétrico de metabolismo celular por MTT.

Fonte: Hayashi (2020)

Legenda: [A] aumento de 4x. observar colônia e população de células progenitoras; [B] aumento de 20x. Célula progenitora com citoplasma (CYT) alongado característico e seu núcleo (NUC) em processo de replicação; [C] aumento de 4x. Placa de cultivo com 90% de confluência, passível de expansão; [D] notar na microscopia eletrônica de varredura células progenitoras com morfologia homogênea, apresentando aspecto achatado, alongado e fibroblástico com núcleo (NUC) e citoplasma (CYT); [E] gráficos representando o método de avaliação de metabolismo celular por MTT utilizando três diferentes meios de cultivo.

3.4.3 Imunofluorescência

A análise de imunofluorescência foi realizada a fim de verificar a expressão dos marcadores de citoesqueleto (β -tubulina; vimentina); células-tronco mesenquimais (CD90/Thy1 e CD105); pluripotência (Nanog e Oct-4); proliferação celular (PCNA); e hematopoiese (CD34) (figura 2). Foram observadas expressões positivas para os marcadores de células-tronco mesenquimais, com exceção do CD90, citoesqueleto, pluripotência e proliferação celular. Por outro lado, não houve expressão para o marcador CD34 (Figura 2).

Figura 2: Imunofenotipagem das células progenitoras provenientes da cartilagem articular através de imunofluorescência.

Fonte: Hayashi (2020)

Legenda: Marcação dos núcleos celulares com DAPI, azul, e com FITC, em verde, para marcadores vimentina (A), β -tubulina (B), CD105 (D), Oct-4 (E), Nanog (F) e PCNA (H). Ausência de expressão do marcador CD90/Thy1 (C) e CD34 (G).

3.4.4 Citometria de Fluxo

Em relação aos marcadores de citoesqueleto, a expressão de diferentes marcadores foi analisada na passagem quatro de cultivo celular. Foi observada marcação para vimentina de 52,56%; β -tubulina de 28,49%; e de CK-18 de 21,49% (Figura 3A). Foi observada uma alta expressão do marcador mesenquimal CD105 (71,15%), e intermediária para CD73 (10%). Porém para o CD90/Thy1, a expressão foi de apenas 1,39% (Figura 3B). Quando analisado a pluripotência das células, foi possível observar uma baixa expressão de Nanog (6,56%) e Oct-4 (4,2%) (Figura 3C). Para o marcador de células precursoras hematopoiéticas, CD117/c-kit, foi encontrada uma expressão de 44,92%; enquanto para células hematopoiéticas, CD34, houve uma baixa expressão (3,59%) (Figura 3D). Em contrapartida, houve uma alta expressão do marcador de proliferação celular PCNA de 68,5% (Figura 3E).

Figura 3: Histograma da imunofenotipagem parcial das células progenitoras da cartilagem de coelhos Nova Zelândia em passagem quatro por citometria de fluxo.

Fonte: Hayashi (2020)

Legenda: Análise por citometria de fluxo com anticorpo vimentina (52,56%); B-tubulina (28,49%); CK18 (21,49%); CD105 (71,15%); CD90 (1,39%); CD73 (10%); Nanog (6,56%); Oct-4 (4,2%); CD34 (3,59%); CD117 (44,92%) e PCNA (68,5%).

3.4.5 Diferenciação Celular

As células progenitoras foram mantidas em meio de indução osteogênicas e adipogênicas por 14 dias. Na diferenciação condrogênica, corada com Tricrômio de Masson, foram observadas células que perderam sua arquitetura original para um formato similar ao de condrócitos, apresentando colágeno em sua matriz extracelular (Figura 4A). Na diferenciação osteogênica foi utilizada a coloração de Von Kossa onde foi observado que as células perderam seu formato original apresentando uma matriz extracelular com pontos de calcificação (Figura 4B). A diferenciação adipogênica corada com Oil Red apresentou células que perderam seu formato fibroblástico ficando com membrana celular mais arredondada, núcleo menos centralizado e com vacúolos em seu citoplasma (Figura 4C).

3.4.6 Análise do Potencial Tumorigênico das Células *in vivo*

Dois camundongos Balb-c nudes receberam aplicação de células progenitoras de cartilagem, a fim de verificar seu potencial tumorigênico *in vivo*. As células permaneceram inoculadas por 60 dias nos animais, os quais durante este período não apresentaram nenhuma alteração morfológica macroscópica e de peso. Após a eutanásia, uma nova avaliação macroscópica foi realizada, sendo possível observar que não houve a presença de nódulo tumoral no local da aplicação ou em outras partes do corpo (Figura 4D). Além disso, não houve nenhuma alteração microscópica no fígado, pulmão, rim, coração e baço (Figura E-I).

Figura 4: Fenotipagem das células progenitoras da cartilagem articular através das suas diferenciações e teste tumorigênico em camundongo imunodeprimido.

Fonte: Hayashi (2020)

Legenda: Em [A] diferenciação condrogênica corado com Tricromio de Masson; [B] diferenciação osteogênica corado pelo método Von Kossa; [C] diferenciação adipogênica corado através de Oil Red; [D] Camundongo Balb-c nude após a eutanásia; de [E-I] as análises histológicas realizadas coradas com hematoxilina eosina (HE): [E] baço; [F] rim com presença dos glomérulos (seta); [G] fígado apresentando um hepatócito (seta); [H] pulmão com alvéolo (seta) [I] coração com células do miocárdio (seta).

3.5 DISCUSSÃO

As células tronco mesenquimais (CTM) tem se tornado uma ferramenta importante no tratamento de lesões do tecido cartilaginoso, devido ao seu potencial de auto renovação e diferenciação em células que formam o tecido mesodermal (ABDALLAH e KASSEM, 2008).

O coelho é um animal amplamente utilizado em modelos pré-clínicos para avaliar abordagens de medicina regenerativa. Entretanto, ainda são necessários estudos para avaliar o potencial das CTMs dessa espécie para ser um modelo de tradução viável (BAKHTINA et al.,

2014). Para isso, investigamos a capacidade das células progenitoras isoladas da cartilagem de coelho como fonte de células para regeneração da cartilagem articular, com foco no estabelecimento de um protocolo para cultura e caracterização dessas células, além de avaliar seu potencial de diferenciação por imunofenotipagem e potencial de tumorigenicidade *in vivo*.

Segundo a Sociedade Internacional para terapia Celular (International Society for Cellular Therapy ISCT), um dos critérios estabelecidos para uma célula ser classificada como CTM é que ela seja isolada de uma população de células com base em sua aderência seletiva à superfície do plástico, em cultura (BYDLOWSKI et al., 2009; GALIPEAU et al., 2016). No nosso estudo, as células progenitoras de cartilagem articular foram isoladas e demonstraram adesão ao plástico, mesmo após onze sucessivas passagens e descongelamento. Além do mais, o formato fibroblástico das células permaneceu constante após todos os procedimentos, indo de acordo com os achados de Fei et al. (2013) e Borghesi et al. (2017).

Quando as células foram cultivadas em três meios de cultivo diferentes (DMEM HIGH, ALPHA MEM e HAM's F12) e avaliadas pelo ensaio colorimétrico com MTT, foi possível observar um maior metabolismo celular na presença de meio DMEM HIGH, indicando maior crescimento e viabilidade celular. Esses dados mostram que as células necessitaram de uma concentração maior de glicose para desenvolverem suas atividades metabólicas, fato esse que já foi demonstrado ser um passo crucial na adaptação de células-tronco mesenquimais após a implantação. Isso ocorre devido à incapacidade das CTMs utilizarem rapidamente as reservas intracelulares, necessitando da glicose livre como fonte primária de energia (MOYA et al., 2017).

É bem estabelecido que para uma célula ser classificada como CTM é necessário que haja a expressão de marcadores mesenquimais e negatividade para marcadores hematopoéticos (WILSON et al., 2019). Portanto, analisamos os imunofenótipos das células durante a passagem quatro, tanto por citometria de fluxo quanto por imunocitoquímica. Nossos resultados mostraram que não houve expressão do marcador hematopoiético CD34, indo de acordo com o preconizado pela ISCT, e por outros estudos que também não encontraram expressão para esse marcador em células mesenquimais isoladas de coelhos (BORGHESI et al., 2017; ZOMER et al., 2018).

Também foram avaliados marcadores de células-tronco citoesqueléticas e mesenquimais, como vimentina e CK-18, que são filamentos intermediários, e β -tubulina, uma proteína da membrana do microtúbulo (COULOMBE e OMARY, 2002; CHANG e GOLDMAN, 2004). Uma alta expressão desses marcadores foi encontrada nas células progenitoras isoladas da cartilagem de coelhos, sugerindo que nossa cultura foi heterogênea na composição,

apresentando células mesenquimais e epiteliais. Segundo Borghesi et al. (2017) células isoladas da membrana amniótica de coelhos também apresentam essa heterogeneidade. No entanto, pode-se assumir que houve prevalência de células mesenquimais, uma vez que o método utilizado para o isolamento celular utilizado foi com a enzima colagenase, e o formato fibroblastóide foi observado em toda a cultura ao longo das passagens celulares (PAROLINI et al., 2008).

Quando marcadores mesenquimais mais específicos foram avaliados em nosso estudo, notou-se uma alta expressão de CD105 e CD73, porém baixa para CD90. Esses resultados contraditórios também já foram descritos por outros autores (MARTÍNEZ-LORENZO et al. 2009; BAKHTINA et al., 2014). No estudo conduzido por Bakhtina et al. (2014) foi encontrado ausência de expressão de CD90 em células mesenquimais da medula óssea de coelhos. Além disso, Martínez-Lorenzo et al. (2009) encontraram 40,5% da expressão de CD90 e expressão negativa de CD73 e CD105 em CTMs de tecido adiposo de coelho. Segundo Zomer et al. (2018) as disparidades nos resultados podem ser devido a anticorpos inespecíficos, uma vez que os anticorpos anti-coelho não estão amplamente disponíveis. Além disso, diferenças na passagem de células usadas em cada estudo e variações nas metodologias de isolamento podem afetar os resultados (ZOMER et al., 2018).

Sabe-se que os fatores de transcrição Nanog e Oct-4 estão envolvidos na regulação da pluripotência, auto renovação e proliferação de células tronco embrionárias e adultas (MUSIAL-WYSOCKA et al., 2019). Quando esses marcadores foram analisados em nosso estudo, encontramos baixa expressão de ambos nas células progenitoras isoladas da cartilagem. No entanto, esses fatores de transcrição podem ser expressos em níveis baixos nas CTMs de passagem precoce e podem diminuir gradualmente ao longo do tempo (HAN et al., 2014). Além disso, houve alta expressão do marcador PCNA, tanto por citometria de fluxo, quanto por imunocitoquímica, mostrando que a capacidade de proliferação das células não foi afetada.

Essas características nos fazem inferir que as células progenitoras isoladas da cartilagem do coelho apresentam potencial para responder a lesão e migrar para zonas defeituosas da cartilagem (XUE et al., 2019).

Apesar de apresentarem imunofenótipo distinto, as células progenitoras provenientes da cartilagem foram capazes de se diferenciarem *in vitro* em três linhagens diferentes com características adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas. Um grande potencial de diferenciação de CTMs de coelhos também já foi demonstrado por outros autores (BAKHTINA et al., 2014; LIU et al., 2018).

Após o isolamento, caracterização e diferenciação das células progenitoras isoladas da cartilagem de coelho, que são pré-requisitos para definir uma célula-tronco, foi realizado o ensaio de potencial tumorigênico *in vivo* para avaliar a segurança do seu potencial uso na medicina regenerativa. E após 60 dias da aplicação das células em camundongos Balb-c nude, foi constatado que não houve nenhuma formação de trombo, tumor, ou qualquer alteração macro e microscópica na pele, baço, fígado, rins, coração e pulmão. Este resultado confirma descrições anteriores sobre a segurança de células mesenquimais provenientes de coelho (BORGHESI et al., 2017).

3.6 CONCLUSÃO

Os condrócitos são originários de células progenitoras mesenquimatosas e apesar da sua importância, eles têm potencial de crescimento e regeneração tecidual limitado quando lesionados, levando a uma capacidade limitada da cartilagem para recuperar em resposta a lesões. Desta forma, estudos, principalmente na área de engenharia tecidual, têm sido realizados para promover possíveis tratamentos para regeneração tecidual, fazendo com que o estabelecimento do cultivo, isolamento e caracterização das células progenitoras provenientes da cartilagem articular seja de suma importância para a evolução nesta área da pesquisa.

Neste trabalho demonstramos o isolamento e caracterização de células progenitoras de cartilagem de coelho, indicando uma fonte eficiente e segura para a Medicina Regenerativa de joelho para diferentes espécies animais.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells : from basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**, v. 106, p. 109–116, 2008.
- BAKHTINA, A., TOHFAFAROSH, M., LICHTLER, A., ARINZEH, T. L. Characterization and differentiation potential of rabbit mesenchymal stem cells for translational regenerative medicine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, 50(3), 251-260, 2014.
- BORGHESI, Jéssica.; Mario, L. C.; Carreira, A. C. O.; Miglino, M. A.; and Favaron, P. O. Phenotype and multipotency of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) amniotic stem cells. **Stem cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 27, 2017.

BYDLOWSKI, S. P., DEBES, A. A., MASELLI, L. M., JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 31(supl 1), 25-35. 2009.

CAMARERO-ESPINOSA, S.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; FOSTER, J.E.; WEDER, C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 5, p. 734-767, 2016.

CHANG, L., e GOLDMAN, R. D. "Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk." **Nature reviews Molecular cell biology** 5, no. 8. p.601. 2004

COLOMBINI, A., ORFEI, C.P., KOUROUPIS, D., RAGNI, E., DE LUCA, P., VIGANÒ, M., CORREA, D. AND DE GIROLAMO, L. Mesenchymal stem cells in the treatment of articular cartilage degeneration: New biological insights for an old-timer cell. **Cytotherapy**, v.21, n.12, p. 1179-1197, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.10.004>.

COULOMBE, PIERRE A., AND M. BISHR OMARY. "'Hard'and 'soft'principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments." **Current opinion in cell biology**, v. 14, no. 1, 110-122, 2002.

CUCCHIARINI, M.; MADRY, H.; GUILAK, F.; SARIS, D. B.; STODDART, M. J.; KOON WONG, M.; ROUGHLEY, P. J. A vision on the future of articular cartilage repair. **European Cells and Materials**, v. 27, n. SUPPL, p. 12–16, 2014.

FEI, X.; JIANG, S.; ZHANG, S.; LI, Y.; GE, J.; HE, B.; GOLDSTEIN, S.; RUIZ, G. Isolation, culture, and identification of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 67, n. 2, p. 689-694, 2013.

GALIPEAU, J., KRAMPERA, M., BARRETT, J., DAZZI, F., DEANS, R.J., DEBRUIJN, J., DOMINICI, M., FIBBE, W.E., GEE, A.P., GIMBLE, J.M. AND HEMATTI, P. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. **Cytotherapy**, v. 18(2), p.151-159, 2016. doi:10.1016/j.jcyt.2015.11.008.

HAN, S.M., HAN, S.H., COH, Y.R., JANG, G., RA, J.C., KANG, S.K., LEE, H.W. and YOUN, H.Y. Enhanced proliferation and differentiation of Oct4-and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. **Experimental & molecular medicine**, 46(6), pp.e101-e101. 2014.

HOFFMAN, B. E., NEWMAN-TARR, T. M., GIBBARD, A., WANG, S., HANNING, C., PRATTA, M. A., BOYLE, R.J., KUMAR, S., MAJUMDAR, M. K. Development and characterization of a human articular cartilage-derived chondrocyte cell line that retains chondrocyte phenotype. **Journal of cellular physiology**, 222(3), 695-702, 2010.

HORWITZ, E. M., LE BLANC, K., DOMINICI, M., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 7(5), 393-395. 2005.

KERKER, J.T., LEO, A.J. AND SGAGLIONE, N.A. Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes. **Sports medicine and arthroscopy review**, 16(4), pp.208-216. 2008.

LIU, H., WEI, L.K., JIAN, X.F., HUANG, J., ZOU, H., ZHANG, S.Z. AND YUAN, G.H. Isolation, culture and induced differentiation of rabbit mesenchymal stem cells into osteoblasts. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 15(4), pp.3715-3724, 2018. DOI: 10.3892/etm.2018.5894.

MAINIL-VARLET, P.; VAN DAMME, B.; NESIC, D.; KNUTSEN, G.; KANDEL, R.; ROBERTS, S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. **The American journal of sports medicine**, v. 38, n. 5, p. 880–90, 2010.

MAPARA, M., THOMAS, B. S., BHAT, K. M. Rabbit as an animal model for experimental research. **Dental research journal**, 9(1), 111, 2012.

MARTÍNEZ-LORENZO, M.J., ROYO-CAÑAS, M., ALEGRE-AGUARÓN, E.,

DESPORTES, P., CASTIELLA, T., GARCÍA-ÁLVAREZ, F. AND LARRAD, L. Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. **Journal of Orthopaedic Research**, v.27(11), p.1499-1507, 2009. DOI 10.1002/jor.20898.

MOYA, A., PAQUET, J., DESCHEPPER, M., LAROCLETTE, N., OUDINA, K., DENOEU, C., BENSIDHOUM, M., LOGEART-AVRAMOGLU, D. AND PETITE, H. Human mesenchymal stem cell failure to adapt to glucose shortage and rapidly use intracellular energy reserves through glycolysis explains poor cell survival after implantation. **Stem Cells**, v.36(3), p.363-376, 2018. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.2763>.

MUSIAŁ-WYSOCKA, A., KOT, M., SUŁKOWSKI, M., BADYRA, B. and MAJKA, M., Molecular and functional verification of Wharton's jelly Mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) Pluripotency. **International journal of molecular sciences**, 20(8), p.1807. 2019.

NARANDA, J., GRADIŠNIK, L., GORENJAK, M., VOGRIN, M. AND MAVER, U. Isolation and characterization of human articular chondrocytes from surgical waste after total knee arthroplasty (TKA). **PeerJ**, 5, p.e3079. 2017.

PARK, H., LEE, H. J., AN, H., & LEE, K. Y. Alginate hydrogels modified with low molecular weight hyaluronate for cartilage regeneration. **Carbohydrate polymers**, 162, 100-107, 2017.

PAROLINI O., ALVIANO F., BAGNARA G.P., BILIC G., BILIC, G., BÜHRING H.J., EVANGELISTA M., HENNERBICHLER, S., LIU, B., MAGATTI, M., MAO, N., e MIKI, T. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**.26:300–11, 2008. doi:10.1634/stemcells.2007-0594

PIERMATTEI, DONALD L.; FLO, GRETCHEN L, E DECHAMP, C.E. Diagnóstico e tratamento de fraturas, claudicação e afecções das articulações em **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. p. 1-286, 4 ed. Manole, 2009.

TAFFETANI M, RAITERI R, GOTTARDI R, GASTALDI D, VENA P. A quantitative interpretation of the response of articular cartilage to atomic force microscopy-based dynamic nanoindentation tests. **Journal of biomechanical engineering**. Jul 1;137(7):071005, 2015.

XUE, K., ZHANG, X., GAO, Z., XIA, W., QI, L. AND LIU, K. Cartilage progenitor cells combined with PHBV in cartilage tissue engineering. **Journal of translational medicine**, v.17(1), p.104, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1855-x>.

WILSON, A., HODGSON-GARMS, M., FRITH, J. AND GENEVER, P., Multiplicity of mesenchymal stromal cells: finding the right route to therapy. **Frontiers in immunology**, 10, p.1112. 2019.

ZOMER, H.D., ROBALLO, K.C., LESSA, T.B., BRESSAN, F.F., GONÇALVES, N.N., MEIRELLES, F.V., TRENTIN, A.G. AND AMBRÓSIO, C.E. Distinct features of rabbit and human adipose-derived mesenchymal stem cells: implications for biotechnology and translational research. **Stem cells and cloning: advances and applications**, v. 11, p.43, 2018.

4 ARTIGO II – UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS PROVENIENTES DA CARTILAGEM ARTICULAR NO TRATAMENTO DE LESÃO DE JOELHOS DE COELHOS NOVA ZELÂNDIA (*Oryctolagus cuniculus*)

Rafael Gonçalves Hayashi¹, Jéssica Borghesi¹, Lara Carolina Mario¹, Marcella Giancoli Kato Cano da Silva¹, Ana Carolina Silveira Rabelo¹, Maria Angélica Miglino¹, Phelipe de Oliveira Favaron¹, Ana Claudia Oliveira Carreira¹²

¹Departament of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brazil.

²NUCEL (Cell and Molecular Terapy Center), School of Medicine, Universtity of São Paulo, São Paulo, Brazil.

RESUMO

Os danos na cartilagem relacionados ao trauma ou à osteoartrite resultam no declínio funcional das articulações e representam um grande problema de saúde pública. Recentemente, o papel reparador das células-tronco mesenquimais/progenitoras na reconstrução da cartilagem articular tem chamando cada vez mais atenção. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar o potencial da regeneração da cartilagem articular lesionada com a aplicação de células progenitoras provenientes da cartilagem articular de coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), aderidas ou não à membrana de colágeno. Para tal, 12 coelhos foram submetidos à artrotomia exploratória, onde foram realizadas lesões articulares de 3mm na troclea do fêmur esquerdo dos animais que, em seguida, foram randomicamente distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo: controle da lesão (n=3); tratados com células progenitoras (n=3); tratados com membrana de colágeno (n=3); e tratados com a associação de células progenitoras e membrana de colágeno (n=3). Após 100 dias, foi realizada a eutanásia dos animais e as articulações femoro-tibio-patelar tratadas foram coletadas para análise. Nossos resultados, demonstraram que as células progenitoras provenientes da cartilagem articular possuem potencial de adesão a scaffolds biológicos e que o tratamento da lesão dessa cartilagem articular com essas células, sendo estas associadas ou não a membrana de colágeno, apresentaram uma significativa melhora no processo de cicatrização, concluindo que estas células possuem um importante papel na regeneração da cartilagem articular.

Palavras chave: osteoartrite, artrose, células tronco, scaffold, lagomorfo

4.2 INTRODUÇÃO

Durante a vida, a cartilagem articular é vulnerável a múltiplos fatores de danos, incluindo trauma, sobrecarga, envelhecimento e inflamação. Dentre esses danos, a osteoartrite (OA) ganha destaque devido a sua alta incidência e capacidade de promover distúrbios físicos e mentais (ZHANG et al., 2019; WU *et al.*, 2020). Essa doença é caracterizada por anormalidade irreversível e disfunção da cartilagem articular, bem como dos tecidos adjacentes, resultando em destruição total da articulação (CUCCHIARINI et al., 2014; SMITH et al., 2014; ZHANG et al., 2019; KOLASINSKI *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020). Dados mostram que 15 a 18% da população mundial sofrem com a OA (DAMEN et al., 2019), sendo considerada a terceira doença mais incapacitante, perdendo apenas para diabetes e demência (Osteoarthritis research Society International, 2016; Global Alliance for Musculoskeletal Health, 2019).

Atualmente, não existem medicamentos eficazes universalmente aceitos para terapia da OA, exceto para fins de alívio da dor a curto prazo (JIANG et al., 2016). Convencionalmente, tratamentos físicos como repouso, redução do peso, utilização de bengalas e aplicação de compressas de água quente, podem aliviar a dor na fase inicial da OA. No entanto, esses tipos de tratamentos são demorados e podem causar absenteísmo no trabalho, afetando drasticamente a qualidade de vida do paciente (DEROGATIS et al., 2019; JIANG et al., 2016). Além disso, alguns fármacos anti-inflamatórios podem inibir a gravidade da inflamação, mas são, em sua maioria, medicamentos esteroidais e hormonais, que podem induzir dependência grave, turbulência endócrina e obesidade (REID et al., 2002; DEROGATIS et al., 2019; JIANG et al., 2016).

Os tratamentos cirúrgicos disponíveis consistem em desbridamento da cartilagem articular, microfraturas do osso subcondral, enxerto osteocondral autólogo, osteotomias para realinhamento da articulação e transferência de peso para uma área sem lesão articular (GOU et al., 2019; PALMER et al., 2019; BOEHM et al., 2020). Em casos avançados de OA a única opção terapêutica é a substituição total ou parcial da articulação. No entanto, a cirurgia é invasiva e dolorosa, e os pacientes precisam de um longo período de recuperação com alto risco de complicações. Portanto, as terapias atuais não são efetivas na regeneração da cartilagem (JIANG et al., 2016; PALMER et al., 2019).

Em contraste, os efeitos potenciais das células-tronco mesenquimais/progenitoras (CTMs) na homeostase e remodelagem tecidual tem recebido um interesse crescente na área da medicina regenerativa (NIE et al., 2012; ZHANG et al., 2019). Sabe-se que depois de uma

lesão, a capacidade regenerativa da cartilagem defeituosa é imensamente prejudicada devido à escassez ou mau funcionamento de CTM endógena (MURPHY et al., 2002; Nie et al., 2012; ZHANG et al., 2019). Como possibilidades terapêuticas, surgiram terapias baseadas no implante exógeno de CTM, que poderiam repor as células pluripotentes na cartilagem danificada (SHI et al., 2017; NIE et al., 2012; ZHANG et al., 2019). Essa terapia com CTM tem apresentado um grande potencial na regeneração da cartilagem, melhorando os sintomas da doença com eficácia e segurança (ANKRUM et al., 2014).

As CTMs estão presentes em vários locais do corpo, incluindo medula óssea, polpa dentária, tecido adiposo, sinóvia, cordão umbilical, dentre outros tecidos (JO, LIM e Yoon, 2019). Como as CTMs podem ser coletadas de vários tecidos, muitos estudos estão agora focados em determinar a fonte celular ideal e que forneça o maior número de células com o maior potencial condrogênico (DAVIES et al., 2017; TO et al., 2019). Existem evidências que sugerem que o tipo de tecido e o local anatômico do qual as CTMs são coletadas desempenham um papel na determinação de sua capacidade de regenerar cartilagens (HATAKEYAMA et al., 2017; JO, LIM e Yoon, 2019). Estudos demonstraram que injeções intra-articulares de CTMs da medula óssea foram eficazes no tratamento da osteoartrite em modelos de ratos (YANG et al., 2015) e coelhos (SINGH et al., 2014). No entanto, até o momento, não há estudos que avaliem a cartilagem como uma fonte de CTMs e o seu potencial na recuperação da cartilagem articular lesionada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar a eficácia da aplicação *in loco* e homóloga de células progenitoras provenientes da cartilagem articular de coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), aderidas ou não à membrana de colágeno natural, na qualidade e no tipo de cicatrização da cartilagem articular lesionada.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Células Progenitoras e Membrana de Colágeno

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (número de protocolo: 1215180216).

Neste estudo foram utilizadas células progenitoras provenientes da cartilagem articular de coelhos Nova Zelândia caracterizadas por Hayashi et al., 2020 (Artigo I desta tese e submetido). Em uma placa de 96 poços foi adicionado um fragmento esferoidal (aproximadamente 5 mm de diâmetro) de membrana de colágeno suíno (Chondro-gide™, Geistlich Biomaterials, Switzerland). Em seguida, 1×10^4 de células progenitoras foram

semeadas em uma parte da placa, obtendo o grupo membrana de colágeno associada às células. Para o grupo controle foi gotejado apenas meio de cultivo na membrana. Logo após, para ambos os grupos, foi adicionado 200µl de meio de cultivo DMEM High Glicose com 15% de soro fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos e 1% de ampicilina/streptomicina. A placa foi mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e após 72 horas foi realizada a microscopia eletrônica de varredura para verificação da aderência celular na membrana de colágeno.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As membranas de colágeno do grupo controle (lesão) e associação com células foram removidas da placa de cultivo e fixadas em glutaraldeído 2,5%. Logo após, foram lavadas em tampão fosfato a 0,1M pH7,4, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de desidratações contínuas em álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Por fim, elas foram desidratadas à seco em ponto crítico (Balzers CPD 020) e colocadas em suporte metálico para revestimento em ouro (“sputtering” Emitech K550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435VP no CADI-FMVZ/USP.

4.3.3 Animais Utilizados e Protocolo Experimental

Foram utilizados um total de 12 coelhos machos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus Cuniculus*), com idade aproximada de um ano, com peso médio de 4,5kg, obtidos na granja R.G., localizada na cidade de Suzano/SP.

Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais, sendo:

I) Grupo controle lesão (L) (n=3): os animais foram submetidos à cirurgia, mas não receberam nenhum tratamento;

II) Grupo membrana de colágeno (MC) (n=3): os animais foram submetidos à cirurgia, e foram tratados com membrana de colágeno;

III) Grupo células progenitoras (CP) (n=3): os animais foram submetidos à cirurgia, e foram tratados com células progenitoras;

IV) Grupo membrana de colágeno mais células progenitoras (MCCP) (n=3): os animais foram submetidos à cirurgia, e foram tratados com a associação entre as células progenitoras e a membrana de colágeno.

4.3.4 Procedimento Cirúrgico

Com o estabelecimento do cultivo das células progenitoras e da sua capacidade de aderência à membrana de colágeno Chondro-Gide®, as células foram preparadas para a

aplicação in vivo. Para tal foram selecionados três fragmentos de 3mm de diâmetro da membrana de colágeno com células, e três amostras da membrana de colágeno sem nenhuma preparação prévia, ou seja, sem nenhuma célula aderida. Todas essas amostras foram selecionadas para aplicação homóloga in vivo em lesões cirúrgicas na tróclea femoral do joelho esquerdo de coelhos Nova Zelândia. Portanto, em três animais foi realizado apenas a lesão e nenhum tratamento. Em outros três animais foram aplicados apenas células na quantidade de 1×10^6 diluídas em 0,1mL de solução fosfato (PBS). Em outros três animais foram aplicados a membrana de colágeno com as células aderidas, e nos últimos três animais foram aplicados apenas a membrana de colágeno sem nenhuma célula aderida.

Para realização dos procedimentos cirúrgicos foi utilizado um protocolo anestésico que foi constituído de medicação pré-anestésica com 10mg/kg de cetamina (Ketamina® - Agener União Química Farmaceutica Nacional – Embu-Guaçu/SP); 0,5mg/kg de midazolam (Dormium® Agener União Química Farmaceutica Nacional – Embu-Guaçu/SP), ambos por via intra-muscular (IM); indução anestésica através com 5-8mg/kg de propofol (Provine® União Química Farmaceutica Nacional – Embu-Guaçu/SP) pela via intravenosa; bloqueio anestésico do nervo femoral e isquiático com neurolocalizador com 4mg/kg de lidocaína sem vasoconstritor (Xylestesin® - Cristália - Itapira/SP); manutenção anestésica através de inalação de isoflurano (Isoforine® - Cristália- Itapira/SP) por sonda endotraqueal; e manutenção da analgesia no pós-operatório imediato e por mais quatro dias através da administração subcutânea de 25 mg/kg de dipirona (D-500® – Zoetis Industria de Produtos Veterinários Limitada – Campinas/SP) a cada 12 horas; 0,2 mg/kg de meloxicam (Maxicam® - Ourofino Saúde Animal Limitada – Cravinhos/SP) a cada 24 horas; 5 mg/kg de tramadol (Cloridrato de tramadol – Halex istar Industria Farmacêutica – São Paulo/SP). A antibiótico terapia foi feita através de 10 mg/kg de enrofloxacin (Baytril® - Bayer S.A. – São Paulo/SP) a cada 24 horas por via subcutânea por sete dias.

As lesões na tróclea femoral esquerda dos coelhos foram realizadas através de artrotomia exploratória. O acesso cirúrgico foi com uma incisão longitudinal ao membro, lateral a patela, desde o 1/3 médio distal do fêmur até o 1/3 proximal da tíbia, incisando a aponeurose de inserção do músculo bíceps femoral e cápsula articular. Acessando internamente a cápsula articular e rebatendo medialmente a patela e ligamento patelar, foram realizadas lesões na tróclea do fêmur com um punch de 3mm. A profundidade das lesões no sulco troclear em fêmur esquerdo de cada animal foi de 1mm. Após realizadas as lesões, o animal de cada grupo recebeu seu respectivo tratamento. Para não deixar a lesão exposta foi utilizado cola cirúrgica (EVICEL® código: EVB01BR e EVB02BR) em todos os grupos experimentais. Após a

secagem da cola cirúrgica, foi realizada a sutura da cápsula articular em padrão Ford, seguindo da sutura de subcutâneo com padrão simples contínuo e pele com padrão simples separados, todas com fio cirúrgico nylon 3.0.

Após 100 dias de pós-operatório foi realizado a eutanásia desses animais, e para tal, foi utilizado protocolo anestésico com 10mg/kg de propofol e 5 mg/kg de diazepam. Em seguida, foram administrados 60 mg/kg de cloreto de potássio 19,1% (Halex Istar Indústria Farmacêutica – São Paulo/SP), e, após um minuto desta aplicação foi confirmado o óbito, e então as articulações femoro-tibio-patelar lesionadas foram coletadas para as análises.

4.3.5 Análise Histológica

Amostras do sulco troclear do local lesionado foram removidas com o auxílio de uma serra óssea cirúrgica (CÃO MEDICA, Campinas, SP, Brasil) e fixadas em 4% de paraformaldeído por 24 horas. Logo após, as amostras foram descalcificadas com 10% de ácido EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético), mais 4% de paraformaldeído, com estabilização do pH em 7,0 através da adição de hidróxido de sódio (NaOH). As amostras foram desidratadas em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%), seguido de diafanização em xilol, para então, serem embebidos em similar de parafina (Histosec) (TOLOSA et al., 2003).

Os blocos foram cortados seriados em micrótomo automático (Leica, RM2165, Germany) obtendo-se cortes de 5µm, os quais foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60°C. Após os cortes serem desparafinizados, foram corados seguindo-se a técnica rotineira de coloração de tecido, utilizando a coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.); Tricrômio de Masson; vermelho de Picrossirius; e azul de Alcian.

As amostras foram avaliadas seguindo o sistema de avaliação proposto pela International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society (ICRS II), descrito por Mainil-Varlet et al. 2010, na qual cada lâmina foi analisada levando em conta catorze critérios diferentes que avaliam a morfologia do tecido e das células, além da presença de calcificação, inflamação e vascularização. Para cada um dos critérios foi atribuído notas de 0 a 100, onde 100 representa o estado mais preservado do tecido.

4.3.7 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, onde todos os dados foram considerados paramétricos. Em seguida, foram analisados através da análise de variância *One-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, onde todos os grupos

tratados foram comparados ao grupo lesão. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão e os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas no software *GraphPad Prism* 5.0.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Aplicação das Células Progenitoras em Membrana de Colágeno

As células provenientes da cartilagem articular dos coelhos foram submetidas à técnica de microscopia eletrônica de varredura com a finalidade de visualizar a aderência das mesmas na membrana de colágeno Chondro-Gide®. Foi possível observar que após 72 horas a membrana controle, ou seja, a membrana que foi incubada apenas com meio de cultivo, apresentou somente as fibras da membrana de colágeno sem a presença de nenhuma outra estrutura (Figura 1A). Na membrana incubada com células é possível observar que essas estavam sobre e entre as fibras de colágeno na membrana (Figura 1B-F).

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura da membrana de colágeno Chondro-gide®

Fonte: Hayashi (2020)

Legenda: Microscopia Eletrônica de Varredura de Membrana de Colágeno (Chondro-Gide®). Em [A], membrana de colágeno com as fibras de colágeno (seta) sem a presença de células em sua composição. [B-F] Membrana de colágeno após a aderência de células progenitoras (seta) por 72 horas.

4.4.2 Análise Macroscópica

Durante as artrotomias foi realizada uma lesão de 3mm de diâmetro no troclea femoral esquerda dos animais de todos os grupos, como pode ser observado na figura 2A. Em seguida, foi aplicado 1×10^6 células no grupo CP (Figura 2C), além de um fragmento de 3mm de membrana de colágeno no grupo MC e membrana de colágeno mais células progenitoras no grupo M CCP (Figura 2B e D). Após 100 dias, foi realizada a eutanásia dos animais, onde foi possível observar macroscopicamente a lesão realizada durante os procedimentos cirúrgicos. Nessa região, havia uma depressão, porém sem aspecto rósea característico da vascularização

do osso subcondral que havia no momento da realização da lesão durante o procedimento cirúrgico (Figura 2A). Não foi possível observar nenhuma diferença macroscópica entre o grupo L (Figura 2E e 2I), MC (Figura 2F e 2J), CP (Figura 2G e 2K) e M CCP (Figura 2H e 2L).

Figura 2: Procedimento cirúrgico para realização das lesões na troclea femoral de coelhos e aplicação dos tratamentos, com diferentes combinações de células associadas ou não a membrana de colágeno e aspecto macroscópico dos grupos lesionados e tratados.

Fonte: Hayashi (2020)

Legenda: Artrotomia exploratória [A], onde foi realizada a lesão (seta) e subsequentemente aplicados os tratamentos com células progenitoras [B], membrana de colágeno [C], e membrana de colágeno com células progenitoras [D]. Em todos os animais é possível observar dentro do círculo amarelo os locais onde foi realizado a lesão e ocorreu o processo de cicatrização por 100 dias, sendo que [E e I] grupo lesão (L), [F e J] grupo membrana de colágeno (MC), [G e K] grupo de células progenitoras (CP), e [H e L] grupo membrana de colágeno e células progenitoras (MCCP).

4.4.3 Análise Microscópica

Feita a análise macroscópica, as amostras foram descalcificadas e processadas para análise histológica e coradas através de H.E. (figura 3A-E), Tricrômio de Masson (Figura 3F-J), azul de Alcian (figura 3K-O), e vermelho de Picrosirius (Figura 3P-T). Todos os grupos foram analisados e classificados seguindo a proposta de Mainil-Varlet et al. (2010), sendo utilizado como referência a cartilagem articular saudável, ou seja, sem a realização de qualquer tipo de lesão ou tratamento (Figura 3A, F, K e P).

Foi possível observar que o grupo lesão, no quesito avaliação morfológica do tecido, apresentou moderada alteração vista através da coloração de H.E. (Figura 3B) e vermelho de Picrosirius (Figura 3Q). Dentre as alterações encontradas, podem ser citadas falhas no preenchimento do tecido cartilaginoso; alteração no sentido das fibras de colágeno (Figura 3B); e alteração na coloração dessas fibras na luz polarizada (Figura 3Q), quando comparados à cartilagem articular saudável (Figura 3A e P). Devido a isso, foi atribuído ao grupo lesão uma média de 37,22% em relação a esse quesito. Já no grupo MC, é possível observar que houve substituição da cartilagem hialina por tecido fibroso (Figura 3C), representado pela coloração vermelha intensa (Figura 3R). Sendo assim, esse tratamento não foi eficiente em melhorar esse parâmetro, pois obteve média de 38,33%, o que foi confirmado pela análise estatística (figura 4A). Em relação ao grupo CP, observou-se que houve melhora na morfologia geral do tecido devido ao sentido e a qualidade da cartilagem hialina (Figura 3D) e sua coloração (Figura 3S). Isso fez com que houvesse significância estatística devido a média de 71,11%, quando comparado ao grupo lesão. Por fim, observou-se que a superfície articular no grupo MCCP apresentou discretas alterações na coloração da cartilagem articular à luz polarizada (Figura 3T); substituição discreta de cartilagem hialina por tecido fibroso (Figura 3E); e ausência de qualquer tipo de tecido na região de cicatriz. Embora o aspecto geral deste grupo tenha sido aparentemente pior do que o grupo de células progenitoras sua média foi de 76,11%, com significância estatística (Figura 4A).

O segundo quesito avaliado foi a coloração da matriz através da coloração de Azul de Alcian, onde se observa a diferença de intensidade do corante devido a diferença entre os glicosaminoglicanos presentes nas diversas camadas da cartilagem articular (Figura 3K-O). O grupo lesão apresentou desde discretas alterações de coloração no tecido cicatricial, com ausência da coloração mais intensa na região de superfície da cartilagem articular, até ausência da cartilagem articular com sua substituição por tecido fibroso, comprometendo assim a sua avaliação (Figura 3K). Por isso, foi atribuída uma média de 31,43% ao grupo lesão (Figura 4B).

Dentre os grupos tratados, o grupo MC também apresentou intensa substituição da cartilagem hialina por tecido fibroso (Figura 3L) e, por isso, também teve comprometimento em sua nota com média de 31,43%, portanto, não havendo diferença estatística (Figura 4B). O grupo CP foi o que apresentou as melhores características neste quesito, pois na zona de transição e de cartilagem profunda praticamente não houve alterações de coloração ao Azul de Alcian, sendo que apenas na zona superficial houve uma alteração com ausência da coloração azul intenso (Figura 3N). Por isso, a média foi de 70%, com significância quando comparado ao grupo lesão (Figura 4B). Em relação ao grupo M CCP, observou-se um bom aspecto nas camadas de transição e profunda, porém houve alterações na camada superficial, sendo caracterizadas por ausência de marcação ou alteração na coloração dos glicosaminoglicanos. Apesar dessas diferenças visíveis sua média foi de 67,14% e houve diferença estatística quando comparado ao grupo lesão (Figura 4B).

Outro critério avaliado foi a morfologia das células presentes no tecido cicatricial e, neste quesito, o grupo lesão apresentou algumas células com aspecto de condrócitos, porém sem o formato oval característico. Além disso, essas células apresentaram núcleo, citoplasma e lacunas menores do que o normal (Figura 3B), recebendo, assim, média de 53,89%. O grupo MC apresentou alterações desde o formato até o tipo de células. Essas alterações foram caracterizadas por condrócitos e lacunas menores que, por vezes, foram substituídos por células com núcleo alongado e sem a presença de lacunas permeados por tecido fibrocartilagenoso (Figura 3C). Por essas diversas alterações encontradas, a média deste grupo foi de 34%, sem relevância estatística (Figura 4C). Em contrapartida, no grupo CP foi possível observar células com tamanho e aspectos ovais normais de condrócitos por toda a extensão da cartilagem articular, com exceção da zona superficial (Figura 3D e 3I). A melhora nesse parâmetro foi comprovada pelo aumento da média para 87,78% em relação a cartilagem saudável, e com diferença estatística em relação ao grupo lesão (Figura 4C). O grupo M CCP apresentou uma moderada morfologia celular, porém nas regiões próximas a superfície articular houve substituição dos condrócitos por células com núcleos redondos a alongados sem a presença de lacunas (Figura 3E). Além disso, um dos animais apresentou ausência de tecido cicatricial, promovendo uma grande variação na média desse grupo com 57,78%, e sem relevância estatística com relação ao grupo lesão (Figura 4C).

Com relação ao critério de avaliação de agrupamento de condrócitos o grupo lesão apresentou média de 54,44%, sendo possível a observação de condrócitos agrupados discretamente entre si (Figura 3B). O grupo MC apresentou desde ausência de condrócitos substituído por células com núcleo alongado (Figura 3C e M), até a presença de agrupamento

normal de condrócitos na zona de cartilagem profunda e de transição. Porém, na zona superficial não foi observado essas características, no entanto, a média desse grupo também foi 55,71% e sem significância estatística em relação ao grupo lesão (Figura 4D). O grupo CP apresentou condrócitos agrupados de maneira semelhante ao tecido saudável (Figura 3D), com exceção da região da zona de transição (Figura 3I). Sendo assim, houve aumento da média para 83,33%, porém sem diferença estatística quando comparado ao grupo lesão (Figura 4D). Em relação ao grupo MCCP observou-se uma grande variação nesse quesito, indo desde a presença de condrócitos agrupados de maneira similar ao tecido original pela zona de cartilagem profunda e parte da zona de transição, até a ausência dessas células, fazendo com que esse grupo ficasse com média 62,22% e portanto, sem significância estatística (Figura 4D).

A arquitetura de superfície também foi avaliada e, neste quesito, o grupo lesão apresentou diferença entre os animais, sendo que, em um deles, foi observado uma boa continuidade na superfície articular porém em outro houve muita irregularidade, com substituição da cartilagem articular por tecido fibroso e até ausência de tecido cicatricial, gerando falha na continuidade da superfície articular. Por isso, esse grupo ficou com média de 56,11%. O grupo MC apresentou alteração na composição da cartilagem articular, sendo caracterizado pela presença de tecido fibroso ao invés de cartilagem hialina, além da ocorrência de falhas no processo de cicatrização, ocasionando ausência de tecido na região de lesão (Figura 3D). Devido a esses fatores, foi atribuída uma média de 65% para esse grupo (Figura 4E). No grupo CP observou-se discreta irregularidade na arquitetura da superfície (Figura 3I), porém com preenchimento de cartilagem articular por toda a extensão da lesão (Figura 3D). E devido a média de 91,11%, houve significância estatística quando comparada ao grupo lesão (Figura 4E). O grupo MCCP apresentou algumas falhas de preenchimento de cartilagem articular e irregularidades em algumas regiões da superfície articular (Figura 3E, J e T), porém sua média foi 92%, com relevância estatística comparado ao grupo lesão (Figura 4E).

Em relação ao critério integração basal, o grupo lesão apresentou discretas falhas na união entre a zona profunda e zona de cartilagem calcificada (Figura 3B). Além disso, foi possível visualizar a não união da zona de cartilagem calcificada com o osso subcondral (Figura 3G), sendo atribuído, portanto, uma média de 49,44%. O grupo MC também apresentou falhas de integração devido a presença de tecido fibroso, porém sem falhas grandes de integração basal (Figura 3C, H e M), mas mesmo com uma média de 63,89% não houve diferença estatística quando comparado ao grupo lesão (Figura 4F). Já o grupo CP apresentou uma boa integração basal, com apenas pequenos pontos com ausência de cartilagem articular (Figura 3D). Esse tratamento foi eficaz em melhor esse quesito, promovendo aumento da média para 80%,

apresentando relevância estatística quando comparado ao grupo lesão (Figura 4F). No grupo MCCP foi observado uma boa integração basal e, com isso seja estatisticamente significante, devido a média de 88,89% (Figura 4F).

A formação da marca de maré foi um critério em que o grupo lesão apresentou uma perda na definição da mesma devido a presença de tecido fibroso em dois animais (Figura 3G e L). No entanto, em um deles foi possível visualizar a marca de maré separando o tecido cicatricial da zona de transição e zona de cartilagem profunda (Figura 3B), ficando com média 26,67%. No grupo MC foi observado uma intensificação na coloração onde acredita-se que seria a região de zona de transição para a zona profunda, mas a presença de tecido fibroso dificulta essa afirmação (Figura 3C, H e M). Sendo assim, foi atribuída ao grupo uma média de 38,89%, onde não houve diferença estatística em relação ao grupo lesão (Figura 4G). O grupo CP apresentou uma má definição da marca de maré (Figura 3 D e I) em relação ao grupo saudável (Figura 3A e F), fazendo com que ele ficasse com uma média de 58,89% com relevância estatística em relação ao grupo lesão (Figura 4G). No grupo MCCP, a marca de maré foi a mais definida dentre todos os grupos tratados, porém com uma pequena diminuição de sua visualização em relação a cartilagem saudável e, por isso, este grupo ficou com média 93,89% com relevância estatística (Figura 4G)

Na avaliação das anormalidades do osso subcondral o grupo lesão apresentou por vezes o destacamento da zona de cartilagem calcificada do osso subcondral (Figura 3G), fazendo com que a média fosse 60% (Figura 4H). O grupo MC obteve uma média semelhante à do grupo lesão 62,22% (Figura 4H) devido a falhas no preenchimento e vascularização intensa desta região (Figura 3H). O grupo CP apresentou uma boa avaliação, porém com alterações na intensidade das colorações realizadas (Figura 3D, I e N), fazendo com que a média ficasse em 86,67%, mas sem significância estatística (Figura 4H). O grupo MCCP foi o melhor de todos apresentando uma média de 90,56% com relevância estatística em relação ao grupo lesão (Figura 4H).

Nos quesitos inflamação e presença de calcificação/ossificação da cartilagem articular não foi observado nenhuma alteração em nenhum dos grupos experimentais e, portanto, todos os grupos tiveram média de 100%, com exceção do grupo MC no critério de avaliação de presença de calcificação que teve média de 96,67% mas sem significância estatística em relação ao grupo lesão (Figura 3A-T e 4I e J).

Em relação ao critério vascularização foi observado que no grupo lesão um dos animais apresentou intensa vascularização no tecido cicatricial (Figura 3G), ocasionando uma média de 70%, ao passo que nos animais do grupo MC foi observado a presença de moderados vasos

sanguíneos (Figura 3H), fazendo com que a média deste grupo tenha ficado em 63,13%. No grupo CP e MCCP a média foi de 100%, porém nenhum dos grupos tratados apresentou relevância estatística em relação ao grupo lesão (Figura 4K).

Na avaliação de superfície o grupo lesão apresentou grandes alterações variando desde má formação da superfície articular no tecido cicatricial (Figura 3A), até mesmo substituição da cartilagem hialina por tecido fibroso. Devido ao comprometimento da estrutura da superfície articular, a média foi de 39,44%. No grupo MC, também houve alterações como ausência de tecido cicatricial; substituição da cartilagem hialina por tecido fibroso; e ausência da zona superficial da cartilagem articular (Figura 3C, H e M), sendo atribuído uma média de 21,67% (Figura 4L). Neste quesito o grupo CP apresentou apenas irregularidades discretas (Figura 3I e N), fazendo com que este grupo ficasse com média 82,22% e significância estatística em relação ao grupo lesão. Já o tratamento com MCCP apresentou moderada irregularidade na superfície articular (Figura 3J e O), e uma média 26,11%.

A avaliação da zona de transição e profunda foi baseada na coloração de vermelho de Picrosirius, sendo que no grupo saudável foi possível visualizar, à luz polarizada, regiões escuras devido a presença de proteoglicanos e ausência de fibras de colágeno (Figura 3P). E em relação ao grupo lesão foi possível observar a coloração amarelo/avermelhada (Figura 3Q), que representa a presença de fibras de colágeno ao invés de proteoglicanos, fazendo com que esse grupo tivesse uma média de 37,78% (Figura 4M). O grupo MC apresentou um tecido cicatricial de coloração avermelhada (Figura 3R) sem a presença de proteoglicanos em parte da região lesionada, e por isso este grupo teve média de 51,11%, sem relevância estatística. O grupo CP teve a melhor avaliação neste quesito em comparação com os demais tratados, pois em seu processo de cicatrização houve redução de coloração a luz polarizada, especialmente na região de zona superficial (Figura 3S). A média desse grupo foi de 83,33%, apresentando significância quando comparado ao grupo lesão (Figura 4M). O grupo MCCP também apresentou tecido cicatricial de coloração avermelhada, porém em menor intensidade e, por vezes, com colorações verdes e amarelas, mas sem a indicação da presença de proteoglicanos e ausência de colágeno (Figura 3T), e por isso, a média desse grupo foi 52,22%, e não houve diferença estatística em relação ao grupo lesão (Figura 4M).

O último critério avaliado segundo a ICRS II foi a avaliação geral da cartilagem quanto ao tecido cicatricial. O grupo lesão apresentou média de 27,22% nesse quesito, devido a falhas de preenchimento de tecido cicatricial e, também, porque quando ocorreu reparação tecidual as fibras de colágeno estavam em sentido diferente do tecido saudável (Figura 3A, B e Q). Além disso, houve substituição intensa de cartilagem hialina por um tecido fibroso em toda região de

lesão, inclusive comprometendo a superfície articular que deve ser lisa e com ausência de vasos sanguíneos (Figura 3G e L). Em relação ao grupo MC foi atribuída uma média de 33,89%, uma vez que apresentou a mesma substituição do colágeno por tecido fibroso, e a mesma falha de preenchimento de tecido cicatricial que o grupo lesão. O grupo CP apresentou apenas irregularidades na superfície articular devido a alterações de glicosaminoglicanos e colágeno na zona superficial. No entanto, foi o melhor grupo na avaliação geral, com média de 79,44% e diferença significativa em relação ao grupo lesão (Figura 4N). O grupo MCCP ficou com uma média de 69,44%, com relevância estatística (Figura 4N) pois dois animais deste grupo apresentaram um processo cicatricial moderado nas regiões de zona de transição, profunda e cartilagem calcificada (Figura 3E, O e T).

Figura 3: Análise microscópica comparativa da cartilagem articular normal, lesão e grupos tratados.

Fonte: Hayashi (2020)

Legenda: Análise histológica da articulação saudável [A, F, K e P], grupo L- controle [B, G, L e Q], grupo MC- membrana de colágeno [C, H, M e R], grupo CP- células progenitoras [D, I, N e S] e grupo MCCP- tratado com células progênicas mais membrana de colágeno [E, J, O e T]. Colorações: H.E. [A-E], Tricrômio de Masson [F-J], Azul de Alcian [K-O] e vermelho de Picrosirius [P-T].

Figura 4: Análise histológica dos tecidos controle e tratados, seguindo o sistema de avaliação proposto pela International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society (ICRS).

Fonte: Hayashi (2020).

Legenda: As lâminas da cartilagem dos joelhos foram avaliadas seguindo 14 critérios, sendo eles [A] morfologia do tecido; [B] coloração da matriz; [C] morfologia celular; [D] agrupamentos de condrócitos; [E] arquitetura da superfície; [F] integração basal; [G] formação da marca de maré; [H] anormalidade do osso subcondral; [I] inflamação; [J] calcificação; [K] vascularização; [L] avaliação da superfície; [M] avaliação da zona de transição; [N] avaliação geral. L: grupo lesão; MC: grupo membrana de colágeno; CP: grupo células progenitoras; e MCCP: grupo membrana de colágeno e células progenitoras. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão sendo considerado diferença significativa quando $p \leq 0,05$. Asterisco (*) sinaliza diferença entre o grupo lesão e o grupo tratado que está assinalado.

4.5 DISCUSSÃO

Os tratamentos para reparo e regeneração da cartilagem articular ainda são insatisfatórios para o retorno da atividade normal da articulação devido à má capacidade regenerativa desse tecido. O campo da engenharia de tecidos da cartilagem articular, que visa reparar, regenerar e/ou melhorar a funcionalidade da cartilagem articular lesionada ou doente, despertou intenso interesse e possui grande potencial para melhorar a função após a cicatrização da articulação lesada (ZHANG et al., 2019). Desta forma, a utilização da engenharia tecidual tem crescido como alternativa no tratamento de lesões de cartilagem articular tanto em humanos quanto em animais e através de diversos tipos de scaffolds (FU et al., 2018).

A membrana de colágeno do tipo I/III provenientes de suíno (Chondro-gide®) é um tipo de scaffold que tem sido utilizada através de métodos cirúrgicos nos quais os seus resultados tem se mostrado promissores segundo Girolamo et al., (2018), que tem obtido resultados melhores na cicatrização da cartilagem articular após oito anos de aplicação da membrana do que sem a utilização desta. Adicional a isso, dentre os métodos utilizados, o uso da membrana Chondro-gide associada a células progenitoras tem se tornado uma opção viável (ZHANG, CHI e XIANG., 2016; RICHTER, ZECH e MEISSNER., 2016).

Em humanos, lesões cartilaginosas geralmente são resultantes da osteoartrite, e muitos estudos em experimentação animal são feitos para simular essas lesões. Comumente utiliza-se animais com tamanhos suficientes para a realização de pequenos procedimentos cirúrgicos em que normalmente é realizada a retirada de parte da cartilagem articular para criação de um defeito cartilaginoso na área de carga do joelho, sendo o coelho um modelo animal muito utilizados para esta lesão articular, pois são animais grande o suficiente e que apoiam a maior parte do peso corpóreo sobre o membro pélvico (TOGHRAIE et al., 2011; DONG et al., 2013), e por isso, nosso estudo utilizou este modelo animal para indução da lesão da cartilagem articular e posteriormente verificação da eficácia dos tratamentos escolhidos.

A lesão articular foi feita com auxílio de um punch de 3mm de diâmetro na tróclea femoral do membro pélvico esquerdo com remoção do tecido cartilaginoso. Esta escolha se deve ao fato que este tipo de lesão é semelhante ao que ocorre na doença, e por isso, esta lesão já foi utilizada em outros estudos com o mesmo propósito, pois este modelo correlaciona as doenças na cartilagem articular que tem indicação de tratamento cirúrgico (ZHANG et al 2019).

A partir do modelo da lesão pôde-se iniciar pesquisas para tentar realizar o reparo do tecido, o que ocasionaria em um adequado retorno da função da cartilagem articular. Muitos estudos utilizam a microfratura como opção de tratamento, pois através da formação de coágulos devido ao sangramento do osso subcondral as células inflamatórias e outras

provenientes dos vasos sanguíneos auxiliariam no processo cicatricial. Porém a limitação desta técnica é que no local da lesão ocorre a substituição dos condrócitos e sua matriz extracelular por fibrocartilagem, o que gera um conforto apenas temporário ao paciente. Devido à baixa eficácia desta técnica e o avanço da terapia celular, novos tratamentos foram e estão sendo preconizados com o intuito de realizar a reparação tecidual (CARON, 2010; UMLAUF et al., 2010; MCILWRAITH, 2012; JESSOP et al., 2019; SINGH, 2019).

Em relação à terapia celular, as células mesenquimais foram o tipo celular mais estudado, uma vez que estas células são consideradas imunoprivilegiadas, pois não expressam ou possuem uma expressão mínima de MHC de classe I e II, o que as tornam propícias para os tratamentos em diferentes indivíduos (RYAN et al., 2005; DOMINICI et al., 2006). Desta forma, diversos trabalhos foram realizados neste sentido como (KRISTJÁNSSON e HONSAWEK, 2017; BURNES et al., 2018; SATUÉ et al., 2019; ZHANG et al., 2019) em reparo de cartilagem articular. Contudo, estes trabalhos não fizeram com que o tecido retornasse à condição original.

De acordo com isso, nosso trabalho realizou a obtenção de células provenientes de cartilagem articular de coelho, as quais, apesar de serem progenitoras apresentaram em sua caracterização características mesenquimais, sendo, portanto, consideradas imunoprivilegiadas devido às suas características mesenquimais, e além disso, possuíam características de origem condrocitárias. Porém a literatura demonstra que o uso de células tronco não é totalmente eficaz, por isso a engenharia tecidual torna-se necessária, e através dela novos tratamentos estão surgindo com diversos tipos de scaffolds os quais possuem o intuito de melhorar a regeneração tecidual (GIROLAMO et al., 2018).

Em relação aos *scaffolds* utilizados na engenharia tecidual, a membrana de colágeno Chondro-gide tem sido aplicada para fornecer sustentação e suporte para as células no tecido lesionado (FILHO et al., 2012). Então, com intuito de melhorar a eficácia e utilizar as características de ambos os tipos de tratamento citados acima, realizamos a associação de células com o uso desta membrana. Desta forma verificamos que as células foram capazes de se aderirem à membrana em cultivo em 72 horas, e, posteriormente, serem aplicadas *in vivo* nos animais lesionados. A importância da associação destes dois métodos deve-se ao fato de a membrana fornecer uma estrutura para as células poderem crescer, se expandir e se concentrarem no local em que são necessárias (SUN; TITUSHKIN e CHO, 2006). Foi observado em nosso trabalho, através da microscopia eletrônica de varredura que as células permaneceram na membrana, o que proporciona adesão e fixação dessas células no local da lesão, garantindo seus efeitos parácrinos *in loco*.

As lesões realizadas na cartilagem articular foram somente até a região superficial do osso subcondral. Isso deve ao fato de lesões que chegam à profundidade de osso subcondral poderem apresentar alterações no processo de cicatrização devido aos vasos sanguíneos ali presentes como na cicatrização por microfratura (STEADMAN, KARA e SCHLEGEL, 2003; MCILWRAITH, 2012; VOLZ et al., 2017; GIROLAMO et al., 2018)

Com base na diversidade de estudos preliminares e suas variadas taxas de sucesso, testamos três diferentes grupos de tratamentos, os quais foram avaliados seguindo critérios descritos por Mainil Varlet et al. (2010) para testar a eficácia de cada um deles. Observamos em nossos resultados que para o grupo CP houve diferença significativa para itens de avaliação de morfologia celular dos condrócitos, avaliação de superfície e avaliação da zona de transição. O que nos leva a inferir que os animais tratados com CP tiveram uma cicatrização em sentido da superfície da cartilagem articular para sua região mais profunda, e adicional a isso, a morfologia celular dos condrócitos indicam que as células progenitoras possuem características celular semelhantes a dos condrócitos presentes em tecidos saudáveis (MEIRELLES, et al., 2006; SEOL et al., 2012).

Na sequência observamos que o grupo de tratamento MCCP apresentou diferença estatística para o itens de anormalidades do osso subcondral, o que demonstra que a membrana faz a fixação das células progenitoras na região da lesão evitando a dispersão das mesmas no organismo, desta forma as células aderidas previamente a membrana permanecem durante a reparação tecidual da cartilagem articular, mantendo sua uniformidade a partir da zona profunda, e por isso, esta associação aparenta ser benéfica, uma vez que estudos demonstram sua eficácia, pois células aderidas a membrana tendem a ter uma melhor reparação do tecido lesionado, quando comparado com outros tratamentos individuais, assim como demonstrados por Behrens et al., (2006).

Por fim, o grupo CP e MCCP tiveram diferença significativa para a morfologia celular, a coloração da matriz, a arquitetura de superfície, a integração basal, a formação da marca de maré e a avaliação geral, quando comparados ao grupo lesão (L), o que demonstra que todos eles têm incomum a utilização das células isoladas ou associadas a membrana de colágeno. Com isso, podemos inferir que essas características se devem a capacidade das células progenitoras se diferenciarem em condrócitos, pois tivemos uma melhor definição das estruturas da cartilagem articular.

Com base nos critérios de avaliação utilizados, os itens vascularização, inflamação, calcificação e agrupamento de condrócitos não apresentaram diferenças estatística. Isso pode ser justificado uma vez que o processo de vascularização não ocorre em cartilagens saudáveis,

sendo, portanto, estas células derivadas de cartilagem adaptadas as baixas concentrações de oxigênio e nutrientes, não necessitando de vascularização, e, portanto, não ocorrendo processo inflamatório. O processo de calcificação nas lesões não foi observado, uma vez que a lesão induzida foi até a região da transição entre a zona de cartilagem calcificada e osso subcondral. Com isso, esse resultado era o esperado devido apenas à regeneração da cartilagem articular. E, por fim, o agrupamento de condrócitos não foi observado, contudo o processo de proliferação encontrava-se presente, o que demonstra que as células estavam em processo de crescimento indicando o possível processo futuro de agrupamento (BRITTBERG et al., 1996; SUN et al., 2010; MAPP e WALSH, 2012).

4.6 CONCLUSÃO

O tratamento com células progenitoras, se mostrou eficaz na restauração das características morfológicas da cartilagem. Além disso, quando estas células foram cultivadas em associação com a membrana de colágeno demonstraram uma boa capacidade de adesão na membrana e conseqüentemente nas regiões mais profundas da lesão articular em modelo experimental em coelhos.

REFERÊNCIAS

- ANKRUM J.A., ONG J.F., KARP J.M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nat Biotechnol.** v32: 252-60. 2014.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. D. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 1ª edição, São Paulo: Editora Manole, v. 2, p.1-331. 2003.
- BEHRENS, P., BITTER, T., KURZ, B. and RUSSLIES, M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)—5-year follow-up. **The knee**, 13(3), pp.194-202. 2006.
- BOEHM, E., MINKUS, M., and MARKUS SCHEIBEL, M. Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal articular cartilage defects of the humeral head. **Journal of shoulder and elbow surgery** 29, no. 1 2020: 2-11. 2020.

BRITTBERG, M., NILSSON, A., LINDAHL, A., OHLSSON, C. and PETERSON, L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, 326, pp.270-283. 1996.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. 2a ed. **Diagnosis and Management of Lameness in the Horse**. Ed. Elsevier. p. 655. 2010.

CUCCHIARINI, M.; MADRY, H.; GUILAK, F.; SARIS, D. B.; STODDART, M. J.; KOON WONG, M.; ROUGHLEY, P. J. A vision on the future of articular cartilage repair. **European Cells and Materials**, v. 27, p. 12–16, 2014.

DAMEN, J., VAN RIJN, R.M., EMANS, P.J., HILBERDINK, W.K., WESSELING, J., OEI, E.H. AND BIERMA-ZEINSTRAS, S.M Prevalence and development of hip and knee osteoarthritis according to American College of Rheumatology criteria in the CHECK cohort. **Arthritis research & therapy**, 21(1), p.4. 2019.

DAVIES, B.M., SNELLING, S.J., QUEK, L., HAKIMI, O., YE, H., CARR, A. AND PRICE, A.J. Identifying the optimum source of mesenchymal stem cells for use in knee surgery. **Journal of Orthopaedic Research**, 35(9), pp.1868-1875. 2017.

DEROGATIS, M., ANIS H.K., SODHI, N., EHIOBOBO J. O., CHUGHTAI, M., BHAVE, A., and MONT, M.A. Non-operative treatment options for knee osteoarthritis. **Annals of translational medicine**. 7, no. Suppl 7, 2019.

DOMINICI, M.L.B.K., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F.C., KRAUSE, D.S., DEANS, R.J., KEATING, A., PROCKOP, D.J. AND HORWITZ, E.M Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 8(4), pp.315-317. 2006.

DONG, J., JIANG, D., WANG, Z., WU, G., MIAO, L. AND HUANG, L. Intra-articular delivery of liposomal celecoxib–hyaluronate combination for the treatment of osteoarthritis in rabbit model. *International journal of pharmaceutics*, 441(1-2), pp.285-290. 2013.

FILHO, M.M.D.C.C., DOCA, D., COHEN, M. and FERRETTI, M. Atualização no diagnóstico e tratamento das lesões condrais do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 47(1), pp.12-20. 2012.

FU, N; DONG, T.; MENG, A.; MENG, Z.; ZHU, B.; LIN, Y. Research Progress of the Types and Preparation Techniques of Scaffold Materials in Cartilage Tissue Engineering. **Current Stem Cell Research & Therapy**. V.13, p 583-590, 2018. DOI:10.2174/1574888X12666170718152611

GIROLAMO, L., JANNELLI, E., FIORUZZI, A., AND FONTANA, A. Acetabular Chondral Lesions Associated with Femoroacetabular Impingement Treated by Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis or Microfracture: A Comparative Study at Eight-Year Follow-Up. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**. p. 1-12, 2018. doi:10.1016/j.arthro.2018.05.035

Global Alliance for Musculoskeletal Health - <https://gmusc.com/who-we-are/understanding-the-problem/>. Acessado 15/01/2020.

GOU, G.H., TSENG F.J., WANG S.H., CHEN, P.J., SHYU, J.F., WENG, C.F. and PAN, R.Y. Autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the knee: A meta-analysis and systematic review. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery** 2019.

HATAKEYAMA, A., UCHIDA, S., UTSUNOMIYA, H., TSUKAMOTO, M., NAKASHIMA, H., NAKAMURA, E. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cell derived from hip joints: a comparative analysis with a matched control knee group. **Stem Cells Int**. 9312329. 2017. doi: 10.1155/2017/9312329

JESSOP, Z.M., MANIVANNAN, S., ZHANG, Y., THORNTON, C.A., NARAYAN, R. and WHITAKER, I.S. Tissue specific stem/progenitor cells for cartilage tissue engineering: A systematic review of the literature. **Applied Physics Reviews**, 6(3), p.031301. 2019.

JIANG, Y.; YOUZHI, C.; WEI, Z.; ZI, Y.; CHANGCHANG, H.; TONG, T.; PING, L.; SHUFANG, Z.; DANTE, N.; ROCKY, S. T.; WEI, O. H. Human cartilage-derived progenitor cells from committed chondrocytes for efficient cartilage repair and regeneration. **Stem cells translational medicine**, v. 5, n. 6, p. 733-744, 2016.

JO, C.H., LIM, H.J. AND YOON, K.S. Characterization of Tendon-Specific Markers in Various Human Tissues, Tenocytes and Mesenchymal Stem Cells. **Tissue engineering and regenerative medicine**, 16(2), pp.151-159. 2019.

KOLASINSKI, S. L., NEOGI, T., HOCHBERG, M.C., OATIS, C., GUYATT, G., BLOCK, J., CALLAHAN, L. American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. **Arthritis & Rheumatology**, 2020.

KRISTJÁNSSON, B., and HONSAWEK, S. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. **World journal of orthopedics**, 8(9), 674, 2017.

MAINIL-VARLET, P.; VAN DAMME, B.; NESIC, D.; KNUTSEN, G.; KANDEL, R.; ROBERTS, S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. **The American journal of sports medicine**, v. 38, n. 5, p. 880–900, 2010.

MAPP, P.I. AND WALSH, D.A. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, 8(7), p.390. 2012.

MCILWRAITH, C.W., FRISBIE, D.D. AND KAWCAK, C.E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. **Bone & joint research**, 1(11), pp.297-309. 2012.

MEIRELLES, L. DA S., CHAGASTELLES, P.C. AND NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, 119(11), pp.2204-2213. 2006.

MURPHY J.M., DIXON K., BECK S., FABIAN D., FELDMAN A., AND BARRY F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. **Arthritis Rheumatol** 46(3):704–13. 2002. doi: 10.1002/art.10118.

NIE, H., LEE, C.H., TAN, J., LU, C., MENDELSON, A., CHEN, M., EMBREE, M.C., KONG, K., SHAH, B., WANG, S. and CHO, S. Musculoskeletal tissue engineering by endogenous stem/progenitor cells. **Cell and tissue research**, 347(3), pp.665-676. 2012.

Osteoarthritis Research Society International -
https://www.oarsi.org/sites/default/files/docs/2016/oarsi_white_paper_oa_serious_disease_121416_1.pdf Acessado 15/01/2020.

PALMER, J. S., MONK, A.P., HOPEWELL, S., BAYLISS, L.E., JACKSON, W., BEARD, D.J. and PRICE, A.J. Surgical interventions for symptomatic mild to moderate knee osteoarthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v.7, 2019.

REID M.C., SHENGELIA R., PARKER S.J. Pharmacologic management of osteoarthritis-related pain in older adults. **Am J Nurs**. v.112: S38-43, 2012.

RICHTER, M., ZECH, S. AND MEISSNER, S.A. Matrix-associated stem cell transplantation (MAST) in chondral defects of the ankle is safe and effective–2-year-followup in 130 patients. **Foot and Ankle Surgery**, 23(4), pp.236-242. 2017.

RYAN, J.M., BARRY, F.P., MURPHY, J.M. and MAHON, B.P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of inflammation**, 2(1), p.8. 2005.

SATUÉ, M., SCHÜLER, C., GINNER, N. AND ERBEN, R.G. Intra-articularly injected mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration, but do not permanently engraft in distant organs. **Scientific reports**, 9(1), pp.1-10. 2019.

SEOL, D., McCABE, D.J., CHOE, H., ZHENG, H., Yu, Y., JANG, K., WALTER, M.W., LEHMAN, A.D., DING, L., BUCKWALTER, J.A. AND MARTIN, J.A., 2012. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. **Arthritis & Rheumatism**, 64(11), pp.3626-3637.

SINGH, Y.P., BANDYOPADHYAY, A. AND MANDAL, B.B. 3D Bioprinting Using Cross-Linker-Free Silk–Gelatin Bioink for Cartilage Tissue Engineering. **ACS applied materials & interfaces**, 11(37), pp.33684-33696. 2019.

SHI W.J., TJOUMAKARIS F.P., LENDNER M., FREEDMAN K.B. Biologic injections for osteoarthritis and articular cartilage damage: can we modify disease? *Phys Sportsmed* 2017;45(3):203–23. doi: 10.1080/00913847.2017.1357421.

SINGH A., GOEL S.C., GUPTA K.K., KUMAR M., ARUN G.R., PATIL H. The role of stem cells in osteoarthritis: An experimental study in rabbits. **Bone Joint Res.** v.3: 32-7. 2014.

SMITH, T.O., PURDY, R., LISTER, S., SALTER, C., FLEETCROFT, R. and CONAGHAN, P. Living with osteoarthritis: a systematic review and meta-ethnography. **Scandinavian journal of rheumatology** v.43, no. 6, p.441-452. 2014.

STEADMAN, J.R., KARAS, S.G. AND SCHLEGEL, T.F. The Microfracture Technique in the Treatment of. **The journal of knee surgery**, 16(2), pp.83-86. 2003.

SUN, S., TITUSHKIN, I. and CHO, M. Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus. **Bioelectrochemistry**, 69(2), pp.133-141. 2006.

SUN, Y., FENG, Y., ZHANG, C.Q., CHEN, S.B. AND CHENG, X.G. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. **International orthopaedics**, 34(4), pp.589-597. 2010.

TOGHRAIE, F.S., CHENARI, N., GHOLIPOUR, M.A., FAGHIH, Z., TORABINEJAD, S., DEHGHANI, S. and GHADERI, A. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. *The Knee*, 18(2), pp.71-75. 2011

UMLAUF, D., FRANK, S., PAP, T. and BERTRAND, J. Cartilage biology, pathology, and repair. **Cellular and molecular life sciences**, 67(24), pp.4197-4211. 2010.

VOLZ, M., SCHAUMBURGER, J., FRICK, H., GRIFKA, J. and ANDERS, S. A randomized controlled trial demonstrating sustained benefit of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis over microfracture at five years. **International orthopaedics**, v.41(4), pp.797-804. 2017.

WU, C.L., HARASYMOWICZ, N.S., KLIMAK, M.A., COLLINS, K.H. and GUILAK, F. The Role of Macrophages in Osteoarthritis and Cartilage Repair." **Osteoarthritis and Cartilage** 2020. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.12.007>.

YANG X., ZHU T.Y., WEN L.C., CAO Y.P., LIU C., and CUI Y.P. Intraarticular Injection of Allogenic Mesenchymal Stem Cells has a Protective Role for the Osteoarthritis. **Chin Med J (Engl)**. v.128: pp.2516-23. 2015.

ZHANG, R., MA, J., HAN, J., ZHANG, W., & MA, J. Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis. **American journal of translational research**, 11(10), 6275. 2019.

ZHANG, J., ZHANG, D., WU, C., LIU, A., ZHANG, C., JIAO, J. and SHANG, M. Icariin-conditioned serum engineered with hyaluronic acid promote repair of articular cartilage defects in rabbit knees. **BMC complementary and alternative medicine**, 19(1), pp.1-9. 2019.

5 CONCLUSÃO FINAL

A partir do exposto, concluímos que as células progenitoras provenientes da cartilagem articular apresentam características de células tronco mesenquimais. Além disso, em tratamento de lesões articulares, quando aplicadas isoladas, ou associadas à membrana biológica (Chondro-gide®), possuíram boa capacidade de regeneração, levando a um processo de cicatrização com um tecido muito semelhante ao da cartilagem original. Desta forma, estas células de coelho, podem ser vistas como uma possibilidade para a aplicação em terapia celular. Contudo estudos posteriores são necessários para compreensão dos seus mecanismos de ação após a aplicação.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; MOGGIO, A.; BUSSOLATI, B. Concise review: stem/progenitor cells for renal tissue repair: current knowledge and perspectives. **Stem cells translational medicine**, v. 2, n. 12, p. 1011-1019, 2013.

BAKHTINA, A., TOHFAFAROSH, M., LICHTLER, A., ARINZEH, T. L. Characterization and differentiation potential of rabbit mesenchymal stem cells for translational regenerative medicine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, 50(3), 251-260, 2014.

CAMARERO-ESPINOSA, S.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; FOSTER, J.E.; WEDER, C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 5, p. 734-767, 2016.

COLOMBINI, A., ORFEI, C.P., KOUROUPIS, D., RAGNI, E., DE LUCA, P., VIGANÒ, M., CORREA, D. AND DE GIROLAMO, L. Mesenchymal stem cells in the treatment of articular cartilage degeneration: New biological insights for an old-timer cell. **Cytotherapy**, v.21, n.12, p. 1179-1197, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.10.004>.

CUCCHIARINI, M.; MADRY, H.; GUILAK, F.; SARIS, D. B.; STODDART, M. J.; KOON WONG, M.; ROUGHLEY, P. J. A vision on the future of articular cartilage repair. **European Cells and Materials**, v. 27, p. 12–16, 2014.

DeRogatis, Michael, Hiba K. Anis, Nipun Sodhi, Joseph O. Ehiorobo, Morad Chughtai, Anil Bhave, and Michael A. Mont. Non-operative treatment options for knee osteoarthritis. **Annals of translational medicine** 7, no. Suppl 7, 2019.

Fu, N; Dong, T.; Meng, A.; Meng, Z.; Zhu, B.; Lin, Y. Research Progress of the Types and Preparation Techniques of Scaffold Materials in Cartilage Tissue Engineering. **Current Stem Cell Research & Therapy**. V.13, p 583-590, 2018. DOI:10.2174/1574888X12666170718152611.

Global Alliance for Musculoskeletal Health - <https://gmusc.com/who-we-are/understanding-the-problem/>. Acessado 15/01/2020.

HOFFMAN, B. E., NEWMAN-TARR, T. M., GIBBARD, A., WANG, S., HANNING, C., PRATTA, M. A., BOYLE, R.J., KUMAR, S., MAJUMDAR, M. K. Development and characterization of a human articular cartilage-derived chondrocyte cell line that retains chondrocyte phenotype. **Journal of cellular physiology**, 222(3), 695-702, 2010.

JIANG, Y.; YOUZHI, C.; WEI, Z.; ZI, Y.; CHANGCHANG, H.; TONG, T.; PING, L.; SHUFANG, Z.; DANTE, N.; ROCKY, S. T.; WEI, O. H. Human cartilage-derived progenitor cells from committed chondrocytes for efficient cartilage repair and regeneration. **Stem cells translational medicine**, v. 5, n. 6, p. 733-744, 2016.

KERKER, J.T., LEO, A.J. AND SGAGLIONE, N.A. Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes. **Sports medicine and arthroscopy review**, 16(4), pp.208-216. 2008.

MEIRELLES, L. DA S., CHAGASTELLES, P.C. AND NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, 119(11), pp.2204-2213. 2006.

NARANDA, J., GRADIŠNIK, L., GORENJAK, M., VOGRIN, M. AND MAVER, U. Isolation and characterization of human articular chondrocytes from surgical waste after total knee arthroplasty (TKA). **PeerJ**, 5, p.e3079. 2017.

Osteoarthritis   Reseach   Society   International   -
https://www.oarsi.org/sites/default/files/docs/2016/oarsi_white_paper_oa_serious_disease_121416_1.pdf Acessado 15/01/2020.

PAROLINI O., ALVIANO F., BAGNARA G.P., BILIC G., BILIC, G., BÜHRING H.J., EVANGELISTA M., HENNERBICHLER, S., LIU, B., MAGATTI, M., MAO, N., e MIKI, T. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**.26:300–11, 2008. doi:10.1634/stemcells.2007-0594

PARK, H., LEE, H. J., AN, H., & LEE, K. Y. Alginate hydrogels modified with low molecular

weight hyaluronate for cartilage regeneration. **Carbohydrate polymers**, 162, 100-107, 2017.

REID M.C., SHENGELIA R., PARKER S.J. Pharmacologic management of osteoarthritis-related pain in older adults. **Am J Nurs.** v.112: S38-43, 2012.

SEOL, D., McCABE, D.J., CHOE, H., ZHENG, H., Yu, Y., JANG, K., WALTER, M.W., LEHMAN, A.D., DING, L., BUCKWALTER, J.A. AND MARTIN, J.A., 2012. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. **Arthritis & Rheumatism**, 64(11), pp.3626-3637.

TAFFETANI M, RAITERI R, GOTTARDI R, GASTALDI D, VENA P. A quantitative interpretation of the response of articular cartilage to atomic force microscopy-based dynamic nanoindentation tests. **Journal of biomechanical engineering**. Jul 1;137(7):071005, 2015.

ZHANG, R., MA, J., HAN, J., ZHANG, W., & MA, J. Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis. **American journal of translational research**, 11(10), 6275. 2019.