MARCOS VINÍCIUS MENDES SILVA

**Reparo de lesões induzidas na articulação
femorotibiopatelar de ovinos através do implante de
biomateriais associados à células-tronco de polpa dentária
humana**

São Paulo

2015

MARCOS VINÍCIUS MENDES SILVA

**Reparo de lesões induzidas na articulação femorotibiopatelar de ovinos
através do implante de biomateriais associados à células-tronco de polpa
dentária humana**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Co-orientadora:

Dr^a. Graciela Conceição Pignatari

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3183
FMVZ

Silva, Marcos Vinícius Mendes

Reparo de lesões induzidas na articulação femorotibiopatelar de ovinos através do implante de biomateriais associados à células-tronco de polpa dentária humana / Marcos Vinícius Mendes Silva. -- 2015.
79 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Cirurgia, São Paulo, 2015.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

Co-orientador: Dr^a. Graciela Conceição Pignatari.

1. Lesão osteoarticular. 2. SHED. 3. Terapia celular. 4. Biomateriais. 5. Ovinos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Reparo de lesões induzidas na articulação femorotibiopatelar de ovinos através do implante de biomateriais associados à células-tronco de polpa dentária humana", protocolado sob o nº 1736/2009, utilizando 4 (quatro) carneiros, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/8/2009.

We certify that the Research "Repair of induced lesion in femorotibiopatelar's joints in sheep through use of biomaterial associated with human dental pulp stem cell", protocol number 1736/2009, utilizing 4 (four) sheep, under the responsibility Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/19/2009.

São Paulo, 14 de dezembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Marcos Vinícius Mendes

Título: Reparo de lesões induzidas na articulação femorotibiopatelar de ovinos através do implante de biomateriais associados à células-tronco de polpa dentária humana

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. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“Acredite no seu sonho, lute por ele, e quando tiver a oportunidade aproveite como se fosse um momento único em sua vida, e acredite ele pode não ser único, mas vai ser inesquecível.”

(Heitor Levinski)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Ilza Rosa Silva, pelo exemplo de vida e determinação. Muito obrigado por todos os seus ensinamentos, incentivos e apoio na minha vida.

Sem você eu não conseguiria ter concluído mais esta etapa importante da minha vida. Obrigado por me proporcionar mais esta alegria. Fácil não foi, mas saiba que esta vitória é nossa.

Obrigado mãe por sempre acreditar em mim!

Aos meus irmãos Fernando Cézar Mendes Silva e Wilze Lidyane Mendes Silva por todo amor, carinho e por sempre terem apoiado os meus estudos. Eu sei o quanto vocês também torceram para que este momento chegasse. Obrigado por todo apoio!

AGRADECIMENTOS

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante.”
(Paulo Coelho)

À Deus por ter me conduzido e proporcionado forças para enfrentar os obstáculos com os quais eu me deparei e ter me agraciado com vida e saúde. Eu sei que estes momentos não foram poucos, mas sempre me deu a mão, me iluminou e indicou o caminho a seguir.

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela oportunidade da realização da pós-graduação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, pela convivência, compreensão e amizade durante todos estes anos de pós-graduação. Eu agradeço por ter confiado em mim desde o primeiro momento que a conheci e acreditado em nossa pesquisa. Cada dia eu aprendo um pouco mais com você. Obrigado pela paciência e dedicação comigo, pois soube unir sabedoria para me orientar durante estes anos.

À Dra. Graciela Conceição Pignatari pela co-orientação e ensinamentos durante estes anos de pós-graduação. Sem a sua dedicação, compreensão e apoio este trabalho não teria se concretizado. Obrigado pela dedicação comigo, pois sempre que eu precisei você foi prestativa e me auxiliou no que era necessário.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Dr. Daniel Seitz, que em parceria com a *Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterilien/ Universität Bayreuth e Biocer entwicklungs*, da Alemanha, produziram os biomateriais utilizados neste trabalho, obrigado pela cooperação e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Stefano Carlo Filipoo Hagen pelos ensinamentos, conselhos e por sempre me prestar auxílio quando necessário. Obrigado por todas as palavras de incentivo e apoio nos momentos difíceis que eu enfrentei na pós-graduação, pelos momentos descontraídos e pelas explicações durante a realização dos exames ultrassonográficos, com certeza foram únicos. Sem os seus ensinamentos eu não teria compreendido um pouco mais do universo da imagem.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, pela colaboração, compreensão e sugestões durante a execução deste trabalho. Sempre solícito e prestativo quando eu precisei. Obrigado pela realização dos exames artroscópicos e pelo apoio neste projeto.

À Profa. Aline Magalhães Ambrósio e o seu grupo por terem realizado os procedimentos anestésicos para que este trabalho fosse concretizado. Obrigado por todo apoio prestado e por estar sempre disposta a ajudar.

Ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani por ter disponibilizado alojamento para os animais deste projeto no início do desenvolvimento do mesmo.

À Dra. Silvana Maria Unruh pelo apoio prestado desde o meu mestrado até o término do doutorado. Todo auxílio prestado nas questões burocráticas para a realização dos exames radiográficos e, posteriormente, realizando os mesmos foram importantes. Obrigado pelo constante apoio, dedicação e por sempre ter acreditado neste trabalho.

À funcionária, Marta Maria da Silva Righetti pela paciência, dedicação e amizade, pois com você aprendi muito. Os primeiros processamentos histológicos eu aprendi com você. Nós

sofremos juntos, mas obrigado pelos ensinamentos. Sempre animada, disposta a ensinar e com palavras otimistas. Obrigado por tudo!

À Isabella Rodrigues Fernandes e Fabiele Baldino Russo por todos os ensinamentos repassados durante estes anos e por terem me ajudado bastante, principalmente no início do projeto, na parte laboratorial. Valeu por todo o apoio!

Ao Matheus Levi Tajra Feitosa pelo auxílio no início deste trabalho, definindo protocolos e assuntos relevantes para a realização do mesmo.

Ao Rafael Garabet Agopian pela amizade durante estes anos de pós-graduação e por ter contribuído na realização deste trabalho. Sempre prestativo, procurando ajudar sem medir esforços, jamais negou um favor quando precisei. Obrigado pelos conselhos, momentos de descontração, ensinamentos e oportunidades que pode me proporcionar até mesmo fora da pós-graduação. Eu sempre serei grato.

A secretária, Jaqueline Martins de Santana, Maria Fátima Lourdes Minari, aos técnicos Diogo Nader Palermo, Edinaldo Ribas farias e Rose Eli Grassi Rici pelo convívio diário e ensinamentos.

À funcionária, Ana Paula Silva (Paulinha) por ter me acompanhado durante esta trajetória e pelas conversas descontraídas. Obrigado pelos bons momentos de convivência.

Aos funcionários da pós-graduação, Dáurea Taciana e Henrique Narducci por toda a paciência e prestatividade durante estes anos.

À Karla Patrícia Cardoso Araújo, pelos anos de convivência desde a graduação até a pós-graduação. Obrigado por ter me proporcionado a oportunidade de conhecer a minha orientadora e compreender o mundo da pós-graduação. Desde a primeira vez que vim para São Paulo sempre me acolheu, me incentivou e apoiou em todos os momentos aqui vividos. Você sempre é muito especial!

À Caroline Pinho Winck (Carol) e Sílvia Amélia Ferreira Lima (Amélia) pela compreensão, confiança e amizade sincera durante todos os anos de pós-graduação. Sempre me acompanharam em vários momentos desta conclusão dizendo palavras sábias. Obrigado pela amizade que nós temos até hoje, mesmo depois de finalizado a pós-graduação.

À Adriana Pinheiro da Franca, pelo convívio e amizade. Obrigado por todo incentivo prestado, desde o momento que nós conhecemos. Passamos algumas dificuldades juntos na pós, mas também vitórias. Amizade verdadeira permeia por toda vida.

Ao José Luiz Nogueira (Nogueira), pela amizade leal, conselhos e palavras sábias nos momentos necessários. Valeu por todo o apoio prestado e pelos momentos de convívio durante a pós-graduação!

À Renata Avancini Fernandes Nogueira (Re), pelos bons momentos, sinceridade, amizade e disponibilidade. Sempre me socorrendo quando necessário. Obrigado pela ajuda em vários momentos que eu precisei. Valeu mesmo pelas conversas, momentos de alegria, ensinamentos e oportunidades que pode me proporcionar fora da pós-graduação. Sabe que eu sempre serei grato por tudo e cada dia eu venho aprendendo mais com você.

À Larissa Fernandes Nogueira (Lalá) e Luiza Fernandes Nogueira (Lulú) por alegrar todos os dias que às vejo. Vocês são duas crianças iluminadas e abençoadas por Deus. Lalá sempre esperta e inteligente e Lulú a minha mais nova afilhada que é uma alegria constante. Gosto muito de vocês!

Ao Kaio Barros Bezerra (Kaiera's), pelo convívio diário na república, amizade e apoio durante esta fase da minha vida. Passamos por momentos complicados durante a pós-graduação, mas sobrevivemos e soubemos ajudar um ao outro. Sempre disposto e auxiliando no que fosse preciso. Obrigado por tudo que tem feito por mim e principalmente pela contribuição em meu trabalho. A sua participação foi essencial.

À Dilayla Kelly de Abreu (Isaura), pelos bons momentos vivenciados durante a pós-graduação e pela amizade verdadeira que concretizamos durante estes anos. Sempre animada, prestativa, sem tempo para quase nada, mas jamais esquece dos amigos. Valeu por tudo que fez e vem fazendo por mim. Você é muito especial.

À Bruna Pacheco (Enrica's) e Thiago, pelo convívio, momentos de diversão e pela amizade. Ainda teremos muitas histórias para contar.

À Franceliusa Delys (Natal) pelo convívio durante uma etapa da pós-graduação. Mesmo sendo de estados diferentes a nossa amizade foi concretizada aqui em São Paulo. Obrigado por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e conversas descontraídas. Como tivemos e teremos histórias para contar... Só os nossos cafezinhos pela tarde sabem... Valeu por cada momento vivenciado e também por ser organizadora das nossas excursões. São Paulo ficou pequena para nós.

Ao Marcos Palmeira por ter vivenciado junto comigo alguns anos da minha pós-graduação, sejam momentos alegres e difíceis. Eu sei que aproveitamos muito bem São Paulo. A sua amizade é para a vida toda. Valeu por tudo!

Ao Carlos A. P. Sarmiento e Evander Bueno, pelos momentos vivenciados durante a pós-graduação.

Às alunas de iniciação científica, Jennifer Farias, Thaís Trevisan e Fernada Lye Watari obrigado por confiarem nos meus ensinamentos e terem permitido eu participar dos projetos que vocês executaram. Cada momento foi muito importante. Valeu por sermos amigos até hoje.

À Lara Carolina Mario e Jéssica Borghesi pelos momentos de descontração e conversas. O nosso convívio foi muito importante e no decorrer do tempo concretizamos uma boa amizade. Vocês puderam me fazer recordar e vivenciar um pouco de Minas Gerais. Valeu mesmo por toda a receptividade e pelo convívio durante estes últimos anos de pós-graduação.

À Maria Angélica Machado Arroyo (M.A.) pelo apoio, bate-papos, confraternizações; cada momento foi importante durante nossa convivência na pós. Obrigado!

À Katia de Oliveira Pimenta Guimarães pelo convívio no laboratório, momentos de descontração, conversas e pela amizade sincera. Obrigado pela ajuda nos momentos finais deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação nos últimos anos: Paulo Ramos, Amilton César, Miguel Lobo, Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda, Luciano Cesar Pereira Campos Leonel, Gabriela de Souza Reginato (Gabi), Adriana Raquel da Anunciação, Jodonai Barbosa, Renan Olio, Juliana Ferrão, Bruna Andrade, Dailiany Orechio, Thais Borges Lessa, Carol Martins e Rafael Senos saibam que cada momento convívio com vocês foi muito importante para que eu conseguisse vencer esta etapa da minha vida. Cada um do seu jeito, mas todos com pensamentos positivos. Obrigado pela convivência!

Ao João Leonardo Mendonça e ao Raphael Cruz e à todos do laboratório de células-tronco (LCT) pelo convívio no laboratório e pelo profissionalismo de cada um.

Ao Mario Reyes Aleman e Joel Alexis Ferreira Ojeda pelo convívio diário nestes últimos anos. Eu sei que esta república constituída por um mineiro, um mexicano e um paraguaio nunca mais será a mesma. Apesar dos idiomas diferentes conseguimos nos entender bastante. Valeu!

Aos meus tios Andrey Márcio Silva, Wilson Ferreira, Eni, Marlene Rosa e primos Wilney Fernando Silva, Stefania Aparecida Silva, Suiara Leilanny Silva Gomes, Vitória Cristina Rodrigues Silva, Vitor Emanuel Rodrigues Silva que mesmo distantes sempre me incentivaram na conclusão de mais esta etapa da minha vida. Obrigado por todo apoio proporcionado. Eu sei que a distância às vezes torna-se um fator limitante de estarmos juntos em momentos especiais, mas tudo foi em prol de algo melhor. Quantas alegrias e angústias eu pude compartilhar com vocês, mas nada me desanimou com a ajuda de vocês.

Aos meus afilhados Pedro Henrique Gonçalves Pereira (Peu) e Anamaria de Souza Mendes por sempre entenderem a minha ausência, devido à distância, em prol da realização dos meus sonhos. Vocês são especiais e jamais eu me esqueço de vocês.

À Priscila Gonçalves Pereira (Pri), que mesmo sendo alguns anos mais nova do que eu, sempre ouviu minhas histórias vivenciadas durante a pós-graduação. Cada momento difícil me incentivava a continuar lutando pelos meus ideais e jamais desistir. Todas as nossas conversas foram válidas e importantes. Você é muito especial!

À Fernanda Maria de Jesus e José Antonino Neto pelo apoio, carinho e por terem me acompanhado em mais esta etapa. São pessoas que sempre contribuíram na minha formação como pessoa. Todos os conselhos sempre foram importantes. Valeu!

Ao Leonardo Gonçalves Pereira, Maria Inês e Pedro Ramos, pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos mineiros Alexandre Eusébio, Talita Pina, Tania Mara Pina e Rejane Souto que mesmo distante sempre me apoiaram e torceram para que este momento se concretizasse. Eu sei que realmente acompanharam, torceram e sofreram juntos comigo durante todos os anos de pós-graduação. Sem as palavras sábias de vocês muitas coisas teriam sido mais difíceis. Anos de amizade é resumido assim mesmo. Vocês sempre serão inesquecíveis!

À minha madrinha Elita, por ter me incentivado, por sempre comemorar as minhas vitórias e torcer pelo meu sucesso.

À minha avó Ana Rosa de Jesus (Nena) e ao meu avô Antônio Ferreira Silva, pelo amor, preocupação, incentivo constante e por sempre estarem ao meu lado. Quantas histórias já ouviram durante a minha pós-graduação... Vocês são exemplos de vida. Amo vocês!

À Roberta Oliveira Macedo, Adriana Fernandes e Tatiana Dalcun, pela amizade, desde a graduação e mesmo distante sempre estiveram torcendo pelas minhas vitórias. A distância jamais vai nos separar, pois a amizade prevalece.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas durante o mestrado e doutorado.

Às pessoas que conheci em São Paulo, obrigado pelo convívio, constante incentivo e apoio.

Às pessoas que aqui não estão citadas, mas que me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho, obrigado.

Muitas pessoas entra e sai em sua vida ao longo dos anos, mas só os verdadeiros amigos deixam impressões em seu coração. Cada um de vocês é muito importante para mim.

*“A Grande Conquista é o resultado de pequenas vitórias que passam despercebidas”
(Paulo Coelho)*

RESUMO

SILVA, M. V. M. **Reparo de lesões induzidas na articulação femorotibiopatelar de ovinos através do implante de biomateriais associados à células-tronco de polpa dentária humana.** [Repair of induced lesion in femorotibiopatelar's joints in sheep through use biomaterial associated with human dental pulp stem cell]. 2015. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Lesões na cartilagem articular do joelho são patologias frequentes e geralmente causadas por traumas. Apesar de algumas serem assintomáticas, essas alterações osteocondrais podem evoluir para degeneração da cartilagem articular e osteoartrite. Uma da degeneração progressiva da cartilagem articular leva a osteoartrite (OA), comumente sendo a articulação femorotibiopatelar a mais afetada. Como os tratamentos convencionais para OA não são curativos, apenas paliativos, a terapia celular com células-tronco (CT) desponta como alternativa. Neste trabalho utilizamos células-tronco de dente decíduo esfoliado (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth* - SHED), cultivadas em associação com um biomaterial, para tratar lesões osteocondrais provocadas em joelhos de ovinos. Quatro defeitos osteocondrais foram cirurgicamente produzidos para testar quatro condições: 1) SHED associada ao biomaterial, 2) somente biomaterial, 3) somente SHED e 4) nenhum tratamento (controle). Os ovinos foram acompanhados clinicamente e através de exames radiográfico, US e artroscopia, por 120, 190, 365 e 730 dias até a eutanásia. Os resultados revelaram que o tratamento com biomaterial em associação com SHED, produziu reparo similar à estrutura cartilágnea a partir de 190 dias, apresentando características de cartilagem adjacente. Entretanto, apesar dos resultados positivos em relação ao reparo da lesão osteocondral, não foi possível afirmar se a melhora deveu-se a diferenciação direta das SHED para células presentes na cartilagem ou se foi um efeito parácrino das mesmas. Em tempo, não foi observada rejeição e nenhuma reação adversa ao implante celular xenogênico durante o período experimental.

Palavras-chave: Lesão osteoarticular. SHED. Terapia celular. Biomateriais. Ovinos.

ABSTRACT

SILVA, M. V. M. **Repair of induced lesion in femorotibiopatellar's joints in sheep through use biomaterial associated with human dental pulp stem cell.** [Reparo de lesões induzidas na articulação femorotibiopatelar de ovinos através do implante de biomateriais associados à células-tronco de polpa dentária humana]. 2015. 79 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Articular cartilage injuries on the knee are frequent pathologies and usually caused by trauma. Although some are asymptomatic, these changes may evolve into osteochondral articular cartilage degeneration and osteoarthritis. A progressive degeneration of articular cartilage leads to osteoarthritis (OA), being femorotibiopatellar joint the most affected one. As conventional treatments for OA are not curative, but palliative, cell therapy with stem cells (SC) stands out as an alternative. In this work we used stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), grown in association with a biomaterial, to treat osteochondral lesions on sheep's knees. Four osteochondral defects were surgically produced to test four conditions: 1) SHED associated with the biomaterial, 2) only the biomaterial, 3) only SHED and 4) no treatment (control). The sheep were followed clinically and through radiographic exams, US and arthroscopy, for 120, 190, 365 and 730 days until euthanasia. The results showed that treatment with biomaterial in combination with SHED produced repair similar to the cartilage structure from 190 days, showing cartilage adjacent features. However, despite the positive results in relation to the repair of osteochondral lesion it was not possible to say whether the improvement was due to direct differentiation of SHED for cells present in cartilage or was a paracrine effect. In time, there was no rejection and no adverse reaction to the xenogenic cell implant during the trial period.

Keywords: Osteoarticular injury. SHED. Cell therapy. Biomaterials. Sheep.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	CARTILAGEM ARTICULAR E SUAS PATOLOGIAS	18
2.2	CÉLULAS-TRONCO (CT)	21
2.3	CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA	23
2.4	BIOMATERIAIS	25
2.5	MODELO ANIMAL.....	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)	30
4.1.1	Isolamento, Cultivo e expansão das SHED	30
4.1.2	Congelamento das células	31
4.2	BIOMATERIAL.....	31
4.3	PREPARO DAS SHED ASSOCIADAS AO BIOMATERIAL, SOMENTE BIOMATERIAL E SHED PARA O IMPLANTE NOS OVINOS	33
4.4	OBTENÇÃO DO MODELO ANIMAL DE LESÃO OSTEOCONDRA.....	34
4.4.1	Animais.....	34
4.4.2	Protocolo Anestésico	34
4.4.3	Procedimento Cirúrgico para indução da lesão	35
4.5	TERAPIA CELULAR UTILIZANDO AS SHED HUMANAS ASSOCIADAS OU NÃO AO BIOMATERIAL	35
4.5.1	Cuidados pós-operatórios	37
4.6	MONITORAMENTO DOS ANIMAIS APÓS TERAPIA CELULAR.....	37
4.6.1	Monitoramento da evolução clínica	37
4.6.2	Exame Radiográfico	38
4.6.3	Exame Ultrassonográfico	38
4.6.4	Exame de Artrosopia	39
4.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO FEMOROTIBIOPATELAR DOS OVINOS SUBMETIDOS A TERAPIA CELULAR	40
4.7.1	Eutanásia.....	40
4.7.2	Descalcificação Óssea	40
4.7.3	Procedimentos histológicos para a análise do material submetido ao processo de descalcificação	41

4.7.4	Colorações	42
4.7.4.1	Coloração de Hematoxilina-Eosina.....	42
4.7.4.2	Coloração de Tricromo de Masson.....	42
4.7.4.3	Coloração de Picrosírius.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)	44
5.2	MONITORAMENTO CLÍNICO DOS ANIMAIS TRATADOS COM SHED ASSOCIADOS OU NÃO AO BIOMATERIAL.....	45
5.2.1	Evolução Clínica	45
5.2.2	Exame Radiográfico	45
5.2.3	Exame Ultrassonográfico	47
5.2.4	Exame Artroscópico	50
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO FEMOROTIBIOPATELAR DOS ANIMAIS TRATADOS COM SHED ASSOCIADOS OU NÃO AO BIOMATERIAL.....	53
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICE	79

1 INTRODUÇÃO

Os defeitos osteocondrais do joelho acometem toda a espessura da cartilagem e são geralmente de origem traumática, podendo ocorrer isoladamente ou em conjunto com lesões ligamentares ou meniscais. Contudo, apesar de algumas lesões condrais serem assintomáticas, elas podem evoluir para a degeneração da cartilagem e osteoartrite (BUCKWALTER, 1998).

Lesões osteocondrais degenerativas e progressivas são caracterizadas por alterações na cartilagem articular e tecido ósseo, sendo a articulação do joelho a mais afetada (BENNEL; HINMAN, 2011; ROI et al., 2015; CHEN et al., 2015). Um desses processos é conhecido como osteoartrite (OA), um processo inflamatório degenerativo que acomete a articulação e o osso subcondral (SCHMINKE; MIOSGE, 2014; CHEN et al., 2015).

Principalmente pela dor e pela diminuição progressiva da mobilidade, a OA é uma doença que afeta a qualidade de vida dos pacientes (ARLIANI et al. 2014; ROI et al., 2015). É a afecção mais prevalente em toda população mundial (RADL, 2005; RICCI; COIMBRA, 2006; SCHMINKE; MIOSGE, 2014), podendo afetar de 6% a 12% da população adulta e mais de um terço das pessoas com mais de 65 anos de idade (MICHAEL; SCHLUTER-BRUST; EYSEL, 2010; HUANG et al., 2015). Fatores como a obesidade, o mau alinhamento articular, o envelhecimento e o decréscimo de força muscular podem causar o surgimento da OA de joelho (RADL, 2005; MILAGRES et al., 2006; HUANG et al., 2015).

Considerando que dentro das alternativas terapêuticas utilizadas atualmente a OA não tem cura, um tratamento não convencional, como a terapia celular utilizando células-tronco (CT), pode ser especialmente interessante (NOLAN et al., 2008). As CT possuem a capacidade de originar várias linhagens celulares, de responder a estímulos externos, possuem potencial de auto-renovação e proliferação. São classificadas de acordo com as suas fontes de obtenção, cada uma com características diferentes quanto à sua contribuição no desenvolvimento e no funcionamento do organismo (CAPLAN, 2005; MAUMUS et al., 2013).

Populações de CT foram isoladas também da polpa dentária humana, de dentes decíduos esfoliados (*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth* - SHED) e se tornaram fonte de células-tronco mesenquimais (MSC) de fácil obtenção

e cultivo, sendo altamente proliferativas e com capacidade de diferenciação (MIURA et al., 2003; KERKIS et al., 2006; HUANG, GRONTHOS; SHI, 2009; CASAGRANDE, 2011; CHEN et al., 2012; KASHYAP, 2015).

Alguns estudos têm demonstrado interessantes resultados aliando a terapia celular com CT à engenharia de biomateriais, que funcionam como suporte para as células, melhorando a sobrevivência após o transplante, auxiliando na regeneração de tecidos danificados e o aumentando a biocompatibilidade (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008; WILLIAMS, 2008; KATARI; PELOSO; ORLANDO, 2014).

Neste trabalho, nossa hipótese é a de que as SHED são capazes de regenerar lesões osteocondrais produzindo cartilagem. Para tanto, procuramos aliar a terapia celular com SHED e biomaterias no tratamento de lesões osteocondrais induzidas na região femorotibiopatelar de ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARTILAGEM ARTICULAR E SUAS PATOLOGIAS

O tecido conjuntivo é constituído por células e matriz extracelular, composta principalmente por colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas. Existem dois tipos de tecido conjuntivo que conferem uma estrutura rígida ao organismo formando o esqueleto, o tecido ósseo e o cartilaginoso (HUBER; TRATTNIG; LINTNER, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

No tecido cartilaginoso há condrócitos e material extracelular abundante, que constitui a matriz. O tecido cartilaginoso não contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, e se nutre pelos capilares do conjuntivo envolvente, o pericôndrio. Entretanto, a cartilagem que reveste a superfície dos ossos nas articulações móveis não tem pericôndrio e recebem nutrientes do líquido sinovial das cavidades articulares. Apesar de não conter vasos linfáticos ou nenhuma terminação nervosa, a cartilagem pode ser considerada como uma estrutura altamente complexa, que suporta grandes exigências do ponto de vista funcional (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Nas superfícies dos ossos das articulações sinoviais há o revestimento por cartilagem articular, que atua promovendo uma superfície de baixa fricção, além de transmitir e distribuir força na articulação (HUBER; TRATTNIG; LINTNER, 2000). A matriz extracelular da cartilagem articular tem 60% de seu volume total constituído por água (SHU et al., 1995), enquanto a matriz orgânica é composta principalmente entre 80 a 90% por fibras colágenas tipo II, VI, IX, X e XI, 30% de proteoglicanas e 10% de proteínas não colágenas (BUCKWALTER; MANKIN, 1998; ODA, 2005).

A cartilagem articular é do tipo hialina e se divide em quatro camadas: zona superficial, zona média, zona profunda, osso subcondral e osso esponjoso (Figura 1). Essas camadas se diferem pela composição e tipo de proteoglicanos presentes, além da disposição das fibras colágenas (WONG; CARTER, 2003). Sendo assim, variações na quantidade de colágenos possuem influência no comportamento mecânico da cartilagem articular.

Os colágenos são responsáveis pela resistência à força de tensão e os proteoglicanos atuam nas forças de compressão (O'CONNOR; ORFORD; GARDNER, 1988; SCHMIDT et al., 1990). As fibras de colágenos existentes na zona superficial são finas, compactas e dispostas de forma paralela à superfície articular (CHU, 2001). Tanto na zona superficial e média, as fibras possuem tamanho médio e estão dispostas obliquamente a superfície articular. Uma malha densa é formada neste local, sendo composta por proteoglicanos interligados. Já na zona profunda encontra-se fibras de colágeno espessas, organizadas perpendicularmente à superfície articular. Estas penetram a zona calcificada e óssea subcondral, juntando a cartilagem ao osso subcondral (ODA et al., 2007) (Figura 1).

Figura 1 – Desenho representativo das camadas que compõem a articulação, com o tecido cartilaginoso e ósseo

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda – Desenho da região do joelho, evidenciando o sulco troclear femoral e em aumento as camadas que compõem a articulação, com o tecido cartilaginoso e suas camadas e o tecido ósseo com suas camadas.

Existem diversas doenças que atingem os ossos e a cartilagem, seja por causa do desgaste físico ou pelo processo de envelhecimento. Uma dessas doenças que afetam a cartilagem é a OA, lesão osteocondral degenerativa complexa, resultante da degeneração da cartilagem articular e óssea, redução do espaço articular e alterações da membrana sinovial (BENNEL; HINMAN, 2011; SCHMINKE; MIOSGE, 2014).

A OA pode ser considerada primária, quando aparece sem qualquer causa desencadeante aparente, tal como o envelhecimento, e secundária quando decorrem de lesões prévias, micro e macrotraumáticas repetidas de uma articulação,

que se dá através de deformidades congênitas ou alguma doença sistêmica adjacente, podendo ser também secundária em alguns pós-operatórios, desalinhamento do joelho e osteonecrose asséptica (MICHAEL; SCHLUTER-BRUST; EYSEL, 2010). A atividade física e os esportes de alto impacto podem ser a causa de 49% dos defeitos na cartilagem de origem secundária, devido ao aumento das forças físicas, forçando o atleta a trabalhar próximo da sua capacidade máxima (FRITZ et al., 2008; ARLIANI et al., 2014; ROI et al., 2015).

As evidências clínicas da OA são caracterizadas por dor articular, limitação de movimento, crepitação, efusões ocasionais e variáveis graus de inflamação. O processo patológico da doença ativa afeta todos os tecidos da articulação, levando a uma alteração metabólica local, alterando o processo de reparo tecidual e culminando com uma insuficiência articular (SHARMA; ELISSEEFF, 2004; ARLIANI et al., 2014; CHEN et al., 2015).

A idade é o fator de risco principal para OA comprometendo a capacidade de regeneração da cartilagem articular (OTTE, 2000). Alguns fatores de risco adicionais são o excesso de peso, determinadas desordens metabólicas, má nutrição, instabilidades comuns, junção-sobrecarga e ferimentos da cartilagem (MILAGRES et al., 2006).

A medida que a idade avança, aumentam as chances de desenvolver OA, sendo que aproximadamente 13,9 % de adultos acima de 25 anos e 33,6 % de adultos acima de 65 anos tem OA clínica em pelo menos uma articulação (CDC, 2013).

A prevalência de OA sintomática do joelho em dois estudos do Reino Unido foi de 11 a 19%. O risco de desenvolver OA sintomática no joelho foi estimado em 45% (40% em homens e 47% em mulheres), com riscos aumentando para 60,5% em pessoas obesas (MURPHY et al., 2008). Além disso, notaram-se nos últimos 20 anos um acréscimo da OA sintomática do joelho, aumentando em 4,1% e 6% entre homens e mulheres, respectivamente (NGUYEN et al., 2011).

Atualmente no Brasil, segundo dados do instituto brasileiro de geografia e estatística (IBGE), a população de indivíduos maiores de 60 anos é de aproximadamente 19 milhões e irá aumentar para mais de 64 milhões nos próximos anos. De acordo com os dados da previdência social, a OA é responsável por 7,5% dos afastamentos do trabalho, é a segunda causa da prorrogação do auxílio-doença (10,5%) e o quarto motivo das aposentadorias precoces. Desta maneira, torna-se

uma preocupação, considerando a incapacidade, perda de qualidade de vida e os custos gerados por essa doença ao sistema de saúde (LE et al., 2012).

De acordo com a sociedade brasileira de ortopedia e traumatologia e do IBGE, o Brasil tem 163 mil vítimas da OA com até 19 anos; 1,3 milhões na faixa de 20 a 39 anos; 4,2 milhões de pacientes entre 40 e 59 anos e 4,2 milhões com 60 anos ou mais, sendo o total das vítimas da doença 4,4 milhões de homens e 5,5 milhões de mulheres (SBOT, 2012).

Em São Paulo foi feito diagnóstico de OA em 36% do total de 84 pacientes idosos, com idade igual ou superior a 60 anos. Destes pacientes, 70,9% eram do sexo feminino, sendo que a articulação mais acometida foi o joelho, com 29,7% (de ROSIS; MASSABKI; KAIRALLA, 2010).

Em relação ao tratamento para a OA, as lesões da cartilagem articular apresentam um potencial limitado de reparo e alguns defeitos não cicatrizam espontaneamente, tornando o processo de regeneração desafiador (SCHMINKE; MIOSGE, 2014). Existem muitas opções terapêuticas, mas nenhuma terapia proporciona cura definitiva (MARTINEK; FU; HUARD, 1999; RAINBOW; REN; ZENG, 2012; AMOAKO; PUJATLE, 2014). Geralmente, o tratamento é multidisciplinar e busca uma melhora funcional, mecânica e clínica. Os tratamentos para a OA incluem programas educativos e exercícios terapêuticos com orientação de um profissional qualificado. Já, os tratamentos farmacológicos incluem analgésicos, antiinflamatórios não esteróides e medicamentos condroprotetores, que podem retardar a progressão da doença (SOFAT; EJINDU; KIELY, 2011; RAINBOW; REN; ZENG, 2012; AMOAKO; PUJATLE, 2014). Em relação a tratamentos experimentais, a aplicação de células-tronco já foi utilizada no tratamento de OA, osteonecrose e fraturas (LEE et al., 2003; LUYTEN, 2004; OREFFO; TRIFFITT, 1999; PARK et al., 2015).

2.2 CÉLULAS-TRONCO (CT)

No decorrer da vida, o organismo apresenta alta capacidade de regeneração em resposta a diferentes tipos de doenças. Isso ocorre devido à presença de

células-tronco (CT) nos tecidos, que se auto-renovam e diferenciam em vários tipos celulares funcionais (NARDINI; MEIRELLES, 2006; ZAGO; COVAS, 2006). Sendo assim, CT é um grupo de células indiferenciadas com capacidade de proliferação originando células semelhantes ou células filhas. De acordo com o seu potencial de diferenciação, elas podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e oligopotentes. As totipotentes são as células capazes de se diferenciarem em qualquer tecido ou anexo embrionário, podendo originar qualquer tipo celular. Já as pluripotentes, também conhecidas como células-tronco embrionárias (CTE), são capazes de se diferenciarem em qualquer tecido adulto, provenientes das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma). As multipotentes, também conhecidas como células-tronco adultas (CTA) ou mesenquimais (CTM), possuem plasticidade limitada e podem se diferenciar em alguns tipos celulares derivados do mesmo folheto embrionário. Por fim, as oligopotentes ou progenitoras que podem originar apenas um tipo celular ou poucos tipos do mesmo tecido (CAPLAN, 2005; ZHANG et al.; 2006; MAUMUS et al., 2013).

Com a descoberta de CTM provenientes de diversos tecidos foi necessária a padronização das características para sua classificação. De acordo com o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CTM caracterizam-se como sendo aderentes ao plástico, devem expressar marcadores CD105, CD73 e CD90 e não expressar os marcadores CD45; CD34; CD14 ou CD1b, CD79a ou CD19 e HLA-DR quando mantidas em cultura e devem se diferenciar em adipócitos, osteoblasto e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

As CTM são consideradas como uma população de células-tronco somáticas presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, a polpa dentária, o tecido adiposo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (HUANG, GRONTHOS; SHI, 2009; MONTEIRO; ARGOLO NETO; DEL CARLO, 2010; ESPER et al., 2015). Atualmente, as CTM são o tipo mais provável de CT a serem utilizadas na prática de clínica, devido a sua fácil acessibilidade e multipotencialidade de diferenciação em vários tecidos necessários num processo de reparação (TORQUETTI et al., 2007; PARK et al., 2015).

Além disso, as CTM possuem propriedades imunomodulatórias, baixa expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I), ausência

de moléculas coestimulatórias, como CD80, CD86, ou CD40, e são descritas pelo efeito imunomodulatório sobre as células do sistema imunológico. Do mesmo modo, não induzem a proliferação de linfócitos alogênicos ou xenogênicos, causando efeitos sobre a função de linfócitos B, inibindo sua diferenciação em células plasmáticas (PEVSNER-FISHER et al., 2007). Por fim, as CTM expressam várias moléculas bioativas como moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com as outras células (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006; IMAMURA et al., 2015).

Alguns estudos sugerem que as CTMs migram seletivamente para áreas de lesão, inflamação e tumores, onde elas estão envolvidas na reparação tecidual (CHEN et al., 2008; CHEN et al., 2015). Esses efeitos tornam essas células viáveis para o uso como tratamento quando realizada terapia em locais específicos. Por fim, além da capacidade de diferenciação, as CTM humanas não produzem teratomas diferentemente das CTE que quando injetadas formam esse tipo de tumor (NARDINI; MEIRELLES, 2006).

2.3 CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo não mineralizado presente na cavidade interna do dente, sendo responsável pela sua manutenção e vitalidade. É constituída por várias células envolvidas por uma matriz extracelular amorfa e fibrosa, permeada por plexos nervoso, sanguíneo e linfático que se juntam aos tecidos circundantes ao dente via forame apical. Além disso, o conjunto de células do tecido pulpar é heterogêneo composto por fibroblastos, células de defesa, células-tronco progenitoras mesenquimais e pelos odontoblastos (GOLDBERG; SMITH, 2004).

Os tecidos dentais já foram utilizados como fontes para obtenção de CT, identificando cinco fontes diferentes: células-tronco progenitoras do folículo dental (CTPFD), células-tronco de dentes decíduos esfoliados (do inglês: *stem cell from human exfoliated deciduous teeth*, SHED), células-tronco de polpa dentária (CTPD), células-tronco de ligamento periodontal (CTLP) e as células-tronco da papila apical (CTPA) (HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009).

As SHED são multipotentes, altamente proliferativas e clonogênicas (MIURA et al., 2003) e podem ser retiradas com mínimo desconforto para o paciente (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; EVANGELINELIS et al., 2014). Assim, as SHED tornam-se uma fonte atrativa para ensaios clínicos e medicina regenerativa (GRONTHOS et al., 2002; PIERDOMENICO et al., 2005; KERKIS et al., 2006; HUANG, GRONTHOS, SHI., 2009; EVANGELINELIS et al., 2014; ESPER et al., 2015; WAKAYAMA et al., 2015).

Quando as SHED são comparadas às células-tronco provenientes da medula óssea e da polpa de dentes permanentes, nota-se que as SHED apresentam uma maior taxa de proliferação, além de possuírem habilidade de se diferenciarem em alguns tipos celulares e estimularem a osteogênese após transplante *in vivo* (MIURA et al., 2003). Em um trabalho de reparo de calvária murina, as SHED foram consideradas as CT ideais para indução de formação de osso, visto após transplante de SHED com hidroxiapatita/ tricalcio-fosfato (SEO et al., 2008).

As propriedades das SHED também foram verificadas através da injeção de meio SHED-condicionado no reparo de rugas causadas pelos danos da luz UV-B, bem como o aumento na produção de colágeno em fibroblastos humanos, sugerindo que as SHED podem ser usadas no tratamento contra os efeitos do envelhecimento produzidos pelos raios UV e na cicatrização (NISHINO et al., 2011). Além disso, meio SHED-condicionado também já foi usado para tratar isquemia cerebral em ratos, produzindo uma melhora da deficiência motora após 15 dias de tratamento (INOUE et al., 2013). Ainda em relação ao tratamento de isquemia, outro trabalho injetou SHED no cérebro de camundongos, mostrando que houve redução da perda tecidual e apoptose, sugerindo mecanismos de inibição de citocinas pró-inflamatórias e aumento da expressão de antiinflamatórios, sugerindo mecanismos parácrinos envolvidos (YAMAGATA et al., 2013), também verificados anteriormente no tratamento de ratos com lesão na medula espinal (TAGHIPOUR et al., 2012).

Infelizmente, pouco se sabe sobre os efeitos imunomoduladores das SHED, uma característica importante das CTM levada em conta nos protocolos de terapia celular. Um estudo *in vitro* comparando SHED com CTM de medula óssea revelou que ambas não estimularam a proliferação de linfócitos T alogênicos, ressaltando a pouca imunogenicidade dessas duas CTM. Além disso, as duas CTM inibiram a proliferação de linfócitos T quando estimulados por fitohemaglutinina, sugerindo novamente um efeito imunossupressor (ALIPOUR et al., 2013). SHED também foi

usada para tratar Lupus Eritematoso sistêmico em camundongos, elevando o número de células Treguladoras via Th17 (YAMAZA et al., 2010). Além disso, os sintomas da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) induzida em camundongos, caracterizada por inflamação e fibrose, melhoraram após o tratamento com SHED (WAKAYAMA et al., 2015). Sendo assim, as SHED têm sido consideradas como promissoras para protocolos envolvendo terapia celular com CT (KASHYAP, 2015; ESPER et al., 2015; WAKAYAMA et al., 2015).

Por fim, uma outra aplicação descrita para as SHED é a modelagem de doenças através da reprogramação celular, principalmente para doenças do sistema nervoso, pela facilidade de reprogramação e também considerando que as SHED têm a mesma origem embrionária que as células do sistema nervoso, a ectoderme (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014).

2.4 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são definidos como materiais não vivos, de origem natural ou sintética, capazes de estabelecerem uma interação apropriada com o tecido circunvizinho, sem induzir uma resposta adversa ao hospedeiro. Além disso, funcionam como suporte estrutural e devem propiciar um ambiente fisiológico adequado para as células e fatores bioquímicos (AHSAN; NEREM, 2005; GOMES et al., 2008; KATARI; PELOSO; ORLANDO, 2014). Eles devem apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam desempenhar a função desejada, além de estimularem uma resposta adequada dos tecidos vivos (KAWACHI et al., 2000; KATARI; PELOSO; ORLANDO, 2014).

Os pré-requisitos necessários para sejam usados em implantes são: ser biocompatível, não ser rejeitado e nem causar resposta inflamatória; ser biodegradável; apresentar porosidade que permita a difusão de nutrientes com tamanhos e formas adequadas; suportar a adesão e proliferação celular; ser capaz de interagir com os tecidos vizinhos ao defeito e fornecer suporte para o tecido formado e vascularização (HOFFMANN et al., 2009; HANSON; D'SOUZA; HEMATTI, 2014; KATARI; PELOSO; ORLANDO, 2014).

Os progressos obtidos na área da Medicina aliados à engenharia e tecnologia, têm possibilitado o desenvolvimento de técnicas que buscam a reconstrução das lesões ocasionadas no aparelho locomotor e o restabelecimento das funções, como os biomateriais em cirurgia ortopédica (LEWALLEN et al., 2014). Quatro classes de materiais são correntemente aplicadas em cirurgia ortopédica: metais e ligas metálicas, polímeros, cerâmicos e compósitos. Os primeiros são usados em ortopedia, na grande maioria das situações, com a finalidade de substituir estruturas ósseas e osteocartilagíneas lesadas e na condição de materiais de osteossíntese/fixação (POINERN; BRUNDAVANAM; FAWCETT, 2012; LEWALLEN et al., 2014). Os polímeros são resinas sintéticas usados na fabricação e fixação de endopróteses de substituição articular e, também, em ortóteses/exopróteses da coluna e dos membros (BALDWIN; KIICK, 2010; LEWALLEN et al., 2014). Os cerâmicos podem ser utilizados quando ocorrem limitações e complicações relacionadas aos autoenxertos ósseos e risco potencial de transmissão de doenças infecciosas ligadas ao aloenxertos ósseos (LIU; WEBSTER, 2010; LEWALLEN et al., 2014).

Os biomateriais compósitos são preparados com o objetivo de produzir materiais com uma combinação de propriedades, isso pode acontecer somando as propriedades dos materiais que fazem parte do compósito ou adquirindo uma nova propriedade. Para que isto ocorra é necessário haver uma melhoria das propriedades mecânicas, como a resistência e a rigidez a ambientes corrosivos, permitindo ter diferentes funções mecânicas, biológicas e biomédicas (RODRIGUES, 2013; LEWALLEN et al., 2014).

Dentre os biomateriais de reconstituição óssea, os cerâmicos, representado principalmente pela hidroxiapatita (HA) e pelos tricálcio-fosfatos são os mais utilizados devido à semelhança com a parte inorgânica do osso (WANG, 2003; MANKANI et al., 2006). Já, alguns polímeros naturais ou sintéticos têm sido utilizados na engenharia tecidual de cartilagem (KOCK; VAN DONKELAAR; ITO, 2012; LEWALLEN et al., 2014).

A quitosana é um biopolímero (polissacarídeo) conhecido, biodegradável, não tóxico, com propriedades antibacterianas tem sido usado para regeneração de cartilagem (DI MARTINO; SITTINGER; RIBUD, 2005; GUPTA et al., 2014). Ela pode ser encontrada na natureza no exoesqueleto rico em quitina de crustáceos e insetos e nas paredes celulares de fungos. Além disso, a quitosana pode ser moldada em

várias formas e ser associada com outros biomateriais (HSIEH et al., 2007). Um estudo feito utilizando cultura de células em suporte de quitosana e glutaraldeído demonstrou diferenciação das células em condrócitos e a parte interna do suporte produziu colágeno (HOFFMANN et al., 2009).

Alguns estudos *in vivo* demonstraram um alto grau de biocompatibilidade do suporte de quitosana em camundongos (VANDEVORD et al., 2002; GUPTA et al., 2014). Já em outros, utilizando ovinos, evidenciou-se excelente capacidade de reparação óssea, quando inserido na tíbia um biomaterial constituído por hidroxiapatita (COSTA et al., 2015).

2.5 MODELO ANIMAL

Como relatado anteriormente, os tratamentos disponíveis para tratar doenças articulares não são curativos na maioria das vezes, mas apenas amenizam os sintomas. Desta maneira, novos métodos de tratamento precisam ser testados e os modelos animais, desenvolvidos a cerca de cento e cinquenta anos, tornam-se importantes para o delineamento experimental, permitindo o melhor conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação dos medicamentos ou dos efeitos ocasionados pelas cirurgias (LYNETTE, 1998).

Modelos pré-clínicos de reparação da cartilagem articular são importantes para abordagens experimentais (CARNEIRO; BARBIERI; NETO, 2013; FISHER et al., 2015) e devem ser escolhidos baseados na semelhança com a estrutura humana, com relação à anatomia, biologia celular e mecanismo articular (FISHER et al., 2015). Além disso, os modelos animais podem ser submetidos a procedimentos operatórios, que simulam e avaliam a viabilidade do procedimento, consequências fisiopatológicas e a eficácia terapêutica (FAGUNDES; TAHA, 2004).

Animais como coelhos, cachorros, mini-porcos e ovelhas têm o processo de osteogênese similar ao de humanos, sendo considerados ideais para pesquisas de crescimento e remodelação óssea (HOLY et al., 2000; FISHER et al., 2015). Estudos provocando defeitos osteocondrais no joelho de coelhos e mini-porcos permitiram a análise e acompanhamento da regeneração (GUPTA et al., 2014; FISHER et al., 2015).

A escolha do ovino como modelo pré-clínico de defeitos osteocondrais ocorre devido à similaridade com o joelho humano apresentando ligamento cruzado, menisco e ligamento colateral assimétrico pela extensão com a porção distal bicondilar do fêmur e, por isso, o ovino vem sendo utilizado há muito tempo em muitos experimentos de cirurgia ortopédica. Além disso, o acesso à articulação dos ovinos é fácil, o que proporciona um melhor manuseio durante o experimento (SMITH et al., 2008; OSTERHOFF et al., 2011; ORTH; MADRY, 2013). Por fim, o joelho de ovinos também é um bom modelo biomecânico de comparação com os humanos, pois suas estruturas de sobrecarga durante a movimentação são similares entre as espécies e possuem semelhanças na capacidade de reparação dos defeitos da cartilagem articular (MRUGALA et al., 2007; OSTERHOFF et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de reparo das SHED humanas em associação ou não a um biomaterial no tratamento de lesão osteocondral induzida na articulação femorotibiopatelar de ovinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir um modelo pré-clínico para o estudo do reparo de lesões ósteocondrais através da indução de lesão em joelhos de ovinos, considerando a utilização de todos os controles e variáveis na mesma articulação, uma vez que esses não são isogênicos;
- Avaliar fisicamente o paciente, além dos exames de imagem radiográfico, ultrassom e artroscopia o efeito do tratamento das lesões ao longo de dois anos;
- Avaliar histologicamente, através de colorações, o efeito do tratamento das lesões.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi dividido em 4 etapas sendo que a primeira consistia no isolamento e expansão das SHED, a segunda na obtenção do modelo, a terceira no tratamento destas lesões com SHED associadas ou não a um biomaterial e a quarta na avaliação dos tratamentos.

4.1 CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)

4.1.1 Isolamento, Cultivo e expansão das SHED

As SHED foram isoladas a partir dos “dentes-de-leite” de pessoas sem nenhuma afecção associada, os quais foram doados através do “Projeto A Fada do Dente” desenvolvido sob a coordenação da Profa Dra Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga. Dessa forma, após a queda espontânea ou mediante a extração em consultório dentário, o dente decíduo foi enviado para o Laboratório de Células-Tronco (LCT) do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP dentro de um tubo contendo meio de transporte, composto por DMEM (LGC Biotecnologia, SP, BR) suplementado com 5% solução de antibiótico-antimicótico (500U/mL penicilina, 500µg/mL estreptomicina e 2,5µg/mL anfotericina (Sigma, MO, USA) e 1% soro fetal bovino comum (SFB - Invitrogen, CA, USA), sob temperatura de 4°C.

As células-tronco foram obtidas usando protocolo modificado de Miura e colaboradores (2003). Para tanto, o dente foi lavado por 3 vezes em tampão salina-fosfato (PBS) 1x (Sigma) contendo 5% da solução de antibiótico-antimicótico (500U/mL penicilina, 500µg/mL estreptomicina e 2,5µg/mL anfotericina), a polpa foi retirada com auxílio de agulha (22G x 3 1/2"- BD, NJ, USA), lavada novamente com PBS e digerida com Colagenase tipo I (3mg/mL- Invitrogen, MA, USA) em PBS por 30 minutos em banho-maria. Passados os 30 minutos, a ação da enzima foi bloqueada utilizando meio de cultura para SHED, meio comercial, contendo 10% de SFB e, então foi feita uma centrifugação por 5 minutos a 200g. O precipitado foi

ressuspendido em meio de cultura SHED contendo α -MEM (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi, Invitrogen), 1% de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA - Invitrogen), 1% L-Glutamina (Invitrogen) e 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 0,25 μ g/mL de anfotericina e colocado em placa de cultura de 60mm. As células foram mantidas em estufa a 37° C com atmosfera úmida contendo 5% de gás carbônico (CO₂). As SHEDs foram monitoradas e fotomicrografadas em microscópio Nikon Eclipse (TS100) (TY, JP) diariamente.

Para a expansão, quando as células atingiam confluência em torno de 80% eram lavadas por 2x com PBS e tripsinizadas com *Tryple Express* (Invitrogen) durante aproximadamente 5 min a 37°C. Após descolamento celular monitorado em microscópio, as células foram inativadas com meio de SHED contendo 10% de SFB e plaqueadas de acordo com a quantidade celular e necessidade experimental.

4.1.2 Congelamento das células

O procedimento de congelamento foi iniciado com a lavagem das células com PBS, seguida de tripsinização com *Tryple Express* (Invitrogen). Após a tripsinização, as células foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 200g e o precipitado formado foi ressuspendido em solução de congelamento contendo: 90% de SFB (Invitrogen), e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (LGC Biotecnologia). Em seguida, os criotubos foram congelados por 24h em freezer -80° e posteriormente transferidos ao nitrogênio líquido. Quando necessário à utilização das células, elas eram descongeladas rapidamente em banho-maria e colocadas em cultivo novamente.

4.2 BIOMATERIAL

O biomaterial utilizado neste projeto foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores da *Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterilien/ Universität Bayreuth* e *Biocer Entwicklungs* – GMBH, na Alemanha sob supervisão do nosso

colaborador Daniel Seitz. Este grupo desenvolveu um biomaterial duplamente compatível com tecido ósseo e cartilaginoso, com tamanho compatível as lesões realizadas no modelo animal proposto neste projeto.

A estrutura do biomaterial para o reparo osteocondral, o crescimento e formação óssea foi feita utilizando implantes cerâmicos de hidroxiapatita (HA) comercial. Já, a porção correspondente ao implante cartilaginoso foi associada com a cerâmica utilizando-se uma solução de sílica embebida em hidroxiapatita em pó, técnica desenvolvida pelo *Friedrich-Baur-Institute*. Este implante era composto por esponjas estáveis liofilizadas de quitosana com adição de componentes da matriz cartilaginosa, como a hialurona, sulfatos de condroitina, sulfato de dermatana. Os componentes foram selecionados de acordo com estudos preliminares *in vitro* realizados com condrócitos isolados de bovino e células condrocíticas ATDC5 (HOFFMANN et al., 2009). Para este projeto, o biomaterial foi produzido com as dimensões de 5,21mm de altura e 5,09mm de diâmetro. A figura 2 mostra o aspecto geral do biomaterial com suas diferentes porções e foram realizadas (SILVA, 2011). A figura 2A representa uma macroscopia do biomaterial com suas duas porções, sendo a superior esponjosa de quitosana e a inferior rígida de HA. A figura 2B revela a ultra-estrutura através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), evidenciando aspectos da ultra-estrutura da quitosana (Figura 2B-1) e de HA (Figura 2B-2). A figura 2A foi obtida por uma máquina fotográfica (Sony Cyber-shot, DSC- WX100) e a figura 2B fotografada por um microscópio eletrônico de varredura (LEO 435VP - Zeiss, Oko, DE).

Figura 2 – Imagem do biomaterial e seus componentes, macroscópica ou por MEV

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2011).

Legenda: A) Fotografia demonstrando o biomaterial com os seus dois constituintes: HA, porção inferior e quitosana, porção superior. B) Fotomicrografia do biomaterial obtida por MEV também evidenciando as suas duas partes. 1) Quitosana e 2) HA. Escala de barra: 1mm.

4.3 PREPARO DAS SHED ASSOCIADAS AO BIOMATERIAL, SOMENTE BIOMATERIAL E SHED PARA O IMPLANTE NOS OVINOS

A viabilidade do procedimento de colocação das SHED sobre o biomaterial *in vitro* foi testada por (SILVA, 2011), onde foi observado 75% de adesão celular.

Diante do sucesso obtido, o mesmo procedimento foi realizado para o implante nas lesões induzidas. Em resumo, o biomaterial foi colocado dentro de um poço numa placa com 12 orifícios e embebido em meio de cultura para SHED por 3 horas. Passado esse período, aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células foram cuidadosamente aplicadas na superfície do biomaterial que contém a matriz cartilaginosa. O biomaterial contendo as células foi incubado por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂, antes do implante nos animais. O procedimento acima foi feito para o biomaterial que seria implantado sem as células e também a mesma quantidade de células foi semeada em uma placa de Petri de 10cm para ser utilizada no procedimento cirúrgico sem associação com biomaterial.

Minutos antes de iniciar a cirurgia, as células no biomaterial ou na placa foram cuidadosamente lavadas com PBS por três vezes, para a eliminação do SFB utilizado no cultivo celular. Após as lavagens, as células da placa foram removidas com o auxílio de um rodo, centrifugadas e posteriormente ressuspensas em 100µL de meio α -MEM sem soro. Os biomateriais associados ou não as células, após

lavagens, também foram recobertos com meio α -MEM sem soro na placa, para o transporte.

4.4 OBTENÇÃO DO MODELO ANIMAL DE LESÃO OSTEOCONDRA

O projeto proposto foi conduzido após avaliação e aprovação pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), protocolado sob número 1736/2009.

4.4.1 Animais

Neste projeto foram utilizados quatro ovinos sem raça definida (SRD), castrados e com idade entre 24 e 36 meses.

Os animais foram mantidos no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais da FMVZ-USP, em baias de 10 metros quadrados com alimentação à base de feno, duas vezes ao dia; 200g de ração peletizada; uma vez ao dia e água a vontade. As condições de manejo foram mantidas durante todo o período experimental.

4.4.2 Protocolo Anestésico

Como pré-medicação foi utilizado 0,6 mg/kg de maleato de midazolam (Genon, SP, BR) associado a 2 mg/kg de cloridrato de meperidina (Genon) na mesma seringa por via intravenosa (IV). Assim que o animal veio a decúbito ventral foi realizada a tricotomia da articulação femorotibiopatelar e da veia cefálica, para acesso venoso. Para a fluidoterapia utilizou-se *ringer* lactato (J.P. indústria farmacêutica, SP, BR) durante todo o período trans-operatório.

O animal foi induzido anesteticamente com 3,5 mg/kg de propofol (Propofol®, Eurofarma, SP, BR) associado a 5 μ g/kg de cloridrato de fentanil (Fentanil®, Cristália, SP, BR). Em seguida, o animal foi intubado com sonda endotraqueal

(Rüschelit®, KE, DE) de tamanho apropriado e mantido em anestesia com isoflurano (Isoran®, Biochimico, RJ, BR) diluído em oxigênio 100%.

4.4.3 Procedimento Cirúrgico para indução da lesão

Para a realização da cirurgia, o animal permaneceu em jejum hídrico de 12 horas e sólido por um período de 24 horas. Em seguida a articulação femorotibiopatelar esquerda foi feita a antissepsia. A pele foi incisada divulsionando tecidos para dar acesso aos músculos e a região óssea.

A técnica de artrotomia parapatelar medial foi realizada e logo após a visualização da patela, a mesma foi deslocada lateralmente através de pressão manual e o membro do animal foi flexionado para melhor visualização das trócleas femoral medial e lateral.

Com o auxílio de um delimitador (Kolplacir, SP, BR) para biópsia de pele de 5 mm, os quatros defeitos osteocondrais foram delimitados, sendo dois na porção proximal do sulco femoral e outros dois na parte distal. A cartilagem foi removida com lâmina de bisturi número 15 (*two arrows*, SHG, CN). Para finalizar, os defeitos subcondrais de 6 mm de profundidade foram criados com auxílio de furadeira e broca cirúrgica de 4,5mm em baixa rotação. A profundidade dos defeitos ósseos foi verificada com medidor de profundidade cortical com o intuito de padronizar os defeitos osteocondrais criados.

4.5 TERAPIA CELULAR UTILIZANDO AS SHED HUMANAS ASSOCIADAS OU NÃO AO BIOMATERIAL

Os defeitos osteocondrais criados como descrito no item acima foram limpos e irrigados abundantemente com solução salina estéril. Os tratamentos foram feitos logo após a produção dos quatro defeitos. A primeira lesão recebeu biomaterial (figura 3A), a segunda SHED humana associadas ao biomaterial (figura 3B), a terceira apenas injeção de SHED (figura 3C) e a quarta, o controle, não recebeu nenhum tratamento para a lesão (figura 3D). Para a colocação dos biomateriais nos

orifícios 1 e 2, os biomateriais foram transportados conforme descrito no item 4.3 e após a produção do defeito osteocondral foram cuidadosamente encaixados nos dois orifícios. As SHED foram preparadas conforme descrito no item 4.3 e gentilmente inoculadas no orifício 3 com o auxílio de uma pipeta (Figura 3C), sendo que após o inoculo o tecido permanecia “descansando” por 5 minutos para acomodação celular.

Ao final, a cápsula articular, o tecido subcutâneo e a pele foram fechados com suturas de rotina. A cápsula articular foi suturada em pontos simples separados com Vycril 2-0 (Brasuture, SP, BR) e a pele com pontos Náilon 2-0 (Brasuture) em pontos simples separados.

Figura 3 - Visão macroscópica do implante das SHED humana associadas ou não ao biomaterial nas lesões osteocondrais induzidas na articulação femorotibiopatelar esquerda de ovinos

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2011).

Legenda: A) Inserção do biomaterial sem associação com SHED humana no defeito osteocondral identificado pelo número 1; B) Biomaterial associado às SHED humana no defeito osteocondral identificado pelo número 2; C) Injeção das SHED sem biomaterial no defeito osteocondral identificado pelo número 3; D) Orifício controle sem células e/ou biomaterial, identificado com o número 4. Imagens obtidas por uma máquina fotográfica (Sony Cyber-shot, DSC- WX100).

4.5.1 Cuidados pós-operatórios

Para analgesia, logo após o procedimento cirúrgico, o animal recebeu 1mg/kg de cetoprofeno (Ketofen®, Merial, SP, BR), 25 mg/kg de dipirona sódica (D-500®, Fort Dodge Saúde Animal, SP, BR) e 2 mg/kg de cloridrato de tramadol (Tramal®, Pfizer, SP, BR) por via IV. A analgesia foi mantida duas vezes ao dia com cloridrato de tramadol 2mg/kg e dipirona sódica (D-500®, Fort Dodge Saúde Animal, SP, BR) por cinco dias.

A profilaxia antibacteriana foi feita através de enrofloxacin (Baytril®, Bayer, SP, BR) na dose de 5mg/Kg uma vez ao dia, durante cinco dias após a realização do procedimento cirúrgico.

Logo após a cirurgia, foi aplicada bolsa de gelo por 25 a 30 minutos na articulação femorotibiopatelar do animal, promovendo desta forma analgesia adicional e diminuição do edema. Nas duas semanas após o procedimento cirúrgico foi aplicada bolsa de água quente por 15 minutos no mesmo local para auxiliar na recuperação. Os ovinos foram mantidos em baias individuais e monitorados diariamente.

4.6 MONITORAMENTO DOS ANIMAIS APÓS TERAPIA CELULAR

Os animais foram monitorados clinicamente e por imagem, através dos seguintes exames diagnósticos de imagem: radiográficos, ultrassonográficos e de artroscopia.

4.6.1 Monitoramento da evolução clínica

Os animais foram acompanhados através de exame físico após a cirurgia duas vezes ao dia nos primeiros cinco dias e diariamente até o final do período de experimentação.

4.6.2 Exame Radiográfico

Os procedimentos radiográficos utilizados neste projeto foram realizados no setor de radiologia do Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ-USP com auxílio da médica veterinária Silvana Maria Unruh.

Neste procedimento foi utilizado o aparelho radiográfico Tecno-design® (Tecno-Design, SP, BR) e Ray-Tec® (Ray-TEC, SP, BR) de 100 a 500 miliampéres (mA) para a captura das imagens em um sistema digital computadorizado Fuji FCR CAPSULA X®. Para melhor diagnóstico, foram feitas as projeções: mediolateral e craniocaudal da articulação femorotibiopatelar (membros direito e esquerdo) com o animal em decúbito lateral.

4.6.3 Exame Ultrassonográfico

Os exames ultrassonográficos foram efetuados no setor de Serviço de Cirurgia de Grandes Animais da FMVZ-USP e no setor de ultrassonografia do Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ-USP com a colaboração do Prof. Dr. Stefano Carlo Filippo Hagen.

O animal foi contido manualmente em decúbito lateral para a realização do exame e a pele na região a ser examinada foi tricotomizada com tosquiadeira Oster® (Oster, CA, USA), lâmina 40 e lavada em seguida com água e sabão. O gel acústico foi aplicado sobre a superfície. Movimentos passivos de flexão e extensão da articulação foram realizados durante a avaliação.

Para este procedimento, o aparelho ultrassonográfico My Lab 30 esaote® (Esaote, GE, IT) com transdutor linear de 8 – 12 MHz e microconvexo de 5 – 8 MHz foram utilizados.

A articulação femorotibiopatelar foi avaliada completamente a cada exame, com atenção especial aos côndilos femorais, dos quais imagens transversais e longitudinais foram adquiridas.

4.6.4 Exame de Artroscopia

Os procedimentos artroscópicos foram realizados no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP com a colaboração da equipe do Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva.

O animal foi pré-medocado e anestesiado de acordo com o protocolo descrito no item 4.4.2. Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito dorsal para a realização do procedimento de artroscopia, mediante prévia tricotomia, anti-sepsia e montagem de campo operatório na região femorotibiopatelar como de rotina para procedimento cirúrgico.

O procedimento iniciou-se com punção articular e tentativa de retirada de líquido sinovial, utilizando agulha 40x10 (BD) e seringa de 20 mL, porém em nenhum dos procedimentos conseguiu-se quantidade satisfatória de líquido para posteriores análises.

Com isso, utilizando-se a mesma agulha, 35 mL de solução eletrolítica balanceada e estéril foram infundidos, para proporcionar distensão da cápsula articular e com isso, facilitar a confecção do portal para inserção do artroscópio. Após incisão puntiforme de pele, tecido subcutâneo e cápsula articular com lâmina de bisturi nº11, a cânula artroscópica e o obturador cônico em posição crânio-lateral infrapatelar foram introduzidos. Em seguida, substituiu-se o obturador pela ótica de 4,0 mm a 30° iniciando-se o exame da articulação.

Após inspeção da cavidade articular e visualização das estruturas anatômicas de interesse (cristas e sulco trocleares), identificou-se o melhor posicionamento da ótica para captura de imagens.

Para realização das imagens foi utilizado um aparelho de artroscopia com fonte de luz da marca STORZ® modelo Nova e micro câmera modelo DX ntsc (Karl Storz GmbH & Co. KG, TUT, DE).

A solução eletrolítica foi infundida continuamente para a cavidade articular por sistema pressurizado, sem controle de pressão máxima, para manutenção da distensão articular durante todo o procedimento cirúrgico, através da válvula da cânula artroscópica, sendo o volume excedente drenado através da agulha previamente posicionada.

A pele do animal após o procedimento foi suturada em pontos simples separados, utilizando Náilon 2-0 e a recuperação anestésica ocorreu em baia silenciosa e escura após o término do procedimento cirúrgico, provido de analgésico pós-operatório.

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO FEMOROTIBIOPATELAR DOS OVINOS SUBMETIDOS A TERAPIA CELULAR

4.7.1 Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada com 120, 190, 365 e 730 dias para análises histológicas. Para este procedimento utilizou-se 50mg/kg de tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, SP, BR) com aplicação IV e também o cloreto de potássio a 19,1% (Samtec Biotecnologia, SP, BR) com aplicação IV até parar os batimentos cardíacos.

4.7.2 Descalcificação Óssea

As articulações foram divididas em quatro partes iguais, respeitando o limite dos devidos tratamentos. Após essa divisão os fragmentos foram colocados em potes, fixados em paraformaldeído (PFA) a 5% por 24 horas, lavados em água corrente por aproximadamente 30 minutos e submetidos à descalcificação. Diferentes processos de descalcificação óssea foram testados durante o mestrado do aluno Marcos Vinicius Mendes Silva e o descalcificador Osteomoll® (Merck, DM, DE) foi mais eficiente e, portanto, utilizado neste trabalho (SILVA, 2011).

Após a fixação e lavagem, as amostras foram imersas em solução de 90% de Osteomoll® em PBS (Sigma), três vezes maior o que o seu volume em solução para a descalcificação (Figura 4B). O Osteomoll® foi trocado a cada três dias até que as

amostras estivessem descalcificadas, por aproximadamente um mês, a depender do tamanho da amostra. Semanalmente foi feita a análise da descalcificação óssea utilizando uma agulha, fora das regiões ósseas que se encontravam os tratamentos. Quando a mesma atravessava o material sem resistência, o osso era considerado adequado para poder fazer as lâminas para análises histológicas.

Ao final, as amostras foram lavadas em água corrente, desidratadas em séries crescentes de alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina a 65°C formando os blocos. Desses foram obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura.

Figura 4 - Superfície do fêmur submetido a descalcificação utilizando descalcificador (Osteomoll®)

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda: A) Marcações utilizadas para divisão dos 4 fragmentos. B) Amostra dos fragmentos submetidas à solução de Osteomoll® (1,2,3,4).

4.7.3 Procedimentos histológicos para a análise do material submetido ao processo de descalcificação

Os procedimentos histológicos foram realizados de acordo com os protocolos descritos e estabelecidos anteriormente (TOLOSA et al., 2003).

Após a inclusão do material na parafina, os blocos contendo as amostras foram cortados em micrótomo automático Leica RM2165 (Leica, Wetzlar, DE) produzindo cortes de aproximadamente 5µm. Os cortes obtidos foram devidamente assentados em lâminas histológicas e deixados na estufa a 60°C durante 2 horas para melhor adesão à lâmina.

Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise estrutural do tecido cartilaginoso, Tricromo de Masson para análise estrutural e marcação das fibras do colágeno e Picrosírius para marcação do colágeno.

As lâminas após procedimentos de coloração foram montadas com Permount® (Fischer Scientific, PB, USA) e posteriormente fotomicrografadas em microscópio Nikon Eclipse (80i) acoplado a uma câmera Nikon DS-Ri (TY, JP).

4.7.4 Colorações

Neste projeto realizamos as seguintes colorações:

4.7.4.1 Coloração de Hematoxilina-Eosina

Os cortes obtidos foram mergulhados no xilol por 10 minutos, cada passagem e em seguida, desidratados em séries crescentes de alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%). Após lavagem em água corrente por 10 minutos os materiais foram corados com hematoxilina (Merck Chemicals®) por 5 minutos e o material foi lavado em água corrente por 10 minutos para a retirada do excesso de hematoxilina. Logo em seguida, o material foi corado pela eosina (Merck Chemicals®) por 1 minuto e lavado com água por 30 segundos. Para finalização, o material corado foi submetido a uma série de alcoóis de 95%, uma vez e duas vezes álcool 100%, por 2 minutos cada e em série de xilóis (I, II, III) por três minutos cada.

O material obtido foi montando em solução de Permount (Fischer Scientific, PB, USA) e analisado através de microscopia de luz microscópio Nikon Eclipse (80i) acoplado a uma câmera Nikon DS-Ri (Nikon, TY, JP).

4.7.4.2 Coloração de Tricromo de Masson

Os cortes obtidos foram mergulhados no xilol I e II por 4 minutos cada, em seguida, desidratados em séries crescentes de alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%),

por 4 minutos cada passagem. Após lavagem em água destilada por 5 minutos, os materiais foram corados com hematoxilina (Merck Chemicals®) por 1 minuto e 30 segundos e o material foi lavado em água corrente por 2 minutos para a retirada do excesso de hematoxilina e então, 5 minutos na água destilada. Logo em seguida, o material foi corado pela fucsina Ácida Escarlata de Biebrich (Synth, SP, BR) por 5 minutos e lavado com água destilada por 5 minutos, corado com Ácido fosfotúngstico – ácido fosfomolibdico (Synth) por 10 minutos. Após esse procedimento foi então corado por azul de anilina (Synth) por 10 minutos e, novamente colocada em água destilada por 5 minutos. Os materiais foram mantidos em ácido acético 1% por 3 minutos e água destilada por 10 minutos. Para finalização, o material corado foi submetido a uma série de alcoóis de 70%, 90%, 100%, 100%, 100% apenas uma rápida passagem em cada álcool, e por 4 minutos em cada série de xilóis (I, II) por 5 minutos cada.

O material obtido foi montado em solução de Permount (Fischer Scientific) e analisado através de microscopia de luz no microscópio Nikon Eclipse (80i) acoplado a uma câmera Nikon DS-Ri (Nikon).

4.7.4.3 Coloração de Picrosírius

Novamente os cortes obtidos foram mergulhados no xilol por 5 minutos, cada passagem e posteriormente, desidratados em séries crescentes de alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%). Em seguida, os cortes foram lavados em água por 30 segundos, corados com picrosírius por 40 minutos e submetidos a uma série crescente de alcoóis (70%, 90% e 100%) por 5 minutos cada e em série de xilóis (I, II, III) por 5 minutos cada.

Após coloração, o material foi analisado por microscopia de luz utilizando microscópio Nikon Eclipse (80i) acoplado a uma câmera Nikon DS-Ri (Nikon).

5 RESULTADOS

5.1 CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)

As SHED foram cultivadas em uma placa apropriada, sobre uma superfície de plástico e foi possível observar a morfologia semelhante a fibroblastos, com células alongadas, fusiformes, pontiagudas e um núcleo central (Figura 5). Além disso, como descrito no item 4.3, as SHED foram colocadas sobre a parte de quitosana do material, mantendo sua morfologia e sendo testadas, quanto a porcentagem que aderiu ao biomaterial, procedimentos desenvolvidos e descritos na dissertação de mestrado do aluno Marcos Vinicius Mendes Silva, sendo a taxa de adesão de 75% (SILVA, 2011).

Figura 5 – Fotomicrografia das SHED humanas mostrando sua morfologia por microscopia óptica de luz

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda: A) aumento de 10x B) Aumento de 20x.

5.2 MONITORAMENTO CLÍNICO DOS ANIMAIS TRATADOS COM SHED ASSOCIADOS OU NÃO AO BIOMATERIAL

Os animais submetidos aos tratamentos foram mantidos por 120, 190, 365, 730 dias de pós-cirúrgico e foram acompanhados clinicamente e através de exames de imagem e artroscópicos durante todo o período de experimentação até a eutanásia.

5.2.1 Evolução Clínica

Durante o período de acompanhamento dos animais foi possível observar que houve uma discreta formação de edema no pós-operatório. Além disso, apesar de se manterem de pé, os animais não apoiavam totalmente no solo o membro operado na primeira semana após a cirurgia. Na segunda semana após o procedimento cirúrgico, os animais apoiavam o membro operado e se locomoviam pouco. A partir da terceira semana de pós-cirúrgico os animais se locomoviam normalmente e se mantiveram assim até o final do período de experimentação.

5.2.2 Exame Radiográfico

Os animais foram monitorados por exames radiográficos para observar a regeneração da porção óssea da lesão e o posicionamento do biomaterial, tendo seus membros pélvicos sido radiografados mensalmente durante o período de tratamento de cada animal. O membro esquerdo de cada animal foi radiografado antes da realização do procedimento cirúrgico, para ser utilizado como controle, sendo representado na figura 6A e C; e na figura 6B e D temos a imagem do membro esquerdo logo após ser submetido ao procedimento cirúrgico. Nas figuras 6A e B temos os resultados obtidos da articulação femorotibiopatelar esquerda dos animais em projeção mediolateral e em 6C e D projeção caudocranial. Vale ressaltar

que nenhuma alteração foi observada na articulação femorotibiopatelar esquerda dos animais, antes da realização do procedimento cirúrgico, como era esperado já que os animais eram saudáveis (Figuras 6A e C). Entretanto, quatro orifícios, dois proximais e dois distais, simetricamente dispostos no sulco troclear do fêmur foram observados após o procedimento cirúrgico na articulação femorotibiopatelar esquerda (Figura 6D). Importante ressaltar que os orifícios proximais são mais radiopacos e por isso, mais evidentes que os distais (Figura 6B e D).

Os dois orifícios proximal medial e lateral apresentaram-se preenchidos com material radiopaco de formato cilíndrico, medindo 0,5 x 0,5 cm de diâmetro cada. Além disso, notou-se um halo de esclerose difuso junto aos orifícios que mediram 0,5 x 0,5 cm de diâmetro cada. Também foi observada uma discreta radiopacidade óssea subcondral heterogênea difusa da patela e discreto osteófito periarticular lateral e medial fêmoro-tibial (Figura 6B).

Os exames radiográficos apresentados neste trabalho nos permitiram afirmar que biomaterial associado ou não as células implantado nas lesões estavam devidamente inseridos e não saíram do local após o procedimento cirúrgico. Entretanto, como parâmetro de imagem para monitorar o tratamento, o exame radiográfico não permitiu observar nenhuma alteração ou melhora da lesão provocada. A figura 6 é uma imagem representativa e apesar de demonstrar resultados referentes a um tratamento, o mesmo padrão de imagem foi mantido em todos os animais, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 6 – Exames radiográficos da articulação femorotibiopatelar esquerda representativos de 120, 190, 365 e 730 dias de pós-operatório, sendo o mesmo membro utilizado como controle, antes da realização da cirurgia

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda: A,C) membro posterior esquerdo sem tratamento - controle; B, D) membro posterior esquerdo pós-cirúrgico. A, B) Membro em projeção mediolateral esquerda; C, D) Projeção caudocranial. Em evidência, observe em B dois defeitos proximais feitos no sulco troclear femoral, sendo preenchidos com biomaterial e biomaterial associado a SHED humana e em D) os quatro defeitos osteocondrais, proximais e distais. As imagens ao lado de B e D representam uma ampliação da área circundada de vermelho em B e D permitindo uma maior visualização das lesões e tratamentos da região.

5.2.3 Exame Ultrassonográfico

Os exames ultrassonográficos foram realizados com o objetivo de analisar os resultados obtidos após a implantação do biomaterial associado ou não às SHED na articulação femorotibiopatelar esquerda e a figura 7 é uma imagem representativa do que foi observado para todos os animais considerando-se o mesmo período de tratamento.

Os resultados obtidos após 120 dias de pós-operatório estão apresentados na figura 7A, B, C e D. A figura 7A e B mostram respectivamente uma imagem longitudinal do defeito subcondral em côndilo medial proximal (biomaterial) e côndilo lateral proximal (biomaterial com as SHED). Na figura 7C e D temos uma imagem

longitudinal dos defeitos subcondrais em porção lateral distal do côndilo sendo o controle representado pela figura 7D e tratamento com as SHED no côndilo medial distal na figura 7C.

Os defeitos, medial distal e lateral distal, foram praticamente mantidos. Já nos defeitos, medial proximal e lateral proximal foi evidenciado um arrasamento do defeito subcondral, os quais se apresentaram como uma linha de base irregular com um maior preenchimento no local da lesão, porém não muito significativas.

Mesmo com esses resultados uma dificuldade para avaliar o tratamento através dos exames ultrasonográficos deste animal, após a realização do procedimento cirúrgico foi encontrada, pois alguns dos defeitos ósseos não se apresentavam bem definidos, além do pouco tempo de tratamento.

Na figura 7E, F, G e H temos as imagens da articulação femorotibiopatelar esquerda após 156 dias de pós-operatório e foi possível observar uma irregularidade de formato côncavo em osso subcondral nas porções proximal e distal dos côndilos femorais, sendo todas preenchidas por conteúdo hipoecogênico.

Além disso, podemos evidenciar na figura 7I, J, L e M, a articulação femorotibiopatelar esquerda após 300 dias de pós-operatório apresentando lesões com aspecto irregular, com relação à linha base. Estas tinham um formato côncavo com características hipoecogênico, com aproximadamente 0,8cm de diâmetro cada um deles.

As lesões, medial proximal (biomaterial) e lateral distal (controle), foram mantidas e na lesão que continha biomaterial associado às SHED (L) um arrasamento com uma linha de base irregular com relação à articulação, mais preenchida no local dos defeitos ocasionados foi evidenciada.

Após 311 dias de pós-operatório (Figura 7N, O, P e Q) foi observada uma acentuada diminuição no diâmetro e na profundidade de todas as lesões com aspecto regular da linha base, exceto na lesão lateral distal (controle) e em menor grau, na medial proximal (biomaterial). Já, a lesão lateral proximal (biomaterial com as SHED) estava preenchida por conteúdo hipoecogênico com discretos ecos puntiformes entremeados, sendo um provável tecido cartilaginoso em mineralização.

Figura 7 – Imagens ultrassonográficas da articulação femorotibiopatelar esquerda, após 120 (A,B,C e D), 156 (E,F,G e H), 300 (I,J,L e M) e 311 (N,O,P e Q) dias de pós-operatório

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda: A,E,I,N) Imagem do defeito subcondral proximal em côndilo medial (biomaterial); B,F,J,O) Imagem longitudinal do defeito subcondral proximal em côndilo lateral (biomaterial com as SHED); C,G,L,P) Imagem longitudinal do defeito subcondral distal em côndilo medial (SHED); D,H,M,Q) Imagem longitudinal do defeito subcondral distal em côndilo lateral (controle).

5.2.4 Exame Artroscópico

A figura 8 apresenta os resultados obtidos através de exames de artroscopia da articulação femorotibiopatelar esquerda, após 93 (Figura 8A, B, C e D), 174 (Figura 8E, F, G e H) e 280 dias, sendo esse o último período de pós-operatório de dois animais, os que foram mantidos por 365 (Figura 8I, J, L e M) e 730 dias (Figura 8N, O, P e Q).

Após 93 dias de pós-operatório foi possível observar no orifício proximal medial da femorotibiopatelar esquerda, local onde foi inserido o biomaterial, uma invaginação do tecido cicatricial (Figura 8A) e no local onde foi implantado o biomaterial associado à SHED, orifício proximal lateral da articulação, uma área cicatricial no plano da superfície articular, discretamente irregular com uma coloração esbranquiçada similar à cartilagem adjacente circundado por alguns vilos (Figura 8B). Na figura 8C, temos o orifício distal medial, local onde apenas células foram aplicadas. Na artroscopia observamos uma área cicatricial de superfície irregular e retraída em relação ao plano articular, com coloração esbranquiçada que apresentou proliferações de aspecto viloso. Entretanto, em 8D, onde o orifício distal lateral foi utilizado como controle, observamos uma invaginação do tecido cicatricial, retraída em relação ao plano articular.

A figura 8E, F, G e H mostra o resultado da artroscopia após 174 dias de pós-operatório, onde foi possível observar uma discreta diferença na invaginação do tecido cicatricial da lesão tratada com biomaterial, com plano retraído em relação à superfície articular (Figura 8E), discreta invaginação do tecido cicatricial (Figura 8F), maior proliferação de aspecto viloso no tratamento com as células (Figura 8G) e ainda uma diminuição na proliferação de aspecto viloso, sendo que o tecido encontrava-se mais regular com relação a articulação (Figura 8H).

Na artroscopia realizada após 280 dias de pós-operatório no animal mantido por 365 dias de pós-operatório (8I, J, L e M) foi possível observar uma área de tecido cicatricial, com um plano discretamente retraído em relação ao plano da superfície articular e coloração esbranquiçada no orifício onde foi implantando apenas o biomaterial (Figura 8I). No orifício proximal lateral da articulação femorotibiopatelar esquerda, local onde foi implantado o biomaterial associado à SHED, foi possível evidenciar uma área cicatricial no plano da superfície articular, discretamente

irregular com uma coloração esbranquiçada similar a cartilagem adjacente (Figura 8J). Uma área cicatricial de coloração esbranquiçada, com superfície irregular e retraída em relação ao plano articular e com proliferação difusa de aspecto viloso foi observada no orifício, que apresentava apenas células (Figura 8L). Na figura 8M, que representa o orifício sem tratamento foi observada uma área cicatricial de superfície irregular, retraída em relação ao plano articular, com coloração esbranquiçada, proliferação difusa de aspecto viloso bem mais evidente quando comparando com o exame anterior.

Na artroscopia realizada após 280 dias de pós-operatório (Figura 8N, O, P e Q) no animal mantido por 730 dias pós-operatório foi possível observar uma invaginação do tecido cicatricial, com um plano discretamente retraído em relação ao plano da superfície articular e coloração esbranquiçada no orifício onde foi implantando apenas o biomaterial (Figura 8N). O exame artroscópico do orifício proximal lateral da articulação femorotibiopatelar esquerda, local onde foi implantado o biomaterial associado à SHED, apresentou uma área cicatricial no plano da superfície articular, discretamente irregular com uma coloração esbranquiçada similar a cartilagem adjacente e com pouca proliferação (Figura 8O). No orifício tratado apenas com células, foi observada uma área cicatricial de superfície irregular e retraída em relação ao plano articular de coloração esbranquiçada, com proliferação difusa de aspecto viloso também de coloração esbranquiçada (Figura 8P). No local do controle, vimos uma área cicatricial de superfície irregular, retraída em relação ao plano articular, com coloração esbranquiçada, proliferação difusa de aspecto viloso bem mais evidente comparando como exame anterior (Figura 8Q).

Figura 8 – Imagens artroscópicas da articulação femorotibio Patelar esquerda de ovino, destacando as diferentes regiões tratadas, após realização dos defeitos osteocondrais, aos 93 (A,B,C e D), 174 (E,F,G e H) e 280 dias no animal que teve 365 de pós-operatório (I,J,L e M) e 280 dias no naimla que teve 730 dias de pós-operatório (N,O,P e Q).

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda: A,E,I,N) Tratamentos com biomaterial; B,F,J,O) Tratamentos com biomaterial associado as SHED; C,G,L,P) Tratamento apenas com SHED; D,H,M,Q) Controle, sem tratamento.

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO FEMOROTIBIOPATELAR DOS ANIMAIS TRATADOS COM SHED ASSOCIADOS OU NÃO AO BIOMATERIAL

Nas Figuras 9, 10 e 11 foram realizadas técnicas de colorações por HE, Tricromo de Masson e Picrosírius, respectivamente, nas amostras dos animais que sofreram eutanásia com 120, 190, 365 e 730 dias de pós-operatório, após a descalcificação do material por Osteomoll®. A avaliação histológica dos tratamentos foi realizada por duas patologistas independentes que fizeram as análises cegas de cada um dos tratamentos, sendo que a transcrição dos resultados observados se encontra no texto e no quadro 1 (Apêndice A).

No primeiro período de tratamento pós-operatório, 120 dias, nenhum dos tratamentos revelou melhora significativa em comparação com o controle, sem tratamento (Figura 9D, 10D e 11D). Entretanto, foi possível observar que o defeito tratado com biomaterial associado às SHED apresentava mais material de preenchimento, (Figura 9B e 10B), sem, no entanto significar a formação de alguma estrutura identificável. O tecido encontrava-se eosinofílico, disperso, não encapsulado, distribuído de forma heterogênea com presença de células pequenas de maneira difusa (Figura 9B e 10B). Ainda, com 120 dias de tratamento não foi possível observar a presença de condrócitos em nenhum dos tratamentos (Figura 9A, 9B, 9C, 9D, 10A, 10B, 10C e 10D), mas sim um aspecto de trabéculas, ora mais espessas, ora mais delgadas, não encapsuladas e distribuídas de forma homogênea, formando colméias (Figura 9A, 9B, 9C, 9D, 10A, 10B, 10C e 10D).

Após 190 dias, em todos os tratamentos incluindo o controle, os tecidos já estavam mais preenchidos. No tratamento realizado apenas com biomaterial foi possível observar cartilagem hialina com condrócitos de tamanhos variados, distribuídos difusamente e matriz extracelular de aspecto irregular e heterogêneo (Figura 9E, 10E e 11E). Uma significativa melhora foi notada sugerindo um aspecto de cartilagem no tratamento feito usando às SHED associadas ao biomaterial (Figura 9F e 10F). Já no defeito tratado somente com células foi observado condrócitos organizados em grupos ou em colunas, tendo áreas com grande quantidade de matriz extracelular de padrão homogêneo, e poucas áreas com menor quantidade de matriz escassa e irregular (Figura 9G, 10G e 11G). Na Figura

9H, 10H e 11H, sem tratamento (controle) foi possível notar a presença de alguns condrócitos com núcleo fortemente corado, organizados em cordões ou individualmente sugerindo cartilagem principalmente do tipo fibrosa, por vezes, hialina e com padrão homogêneo.

No defeito tratado por 365 dias apenas com biomaterial foi observada pouca quantidade de cartilagem, presença de condrócitos pequenos formando cordões na matriz extracelular densa (Figura 9I, 10I e 11I) diferentemente do tratamento usando biomaterial associado a SHED, onde foi possível observar a presença de tecido cartilaginoso totalmente reconstituído com matriz extracelular mais organizada sugerindo que esse foi o melhor tratamento para reconstituição da cartilagem no nosso modelo (Figura 9J), sendo mais evidente nas colorações com Tricoma de Masson (10J). Já no defeito tratado apenas com células (Figura 9L, 10L e 11L) grande quantidade de matriz extracelular, presença de algumas células redondas pequenas, com núcleo bem corado, distribuídas de maneira individual e difusa. No defeito não tratado (controle), houve a presença de condrócitos apresentando tamanhos variados, ora arredondados, ora ovalados, com núcleo pouco corado, desorganizados e distribuídos de maneira heterogênea e matriz extracelular (Figura 9M, 10M e 11M).

No animal com 730 dias de pós-operatório foram observadas pouquíssimas células com formato de condrócitos, distribuídas individualmente de maneira difusa, circundadas por matriz extracelular sugerindo a presença de cartilagem hialina no defeito tratado apenas com biomaterial (Figura 9N, 10N e 11N) o que também foi observado quando as células foram associadas (Figura 9O, 10O e 11O). No tratamento com células (Figura 9, 10 e 11P), a cartilagem também tinha aspecto de hialina com presença de células bem pequenas, de formato arredondado ou alongado e distribuídas de maneira desorganizada (Figura 9P, 10P e 11P). Já no defeito sem tratamento, controle, uma matriz extracelular foi observado, porém o tecido estava pouco adequado para análise (Figura 9Q, 10Q e 11Q).

Com isso, foi possível afirmar que nos dois últimos períodos de pós-operatório, 365 e 730 dias (Figura 9I, 9J, 9L, 9M, 10I, 10J, 10L, 10M e Figura 9N, 9O, 9P, 9Q, 10N, 10O, 10P e 10Q, respectivamente) todas as lesões apresentavam melhora. Entretanto, foi possível observar a presença de tecido cartilaginoso reconstituído com matriz celular mais organizada principalmente nos tratamentos com SHED associadas ao biomaterial, indicando assim que esse foi o melhor

tratamento para reconstituição da cartilagem no nosso modelo (Figura 9J, 9O, 10J e 10O), sendo mais evidente nas colorações com Tricomo de Masson (10J e 10O). De modo geral, em todos os tratamentos, quanto maior o tempo de pós-operatório melhor o aspecto de recuperação da lesão, tendo aspecto mais semelhante ao da histologia de um joelho normal sem lesão (Figuras 9R, 10R e 11R). No quadro 1, encontra-se um resumo das análises histológicas realizadas (Apêndice A).

Em tempo, em nenhum dos períodos de pós-operatório com os diferentes tratamentos foi observado aspecto de mineralização. Vale ressaltar que dificuldades foram encontradas na análise dos tecidos, pois alguns não se apresentavam com aspecto homogêneo.

Com relação à coloração por picrossírius foi observado o mesmo padrão das colorações anteriores (Figura 11), o que era esperado já que os cortes provém da mesma amostra. Entretanto, apesar de sua importância para a análise de formação de fibras colágenas ele foi impreciso.

Figura 9 - Fotomicrografia dos do sulco troclear femoral submetidos à coloração de HE com diferentes tratamentos e períodos, visualizados por microscopia óptica de luz.

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda: A) Biomaterial; B) Biomaterial associado às SHED; C) SHED D) Controle; E) Biomaterial; F) Biomaterial associado às SHED; G) SHED; H) Controle; I) Biomaterial; J) Biomaterial associado às SHED; L) SHED; M) Controle; N) Biomaterial; O) Biomaterial associado às SHED; P) SHED; Q) Controle; R) Cartilagem normal de ovino. A, B, C e D) Tratamento de 120 dias; E, F, G e H) Tratamento de 190 dias; I, J, L e M) Tratamento de 365 dias; N, O, P e Q) Tratamento de 730 dias. Escala de barras: 50 μ m.

Figura 10 - Fotomicrografia dos tecidos cartilaginosos e conjuntivos do sulco troclear femoral submetidos à coloração de tricromo de Masson com diferentes tratamentos e visualizados por microscopia óptica de luz.

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda: A) Biomaterial; B) Biomaterial associado às SHED; C) SHED D) Controle; E) Biomaterial; F) Biomaterial associado às SHED; G) SHED; H) Controle; I) Biomaterial; J) Biomaterial associado às SHED; L) SHED; M) Controle; N) Biomaterial; O) Biomaterial associado às SHED; P) SHED; Q) Controle; R) Cartilagem normal de ovino . A, B, C e D) Tratamento de 120 dias; E, F, G e H) Tratamento de 190 dias; I, J, L e M) Tratamento de 365 dias; N, O, P e Q) Tratamento de 730 dias. Escala de barras: 50 μ m.

Figura 11 - Fotomicrografia dos tecidos cartilagosos e conjuntivos do sulco troclear submetidos à coloração de Picrosírius com diferentes tratamentos e visualizados por microscopia óptica de luz.

Fonte: (SILVA, M. V. M., 2015).

Legenda: A) Biomaterial; B) Biomaterial associado às SHED; C) SHED D) Controle; E) Biomaterial; F) Biomaterial associado às SHED; G) SHED; H) Controle; I) Biomaterial; J) Biomaterial associado às SHED; L) SHED; M) Controle; N) Biomaterial; O) Biomaterial associado às SHED; P) SHED; Q) Controle; R) Cartilagem normal de ovino . A, B, C e D) Tratamento de 120 dias; E, F, G e H) Tratamento de 190 dias; I, J, L e M) Tratamento de 365 dias; N, O, P e Q) Tratamento de 730 dias. Escala de barras: 50 µm.

6 DISCUSSÃO

O joelho é uma das maiores e mais complexas articulações do nosso corpo, desempenhando papel essencial do movimento no sentido horizontal por carregar o peso do corpo e permitir a corrida e caminhada, e no sentido vertical por permitir movimentos de salto (KAPANDJI, 2000). Lesões ou defeitos ocasionados na cartilagem articular ocorrem frequentemente por causa de traumas, tumores e doença osteocondral degenerativa e progressiva da cartilagem articular, como é o caso da OA e da artrite reumatóide (WAKITAIN et al., 1994, MUSUMECI et al. 2011; MELO et al., 2013, MUSUMECI et al., 2014), resultando em implicações significativas em nível funcional, clínico e social (MUSUMECI et al., 2014).

Dentre as enfermidades osteocondrais, a OA de joelho é mais comum (MUSUMECI et al., 2011) afetando 9,9 milhões de brasileiros, tendendo a aumentar conforme aumenta a expectativa de vida (Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia, 2012). Por conta desses dados, se justificam estudos e novas tentativas para melhorar a qualidade de vida de pacientes com lesões osteocondrais, bloqueando a progressão da doença ou regenerando a articulação acometida.

Atualmente, os tratamentos propostos para lesões osteocondrais são realizados através de medicamentos, técnica de microfratura, mosaicoplastia e o transplante de condrócitos (WAKITAIN et al., 1994; REZENDE; GOBBI, 2009; MUSUMECI et al., 2011; CARNEIRO; BARBIERI; NETO, 2013). A substituição do joelho pelo procedimento cirúrgico de artroplastia também é uma alternativa, porém apesar das suas vantagens, essa técnica vem sendo substituída pela Engenharia de Tecidos dentro da Medicina Regenerativa (MUSUMECI et al., 2011 a e b, 2012, FILARDO et al, 2013).

Neste trabalho propusemos a criação de um modelo de estudo de lesões osteocondrais em ovinos e de um novo modelo de tratamento baseado na Medicina Regenerativa, utilizando células-tronco (SHED) associadas a um biomaterial (constituído por HA e quitosana) visando uma terapia alternativa no tratamento de lesões da cartilagem articular para humanos ou animais. Em tempo, nosso modelo envolveu transplante xenogênico com células SHED humanas sendo infundidas em

ovinos sem apresentação de efeitos adversos a curto e longo prazo após a injeção, sendo o tempo máximo de monitoramento pós-operatório 730 dias.

É sabido que um bom delineamento experimental é fundamental para o melhor conhecimento de uma patologia (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005; CARNEIRO; BARBIERI; NETO, 2013; FISHER et al., 2015). Como nosso modelo de tratamento demanda envolvimento de vários sistemas fisiológicos, o trabalho teve como ponto importante o desenvolvimento de um modelo animal para estudo de terapia de lesões osteocondrais. Além disso, visando uma alternativa para o tratamento de lesões osteocondrais em humanos, o ovino foi o animal escolhido como modelo experimental devido ao seu tamanho, biomecânica similar à articulação femorotibial de humanos e pela capacidade de reparação cartilagínea similar a de humanos (OSTERHOFF et al., 2011; ORTH; MADRY, 2013).

Anatomicamente, humanos e ovinos possuem ligamento cruzado, menisco e ligamento colateral assimétrico pela extensão com a porção distal bicondilar do fêmur, características que o tornam um modelo atratante para este estudo (SMITH et al., 2008; OSTERHOFF et al., 2011).

Legitimando nossa escolha, na ortopedia alguns ensaios pré-clínicos já foram realizados em ovinos como modelos de regeneração da cartilagem articular do joelho utilizando como tratamento plasma rico em plaquetas (PRP) (CARNEIRO; BARBIERI; NETO, 2013); aplicação de CTMs de medula óssea em defeitos ósseos criados em joelho (MRUGALA et al., 2007); indução de necrose na cabeça do fêmur (MANGGOLD et al., 2002); reparação cartilagínea com transplante autólogo de CTMs (XIMIN et al., 2004); avaliação tridimensional em ruptura de ligamento (TAPPER et al., 2008); biomaterial e biomaterial associado com célula para defeitos ósseos (SCHAGEMANN et al., 2009). Por fim, o sulco troclear femoral foi escolhido devido a sua facilidade de manutenção e concavidade (WAKITANI et al., 1994; SMITH et al., 2008; OSTERHOFF et al., 2011). Além disso, essa mesma região já foi usada anteriormente afirmando a facilidade do acesso, sem sinais de claudicação e infecções de feridas pós-cirúrgicas (ORTH; MADRY, 2013).

É sabido que lesões com diâmetros inferiores a 3mm tendem a ser reparadas espontaneamente por tecido fibrocartilaginoso (RUDERT et al., 2005), e que defeitos superiores a 3mm não cicatrizam espontaneamente (JACKSON et al., 2001; SAW et al., 2009), por isso os defeitos realizados neste trabalho tiveram aproximadamente 5mm de diâmetro, impedindo a cicatrização espontânea. Na experimentação animal,

é preciso utilizar o conceito dos 3R's, *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*, traduzido para o português como Alternativas, Redução e Aprimoramento (RIVERA, 2011). Para seguir os princípios dos 3 R's neste trabalho, antes do início do experimento propriamente dito, a técnica cirúrgica com a criação dos defeitos osteocondrais foi treinada em joelho de cadáveres ovinos por algumas vezes e após a habilidade ser obtida e que partimos para a realização da cirurgia.

Em um primeiro momento, este trabalho visava obter um modelo para o estudo da OA. Entretanto, como a fisiopatologia da OA é um processo crônico, progressivo e complexo, envolvendo outros mecanismos, conseguimos apenas obter um modelo animal para o estudo de defeitos osteocondrais, uma parte da enfermidade encontrada na OA.

Os quatro ovinos utilizados neste trabalho tiveram os defeitos osteocondrais induzidos no mesmo membro (pélvico esquerdo), visando minimizar o desconforto do animal e facilitar a recuperação pós-operatória. Além disso, convém ressaltar que a utilização dos quatro defeitos e tratamentos no mesmo membro dos animais ocorreu em virtude deles não serem isogênicos, o que poderia comprometer a comparação da eficácia dos tratamentos feitos em animais diferentes e priorizando também o conceito dos 3R's. Apesar dos quatro defeitos terem sido realizados no mesmo membro, nosso modelo causou mínimo desconforto ao animal, visto que uma semana após a cirurgia os animais apoiavam o membro no solo e se locomoviam no final da segunda semana de pós-operatório, resultados similares aos observados por Caneiro e colaboradores que realizaram um modelo experimental similar, porém com maior diâmetro (8mm), único e em dois joelhos do animal (CARNEIRO; BARBIERI; NETO, 2013). A comparação de nossos resultados com o dado da literatura pode sugerir que apesar da produção de quatro defeitos, como foram no mesmo joelho, isto pode não ter afetado de forma significativa a aumentar o período de recuperação necessário para o reestabelecimento da marcha, ou também o menor diâmetro pode ter requerido menor tempo para melhora clínica dos animais.

As SHED foram escolhidas para esse estudo por serem células mesenquimais com capacidade de diferenciação óssea e cartilaginosa e também considerando resultados prévios de regeneração de defeitos ósseos (GRONTHOS et al., 2002; HUANG et al., 2005; HAU et al., 2006). Além disso, CTM tem como característica a supressão de efeitos e componentes do sistema imune exercendo

imunomodulação, inibindo ativação e proliferação de linfócitos T e B, suprimindo a ativação de células NK (do inglês: *natural killer*), escapando de lise mediada por linfócitos T citotóxicos e modulando a secreção de citocinas que estimulam células dendríticas e macrófagos (SINGER; CAPLAN, 2011), permitindo dessa forma transplantes alo e xenogênicos (LIECHTY et al., 2000). Além disso, as CTM vão em direção aos tecidos lesionados aonde mostram efeitos tróficos com sínteses de moléculas proliferativas, pró-angiogênicas e regenerativas (FILARDO et al., 2013).

Ainda, as SHED são de fácil obtenção (MIURA et al., 2003; BELTRÃO-BRAGA et al., 2011) quando comparados com medula óssea (NAM et al., 2013); tecido adiposo (MAUMUS et al., 2013) e de fácil cultivo, com diferenciação *in vitro* de diversos tipos celulares (MIURA et al., 2003; HUANG, GRONTHOS; SHI, 2009). Por fim, as SHED são provenientes de dentes decíduos, cuja obtenção não requer qualquer intervenção clínica-cirúrgica, já que ocorre a queda do dente de forma espontânea (MIURA et al., 2003; HUANG; GRONTHOS; SHI, 2009; BELTRÃO-BRAGA et al., 2011).

O uso de Biomateriais como alternativas terapêuticas em ortopedia não é uma novidade e muitos estudos vêm sendo realizados com esse intuito (POINERN; BRUNDAVANAM; FAWCETT, 2012; LEWALLEN et al., 2014), tanto como reposição de um defeito quanto com suporte para adesão de CT (DETSCH et al., 2010; BRESSAN et al., 2014). Em nosso trabalho, selecionamos um biomaterial duplo, HA junto com quitosana. A junção entre HA e quitosana no reparo de lesões em tecidos ósseos já foi realizada em coelhos, mostrando boa regeneração (AZEVEDO et al., 2013). Além disso, a quitosana apresenta propriedades semelhantes aos glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular da cartilagem (PETER et al., 2010), tendo sido demonstrada sua citocompatibilidade com diversos tipos celulares (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; HOFFMANN et al., 2009), bem como sua compatibilidade em estudos *in vivo* (DE BRITO et al., 2009; SANTANA et al., 2014). Os mesmos resultados de biocompatibilidade do biomaterial com as SHED tanto *in vitro* quanto *in vivo* foram observados no nosso trabalho. Convém ressaltar que o biomaterial produzido se mostrou firme e altamente biocompatível, unindo um implante cartilaginoso sólido e forneceu substrato para a construção de osso subjacente, mimetizando a zona de transição da cartilagem com a superfície óssea.

Após o procedimento cirúrgico, além do acompanhamento clínico já mencionado, os animais foram monitorados por exames de imagem, sendo que o

exame radiográfico não foi um bom parâmetro de acompanhamento da evolução clínicas dos tratamentos. Já nos exames ultrassonográficos, pudemos observar uma reconstituição do local lesionado e um nivelamento deste local com relação à articulação. Porém, o melhor exame para acompanhamento da terapia aplicada foi o de artroscopia, onde as imagens macroscópicas revelaram a presença de tecido com característica de cartilagem adjacente.

Outra forma de acompanhamento clínico do reparo da lesão osteocondral é a análise do líquido sinovial, tanto para verificar a natureza e a extensão das lesões intra-articulares, ajudando na definição do tratamento e prognóstico da doença (TEW; HOTCHKISS, 1981; MOYER, 1983; BARNABÉ et al. 2005). Além disso, a análise do líquido sinovial permitem avaliações seriadas que podem auxiliar no acompanhamento em resposta à terapia (KIEHL, 1997). Infelizmente, apesar das diversas tentativas, neste trabalho, não foi possível obter quantidades suficientes de líquido sinovial para análise.

O parâmetro para observação da evolução dos tratamentos mais relevante neste trabalho foi à avaliação histopatológica do aspecto do reparo das lesões osteocondrais. Entretanto, apesar dos avanços científicos, a descalcificação óssea ainda é uma limitação para este tipo de procedimento, em função do processo de descalcificação não preservar as estruturas celulares na maioria das vezes, além de ser bastante moroso (CARVALHO et al., 2008). No entanto, para este trabalho estabelecemos anteriormente a utilização do Osteomoll® a 90% como agente descalcificador por preservar de forma adequada as características dos tecidos ósseo e cartilaginoso (SILVA, 2011).

Neste trabalho, os resultados histológicos revelaram que as lesões melhoraram no decorrer dos períodos de tratamento, onde o defeito osteocondral foi progressivamente reconstituído por tecido semelhante ao cartilaginoso, em todos os tratamentos. Entretanto, a associação do biomaterial com as SHED reduziu o tempo de regeneração do local lesionado em comparação aos outros tratamentos, o que é muito importante para o paciente, pois isso reduz o tempo de convalescência e acelera a recuperação melhorando a qualidade de vida do paciente.

Outros estudos já foram feitos usando abordagens ainda experimentais para tratamento de doenças osteocondral com melhora na regeneração da lesão, como a injeção autóloga de CT de medula óssea para o reparo da cartilagem em caprinos (NAM et al., 2013). Em mini-porcos, a lesão de côndilo femoral foi tratada com

biomaterias em associação com PRP ou aspirado de medula óssea (ou ambos) e revelou que os tratamentos com biomaterias em associação com as células foram os que produziram melhores efeitos (BETSCH et al., 2013). Ainda, Niemeyer e colaboradores (2010) compararam as CTM de medula óssea com as CTM de tecido adiposo em associação com PRP para regeneração óssea da tíbia de ovelhas, observando um maior potencial regenerativo quando usadas CTM derivadas de medula óssea associadas ao PRP. A associação de PRP à CTM de medula óssea, separadamente ou associados a HA, em côndilos têmporo-mandibular (esquerdo e direito) de ovinos, revelou melhora da lesão quando as CTM estavam associadas ao biomaterial (CIOCCA et al., 2013), sendo o mesmo resultado observado por Tayton e colaboradores em defeitos bilaterais de condilos de ovinos (TAYTON et al., 2014). Resultados semelhantes considerando as análises histológicas foram obtidos neste trabalho, onde o potencial terapêutico das SHED associadas ao biomaterial representou uma alternativa promissora para o tratamento de lesões osteocondrais, podendo ser utilizada em futuras aplicações clínicas, tanto na medicina regenerativa humana quanto na veterinária.

Considerando-se que a cartilagem articular é composta primariamente de colágeno tipo II, principal molécula do arcabouço fibrilar, representando cerca de 80 a 85% do conteúdo total de colágeno do tecido cartilaginoso (VELOSA et al. 2007) sua análise é importante. Infelizmente, apesar de inúmeras tentativas para a realização desta análise por imuno-histoquímica utilizando anticorpo específico, a maioria dos cortes com diferentes tratamentos e períodos descolaram das lâminas silanizadas durante o processo de desmascaramento dos sítios antigênicos mesmo utilizando maneiras, tempos e tampões variados.

Por fim, importante mencionar que não foi possível avaliar se a melhora das lesões foi devido a diferenciação das SHED implantadas ou se houve uma ação parácrina das mesmas no recrutamento de células dos ovinos. Um possível viés do nosso modelo é que se o efeito regenerativo foi parácrino, pode ter ocorrido influência deste efeito em todos os quatro tratamentos. Nesse caso, novos experimentos utilizando animais isogênicos com lesões isoladas seriam necessários para avaliar a resposta regenerativa da lesão osteocondral.

7 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- O animal selecionado, o ovino, atendeu as características necessárias para a sua utilização como modelo experimental de lesão osteocondral; respeitando o princípio dos 3-Rs e possibilitando a rápida recuperação pós-operatória;
- A avaliação clínica e de imagem é um importante parâmetro para avaliar a evolução dos tratamentos, sendo os exames de US e artroscopia os mais representativos;
- Os períodos de acompanhamento de pós-operatório foram adequados para avaliar diferenças significativas em relação a eficiência e maior rapidez para o reparo das lesões, parâmetros importantes na melhora da qualidade de vida dos pacientes;
- As avaliações histológicas revelaram que o tratamento das SHED em associação ao biomaterial produziram efeitos melhores em comparação aos outros tratamentos e em menor tempo;

REFERÊNCIAS

- AHSAN, T.; NEREM, R. M. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 8, n. 3, p. 134-140, 2005.
- AMOAKO, A. O.; PUJALTE, G. G. A. Osteoarthritis in young, active, and athletic individuals. **Clinical Medicine Insights. Arthritis and Musculoskeletal Disorders**, v. 22, n. 7, p. 27-32, 2014.
- ALIPOUR, R.; ADIB, M.; MASOUMI, K. M.; HASHEMI-BENI, B.; SERESHKI, N. Comparing the immunoregulatory effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 12, n. 4, p. 331-344, 2013.
- ARLIANI, G. G. A.; ASTUR, D. C.; YAMADA, R. K. F.; YAMADA, A. F.; MIYASHITA, G. K.; MANDELBAUM, B.; COHEN, M. Early osteoarthritis and reduced quality of life after retirement in former professional soccer players. **Clinics**, v. 69, n. 9, p. 589-594, 2014.
- AZEVEDO, A. S.; DE SÁ, M. J. C.; FOOK, M. V. L.; NETO, P. I. DA N.; DE SOUSA, O. B.; DE AZEVEDO, S. S.. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos: estudo histológico e morfométrico, **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1265-1270, 2013.
- BALDWIN, A. D.; KIICK, K. L. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. **Biopolymers**, v. 94, n. 1, p. 128-140, 2010.
- BARNABÉ, P. A.; CATTELAN, J. W.; CADIOLI F. A.; GODOY, R. F.. Características físico-químicas e citológicas do líquido sinovial da bainha tendínea digital de eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 288-294, 2005.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C.; PIGNATARI, G. C.; MAIORKA, P. C.; OLIVEIRA, N. A.; LIZIER, N. F.; WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MUOTRI, A. R.; KERKIS, I. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 11-12, p. 1707-1719, 2011.
- BENNEL, K. L.; HINMAN, R. S. A review of the clinical evidence for exercise in osteoarthritis of the hip and knee. **Journal of Science and Medicine in Sport/Sports Medicine Australian**, v. 14, n. 1, p. 4-9, 2011.
- BETSCH, M.; SCHNEPPENDAHL, J.; THUNS, S.; HERTEN, M.; SAGER, M.; JUNGBLUTH, P.; HAKIMI, M.; WILD, M.. Bone Marrow Aspiration Concentrate and Platelet Rich Plasma for Osteochondral Repair in a Porcine Osteochondral Defect Model, **Plos one**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2013.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 44, n. 4, p.215-230, 2006.

BRESSAN, E.; FERRONI, L.; GARDIN, C.; SBRICOLI, L.; GOBBATO, L.; LUDOVICHETTI, F. S.; TOCCO, I.; CARRARO, A.; PIATTELLI, A.; ZAVAN, B. Graphene based scaffolds effects on stem cells commitment. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 296-310, 2014.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. **Instructional Course Lectures**. v. 47, p. 477-486, 1998.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 7-8, p. 1198-1211, 2005.

CARNEIRO, M. O.; BARBIERI, C. H.; NETO, J. B. O gel de plasma rico em plaquetas propicia a regeneração da cartilagem articular do joelho de ovelhas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80-6, 2013.

CASAGRANDE, L.; CORDEIRO, M. M.; NÖR, S. A.; NÖR, J. E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v. 99, n. 1, p.1-7, 2011.

CARVALHO, L. F. DAS C. E S. DE; NEVES, A. C. C.; RICARDO, L. H.; RODE, S. DE M.; MARTINS, A. M. A.. Tempo de descalcificação e preservação do núcleo celular de tecido mineralizado descalcificado com ácido nítrico a 5%, edta a 7% e biodec – R, **Revista Periodontia**, v. 18, n. 2, p. 71-76, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Osteoarthritis**. [2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.htm>). Acesso em: 18 out. 2013.

CIOCCA, L.; DONATI, D.; RAGAZZINI, S.; DOZZA, B.; ROSSI, F.; FANTINI, M.; SPADARI, A.; ROMAGNOLI, N.; LANDI, E.; TAMPIERI, A.; PIATTELLI, A.; IEZZI, G.; SCOTTI, R.. Mesenchymal Stem Cells and Platelet Gel Improve Bone Deposition within CAD-CAM Custom-Made Ceramic HA Scaffolds for Condyle Substitution. **BioMed Research International**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2013.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, n. 3., p. 261–268, 2001.

CHEN, B.; SUN, H. H.; WANG, H. G.; KONG, H.; CHEN, F. M.; YU, Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. **Biomaterials**, v. 33, n. 20, p. 5023-5035, 2012.

CHEN, Y.; SUN, Y.; PAN, X.; HO, K.; LI, G. Joint distraction attenuates osteoarthritis by reducing secondary inflammation, cartilage degeneration and subchondral bone aberrant change. **Osteoarthritis and Cartilage**, p. 1-8, 2015.

CHEN, Y.; SHAO, J. Z.; XIANG, L. X.; DONG, X. J.; ZHANG, G. R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 40, n. 5, p. 815-820, 2008.

CHU, C. R. Chondral and osteochondral injuries: mechanisms of injury and repair response. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 11, n. 2, p. 70-75, 2001.

COSTA, B. D.; CAMARGO, N. H.; OLESKOVIC, N.; GAVA, A.; DALLABRIDA, A. L.; REGALIN, D.; LIMA, M. P. A.; MORAES, A. N. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 35, n. 2, p. 177-187, 2015.

DE BRITO, M. K. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R.; PELLIZZON, C. H.; NETO, C. G. DA T. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n.1, p. 35-40, 2009.

DETSCH, R.; DIESER, I.; DEISINGER, U.; UHL, F.; HAMISCH, S.; ZIEGLER, G.; LIPPS, G. Biofunctionalization of dispense-plotted hydroxyapatite scaffolds with peptides: quantification and cellular response. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92, n. 2, p. 493-503, 2010.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 5983–5990, 2005.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

EVANGELINELLIS, M. M.; PIGNATARI, G. C.; BELTRAO, C. F. B.; BELTRAO-BRAGA, P. C. B. The Use of SHED in Cellular Therapy and Disease Modeling. **Journal of Interdisciplinary Medicine and Dental Science**, v. 2, n. 5, p. 143-148, 2014.

ESPER, G. V. Z.; PIGNATARI, G. C.; RODRIGUES, M. N.; BERTAGNON, H. G.; FERNANDES, I. R.; NASCIMENTO, N.; TABOSA, A. M.; BELTRÃO-BRAGA, P. C.; MIGLINO, M. A. Aquapuncture using stem cell therapy to treat mdx mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FERREIRA, L. M.; HOCHAM, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 28-34, 2005.

FILARDO, G.; MADRY, H.; JELIC, M.; ROFFI, A.; CUCCHIARINI, M.; KON, E.. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 21, n. 8, p. 1717-1729, 2013.

FISHER, M. B.; BELKIN, N. S.; MILBY, A. H.; HENNING, E. A.; BOSTROM, M.; KIM, M.; PFEIFER, C.; MELONI, G.; DODGE, G. R.; BURDICK, J. A.; SCHAEER, T. P.; , D. R.; MAUCK, R. L.. Cartilage repair and subchondral bone remodeling in response to focal lesions in a mini-pig model: implications for tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 21, n. 3-4, p. 850-860, 2015.

FRITZ, J.; JANSSEN, P.; GAISSMAIER, C.; SCHEWE, B.; WEISE, K. Articular cartilage defects in the knee—basics, therapies and results. **Injury**, v. 39, n. 1, p. 50-57, 2008.

GRIESI-OLIVEIRA, K.; ACAB, A.; GUPTA, A. R.; SUNAGA, D. Y.; CHAILANGKARN, T.; NICOL, X.; NUNEZ, Y.; WALKER, M. F.; MURDOCH, J. D.; SANDERS, S. J.; FERNANDEZ, T. V.; JI, W.; LIFTON, R. P.; VADASZ, E.; DIETRICH, A.; PRADHAN, D.; SONG, H.; MING, G. L.; GU, X.; HADDAD, G.; MARCHETTO, M. C.; SPITZER, N.; PASSOS-BUENO, M. R.; STATE, M. W.; MUOTRI, A. R. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. **Molecular Psychiatry**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2014.

GOLDBERG, M.; SMITH, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 15, n. 1, p. 13-27, 2004.

GOMES, M.; AZEVEDO, H.; MALAFAYA, P.; SILVA, S. Natural polymers in tissue engineering applications. In: VAN BLITTERSWIJK, C.; LINDHAL, A.; THOMSEM, P.; OLIVEIRA, J.; SILVA, G.; SOUSA, R.; MANO, J.; REIS, R., (Ed) **Tissue Engineering**: Canadá. Elsevier; 2008. p. 145-192.

GUPTA, A.; BHAT, S.; JAGDALE, P. R.; CHAUDHARI, B. P.; LIDGREN, L.; GUPTA, K. C.; KUMAR, A. Evaluation of three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffold for the repair of subchondral cartilage defects: an in vivo study in a rabbit model. **Tissue engineering: Part A**, v. 20, n. 23-24, 2014.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

HANSON, S.; D'SOUZA, R. N.; HEMATTI, P. Biomaterial–mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. **Tissue Engineering: Part A**, v. 20, n. 15-16, 2014.

HAU, G. R.; LOPEZ, C. M. L.; BALDANI, M. H.; GARBELINI, M. C. L.; PAULETTO, C. A.; LEAL, G. A.; SLUSARZ, P. A. A. Revisão preliminar sobre a viabilidade de utilização de células-tronco provenientes de dentes humanos decíduos e permanentes na regeneração tecidual. **Publicativo da Universidade Estadual de Ponta Grossa - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, p. 47-55, 2006.

HELMUS, M. N.; GIBBONS, D. F.; CEBON, D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 70-80, 2008.

HOFFMANN, B.; SEITZ, E. D.; MENCKE, E. A.; KOKOTT, A.; ZIEGLER, G. Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering. **Journal of Materials Science**, v. 20, n. 7, p. 1495-1503, 2009.

HOLY, C. E.; FIALKOV, J. A.; SHOICHET, M. S.; JOHN, D. In vivo models for bone tissue-engineering constructs. In: Davies J, editor. **Bone Engineering**. Toronto: Copyright; 2000. p. 496-504.

HSIEH, C. Y.; TSAI, S. P.; HO, M. H.; WANG, D. M.; LIU, C. E.; HSIEH, C.H.; TSENG, H. C.; HSIEHAL, H. J. Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds. **Carbohydrate polymers**, v. 67, n. 1, p. 124-32, 2007.

HUANG, J. I.; KAZMI, N.; DURBHAKULA, M. M.; HERING, T. M.; YOO, J. U.; JOHNSTONE, B. Chondrogenic potencial of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 6, p. 1383-1389, 2005.

HUANG, S.; WANG, W.; CHOU, L.; LIAO, C.; LIOU, T.; LIN, H. Osteoarthritis increases the risk of dementia: a nationwide cohort study in Taiwan. **Scientific Reports**, v. 18, n. 5, p.1-7, 2015.

HUANG, G. T.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 9, p. 792-806, 2009.

HUBER, M.; TRATTNIG, S.; LINTNER, F. Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. **Investigative Radiology**, v. 35, n. 10, p. 573-580, 2000.

IMAMURA, M.; EZQUERRO, F.; ALFIERI, F. M.; BOAS, L. V.; TOZETTO-MENDOZA, T. R.; CHEN, J.; ÖZÇAKAR, L.; ARENDT-NIELSEN, L.; BATTISTELLA, L. R. Serum levels of proinflammatory cytokines in painful knee osteoarthritis and sensitization. **International Journal of Inflammation**, p. 1- 8, 2015.

INOUE, T.; SUGIYAMA, M.; HATTORI, H.; WAKITA, H.; WAKABAYASHI, T.; UEDA, M. Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 1-2, p. 24-29, 2013.

JACKSON, D. W.; LALOR, P. A.; ABERMAN, H. M.; SIMON, T. M. Spontaneous repair of fullthickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 83, n. 1, p. 53-64, 2001.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 538p.

KAPANDJI, A. I. Fisiologia Articular. 5º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, v. 2. 280p.

KARAMZADEH, R.; ESLAMINEJAD, M. B. Dental-related stem cells and their potential in regenerative medicine. In: ANDRADES, J. A. **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**. Croácia: Intech, 2013. p. 953- 978.

KATARI, R. S.; PELOSO, A.; ORLANDO, G. Tissue Engineering. **Advances in Surgery**, v. 48, p. 137–154, 2014.

KAWACHI, E.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518, 2000.

KASHYAP, R. SHED - Basic structure for stem cell research. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. 7-9, 2015.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; MASSIRONI, S. M. G.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and embryonic stem cell markers. **Cells Tissue Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 105-116, 2006.

KIEHL, A. R. Synovial fluid analysis. In: Anais do Proc. 14th American College of Veterinary Internal Medicine Forum, Lake Buena Vista, FL. 1997.

KOCK, L.; VAN DONKELAAR, C. C.; ITO, K. Tissue engineering in functional articular cartilage: current status. **Cell Tissue Research**. v. 347, n. 3, p. 613-627, 2012.

LE, T. K.; MONTEJANO, L. B.; CAO, Z.; ZHAO, Y.; ANG, D. Health care costs in US patients with and without a diagnosis of osteoarthritis. **Journal of Pain Research**. v. 5, p. 23-30, 2012.

LEE, H. S.; HUANG, G. T.; CHIANG, H.; CHIOU, L. L.; CHEN, M. H.; HSIEH, C. H.; JIANG, C. C. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. **Stem Cells**, v. 21, n. 2, p. 190-199, 2003.

LEWALLEN, E. A.; RIESTER, S. M.; BONIN, C. A.; KREMERS, H. M.; DUDAKOVIC, A.; KAKAR, S.; COHEN, R. C.; WESTENDORF, J. J.; LEWALLEN, D. G.; WIJNEN, A. J. V. Biological strategies for improved osseointegration and osteoinduction of porous metal orthopedic implants. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 2, p. 218-230, 2014.

LIECHTY, K. W.; MACKENZIE, T. C.; SHAABAN, A. F.; RADU, A.; MOSELEY, A. M.; DEANS, R.; MARSHAK, D. R.; FLAKE, A. W.. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. **Nature Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1282–1286, 2000.

LIU, H.; WEBSTER, T. J. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 299-313, 2010.

LUYTEN, F.P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. **Current Opinions of Rheumatology**, v. 16, p. 599-603, 2004.

LYNETTE, A. H. Responsible conduct with animals in research. England: Oxford Univ. **Press**; 1998.

MANGGOLD, J. ; SERGI, C.; BECKER, K.; LUKOSCHEK, M.; SIMANK, H. G.. A new animal model of femoral head necrosis induced by intraosseous injection of ethanol. **Laboratory Animal**, v. 36, n. 2, p. 173-180, 2002.

MANKANI, M. H.; KUZNETSOV, S. A.; WOLFE, R. M.; MARSHALL, G. W.; ROBEY, P. G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. **Stem Cells**, v. 24, n. 9, p. 2140-2149, 2006.

MARTINEK, V.; FU, F. H.; HUARD, J. Gene therapy and tissue engineering in sports medicine. **Physician Sportsmed**, v. 28, n. 2, p. 34-51, 2000.

MAUMUS, M.; MANFERDINI, C.; TOUPET, K.; PEYRAFITTE, J.; FERREIRA, R.; FACCHINI, A.; GABUSI, E.; BOURIN, P.; JORGENSEN, C.; LISIGNOLI, G.; NOËL, D. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. **Stem Cell Research**. v. 11, n. 2, p. 834–844, 2013.

MELO, M. M.; MALLMANN, P. R.; SONEGO, D. A.; MARQUES, A. T.; GONÇALVES, G. F.; ZANATTA, R.; SOUZA, M. A.; NÉSPOLI, P. E. B.; SOUZA, R. L.. Reprodução experimental da doença articular degenerativa, pelo método cirúrgico associado à terapia condroprotetora, em ratos, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1217-1226, 2013.

MICHAEL, J. W.; SCHLUTER-BRUST, K. U.; EYSEL, P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of knee. **Deutsches Ärzteblatt international**. v. 107, n. 9, p. 152-162, 2010.

MILAGRES, A. S.; SOUZA, I. M.; PEREIRA, J. O. C; PAZ, R. D.; ABREU, F. M. C. Benefícios de um programa de fortalecimento do quadríceps no tratamento da osteoartrite de joelho. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 7, p. 73-78, 2006.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W. ROBEY, P. G.; SHI, S.; SHED: Stem cell from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 5807-5812, 2003.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 238-45, 2010.

MOYER, W. Clinical use of synovial fluid analysis. In: Anais do Proc. 28th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 1983, p.129-135.

MRUGALA, D.; BONY, C.; NEVES, N.; CAILLOT, L.; FABRE, S.; MOUKOKO, D.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Phenotypic and functional characterization of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. **Annals of Rheumathis Diseases**, v. 67, n. 3, p. 288-295, 2007.

MURPHY, L.; SCHWARTZ, T. A.; HELMICK, C. G.; RENNER, J. B.; TUDOR, G.; KOCH, G.; DRAGOMIR, A.; KALSBECK, W. D.; LUTA, G.; JORDAN, J. M. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. **Arthritis Rheumatism**, v. 59, n. 9, p. 1207-1213, 2008.

MUSUMECI, G.; CARNAZZA, M. L.; LORETO, C.; LEONARDI, R.; LORETO, C. β -defensin-4 (HBD-4) is expressed in chondrocytes derived from normal and osteoarthritic cartilage encapsulated in PEGDA scaffold. **Acta Histochem**, v. 114, n. 8, p. 805-812, 2012.

MUSUMECI, G.; LORETO, C.; CARNAZZA, M. L.; COPPOLINO, F.; CARDILE, V.; LEONARDI, R. Lubricin is expressed in chondrocytes derived from osteoarthritic cartilage encapsulated in poly (ethylene glycol) diacrylate scaffold. **European Journal of Histochemistry**, v. 55, n.3, p. 31, 2011.

MUSUMECI, G.; LORETO, C.; CARNAZZA, M. L.; STREHIN, I.; ELISSEEFF, J. OA cartilage derived chondrocytes encapsulated in poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) for the evaluation of cartilage restoration and apoptosis in an *in vitro* model. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 10, p. 1265-1278, 2011.

NAM, H. Y.; KARUNANITHI, P.; LOO, W. C. P.; NAVEEN, S. V.; CHEN, H. C.; HUSSIN, P.; CHAN, L.; KAMARUL, T.. The effects of staged intra-articular injection of cultured autologous mesenchymal stromal cells on the repair of damaged cartilage: a pilot study in caprine model, **Arthritis Research and Therapy**, v. 15, n. 129, p. 1-13, 2013.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p. 249-282, 2006.

NGUYEN, U. S.; ZHANG, Y.; ZHU, Y.; NIU, J.; ZHANG, B.; FELSON, D. T. Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: survey and cohort data. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 11, p. 725-732, 2011.

NIEMEYER, P.; FECHNER, K.; MILZ, S.; RICHTER, W.; SUEDEKAMP, N. P.; MEHLHORN, A. T.; PEARCE, S.; KASTEN, P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3572–3579, 2010.

NISHINO, Y.; YAMADA, Y.; EBISAWA, K.; NAKAMURA, S.; OKABE, K.; UMEMURA, E.; HARA, K.; UEDA, M. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy. **Cytotherapy**, v. 13, n. 5, p. 598-605, 2011.

NOLAN, K.; MILLET, Y.; RICORDI, C.; STABLER, C. Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. **Cell Transplantation**, v. 16, p. 241-243, 2008.

O'CONNOR, P.; ORFORD, C.E.; GARDNER, D.L. Differential response to compressive loads of zones of canine hyaline articular cartilage: micromechanical, light and electron microscopic studies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 47, n. 5, p.414-420, 1988.

ODA, J. Y. **Estudo Morfoquantitativo das alterações decorrentes do envelhecimento na cartilagem articular da epífise distal do fêmur de ratos**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ODA, J. Y.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Variation in articular cartilage in rats between 3 and 32 months old. A histomorphometric and scanning electron microscopy study. **Biogerontology**, v. 8, n. 3, p. 345-352, 2007.

OREFFO, R. O. C.; TRIFFITT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. **Bone**, v. 25, n. 2, p. 5-9, 1999.

ORTH, P.; MADRY, H. A low morbidity surgical approach to the sheep femoral trochlea. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 14, n. 5, p. 1-8, 2013.

OSTERHOFF, G.; LOFFLER, S.; STEINKE, H.; FEJA, C.; JOSTEN, C.; HEPP, P. Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. **Knee**, v. 18, n. 2, p. 98–103, 2011.

OTTE, P. Physiologie der Gelenkerhaltung. In: OTTE, P.; Der Arthrose-Prozess. Gelenkerhaltung – Gefährdung – Destruktion. Teil 1: **Osteochondrale Strukturen**. Numberg:Novartis Pharma Verlag, p. 7-192, 2000.

PARK, Y.; SONG, M.; LEE, C.; KIM, J.; HA, C. Cartilage repair by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells with different hydrogels in a rat model. **Journal of Orthopaedic Research Month**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2015.

PETER, M.; BINULAL, N. S.; NAIR, S. V.; SELVAMURUGAN, N.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R.. Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. **Chemical Engineering Journal**, v. 158, n. 2, p. 353-361, 2010.

PEVSNER-FISCHER, M.; MORAD, V.; COHEN-SFADY, M.; ROUSSO-NOORI, L.; ZANIN-ZHOROV, A.; COHEN, S.; COHEN, I. R.; ZIPORI, D. Toll like receptors their ligands control mesenchymal stem cell functions. **Blood**. v. 109, n. 4, p. 1422-1432, 2007.

PIERDOMENICO, L.; BONSI, L.; CALVITTI, M.; RONDELLI, D.; ARPINATI, M.; CHIRUMBOLO, G.; BECCHETTI, E.; MARCHIONNI, C.; ALVIANO, F.; FOSSATI, V.; STAFFOLANI, N.; FRANCHINA, M.; GROSSI, A.; BAGNARA, G.P. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836–842, 2005.

POINERN, G. E. J.; BRUNDAVANAM, S.; FAWCETT, D. Biomedical magnesium alloys: a review of material properties, surface modifications and potencial as a

biodegradable orthopaedic implant. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, p. 218, 2012.

RADL, A. L. M. Osteoartrose. In: Chiarello B, Driusso P, Radl ALM. **Fisioterapia Reumatológica**. Barueri: Manole; 2005. p. 66-88.

RAINBOW, R.; REN, W.; ZENG, L. Inflammation and joint tissue interactions in OA: implications for potential therapeutic approaches. **Arthritis**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

REZENDE, M. U.; GOBBI, R. G.. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 1, p. 14-9, 2009.

RICCI, N. A.; COIMBRA, I. B. Exercício físico como tratamento na osteoartrite de quadril: uma revisão de ensaios clínicos aleatórios controlados. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 273-280, 2006.

RIVERA, E. A. B.. Ética na experimentação animal. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, n. 1, p. 9-14, 2011.

ROI, G. S.; MONTICONE, M.; SALVONI, M.; SASSI, R.; ALBERTI, G. Self-reported knee symptoms assessed by KOOS questionnaire in downhill runners (skyrunners). **Plos One**. v. 10, n. 4, p. 1-12, 2015.

ROSIS, R. G.; MASSABKI, P. S.; KAIRALLA, M. Osteoartrite: avaliação clínica e epidemiológica de pacientes idosos em instituição de longa permanência. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. v. 8, n. 2, p. 101-108, 2010.

RODRIGUES, L. B.. Aplicações de biomateriais em ortopedia, **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 63-76, 2013.

RUDERT, M.; WILMS, U.; HOBERG, M.; WIRTH, C. J. Cell-based treatment of osteochondral defects in rabbit knee with natural or synthetic matrices: cellular seeding determines the outcomes. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 125, n. 9, 598-608, 2005.

SANTANA, C. C.; NÓBREGA NETO, P. I.; SÁ, M. J. C.; OLIVEIRA, L. M.; FOOK, M. V. L.; AZEVEDO, A. S.; SOUSA, O. B.. Utilização do filme de quitosana na reparação de tendão em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 995-1002, 2014.

SAW, K. Y.; HUSSIN, P.; LOKE, S. C.; AZAM, M.; CHEN, H. C.; TAY, Y. G.; LOW, S.; WALLIN, K. L.; RAGAVANAIDU, K.. Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic Acid: an experimental study in a goat model. **Arthroscopy**, v. 25, n. 12, p. 1391-400, 2009.

SCHAGEMANN, J. C.; ERGGERLET, C.; CHUNG, H. W.; LAHM, A.; KURZ, H.; MROSEK, E. H. Cell-laden and cell-free biopolymer hydrogel for the treatment of osteochondral defects in a sheep model. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 1, p. 75-82, 2009.

SCHMIDT, M. B.; MOW, V. C.; CHUN, L. E.; EYRE, D. R. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 8, n. 3, p. 353-363, 1990.

SCHMINKE, B.; MIOGGE, N. Cartilage Repair In Vivo: The Role of Migratory Progenitor Cells, **Current Rheumatology Reports**, v. 16, n. 464, p. 1-8, 2014.

SEO, B. M.; SONOYAMA, W.; YAMAZA, T.; COPPE, C.; KIKUIRI, T.; AKIYAMA, K.; LEE, J. S.; SHI, S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Diseases**, v. 14, n.5, p. 428-434, 2008.

SHARMA, B.; ELISSEEFF, J. H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 148-159, 2004.

SILVA, M. V. M. 2011. **Implante de células-tronco de polpa dentária humana associadas à biomaterial para o reparo de lesões em joelhos de ovinos**. 2011. 122f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 457–478, 2011.

SMITH, M.; CAKE, M. A.; GHOSH, P.; SCHIAVINATO, A.; READ, R. A.; LITTLE, C. B. Significant synovial pathology in a meniscectomy model of osteoarthritis: Modification by intra-articular hyaluronan therapy. **Rheumatology**, v. 47, n. 8, p. 1172–1178, 2008.

Sociedade Brasileira de ortopedia e traumatologia (SBOT). [2012] Disponível em: <http://www.portalsbot.org.br/> Acesso em: 10 de dezembro de 2012.

SOFAT, N.; EJINDU, V.; KIELY, P. What makes osteoarthritis painful? The evidence for local and central pain processing. **Rheumatology**, v. 50, n. 12, p. 2157-2165, 2011.

SUH, J. K.; SCHERPING, S.; MARUI, T.; STEADMAN, J. R. S.; WOO, S. L. Y. Basic science of articular cartilage injury and repair. **Operative Techniques in Sports Medicine**, v. 3, n. 2, p. 78-86, 1995.

TAGHIPOUR, Z.; KARBALAIE, K.; KIANI, A.; NIAPOUR, A.; BAHRAMIAN, H.; NASR-ESFAHANI, M. H.; BAHARVAND, H. Transplantation of undifferentiated and induced human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells promote functional recovery of rat spinal cord contusion injury model. **Stem cells and development**, v. 21, n. 10, p. 1794-1802, 2012.

TAPPER, J. E.; FUKUSHIMA, S.; AZUMA, H.; SUTHERLAND, C.; MARCHUK, L.; THORNTON, G. M.; RONSKY, J. L.; ZERNICKE, R.; SHRIVE, N. G.; FRANK, C. B. Dynamic in vivo three-dimensional (3D) kinematics of the anterior cruciate ligament/medial collateral ligament transected ovine stifle joint. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 5, p. 660-672, 2008.

TAYTON, E.; PURCELL, M.; SMITH, J. O.; LANHAM, S.; HOWDLE, S. M.; SHAKESHEFF, K. M.; GOODSHIP, A.; BLUNN, G.; FOWLER, D.; DUNLOP, D. G.; OREFFO, R. O. C. The scale-up of a tissue engineered porous hydroxyapatite polymer composite scaffold for use in bone repair: an ovine femoral condyle defect study, **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 103, n. 4, p. 1346-1356, 2014.

TEW, W. P.; HOTCHKISS, R. N. Synovial fluid analysis and equine joint disorders. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 1, n. 5, p. 163-170, 1981.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 331 p.

TORQUETTI, L.; CASTANHEIRA, P.; DE GOES, A. M.; MARCIO, N. Stem cells: potential source for retinal repair and regeneration. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 70, n. 2, p. 371-375, 2007.

VANDEVORD, P. J.; MATTHEW, H. W.; DESILVA, S. P.; MAYTON, L.; WU, B.; WOOLEY, P. H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 59, n. 3, p. 585–590, 2002.

VELOSA, A. P. P.; DE OLIVEIRA, A. M.; CARRASCO, S.; CAPELOZZI, V. L.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Meniscectomia parcial como modelo Experimental de Osteoartrite em Coelhos e Efeito Protetor do Difosfato de Cloroquina. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 6, p. 401-410, 2007.

XIMIN, G.; CHANGYONG, W.; YUFU, Z.; RENYUN, X.; MIN, H.; CUIMI, D.; QIANG, Z.; LINGZHI, D.; JIANXI, L.; YING, Q. S. Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into β -tricalcium phosphate in a sheep model. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 11-12, p. 1818-1829, 2004.

WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2133-2151, 2003.

WAKAYAMA, H.; HASHIMOTO, N.; MATSUSHITA, Y.; MATSUBARA, K.; YAMAMOTO, N.; HASEGAWA, Y.; UEDA, M.; YAMAMOTO, A.. Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating acute lung injury in mice. **Cytotherapy**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2015.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S. J.; YOUNG, R. G.; MANSOUR, J. M.; CAPLAN, A. I.; GOLDBERG, V. M.. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **The Journal of bone and joint surgery**, v. 76, n. 4, p. 579-92, 1994.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.

WONG, M.; CARTER, D. R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. **Bone**, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2003.

YAMAGATA, M.; YAMAMOTO, A.; KAKO, E.; KANEKO, N.; MATSUBARA, K.; SAKAI, K.; SAWAMOTO, K.; UEDA, M.. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxicischemic brain injury in neonatal mice. **Stroke**, v. 44, n. 2, p. 551-554, 2013.

YAMAZA T, KENTARO A, CHEN C, LIU Y, SHI Y, GRONTHOS, S.; WANG, S.; SHI, S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 5, p. 1-10, 2010.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. 2006. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**, São Paulo, Editora Atheneu. Brasil. 245p.

ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W.; PERIN, E.; ANGELI, F.S.; MURAD, F.; YEH, E.; BUJA, L.M.; DE CATERINA, R.; WILLERSON, J.T.; GENG, Y. Stem cells and cardiovascular tissue repair: Mechanism, methods, and clinical applications. **Journal of Cardiothoracic-Renal research**, v. 1, p. 3-14, 2006.

APÊNDICE A

Quadro 1 – Observações histológicas frente aos tratamentos e períodos de pós-operatório

Período e tratamento	CONDRÓCITOS	MATRIZ	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MINERALIZAÇÃO
120 dias: Biomaterial	Não	Não	Não	não
120 dias: Biomaterial + SHED	Não	Não	Não	não
120 dias: SHED	Não	Não	Não	não
120 dias: sem tratamento-controle	Não	Não	Não	não
190 dias: Biomaterial	Sim	Sim hialina e fibrocartilagem	Difusa	não
190 dias: Biomaterial + SHED	Sim	Sim hialina e fibrocartilagem	Difusa	não
190 dias: SHED	Sim	Sim hialina e fibrocartilagem	Colunar e grupos	não
190 dias: sem tratamento-controle	Sim	Sim hialina e fibrocartilagem	Individuais e colunas	não
365 dias: Biomaterial	Sim	Sim hialina	Linear	não
365 dias: Biomaterial + SHED	Sim	Sim hialina e fibrocartilagem	Cordões e individuais	não
365 dias: SHED	Sim	Sim	Individuais	não
365 dias: sem tratamento - controle	Sim	Sim	Individuais e desorganizada	não
730 dias: biomaterial	Sim	Sim	Difusa	não
730 dias: bioamterial + SHED	Sim	Sim hialina	Grupos e colunas	não
730 dias: SHED	Sim	Sim hialina e fibrocartilagem	Individuais	não
730 dias: sem tratamento - controle	Não	Sim	Não	não