CASSIANO DE MOURA ABDALLA

**Uso da membrana de Celulose Bacteriana Associada a Células
Mesenquimais e Ácido Hialurônico após lesão em cartilagem de
patela de Suínos**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia
Orientador: Profa. Dra Ana Maria Minarelli Gaspar

SÃO CARLOS,

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

A135u

Abdalla, Cassiano de Moura

Uso da membrana de celulose bacteriana associada a células mesenquimais e ácido hialurônico após lesão em cartilagem de patela de suínos / Cassiano de Moura Abdalla ; orientadora Ana Maria Minarelli Gaspar. -- São Carlos, 2010.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração Interunidades em Bioengenharia) -- Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

1. Cartilagem articular. 2. Membrana de celulose.
3. Biocompatibilidade. 4. Joelho. 5. Patela. 6. Suínos.
7. Apoptose. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

CASSIANO DE MOURA ABDALLA
MESTRADO EM CIÊNCIAS
ÁREA DE BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC - FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 30/11/10

PROFA. DRA. ANA MARIA MINARELLI
GASPAR (ORIENTADORA)

Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho"

Resultado: APROVADO

Assinatura:

PROF. DR. JOÃO MANUEL DOMINGOS
DE ALMEIDA ROLLO

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Resultado: APROVADO

Assinatura:

PROF. DR. SIDNEY JOSÉ LIMA RIBEIRO

Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho"

Resultado: APROVADO

Assinatura:

DEDICATÓRIA

À minha mãe, em memória, Julieta de Moura Abdalla que muito se dedicou para minha formação profissional e valorização moral. E que sonhava em estar presente nas conquistas de seus filhos.

A Deus, que por intermédio de Jesus Cristo, seu primogênito, nosso Senhor, que por meio de morte em cruz e sangue, resgatou a nossa alma do pecado, tornando a nós, herdeiros da Glória de Deus pela consumação da fé em seu testemunho, que pela fé leva-nos ser filho de Deus e permite por intermédio do Espírito levar ou trazer o amor dessa conquista à alma de minha mãe e meu pai, também, em memória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que fez de Abraão toda a sua descendência terrena por intermédio da conversão do nome de Jacó em Israel e de Israel em uma grande nação. Para que pudesse expressar os poderes de Deus na terra; desde a Páscoa dos Hebreus, no êxodo da escravidão do Egito, através dos poderes dados a Moisés; até os dias de hoje. Depois aos seus filhos, herdeiros da mesma aliança, pela fé em Nosso Senhor Jesus Cristo, fazendo daqueles que não eram hebreus, os chamados gentios, toda a descendência celestial de Abraão. Tornando a descendência de Abraão e Saara, que por Deus gerou a Isaque, mesmo na esterilidade de sua velhice, e ainda esse mesmo Deus, prometeu a Abraão uma descendência terrena, incontável como os grãos de areias; e celestial, incontável como as estrelas que estão no céu. Por essa descendência celestial posso invocar a presença dEle em mim.

Aos colegas de Departamento, Professor Orivaldo e companheiro Nelson. O primeiro pelo amor e sabedoria em lidar com seus alunos que superavam dificuldades da vida cotidiana para poder estar de corpo presente em suas atividades, O segundo, pela maneira extrovertida em desfigurar a tensão que é o anseio pelo sucesso na dissertação de um mestrado, e por oferecer a base de apoio para nossos estudos, sempre aberto de coração, o biotério.

Aos Profs. Drs. Younès Messadeq e Sidney José Lima Ribeiro, do Instituto de Química da UNESP, que confiaram em mim a execução desse projeto.

A doutoranda Sybele Saska, pela amizade e auxílio nesse projeto.

Aos técnicos do laboratório de Histologia, Luís Antonio Potenza e Pedro Sérgio Simões, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP, pela confecção das lâminas.

À minha colega de trabalho instrumentadora, Márcia Carminoto, pelo carinho e competência cirúrgica demonstrada com todos os animais em pesquisa.

Ao colega e médico veterinário Dr. Leandro Boca, responsável pela vigilância sanitária do município de Colina-SP, que esteve presente durante todo o projeto.

Elevo à Deus, a secretária Janete Ferreira Rodrigues dos Santos, pessoa que Deus colocou na minha vida, não devido às suas obrigações que deveria realizar e sim pelo coração e o amor, com os quais competentemente, ofereceu sua base de apoio, a secretaria, diversas vezes "quebrando o galho" de uma obrigação de nossa parte, alunos, confusamente despreparados para as datas solicitadas pelo prazo a cumprir, servindo até como uma parte da memória de cada um deles, lembrando pacientemente a cada um, com antecedência, as suas obrigações dentro do programa estabelecido pela universidade, vigiando cada um como uma mãe vigia os seus filhos.

À minha irmã em Cristo Jesus, da Igreja em Ribeirão Preto, que gratuitamente me ofertou o laboratório e materiais especiais para a contagem das células utilizadas na pesquisa. E que pacientemente, contou e recontou por diversas vezes, aqueles minúsculos condrócitos, como ela mesma dizia, mostrando-me ao microscópio o tamanho das células vegetais, cinco vezes maior, proporcionalmente aos condrócitos, células que ela habitualmente contava em meios de culturas próprios. Que Jesus Cristo lembre de seu nome e desses momentos no dia do juízo final, Simone Cristina Zanollo Torres.

À Professora Diva Maria Dechen Junqueira Franco pelo carinho e dedicação na correção gramatical deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha esposa Eliane, que suportou as trevas do nosso relacionamento, em amor, na esperança, até que a luz de Jesus Cristo brilhou em nosso relacionamento matrimonial, e junto com as minhas filhas Larissa e Nicole, ensinaram-me o que significa o viver do amor infinito, que é “a família”, o propósito de Deus na Terra.

À minha orientadora, Ana Maria Minarelli Gaspar, pela paciência e dedicação, que apresentou em todo o tempo de nosso relacionamento. Agradeço a ela em especial, porque confiou que juntos chegaríamos ao final, com sucesso. Dessa forma, permitiu que um homem de quarenta e sete anos retornasse a emoção da criança que foi, quando aos dez anos de idade, em seu quarto, lia e orava diante dos salmos de Davi e da sabedoria de Salomão, com a bíblia nas mãos pedia a Deus a mesma sabedoria, fé e amor que esses tiveram por Ele.

“Disseram-lhe os seus discípulos: Eis que agora fala abertamente, e não dizes parábola alguma.

Agora conhecemos que sabes tudo, e não hás mister de que alguém te interrogue. Por isso cremos que saíste de Deus.

Respondeu-lhes Jesus: Credes agora?

Eis que chega a hora, e já se aproxima, em que vós sereis dispersos cada um para sua parte, e me deixareis só; mas não estou só, porque o Pai está comigo.

Tenho-vos dito isto, para que em mim tenhais paz;”

“NO MUNDO TEREIS AFLIÇÕES, MAS TENDE BOM ÂNIMO, EU VENCI O MUNDO.”

(Palavras de nosso Senhor Jesus Cristo, evangelho de João capítulo 16, versículos 29 a 33)

RESUMO

ABDALLA, C. M. Uso da membrana de Celulose Bacteriana Associada a Células Mesenquimais e Ácido Hialurônico após lesão em cartilagem de patela de suínos. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2010.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a membrana de celulose bacteriana associada a células mesenquimais, que foram inoculadas juntamente com derivado do ácido hialurônico, hylano G-F 20, em patelas lesadas de suínos. Foram utilizados 12 suínos (24 joelhos) submetidos à raspagem das superfícies articulares das patelas até osso esponjoso; joelhos esquerdos sem tratamento, grupo controle (GC). Joelhos direitos, grupo tratado (GT), tiveram membranas de celulose bacteriana fixadas às superfícies de suas patelas, sendo que as mesmas foram preparadas com inoculação de células mesenquimais, ósseas e cartilaginosas, provenientes das raspagens das superfícies, lavadas em solução fisiológica 0,9%, filtradas e diluídas em 5ml de solução fisiológica à 0,9% e posteriormente acrescentados 2ml de hylano G-F 20. Colhidos 5 ml dessa papa que teve contido o volume de $16,35 \times 10^8$ células na sua totalidade, e foram infiltrados na membrana de celulose revestindo a patela, obedecendo a distribuição de $3,27 \times 10^8$ por $1,2 \text{ cm}^3$. Após 2, 4 e 6 meses os animais foram sacrificados para avaliações macroscópicas e histológicas. As superfícies patelares apresentaram aspecto de neoformação de cartilagem aos dois meses; essas membranas evoluíram para tecido fibroso de altíssima resistência, com densidade de fibras conjuntivas aumentando proporcionalmente ao tempo de cirurgia, quatro ou seis meses conforme as células do infiltrado tiveram alterações morfológicas para fibroblastos. Ao mesmo tempo, parte do volume dessas células sofreu processo de degeneração e morte celular, semelhante ao mecanismo de apoptose celular. Dessa forma, ofereceu substratos para as células remanescentes, colaborando para a neoformação desse tecido conjuntivo. Não ocorreram processos inflamatórios ou agressão às cartilagens em contigüidade à membrana. Pelo contrário, em relação ao grupo controle não tratado, a membrana de celulose bacteriana utilizada segundo a metodologia aplicada, atuou com uma barreira protetora para agressões maiores à cartilagem da fossa intercondilar do fêmur que manteve a integridade de seus contornos articulares. Desta forma, segundo a metodologia utilizada, concluímos que a membrana de celulose bacteriana apresentou biocompatibilidade para uso articular, hábil para agregar condrócitos e fibroblastos.

Palavras Chave: Cartilagem articular. Membrana de celulose. Biocompatibilidade. Joelho. Patela. Suínos.

ABSTRACT

ABDALLA, C. M. Use of Bacterial cellulose membrane associated with Mesenchymal Cells and hyaluronic acid after injury in pig patella cartilage of .2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2010.

The goal of this work was to evaluate the bacterial cellulose membrane associated with mesenchymal cells, which were inoculated with hyaluronic acid derivative, G-F 20 hylano in patelas injured pigs. 12 pigs were used (24 knees) submitted to the scraping of the articular surfaces of spongy bone patelas up; knees left without treatment, group controller (GC). Knees rights, treated group (GT), bacterial cellulose membranes had fixed on their surfaces patelas, being that they were prepared with inoculation of mesenchymal cells, bone and cartilage from sweeps of surfaces, washed in 0.9% saline solution, filtered and diluted in 5 ml of saline solution to 0.9% and subsequently added 2 ml hylano G-F 20. Collected 5 ml that Pope had contained the volume 16.35×10^8 cells in its entirety, and were infiltrated in the membrane of cellulose coating the patella, obeying distribution 3.27×10^8 per 1.2 cm^3 . After 2, 4 and 6 months the animals were sacrificed to macroscopic and histological evaluations. The surfaces patellar components submitted aspect of neoplasm of cartilage to two months; These membranes evolved into fibrous tissue resistance of high density fibrous tears increasing in proportion to the time of surgery, four or six months as had infiltrated cells for morphological changes while fibroblasts, part of the volume of these cells suffered process of degeneration and cell death, similar to the mechanism of cellular apoptosis. This way, offered substrates for the remaining cells, collaborating for this connective tissue neoplasm. There were no inflammatory processes or aggression on cartilage in adjacency to the membrane. On the contrary, compared to the untreated control group, the bacterial cellulose membrane used according to the methodology applied, served with a protective barrier for larger aggressions of cartilage of the femur intercondilar trench that maintained the integrity of its articular contours. This way, according to the methodology, we found that the bacterial cellulose membrane biocompatibility presented for use articulate, skilled to aggregate condrócitos and fibroblasts.

Key Words: Articular cartilage, Cellulose, Biocompatibilty, Knee, Patela.Pig

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células do tecido embrionário	17
Figura 2. A-Tecido mesenquimal; B-Centro formador de cartilagem; C-Condroblastos; D-Condrócito	18
Figura 3. Figura ilustrativa das camadas que compõem a cartilagem hialina (McGINTY, 1996).....	20
Figura 4. Figura ilustrativa da anatomia do joelho. Fonte: Centro de Ortopedia e Reabilitação Esportiva (CORE).	22
Figura 5. A patela centrada na fossa intercondilar do fêmur.....	23
Figura 6. Anatomia região anterior da coxa.Observar a antiga nomenclatura do ligamento patelar, “tendão patelar”.	23
Figura 7. Exemplos de lesões da superfície articular da patela	25
Figura 8. Tratamento por microfatura do osso subcondral. Fonte: Grupo de estudo do joelho de Campinas.	28
Figura 9. A retirada palinets de osso com cartilagem da área doadora para preenchimento da lesão focal em côndilo medial do fêmur. Técnica de transplante autólogo de tecido osteocondral (Mosaicoplastia).....	28
Figura 10. Implante autólogo de condrócitos: A- Mensuração da lesão, B- Desbridamento e preparo da superfície do osso subcondral, C- Fixação da membrana de periósteo sobre a lesão para sua oclusão, D- Sutura do periósteo ocluindo a lesão para injeção das células de condrócitos obtidas pela cultura dos condrócitos (COHEN et al., 2008).....	29
Figura 11. Implante autólogo de condrócitos em matriz assistida.	30
Figura 12. Membrana de celulose bacteriana produzida pela cepa	31
Figura 13. Suíno anestesiado em processo de assepsia posicionado na calha de madeira apropriada para as cirurgias propostas.....	34
Figura 14 A. Incisão mediana do ligamento patelar e (B), incisões transversas	34
Figura 15. Instrumental, grossa, utilizado para a raspagem da cartilagem articular na patela de suíno (A e B).	35
Figura 16. Classificação de Outerbridge de 1961 atualizada em 2001:	35
Figura 17. Classificação da International Cartilage Repair Surgery (ICRS).....	36
Figura 18. Papa de cartilagem após raspagem da superfície osteocondral da patela suína.....	37
Figura 19. Membrana de celulose bacteriana recortada na área de 6 cm ² e ocupando um volume de 6 cm ³ , sendo preenchida em seu interior o volume de 3,6 cm ³ pelo lado maior de	

sua superfície lateral e complementando com 2,4 cm ³ em mais duas aplicações pelo lado medial, discretamente menor.....	38
Figura 20. Membrana fixada na superfície patelar com lesão	38
Figura 21. Sutura do ligamento	39
Figura 22. Sutura do subcutâneo	39
Figura 23 A. Suínos em baias; B. Quatro animais por baía	40
Figura 24. A - Mosaico em que as células são diluídas com a solução homogeneamente; B - O dispositivo da Câmara de Neubauer onde se realiza o procedimento de contagem celular. ...	42
Figura 25. Exemplo com a recontagem na Câmara de Neubauer:	43
Figura 26. GT-6m Joelho com membrana revestindo a superfície patelar sem impedir a mobilidade da mesma pelas aderências à cápsula e com cartilagem articular da fossa intercondílea do fêmur demonstrando integridade da superfície cartilaginosa, com discretos sinais degenerativos grau Ia da ICRS.	45
Figura 27. GT 2M Cartilagem patelar neoformada com o tecido membranoso implantado, a superfície intercondilar do fêmur sofreu lesão grau Ib pela classificação da ICRS	45
Figura 28. GT 2M As facetas articulares, medial e lateral da patela foram restabelecidas, esboçando a superfície articular de uma patela sem desgaste, porém se nota sua forma irregular. Nesse caso a superfície intercondilar do fêmur apresentou lesão grau Ib pela classificação da ICRS	45
Figura 29. GT 6M Tecido esbranquiçado revestindo a superfície patelar em contato direto com superfície intercondilar do fêmur variando essa superfície com lesão grau Ia a Ib.....	46
Figura 30A. GT 6M com patela revestida de fina camada fibrocartilaginosa irregular e desgaste inicial de fossa intercondilar de fêmur em grau Ib da classificação da ICRS, na totalidade e pela mesma classificação, foco erosivo grau IV inferiormente à esquerda; 30B. Superfície patelar com fibrocartilagem irregular e afilada revestindo sua superfície articular	46
Figura 31. GC 2M (A), 4M (B), observa-se uma matriz fibrocartilaginosa com intensa hiperplasia de condrócitos. MASSON, (A) 344X, (B) 176X.....	47
Figura 32. GC 6 M, fibrocartilagem com células dispostas de forma irregular. MASSON 176X.	48
Figura 33. GT 2M, cartilagem revestindo o osso esponjoso mesclando-se com fibrocartilagem adjacente. MASSON, 68,5X.....	48
Figura 34. GT 2M, elevada densidade populacional de células contidas na membrana adjacente ao osso medular, incluindo grande número de condrócitos viáveis. MASSON, 176X.	49

Figura 35. GT 2M, fragmento de matriz cartilaginosa com condrócitos viáveis em seus vacúolos, no interior da membrana (A, B em detalhe). HE, 176X.....	49
Figura 36. GT 2M, membrana preenchida com grande quantidade de fibras colágenas (A) e metaplasia de condrócitos em células alongadas nas suas lacunas ainda presentes (B em detalhe). MASSON, 176X.....	50
Figura 37. GT 4M, fibrocartilagem com predominância de tecido conjuntivo (A). Em B, observam-se células semelhantes à condrócitos no interior de vacúolos. MASSOM, 344X...50	50
Figura 38. GT 4M, matriz cartilaginosa migrando aleatoriamente para o interior da membrana implantada, a partir de osso esponjoso. HE 176X.....	51
Figura 39. GT 6M, observar os espessos feixes de fibras colágenas evidenciando um tecido neoformado fibroso e resistente. MASSON, 176X.	51
Figura 40. GT 6M, membrana com condrócitos e fragmentos de cartilagem com matriz íntegra e preservada em seu interior. HE 176X.....	52

LISTA DE ABREVIACÕES

ICRS - International Cartilage Repair Surgery

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Formação da articulação hialina	17
2.1.1 Cartilagem Hialina	17
2.1.2 Ácido Hialurônico	20
2.1.3 Membrana sinovial.....	21
2.1.4 Ligamento.....	21
2.1.5 Anatomia da articulação da patela	22
2.2 Fisiopatologia da Degeneração da Cartilagem Hialina.....	24
2.3 Terapias Utilizadas para Tratamentos das Lesões da Cartilagem.....	25
2.3.1 Tratamento Clínico.....	25
2.3.1.a Terapias Intra-Articulares.....	26
2.3.2 Tratamentos cirúrgicos	27
2.3.2a Debridamento artroscópico	27
2.3.2b Condroplastia Eletrotérmica.....	27
2.3.2c Microfraturas	27
2.3.2d Transferência Autóloga de Tecido Osteocondral.....	28
2.3.2e Transplante Osteocondral Homólogo.....	29
2.3.2f Transplante Autólogo de Condrócitos	29
2.3.2g Implante de Condrócitos com Matriz Assistida	29
2.4 Membrana de Celulose Bacteriana	30
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODO	33
4.1 Aprovação do Comitê de Ética	33
4.2 Amostra	33
4.3 Procedimento anestésico	33

4.4 Técnica cirúrgica.....	33
4.5 Pós-operatório	39
4.5.1 Pós-operatório imediato	39
4.5.2 Pós-operatório tardio	40
4.6 Eutanásia dos animais	40
4.7 Documentação Fotográfica	40
4.8 Processamento e análise histológica	41
4.9 Contagem do material colhido	41
4.9 Metodologia da contagem.....	42
5. RESULTADOS	44
5.1 Resultados Clínicos.....	44
5.2 Resultados macroscópicos	44
5.2.1 Grupo Tratado	44
5.2.2 Grupo controle.....	46
5.4 Resultados Histológicos.....	47
5.4.1 Grupo Controle.....	47
5.4.2 Grupo Tratado	48
5.5. Resultados quantitativos do material colhido	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9. ANEXO A	68

1. INTRODUÇÃO

A lesão da cartilagem patelar é uma das patologias que acomete a articulação do joelho, tendo sua origem relacionada a traumas ou a processos degenerativos artríticos ou biomecânicos.

Quando esta degeneração está em estado avançado é conhecida como osteoartrose, onde se observa uma lenta degradação da cartilagem articular, que de forma insidiosa conduz o portador a incapacidade funcional severa e intenso desconforto na vida diária.

Inúmeros tratamentos clínicos e cirúrgicos são indicados para minimizar os efeitos da osteoartrose, mas ainda não existe nenhum realmente efetivo; a bioengenharia busca há tempos algum material biocompatível, inerte, estável, biofuncional (o material deve atender às características mecânicas necessárias para cumprir a função desejada, pelo tempo que for necessário), e de fácil esterilização, para que possa reparar lesões de cartilagem ou substituir uma cartilagem lesada.

A membrana de celulose bacteriana é considerada um material biocompatível e foi utilizada por vários pesquisadores desde a substituição temporária de pele à liberação de medicamentos até a substituição da duramater em crânios; desta forma, pensou-se utilizar a membrana de celulose juntamente com células mesenquimais obtidas por raspagem na patela e ácido hialurônico, para se observar os efeitos frente a lesões nesta cartilagem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Formação da articulação hialina

2.1.1 Cartilagem Hialina

O mecanismo de formação da cartilagem envolve a origem de células totipotentes do mesoderma. O mesoderma é o folheto intermediário do embrião (Figura 1).

Figura 1. Células do tecido embrionário

(Fonte: http://www.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/material_didatico/Profa_Patricia/Aula_cartilagem_09.pdf)

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

É através da diferenciação da célula mesenquimal indiferenciada em fibroblastos e condroblastos que se dá a formação da cartilagem (GROSS, 1952; SCHUBERT, 1952); esse princípio oferece base de estudos para reprodução do tecido cartilaginoso pela bioengenharia a partir de células mesenquimais (CAPLAN, 2000; MARTIN et al., 2001; SCAPINELLI et al., 2002).

Na maturidade dos condroblastos quando já ocorreu a deposição da matriz cartilaginosa e depois para manterem a renovação constante e a organização final do tecido cartilaginoso, os condroblastos transformam-se em células mais maduras e passam a se chamar de condrócitos (Figura 2).

Figura 2. A-Tecido mesenquimal; B-Centro formador de cartilagem; C-Condroblastos; D- Condrócito

(Fonte:http://www.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/material_didatico/Profa_Patricia/Aula_cartilagem_09.pdf) 20/10/10

Nelson; Cox (2006) relatam a formação dos órgãos esqueléticos à partir do potencial de células embrionárias que ocorre sob domínio programado de mortes celulares, denominado “apoptose”. Esse é o mecanismo que possibilita a grande quantidade de células embrionárias de o tecido mesenquimal constituírem do corpo embrionário sem forma, segmentação articulada como ocorre com os dedos. Os mecanismos reguladores que desencadeiam apoptose envolvem algumas das mesmas proteínas que regulam o ciclo celular, sendo que os produtos monoméricos da degradação de proteínas e do DNA (aminoácidos e nucleotídeos)

são liberados em um processo controlado que permite que eles sejam captados e recusados pelas células vizinhas. A apoptose, dessa forma, permite que o organismo elimine uma célula sem desprezar seus componentes (NELSON, COX, 2006).

Os condrócitos ocupam 5% a 10% do volume total da cartilagem. Apesar de apresentar um metabolismo lento, devido à pequena proporção de células em relação ao volume do tecido cartilaginoso, estas células são consideradas metabolicamente ativas, visto que em seu citoplasma são encontradas estruturas anabólicas como complexo de Golgi e retículos endoplasmáticos que são responsáveis pela produção de macromoléculas de colágeno, de proteoglicanos e glicoproteínas, constituintes da matriz cartilaginosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A matriz cartilaginosa renova-se constantemente, sendo que a atividade metabólica destas células é influenciada pelo fator de crescimento TGF-beta, fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento da insulina (IGF-I) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Ainda influenciam nessa atividade, as interleucinas, medicações e estímulos físicos mecânicos pela variação da pressão hidrostática da cartilagem (SCHWARTZ; CICCOTTI, 2006).

Na cartilagem 95% dos colágenos são do tipo II e os tipos IX e XI formam um “cross-link” com o colágeno do tipo II, aumentando a insolubilidade dessa matriz. O colágeno tipo VI ancora os condrócitos na matriz e o colágeno tipo X atua na mineralização das camadas mais profundas da cartilagem. Na matriz da cartilagem ainda se observa o colágeno tipo V, em menor quantidade (McGINTY, 1996). Os proteoglicanos presentes na matriz cartilaginosa são moléculas hidrofílicas, que geram a afinidade da cartilagem pela água e são ligadas ao ácido hialurônico que por ser uma molécula de cadeia longa, atua como um esqueleto para as demais moléculas. As glicosaminoglicanas menores da matriz da cartilagem são: Keratan Sulfato, Dermatan Sulfato e Condroitina 4 e 6 Sulfato. Juntos formam um polímero de ânions de proteínas, de alta viscosidade e com alto peso molecular e hidrofílico.

A quantidade e a orientação dos colágenos, proteoglicanos, água e células variam de acordo com o nível ou a camada da cartilagem:

- **Zona tangencial (10-20%):** camada mais rica em colágenos dispostos paralelamente à superfície articular. Sobre a sua superfície existe uma fina camada com altíssima viscosidade, conhecida como “*lâmina splendans*”, protegendo a cartilagem de atritos;

- **Zona de transição (40-60%)**: com fibras de colágenos em disposição randomizadas para suportar compressão;
- **Zona radial (30% da cartilagem)**: com as fibras de colágenos em disposição perpendicular à superficial sugerindo a função de suportar carga também e no final dela, profundamente, aparece uma linha demarcatória chamada de “*Tide mark*” que separa essa camada de outra camada;
- **Camada calcificada**: onde a matriz já se apresenta calcificada fazendo justaposição da cartilagem com o osso subcondral (Figura 3) (McGINTY, 1996; SCHWARTZ; CICCOTTI, 2006).

Figura 3. Figura ilustrativa das camadas que compõem a cartilagem hialina (McGINTY, 1996).

2.1.2 Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico também está presente no dialisado do plasma que forma o líquido sinovial (McGINTY, 1996), mas sabe-se que a diminuição do seu peso molecular é um dos fatores presentes na evolução de uma cartilagem hialina para o estado artrósico (BELCHER et al, 1977) porque a sua viscosidade protege a cartilagem de atritos. Já foi demonstrado *in vitro* que o condrócito na osteoartrite apresenta uma importante diminuição na sua capacidade de produção de matriz (TALLHEDEN et al, 2005) e que esse condrócito melhora sua capacidade de produzir matriz na presença do ácido hialurônico (BLAND; COOPER, 1984). O ácido

hialurônico apresenta diversos derivados comerciais com bons resultados clínicos em técnicas como a viscosuplementação para cartilagens artrósicas.

2.1.3 Membrana sinovial

A membrana sinovial, com células também originárias da diferenciação das células mesenquimais em sinoviócitos, é o tecido que reveste internamente a cápsula articular sinovial e é responsável pela produção do líquido sinovial, produto dialisado do plasma que contém proteínas onde a predominante no plasma é a albumina (BALAZS, 1968); mas a viscoelasticidade natural do líquido sinovial é decorrente de seu rico conteúdo de ácido hialurônico (BALAZS; DENLINGER, 1993; PELLETIER; MARTEL-PELLETIER, 1993).

A membrana sinovial é semipermeável e permite a reabsorção do líquido sinovial primariamente por via vascular, embora também possa ser por via linfática. A combinação do líquido sinovial, altamente viscoso, com a forma das terminações articulares, protege a superfície da cartilagem hialina de estresse físico extremo por parte do peso corporal e das forças musculares (ARNOCZKY; DODDS; WICKIEWICZ, 1996).

A membrana sinovial é também classificada em três tipos, segundo as suas células predominantes: aerolar, fibrosa e adiposa (KEY, 1932; BARLAND; NOVIKPF). A membrana sinovial aerolar é a responsável pela produção da matriz sinovial, composta de proteoglicanos Dermatan Sulfato e o ácido hialurônico, que envolvem as fibras de colágenos tipo I e III (GHADIALLY, 1983). A membrana sinovial adiposa é rica em adipócitos. As células sinoviais fibrosas correspondem à membrana sinovial que está presente nos revestimentos dos ligamentos articulares (CHOWDHURY; MATYAS; FRANK, 1991).

2.1.4 Ligamento

Nos ligamentos, as células sinoviais fibrosas revestem os ligamentos (CHOWDHURY; MATYAS; FRANK, 1991) permitindo que os ligamentos intra e extra articulares se apresentem com alta viscosidade elástica, também protegendo a articulação sinovial de atritos mecânicos. Os ligamentos esqueléticos são estruturas que conectam dois ou mais ossos (SUTER; MAJNO, 1964). Tem funções cinemáticas (ANDRIACCHI et al, 1983), biomecânicas (BLACHARSKI; SOMERSET; MURRAY, 1975; BUTLER; NOYES; GOOD, 1980; GROOD; NOYES; BUTLER, 1981) e possivelmente, neurosensorial (KENNED, WEINBER, WILSON, 1974). Exemplos de ligamentos ricos dessas propriedades são os

ligamentos cruzados do joelho (KENNEDY; WEINBER; WILSON. 1974; FURMAN; MARSHALL; GIRGIS, 1976), apesar, de serem estruturas de modesto suprimento sanguíneo (SCAPINELLI; 1968).

A integridade e estabilidade gerada pela presença dos ligamentos articulares íntegros é fundamental para que o trabalho de fricção entre as cartilagens sejam virtuais e estáveis, evitando dessa maneira o seu desgaste precoce (Figura 4).

Figura 4. Figura ilustrativa da anatomia do joelho. Fonte: Centro de Ortopedia e Reabilitação Esportiva (CORE).

2.1.5 Anatomia da articulação da patela

A anatomia da articulação femuropatelar tem considerações especiais em relação às demais articulações sinoviais, porque a patela é um osso sesamóide, que tem atrito direto de sua cartilagem com cartilagem da fossa intercondilar, com ângulos articulares de importante respeito à sua anatomia (Figura 5).

Eixo normal da patela na flexão

Figura 5. A patela centrada na fossa intercondilar do fêmur

(Fonte: http://www.osteartrose.com.br/tm_femuropatelar.php) 20/10/10

Ainda nesta articulação estão inseridos no polo proximal, um músculo potente, M. quadríceps femoral, formado por quatro músculos (reto femoral, vasto lateral, vasto intermédio e vasto medial) e no seu polo distal está o ligamento patelar, que possui ação de alavanca da perna para a extensão do joelho (Figura 6).

Forças exercidas no joelho no movimento de elevação.

Figura 6. Anatomia região anterior da coxa. Observar a antiga nomenclatura do ligamento patelar, “tendão patelar”.

(Fonte: http://www.osteartrose.com.br/tm_femuropatelar.php) 20/10/10

2.2 Fisiopatologia da Degeneração da Cartilagem Hialina

A lesão da cartilagem patelar pode ser traumática ou degenerativa; na doença degenerativa, conhecida como osteoartrose, a elasticidade e a viscosidade do líquido sinovial estão comparativamente diminuídas, em relação à cartilagem normal e é considerada uma osteoartrite degenerativa. Uma vez iniciada, clinicamente, é crônica e insidiosa (ALTMAN; LOZADA, 1998; VANNUCCI, 2002; TOFFOLETTO et al., 2005). A osteoartrose pode atingir qualquer tipo de articulação e ocorre após alterações nos condrócitos, provocando uma quebra na produção da matriz e a consequente fragilização dessa cartilagem (BOS et al., 2002); além de uma diminuição na concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial, assim como, a diminuição do peso molecular dessas moléculas (BELCHER et al., 1977).

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

A degradação da cartilagem é estimulada por atividades de enzimas conhecidas como proteinases, que podem estar presentes tanto no meio intracelular quanto no extracelular. Quatro classes de proteinases podem ser distinguidas com base na sua ação catalítica, incluindo-se as proteinases aspártica e cisteína, que são ativadas em pH ácidos e as serinas e metaloproteinases, que são ativadas em pH neutro ou alcalino. A ação das metaloproteinases é dependente do zinco. Por serem dependentes do metal zinco para sua interação, essas proteinases são chamadas de metaloproteinases (BRAY; FRANK; MINIACI, 1996).

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

A lesão degenerativa da cartilagem patelar incita a cartilagem à perda de volume e também de sua arquitetura, levando a articulação à perda da congruência de seus contornos articulares que seriam os responsáveis pela manutenção da amplitude do movimento dessas articulações. Essas lesões artrósicas ou traumáticas na patela apresentam-se sob diferentes formas (Figura 7).

Figura 7. Exemplos de lesões da superfície articular da patela

(Fonte: http://www.osteoartrose.com.br/tm_femuropatelar.php) 20/10/10

2.3 Terapias Utilizadas para Tratamentos das Lesões da Cartilagem

O tratamento das lesões de cartilagens, desde focais até artrósicas, atualmente, resume-se em dois tipos: clínico e cirúrgico.

2.3.1 Tratamento Clínico

O tratamento clínico apóia-se na analgesia, com paracetamol em primeira escolha. Preferencialmente são utilizados antiinflamatórios não hormonais, mas pode ser utilizado os hormonais à base de corticóides, quando toleráveis pelo paciente. Entre os não hormonais, os inibidores seletivos da COX-2, são mais indicados por sua analgesia não causar irritações gástricas severas (TROUM, 2006). Condroprotetores orais que enquadram a diacereína, sulfato de glucosamina, condroitina sulfatada, que tem clinicamente suas ações comprovadas por autores como Toffoletto et al (2005) e Navarro, Ballesteros (2006) durante o tratamento de manutenção da artrose.

Rezende et al. (2006) em estudo com vinte ratos submetidos a meniscectomia medial dos joelhos direitos foram divididos em dois grupos de 10 animais cada e comparados com a administração de diacereína em um grupo e outro grupo administrado glucosamina; os joelhos direitos operados demonstraram estado degenerativo que não estava presente no grupo não operado. Já o grupo tratado com diacereína apresentou lesões de amolecimentos e fragilização

da superfície cartilaginosa em estágios menos avançados do que os tratados com glucosamina, apesar de que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados. Também com bons resultados clínicos surgem os compostos de óleos insaponificáveis, comercialmente conhecidos por Piascledyne 300 (Solvay Pharmaceuticals).

Como o tratamento da artrose visa à melhora da dor, esses produtos têm sido utilizados com frequência, evitando a demanda por analgésicos orais (opióides). Quanto ao uso clínico de condroprotetores, De Filippis et al. (2004) concluíram que o uso das glucosaminas sulfatadas (Condroitina sulfato-A e Sulfato de Glucosamina) não alteraram a evolução da osteoartrite, quando comparados aos placebos, visando escala da dor ou da progressão da degeneração dessa articulação em grupos de amostras de tamanhos consideráveis, superiores a 2.000 pacientes em cada.

Os anti-inflamatórios não hormonais de ação tópica produzem diminuição da intensidade das dores. Mas como produto tópico, a pomada à base de capsaína (TOFFOLETTO et al., 2005) é, verdadeiramente, um excelente produto para elevar o limiar da dor em artroses localizadas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes portadores desse tipo de dor, diminuindo realmente a escala da dor articular. É um produto de maior utilidade em artroses unicompartimentais.

2.3.1.a Terapias Intra-Articulares

Navarro e Ballesteros (2006) popularizam a técnica de administração de derivados de ácido hialurônico como condroprotetores e analgésicos em artroses avançadas. Em relação a aplicações intrarticulares de medicamentos, há muito tempo existe a rotina de infiltração de corticóides, porém, atualmente com a viscosuplementação, que comercialmente são conhecidos como Hyalgan¹ e Supartz² que são hialuronato de sódio e o Synvisc³ que é o hylano G-F 20 e ainda no mercado nacional encontramos o Suprahyal⁴ e o Polirreumin.⁵

¹ Sanofi Avents, USA

² Smith & Nephew, England

³ Genzyme Corporations, USA; comercializado Novartis/Brasil

⁴ Meiji Seika Kaisha LTD, Japan

⁵ TRB Pharma/Chemédica, Suíça

A viscosuplementação tem sido o tratamento de escolha para dor artrósica rebelde aos demais tratamentos. Apesar de alguns pesquisadores (LEOPOLD et al., 2003) não observarem diferenças significativas com o uso da viscosuplementação ou do corticóide, NAVARRO, BALLESTEROS (2006) afirmam que a viscosuplementação melhora a viscosidade do líquido sinovial devido ao fato de que os hialuronos serem moléculas de alto peso molecular e, dessa forma, revitalizam a cartilagem, provocando melhora da dor em poucos dias e essa analgesia permanece durante meses.

2.3.2 Tratamentos cirúrgicos

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

2.3.2a Debridamento artroscópico

O debridamento artroscópico é um procedimento minimamente invasivo utilizado para a toaleta articular da cartilagem lesada ou degenerada, utilizando-se a videoartroscopia. Pode ser associados ou não a artroplastia por abrasão, que implica na remoção da cartilagem lesada até a exposição do seu osso subcondral e os resultados revisados (GOLDBERG; MIRZAYAN; VANGSNESS, 2006) demonstram que produz a cobertura da lesão por um tecido de fibrocartilagem. Essa fibrocartilagem tem sua qualidade questionável, mas que produz alguma melhora da dor em alguns casos.

2.3.2b Condroplastia Eletrotérmica

Esse procedimento é realizado também de forma minimamente invasiva por videoartroscopia. Nesse procedimento utiliza-se uma ponteira que produz calor por radiofrequência e dessa forma melhora as irregularidades da superfície da cartilagem, mas compromete a viabilidade dos condrócitos das camadas mais profundas quando mal utilizada. Por essa razão, a sua indicação deve ser bastante criteriosa (KHAN; FANTON, 2006).

2.3.2c Microfraturas

As microfraturas, menores do que 5 mm, nas camadas de cartilagem que penetrem até o osso subcondral sem ultrapassar esse osso, mas criando canais que permitam o acesso de células mesenquimais através do sangue até a superfície lesionada. Essa técnica da microfratura, é considerada atualmente uma boa opção de tratamento das lesões condrais para lesões menores

do que 2,0 cm (SETH; MIRZAYAN; KHARRAZI, 2006). Steadman et al. (1999), criador e divulgador dessa técnica observou resultados altamente satisfatórios com o emprego da mesma em até 11 anos de seguimento, e notavelmente um tecido fibrocartilaginoso preenche a área tratada (Figura 8) .

Figura 8. Tratamento por microfatura do osso subcondral. Fonte: Grupo de estudo do joelho de Campinas. 20/10/10

2.3.2d Transferência Autóloga de Tecido Osteocondral

Conhecida como mosaicoplastia, indicada para pacientes com lesões acima de 2 a 4 cm de diâmetro. Mas em condições de salvação em lesões de até 9 cm, tem sido indicada e o sucesso desta técnica está relacionado com a arquitetura da cartilagem na área lesionada pois a área doadora possui superfície, espessura e funções diferentes da área receptora. A curto prazo, esta técnica gera bons resultados, mas pode ocorrer intercorrências após 3 anos na articulação patelofemural como em outras (KOH; HANGODY; RATHONYL, 2006). (Figura 9).

Figura 9. A retirada pinos de osso com cartilagem da área doadora para preenchimento da lesão focal em côndilo medial do fêmur. Técnica de transplante autólogo de tecido osteocondral (Mosaicoplastia).

Fonte: <http://www.alternet.pt/olympica/diartro/mosaicoplastia.htm>. 20/10/10

2.3.2e Transplante Osteocondral Homólogo

Apresenta índices de sucessos de até 75% (BUGBEE, 2002 e SASHA et al., 2002), mas o desenvolvimento de osteoartrose sobre o tecido transplantado pode ocorrer em longo prazo, com provável reação imunológica ao tecido transplantado, que pode se manifestar ou não. Devido ao alto grau de sucesso, esta técnica é muito indicada em lesões maiores (SASHA et al., 2002; BUGBEE; OSTENPOWSKI, 2006).

2.3.2f Transplante Autólogo de Condrócitos

É a técnica que reproduz a melhor qualidade de tecido para reparação das lesões maiores (BRITTBERG et al., 1994; PETERSON et al., 2000 e SPAGLIONE et al., 2002), mas as contra-indicações são: custo elevado, necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para o re-implante das células de condrócitos cultivadas a partir da retirada de amostra no primeiro tempo cirúrgico, necessidade de um longo período de tempo de suspensão da carga e reabilitação, além da grande dificuldade da técnica cirúrgica. No início da curva de aprendizado há um alto índice de re-operações, motivos que fazem com que esse procedimento muitas vezes, não seja indicado. (MICHELI et al., 2001; ANDERSON; FU; BERT, 2003) e Cohen et al, 2008, demonstrando a técnica. (Figura 10).

Figura 10. Implante autólogo de condrócitos: A- Mensuração da lesão, B- Desbridamento e preparo da superfície do osso subcondral, C- Fixação da membrana de periósteo sobre a lesão para sua oclusão, D- Sutura do periósteo ocluindo a lesão para injeção das células de condrócitos obtidas pela cultura dos condrócitos (COHEN et al., 2008).

2.3.2g Implante de Condrócitos com Matriz Assistida

A matriz cartilaginosa é um tecido muito difícil de ser reproduzido, mesmo sob a intensa atividade de condrócitos, mesmo quando ocorre hiperplasia de condrócitos nas lesões focais. Por essa razão, vários pesquisadores buscam na bioengenharia, novos materiais, que

possam auxiliar a reconstituição da matriz cartilaginosa facilitando a solução para a cura da lesão da cartilagem (CHIA et al., 2006; GAVENIS et al., 2006). Grigolo, Roseti e Fiorini (2001) foram uns dos primeiros pesquisadores a utilizarem uma matriz sintética na tentativa de reproduzir a cartilagem utilizando derivado de hialurano e sugeriram resultados promissores com a mesma de forma que foi a primeira matriz assistida de cartilagem a ser patenteada (Figura 11).

Figura 11. Implante autólogo de condrócitos em matriz assistida.

(Fonte: Nakamura, 2007 por Cristiano Frota Souza Laurino – UNIFESP) . 20/10/10

2.4 Membrana de Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana pode ser considerada como material biocompatível (GEYER et al., 1994). Ela é obtida através de rotas de biossíntese das bactérias dos gêneros: *Glucanoacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* etc. A celulose produzida pela espécie *Glucanoacetobacter xylinus*, é quimicamente pura, livre de ligninas, hemiceluloses e outros polissacarídeos encontrados embebidos na celulose vegetal. Este fator diminui o custo final da produção, visto que a etapa de extração do material não é necessária. É um biopolímero microcristalino com elevado grau de polimerização, o que o distingue dos outros tipos de celulose (VANDAMME et al., 1997).

Essa membrana teve sucesso quando experimentada como biomaterial ortopédico em composto com hidroxiapatita (HUTECHENS, 2004), na substituição de dura-mater de cães (MELLO, 1997) e amplamente divulgada na substituição temporária de pele, em feridas e queimados (FONTANA et al., 1990; 1991).

Em região intra-óssea foi condutora dos osteoblastos para obtenção de preenchimento ósseo (MARTSON et al, 1998). Além dessas utilidades como biomateriais foi comprovada

que a membrana de celulose bacteriana pode agregar antibióticos para liberação lenta (MARKMAN et al., 1995).

Por essas qualidades e também pela sua capacidade de agregar fibroblastos, já demonstrada antes, foi considerada modelo de grande potencial para bioengenharia de tecidos que possa reparar lesões de cartilagem (HELENIUS et al, 2005). Quando implantados condrócitos bovinos sobre a membrana de celulose, houve interação dos mesmos com a membrana gerando a proliferação celular dos mesmos com produção de 50% de colágenos tipo II como matriz intersticial (SVENSSON et al., 2005) (Figura 12).

Figura 12. Membrana de celulose bacteriana produzida pela cepa *Acetobacter xylinus*

3. OBJETIVOS

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar macroscopicamente e histologicamente os efeitos da implantação da membrana de celulose bacteriana, associada a células mesenquimais e ácido hialurônico, sobre patelas lesadas de suínos; além disso, verificaram-se os efeitos tóxicos ou degenerativos para a cartilagem hialina e a viabilidade dessa membrana quanto à condução de matriz de cartilagem intramembranosa associada aos condrócitos implantados.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aprovação do Comitê de Ética

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Araraquara-UNIARA sob o protocolo nº 617 (Anexo A).

4.2 Amostra

A amostra consistiu de 12 animais suínos de raça com modificação genética Dalland, machos, adultos jovens, na faixa etária de 100 dias de vida, com peso médio de 70 kg, provenientes da granja de suínos da fazenda Santa Paula em Colina-SP sendo que toda parte experimental foi realizada em dependências de centro cirúrgico veterinário de propriedade privada no município de Colina-SP.

4.3 Procedimento anestésico

Os animais foram sedados com Azoperone (Stressnil®, Janssen-Cilag Pharmaceuticals, França), intramuscular na dose de 8mg/Kg. de peso e complementado com o anestésico Tiopental Sódico (Tiophentax, Cristália, Brasil) na dose de 10 mg/Kg de peso (VILAHUR et al., 2004) através de acesso venoso e este mantido com solução fisiológica 0,9%. Após assepsia da região lombar, na posição ventral foi realizada a punção de espaço peridural com agulha 40 x 12 e aplicado bloqueio peridural com seringa de 5ml contendo marcaína 5% (MASSONE, 1994). A complementação anestésica foi conduzida com o próprio anestésico Tiopental Sódico, quando necessário, até margem inferior da dose anestésica permitida para o animal, 50 mg/Kg de peso (MASSONE, 1994; VILAHUR et al., 2004). Durante todo o experimento houve a assistência de médico veterinário e da vigilância sanitária do município de Colina-SP.

4.4 Técnica cirúrgica

Os procedimentos cirúrgicos consistiram de:

4.4. a) O animal foi mantido em posição de decúbito dorsal horizontal, posicionado em calha de madeira apropriada para cirurgia abdominal de suínos, onde se realizaram os

procedimentos de assepsia com lavagem exaustiva com degermante iodado e álcool iodado à 10% (Figura 13).

Figura 13. Suíno anestesiado em processo de assepsia posicionado na calha de madeira apropriada para as cirurgias propostas

4.4.b) Nos dois joelhos foram realizadas incisões na pele e subcutâneo, na região pré-patelar através de bisturi com lâmina número 20; dissecado o ligamento patelar e incisado o mesmo na linha mediana com bisturi elétrico (Figura 14A). Feita a secção da porção medial do tendão próximo à patela e a porção lateral em região distal próximo à tíbia, semelhante à técnica de alongamento fracionado em Z dos tendões dos músculos isqueotibiais em encurtamento dos mesmos na paralisia cerebral, descrita por Tachjian (SAGE, 1997) (Figura 14B).

Figura 14 A. Incisão mediana do ligamento patelar e (B), incisões transversas

4.4.c) Nos dois joelhos do animal foram realizados procedimentos de raspagem de toda a superfície osteocondral das patelas (lesão cartilaginosa no grau IV da classificação de Outerbridge (OUTERBRIDGE, 1961, 2001) e também grau IV da ICRS (International Cartilage Repair Surgery) idealizada e construída para a ICRS por Brittberg e Wymalski, 2003. Essa classificação, além de criar uma linguagem comum entre todos os cirurgiões que trabalham na reparação da cartilagem, propicia academicamente um intercâmbio de relações de informação e relacionamentos de fácil entendimento para quem a utiliza. Esta raspagem foi realizada através de um instrumental desenvolvido propriamente para o experimento, denominado de grossa (Figura 15).

Figura 15. Instrumental, grossa, utilizado para a raspagem da cartilagem articular na patela de suíno (A e B).

CLASSIFICAÇÕES DA LESÕES CARTILAGINOSAS UTILIZADAS NA METODOLOGIA DO ESTUDO (Figura 16):

Figura 16. Classificação de Outerbridge de 1961 atualizada em 2001:

Grau I (A): Amolecimento da cartilagem

Grau II (B): Fibrilação da cartilagem

Grau III (C): Fissuras da cartilagem

Grau IV (D): Lesões com exposição do osso subcondral

CLASSIFICAÇÃO DE ARTROSE DA ICRS (Figura 17).

Figura 17. Classificação da International Cartilage Repair Surgery (ICRS)
(BRITTBERG, WINALSKI, 2003)

Grau 1a: Superfície articular íntegra apenas com fibilação ou amolecimento

Grau 1b: Superfície articular íntegra com lacerações ou fissuras

Grau 2: Lesões que atingem menos do que 50% da camada mais espessa

Grau 3a: Lesões que atingem mais do que 50% de profundidade da espessura da cartilagem sem lesar a camada calcificada

Grau 3b: Lesões que atingem mais do que 50% de profundidade da espessura da cartilagem e com acometimento da camada calcificada

Grau 3c: Lesões com mais de 50% de profundidade que atingem a camada calcificada mas não atingem o osso subcondral

Grau 3d: Lesões que atingem mais de 50% da espessura da cartilagem e lesam a camada calcificada com lesão exposta também do osso subcondral

Grau 4: Lesões que atravessam toda a camada do osso subcondral

Essa classificação foi a utilizada nas classificações dos resultados dos animais tratados, devido a melhor padronização e especificações das lesões. Fato que permite que as lesões provocadas sejam mais especificamente enquadradas no grau 4 da ICRS que quando indicada na classificação de Outerbridge, essa não especifica na classe 4, se há acometimento total da camada subcondral do osso, fato que fica muito bem esclarecido na lesão grau 4 da ICRS, que é totalmente semelhante às lesões provocadas nas patelas de ambos os grupos operados.

4.4.d) O conteúdo desta raspagem foi utilizado como papa (Figura 18) e posteriormente, diluída com o Hylano G-F 20⁶ para ser utilizada no grupo tratado (GT). No grupo controle (GC), nos joelhos esquerdos após a lesão da cartilagem, nenhum material foi adicionado;

Figura 18. Papa de cartilagem após raspagem da superfície osteocondral da patela suína.

4.4.e) No joelho direito, grupo tratado (GT), sobre a área raspada foi colocada a membrana de celulose hidratada (figura 12), obtida através do cultivo de uma espécie superprodutora de biofilme do gênero *Glucanoacetobacter xylinus*, proveniente do Laboratório de Química Inorgânica, do Instituto de Química da UNESP, infiltrada com Hylano G-F 20, diluído com a papa das células mesenquimais obtidas da cartilagem e osso patelar, na proporção de 1ml/1,2cm³ (figura 19) . O volume da membrana foi definido pelo padrão de corte copiando a superfície articular da patela, todas as patelas dos suínos apresentaram a largura de 2cm x 3cm de comprimento correspondendo a 6 cm² . Essa área de corte da membrana sendo multiplicada pela altura (espessura) da membrana, 1 cm (10mm) gera o volume de 6cm³. A aplicação da papa foi dividida em 5 aplicações com intervalos médio de 1,2 cm cada, em espaçamento radial, que resultou no preenchimento total do volume da membrana de 6 cm³.

O método de aplicação da papa de células na membrana de celulose bacteriana, descrito segue o modelo proposto, no intra-operatório:

⁶ Synvisc®, Genzyme Biosurgery-USA, Novartis

- Três aplicações contendo $1,2 \text{ cm}^3$ posicionadas a cada intervalo espacial de $1,2 \text{ cm}^2$, na face lateral da membrana e duas aplicações pela face medial, que tem circunferência menor;
- As aplicações foram distribuídas em duas sessões à esquerda e três sessões à direita, procurando respeitar uma forma homogênea de pressão no cilindro da seringa, que distribuiu a papa de células através da forma mais homogênea possível, preenchendo todo o conteúdo da membrana homogeneamente.

Figura 19. Membrana de celulose bacteriana recortada na área de 6 cm^2 e ocupando um volume de 6 cm^3 , sendo preenchida em seu interior o volume de $3,6 \text{ cm}^3$ pelo lado maior de sua superfície lateral e complementando com $2,4 \text{ cm}^3$ em mais duas aplicações pelo lado medial, discretamente menor.

Essa membrana foi suturada com pontos de reparos com fio Catgut simples-1 e transfixados em três pontos de localizações diferentes, de proximal para distal, enlaçados por perfurações na patela e complementados com pontos localizados na parte periférica da patela direita, junto à cápsula sinovial (Figura 20).

Figura 20. Membrana fixada na superfície patelar com lesão

4.4 f) Os dois joelhos tiveram seus tendões reparados com fios mononylon 2-0 conforme descrito pela técnica descrita (Figura 21) e subcutâneo com fio catgut-0 simples (Figura 22) e a pele, suturada com o fio mononylon 2-0.

Figura 21. Sutura do ligamento

Figura 22. Sutura do subcutâneo

4.5 Pós-operatório

4.5.1 Pós-operatório imediato

Foi aplicada, por via intramuscular profunda, a medicação composta de analgésicos, antiinflamatórios e antibióticos profiláticos que é a associação de diclofenaco sódico, estreptomicina, penicilina Benzatina, penicilina procaína e penicilina potássica (Pencivet Plus⁷) na dose diluente de 1ml/30kg peso, que teve sua dosagem repetida uma vez ao dia, durante 7 dias, até que o animal recuperasse a marcha sem claudicação exagerada, realizados curativos com assepsias diárias e lavagem do animal e as baias de manutenção até a cicatrização das feridas cirúrgicas. Ao final de 30 dias nenhum animal apresentou claudicação, não havendo necessidade de manutenção da medicação ou curativos. Dois animais exigiram cuidados mais prolongados na medicação analgésica e curativos na deiscência da pele, sendo ambos os animais membros do grupo controle (Figuras 23 A e B).

⁷ Intervet do Brasil Veterinária LTDA.

Figura 23 A. Suínos em baias; B. Quatro animais por baia

4.5.2 Pós-operatório tardio

Os animais permaneceram por 60, 120 e 180 dias em observação. Mantidos em ambiente fechado com espaço físico de 2m x 2m em cada baia (Figuras 19A e 19B), cada espaço com grade de ventilação e alimentado com rações balanceadas com milho triturado, farelo de soja na proporção de 120 kg para 1.000 kg de milho e 40 kg de sais minerais e complexos vitamínicos como composto de núcleo de crescimento, recebendo 5 litros dessa ração 3 vezes ao dia. Definidos como grupos GT (joelho direito) e GC (joelho esquerdo) de 2M, 4M e 6M respectivamente, mantidos cada um em espaço físico de 2m x 2m, sob supervisão médica veterinária.

4.6 Eutanásia dos animais

Após estes períodos eles foram sedados através de administração intramuscular de Azoperone na dose de 8mg/Kg de peso e anestesiados com o Tiopental Sódico na dose de 10mg/Kg de peso. As superfícies patelares foram removidas e fixadas em solução de Bouin por 72 horas. Posteriormente os animais foram submetidos à eutanásia com uma dosagem maior do anestésico Tiopental Sódico a 60mg/Kg de peso do animal.

4.7 Documentação Fotográfica

Durante o experimento foram realizadas imagens fotográficas seriadas de todas as articulações, superfícies articulares do fêmur com a patela, utilizando máquina fotográfica SONY de 7,2 megapixels e após a eutanásia, somente imagens das superfícies patelares, em todos os animais.

4.8 Processamento e análise histológica

As superfícies patelares foram lavadas em água corrente, descalcificadas em solução de Morse (partes iguais de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50%), seguida por várias lavagens em solução tampão fosfato de sódio (pH 7.0) e posteriormente processadas segundo técnica rotineira para inclusão em parafina.

Cortes semi-seriados de 6µm foram realizados e corados em HE (Hematoxilina-Eosina) e coloração de Masson. Posteriormente, esses cortes foram analisados e fotografados no microscópio⁸ acoplado à câmera digital⁹ do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

4.9 Contagem do material colhido

O material retirado da patela, composto pela raspa da cartilagem do joelho do suíno, foi diluído em 10 ml solução fisiológica a 0,9%. O total de células obtidas, predominantemente condrócitos e alguns raros osteócitos do osso subcondral foi, então, diluído em 10 ml de solução fisiológica a 0,9% e rediluído na proporção de 1ml dessa solução para 9 ml da solução tampão de Hanks. Dessa diluição homogênea de células diluídas foi coletado 200 µl e colocados na câmara de Neubauer (Figura 24A e 24B)) onde foi feito a contagem dessas células sempre pelo mesmo operador, do Departamento de Biotecnologia da UNAERP, Ribeirão Preto-SP, com o microscópio Bel Photonics, com lente PLL 25/0.40. Desse material foram realizadas três contagens onde se realizou a média aritmética.

⁸ Olympus BX51

⁴Olympus DP71 – 12,5 Mpixels

Figura 24. A - Mosaico em que as células são diluídas com a solução homogeneamente; B - O dispositivo da Câmara de Neubauer onde se realiza o procedimento de contagem celular. 01-10-10

4.9 Metodologia da contagem

Foram contadas todas as células contidas em cada quadrilátero que faz parte das diagonais do quadrado central do mosaico, formando uma figura em **X** no quadrilátero central. Somaram-se os dez (10) valores encontrados em cada espaço e executou-se a fórmula para se contar o total de células contida num mililitro:

TOTAL DE CÉLULAS X 25 X 1000 = Total de células estimadas na Câmara de Neubauer que corresponde a 1 ml da solução diluída no tampão em 10 ml (Figura 25)

Figura 25. Exemplo com a recontagem na Câmara de Neubauer:

$72 + 83 + 78 + 80 + 78$ (primeira diagonal) + $60 + 71 + 75 + 75 + 84$ (da segunda diagonal)
 = Total de 756 células presentes nas diagonais.

Esse valor é aplicado à fórmula acima para se obter o total de células contidas no mosaico:
 $756 \times 25 \times 1000$ = Total de células estimadas na Câmara de Neubauer, que corresponde ao conteúdo de 1ml da solução tampão de Hanks.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados Clínicos

Os doze animais operados tiveram recuperação rápida dos movimentos articulares em ambos os joelhos, sendo que, ao décimo dia de pós-operatório, apenas dois animais continuaram apresentando claudicação, observado nos joelhos esquerdos, considerado o grupo controle (GC). Nos joelhos direitos (GT), além de iniciarem marcha não claudicante com rápida evolução, não houve nenhum caso de deiscência de cicatriz ou sinais inflamatórios. No GC, outros dois casos, diferentes dos que apresentaram claudicação, também apresentaram, deiscências de peles apenas, com necessidade de curativos diários até a cicatrização.

Nos momentos das eutanásias, foi observado em todo GC a ocorrência de aderências de tecido articular e imobilização da patela em seu leito articular, devido às aderências cicatriciais ao osso da patela. Todos os joelhos direitos do GT apresentaram mobilidade das articulações das patelas com as superfícies femorais. As mobilidades eram presentes tanto na direção proximal para distal quanto na direção medial para lateral, implicando que a presença da membrana de celulose bacteriana na superfície patelar não foi alvo de aderências teciduais da articulação patelofemoral.

5.2 Resultados macroscópicos

5.2.1 Grupo Tratado

A patela foi previamente fotografada em seu leito articular para posterior remoção nos dois grupos, tratado e controle. Dessa documentação foi possível observar que, as agressões geradas nas cartilagens femorais pela presença da membrana de celulose bacteriana nas superfícies articulares das patelas foram mínimas, sem que houvesse a presença de lesões erosivas sobre a cartilagem femoral ou exposição de osso subcondral (Figura 26), protagonizando graus Ia ou Ib na classificação da ICRS (BRITTBERG, WINALSKI, 2003), lesões que mantinham o leito articular íntegros sem processos erosivos.

Figura 26. GT-6m Joelho com membrana revestindo a superfície patelar sem impedir a mobilidade da mesma pelas aderências à cápsula e com cartilagem articular da fossa intercondílea do fêmur demonstrando integridade da superfície cartilaginosa, com discretos sinais degenerativos grau Ia da ICRS.

Nos animais avaliados após dois meses de operação houve a sugestiva neoformação de superfície articular da patela, simulando a superfície da cartilagem patelar (Figura 27).

Figura 27. GT 2M Cartilagem patelar neoformada com o tecido membranoso implantado, a superfície intercondilar do fêmur sofreu lesão grau Ib pela classificação da ICRS

Em outro animal, com o mesmo tempo de evolução, dois meses, houve até o esboço das duas facetas articulares da patela, medial e lateral (Figura 28).

Figura 28. GT 2M As facetas articulares, medial e lateral da patela foram restabelecidas, esboçando a superfície articular de um patela sem desgaste, porém se nota sua forma irregular. Nesse caso a superfície intercondillar do fêmur apresentou lesão grau Ib pela classificação da ICRS

No GT 6M todas as membranas estavam intimamente aderidas ao osso patelar, perdendo aquele esboço de superfície lisa, antes visto com dois meses de evolução. Mesmo assim, em dois casos foi possível observar a superfície articular lisa da patela, sem agressões severas à cartilagem do fêmur (Figura 29).

Figura 29. GT 6M Tecido esbranquiçado revestindo a superfície patelar em contato direto com superfície intercondilar do fêmur variando essa superfície com lesão grau Ia a Ib

5.2.2 Grupo controle

Em relação ao grupo controle, em todos os períodos, foi observado um desenvolvimento de tecido fibrocartilagenoso revestindo a superfície articular da patela que gerou agressões severas às fossas intercondilares dos fêmures, classificadas nas lesões grau Ib a IV da ICRS (Figuras 30 A e B).

Figura 30A. GT 6M com patela revestida de fina camada fibrocartilagenosa irregular e desgaste inicial de fossa intercondilar de fêmur em grau Ib da classificação da ICRS, na totalidade e pela mesma classificação, foco erosivo grau IV inferiormente à esquerda; 30B. Superfície patelar com fibrocartilagem irregular e afilada revestindo sua superfície articular

5.4 Resultados Histológicos

5.4.1 Grupo Controle

No grupo controle, foi observada uma reação tecidual com formação de uma neocartilagem, com hiperplasia de condrócitos e proliferação de matriz fibrocartilaginosa revestindo toda superfície patelar. A espessura de cartilagem foi mais espessa nos grupos de 2 e 4 meses (Figura 31). No grupo de 6 meses (Figura 32) a fibrocartilagem se apresentou com arquitetura irregular, com inúmeras células dispostas entre as fibras.

Na totalidade dos grupos controles houve lesões erosivas focais que chegaram a corresponder com lesões de graus Ib à IV pela classificação da ICRS; diferente dos grupos tratados com proteção pelo revestimento articular implantado com as membranas de celulose que inseridas sobre a superfície articular da patela, que protegeu a fossa intercondilar do fêmur, permitindo lesões grau Ia a Ib apenas.

Figura 31. GC 2M (A), 4M (B), observa-se uma matriz fibrocartilaginosa com intensa hiperplasia de condrócitos. MASSON, (A) 344X, (B) 176X.

Figura 32. GC 6 M, fibrocartilagem com células dispostas de forma irregular. MASSON 176X.

5.4.2 Grupo Tratado

Nos animais sacrificados após dois meses de tratamento foi possível observar a presença dos condrócitos ainda viáveis nas proximidades do osso esponjoso, representado pelos animais que apresentaram esboço de superfície cartilaginosa em suas patelas, com o aspecto branco ou amarelado, liso e de tecido resistente mecanicamente em graus variáveis. Esse revestimento da superfície óssea foi acompanhado de produção de matriz (Figura 33).

Figura 33. GT 2M, cartilagem revestindo o osso esponjoso mesclando-se com fibrocartilagem adjacente. MASSON, 68,5X.

No grupo tratado com a membrana infiltrada por um elevado número de células de condrócitos obtidos da raspa da cartilagem patelar ($16,35 \times 10^8$), contidas em um volume de 6

cm³. Foi possível observar no campo microscópio a elevada densidade da população de células contidas nesse espaço, incluindo condrócitos ainda viáveis em vacúolos celulares com elevado número de células microcitárias (Figura 34).

Figura 34. GT 2M, elevada densidade populacional de células contidas na membrana adjacente ao osso medular, incluindo grande número de condrócitos viáveis. MASSON, 176X.

Em um caso do GT 2M foi possível observar fragmentos de raspas de cartilagem com presença de matriz acompanhada por condrócitos ainda presentes nos seus vacúolos, porém, essas células se apresentaram com núcleos picnóticos (Figura 35 A, B).

Figura 35. GT 2M, fragmento de matriz cartilaginosa com condrócitos viáveis em seus vacúolos, no interior da membrana (A, B em detalhe). HE, 176X.

Ainda neste grupo (GT 2M) foi possível observar grande quantidade de lacunas de condrócitos preenchidas por células que se tornaram de núcleos picnóticos, porém alongados, sugerindo possível metaplasia dos condrócitos implantados em fibroblastos produtores de matrizes de colágenos de forma desorganizada (Figura 36).

Figura 36. GT 2M, membrana preenchida com grande quantidade de fibras colágenas (A) e metaplasia de condrócitos em células alongadas nas suas lacunas ainda presentes (B em detalhe). MASSON, 176X.

No GT 4M observa-se lacunas com células semelhantes à condrócitos remanescentes, que apresentavam núcleos maiores e arredondados (Figura 37).

Figura 37. GT 4M, fibrocartilagem com predominância de tecido conjuntivo (A). Em B, observam-se células semelhantes à condrócitos no interior de vacúolos. HE, 344X.

Resultado semelhante é observado próximo ao osso esponjoso patelar agredido onde se nota matriz cartilaginosa se expandindo de forma aleatória para o interior da membrana de celulose, mas com aspecto semelhante à fibrocartilagem (Figura 38).

Figura 38. GT 4M, matriz cartilaginosa migrando aleatoriamente para o interior da membrana implantada, a partir de osso esponjoso. HE 176X.

No GT 6M, foi observada uma maciça proliferação de fibras colágenas e metaplasia de quase a totalidade das células em fibroblastos. É importante mencionar que em nenhum dos períodos analisados foi observado sinais de inflamação evidentes que pudessem sugerir algum grau de inflamação ou reação a corpo estranho (Figura 39).

Figura 39. GT 6M, observar os espessos feixes de fibras colágenas evidenciando um tecido neoformado fibroso e resistente. MASSON, 176X.

Na figura 39 observou-se uma grande expansão de fibras colágenas em substituição aos espaços anteriormente preenchidos por células mesenquimais. Quando se compara as figuras 36, 37 e 39, numa evolução de 2 à 6 meses de tratamento, a diminuição celular relativa à expansão de tecido colágeno tornou-se evidente.

Foram observadas no GT 6M áreas de matriz cartilaginosa no interior da membrana, evidenciado por condrócitos no interior de vacúolos próximos ao osso patelar. Mais acima foi observado tecido composto por fibrocartilagem (figura 40).

Figura 40. GT 6M, membrana com condrócitos e fragmentos de cartilagem com matriz íntegra e preservada em seu interior. HE 176X.

5.5. Resultados quantitativos do material colhido

A contagem dessas células contidas no infiltrado teve valor médio de $18,17 \times 10^7$ unidades por ml da solução tampão. Esse volume foi multiplicado por 10 vezes onde se obteve o valor total das células obtidas da raspa ($18,17 \times 10^8$). Em campo operatório, esse volume total foi mantido em 5 ml, diluídos em solução fisiológica 0,9% contendo o total de células. Quando acrescentados 2 ml do Hylano G-F20 para novamente ser subtraído 5 ml aplicados na membrana, onde se obteve a real totalidade de células utilizadas na cirurgia para infiltrar a membrana, que foi de $16,35 \times 10^8$.

A quantidade média de células contidas em 1 ml de solução ativa, diluída com o Hylano G-F20 e infiltrada na membrana, continha o correspondente de $3,27 \times 10^8$ células, infiltradas esse volume de células para cada $1,2 \text{ cm}^3$ de membrana de celulose bacteriana.

Foram observados os seguintes valores: 1ª contagem – $19,275 \times 10^7/\text{ml}$; 2ª contagem – $16,325 \times 10^7/\text{ml}$; 3ª contagem – $18,9 \times 10^7/\text{ml}$ sendo a média do número de células de $18,167 \times 10^7/\text{ml}$. O volume total de células colhidas foi de $18,16 \times 10^8$. Foram realizadas três contagens e uma recontagem, por um único examinador, onde se obteve a quantidade de

células colhidas. Portanto, com a diluição associada ao Hylano G-F 20 passou a conter $16,35 \times 10^8$ na totalidade e por mililitro de papa das células infiltradas a quantidade de $3,27 \times 10^8$ por $1,2 \text{ cm}^3$ na membrana de celulose bacteriana.

6. DISCUSSÃO

A degradação e a perda da cartilagem são fatores cruciais para o desenvolvimento de osteoartrites (FELSON et al., 2000). Em tratamentos de lesões de cartilagem articular é necessário o reparo precoce para que essas degradações ou perda de cartilagem não evoluam para casos de osteoartrites degenerativas de mal prognóstico (BUCKWALTER, 2002 e WOLF; LANE, 2002). Há diversas formas de tratamentos propostos como o debridamento artroscópico com artroplastia por abrasão da lesão da cartilagem quando não atinge osso, as microfraturas, e ainda por artroscopia, o enxerto osteocondral autógeno (mosaicoplastia). Por vias abertas, é utilizado o transplante autólogo de condrócitos ou transplante de periósteo que são técnicas normalmente utilizadas para os defeitos maiores de 3 cm (GROSS, 2003). Dentre as formas de tratamentos mais comuns utilizadas atualmente está o uso do transplante autólogo de condrócitos (TAC) que é utilizado com bons resultados em longo prazo e segundo Brittberg em 2008, a técnica apresenta uma matriz relativamente homogênea, mas considerada uma técnica difícil e o sucesso está diretamente relacionado com o aprendizado da técnica. Por outro lado, HORAS et al. (2003) trabalhando com artroscopia e biópsias dos sítios dos tratamentos efetuados, encontrou na mosaicoplastia os cilindros íntegros e mantendo os padrões ósseos e cartilaginosos nas matrizes desses tecidos, mas no TAC, verificaram o desenvolvimento de fibrocartilagem na matriz desenvolvida.

Em busca de melhores resultados com o TAC, diversos métodos e biomateriais, têm sido propostos para melhorar ainda mais a matriz celular (MAUCK et al., 2000; GRIGOLO; ROSETI; FIORINI et al. 2001; CHERUBINO et al., 2003; SVENSSON et al, 2005; GAVENIS et al., 2006; NG et al., 2009). No uso de matriz assistida para esse método (MACI; Verigen, Leverkusen, Germany), realizado por técnica aberta e comparado ao tratamento com mosaicoplastia, através de avaliações com Ressonância Magnética em ponderância T2, poucas diferenças houve em relação às imagens. Porém, nesse estudo comparativo observou-se o resultado clínico consistentemente superior com o método da MACI em relação à mosaicoplastia (SALZMAN et al. 2009), avaliação essa obtida pela escala de Lysholm (1982).

O uso da membrana de celulose bacteriana como modelo de sustentação para as células cartilaginosas e ósseas, obtidas da própria raspa que efetuou a lesão, utiliza o princípio da bioengenharia de tecidos. É conhecido que, através de diversos fatores, solúveis ou

insolúveis, luz, fatores mecânicos e outros, podem ocorrer uma modificação do perfil de uma célula, assim como ocorre com os fibroblastos (NEMIR; WEST, 2010). Com a metodologia aplicada, nos primeiros dois meses foi possível observar a presença dos condrócitos ainda viáveis nas proximidades ao osso patelar, localizados na membrana implantada. Esses animais apresentaram esboço de superfície cartilaginosa em suas patelas com aspecto branco amarelado. SVENSSON et al. (2005) já haviam reportado quanto à capacidade da membrana de celulose produzida pela cepa *Acetobacter xylinum* permitir que condrócitos sintetizassem colágeno tipo II quando implantados sobre a membrana de celulose bacteriana. Nas proximidades do osso patelar também houve formação de matriz cartilaginosa junto a essas camadas de condrócitos.

Foi observado nos GT 4M e 6M que os núcleos das células implantadas começaram a ficar cada vez mais alongados e o citoplasma também acompanhou a transformação desses núcleos, assim como ocorreu com os condrócitos remanescentes, tornando-se mais alongados e ao final tornaram-se células com diversos formatos, desde ovóides até células fusiformes. Essa alteração no formato das células foi acompanhada de intensa produção de colágeno, tornando a membrana preenchida por fibrocartilagem.

A presença de fibrocartilagem aos quatro meses foi constante em todos os animais, onde se observou condrócitos, porém de forma rara e isolada. Em um animal foi possível visualizar a migração da matriz cartilaginosa para o interior da membrana, mas houve predominância de fibroblastos.

O colágeno entre mesclados com as células implantadas no interior da membrana gerou um tecido com arquitetura semelhante ao ligamento cruzado anterior. Este aspecto histológico é muito semelhante ao descrito por AMIEL et al. (1984) e LYON et al. (1991) para ligamentos.

Não houve agressão severa às cartilagens adjacentes ou em contato direto, face a face, com a membrana implantada. Também, Svensson et al. (2005), no teste *in vitro* da membrana, verificou que a mesma não induziu a atividade dos macrófagos para produzirem citocinas inflamatórias. O mesmo resultado foi observado em todos os animais dos grupos tratados onde não foram observados macrófagos ou leucócitos. Inclusive, quando comparado ao grupo controle, pode-se verificar que a membrana contribuiu para o processo cicatricial da ferida cirúrgica sem processo inflamatório; isto é, não gerou a produção de proteinases por essas

células, que são as enzimas responsáveis pela degradação da cartilagem (BRAY; FRANK; MINIACI, 1996). O mesmo fato não ocorreu com o grupo controle, que teve dois casos de deiscência de pele e dois com claudicações persistentes no pós-operatório, além de ter sido observada a ocorrência de várias lesões artrósicas em graus adiantados no grupo controle, como graus III e IV da classificação da ICRS. Portanto, a membrana de celulose bacteriana demonstrou ser um material biocompatível, que pode ser adaptada a uso articular, com capacidade de abrigar condrócitos e de acolher a produção interna de colágenos e proteger a cartilagem da fossa intercondilar do fêmur que esteve em contato direto com a membrana, revestindo a lesão patelar.

Os casos clínicos foram todos de evolução satisfatórios no grupo tratado, vendo pelas lesões da cartilagem da fossa intercondilar do fêmur, que apresentaram lesões leves classificadas em graus Ia ou IB, no máximo. Essa condição foi observada, também nos quatro animais com seis meses de evolução pós-tratamento com revestimento da lesão patelar com membrana inoculada com a papa de células mesenquimais preparada com Hylano G-F 20. Condrócitos viáveis ainda foram observados até o final dos seis meses do tratamento confirmando essa possibilidade, apesar da intensa proliferação de fibroblastos e tecido conjuntivo com colágenos.

Neste estudo, a produção de colágeno foi maciça na área da membrana infiltrada, pois, a presença de células mesenquimais maduras gerou células para a produção de uma matriz densa e resistente, à base de colágeno, conforme ficou demonstrado nos cortes histológicos e no teste de tração posterior. Analisando o volume de células presentes nos campos visuais microscópicos, foi possível observar que houve morte celular em detrimento da produção de colágeno. Segundo Nelson; Cox, 2006, a apoptose é considerada uma morte programada de células e quando ocorre, os produtos liberados por essas células são reaproveitados pelas células que permanecem para produzirem as estruturas ou tecidos que fazem parte. No modelo experimentado, a alta densidade populacional de células infiltradas na membrana foi um fator que gerou a morte celular, talvez não programada como na verdadeira apoptose, mas de certa forma, permitiu aos condrócitos utilizarem-se dos substratos residuais das células mortas, para uma produção maciça de colágenos. Foi observado também que este tecido pode gerar fibras colágenas de altíssima resistência, auxiliados pela metaplasia dos condrócitos em fibroblastos.

Uma outra hipótese é que o ácido hialurônico no infiltrado pode ter sido também um estímulo para a produção maciça de colágeno pelos fibroblastos. Os proteoglicanos podem ter uma importância fundamental na organização de matrizes extracelulares fazendo a interação das células com os fluídos do tecido (HARDINGHAM, 1981; BRAY; FRANK; BRAY, 1990). Os proteoglicanos apresentam uma cadeia química alongada (McGINTY, 1996) e podem ter induzido a organização das fibras colágenas, onde gerou um tecido resistente à tração. Este tecido possuiu semelhança na sua organização com a organização da matriz da cartilagem, onde se observou que o ácido hialurônico atuou como esqueleto para as glucosaminas e condroitinas sulfatadas, que se encontravam entre mescladas às fibras colágenas.

Apesar do tecido desenvolvido na superfície articular da patela não ter sido o desejado para a reparação de uma lesão cartilaginosa, esse estudo demonstrou que a membrana de celulose utilizada de acordo com essa metodologia em região intra-articular, é uma proposta viável de se continuar sendo pesquisada porque tem ação condroprotetora de lesões mais graves e severas de toda a superfície articular, devido ao seu hábil comportamento intrarticular, que ocorreu de forma biocompatível com a cartilagem hialina.

7. CONCLUSÕES

Segundo os objetivos e a metodologia utilizada pode-se concluir que:

- Em todos os grupos tratados, a articulação se apresentou íntegra macroscopicamente, sem processo erosivo e a membrana de celulose integrada à superfície patelar e a cápsula articular protegeu a fossa intercondilar do fêmur de sofrer lesões artrósicas mais graves, como ocorreu no grupo controle. Dessa forma preservou a mobilidade desta articulação sem dor, pois os animais não necessitaram de claudicar para o uso da marcha; demonstrando possível biocompatibilidade do uso dessa membrana em articulações hialinas
- A morfologia das células arredondadas implantadas sofrendo metaplasias em células de núcleos e citoplasmas alongados sugeriu a metaplasia de algumas dessas células em fibroblastos e a franca diminuição do número de células observadas no campo histológico ao decorrer dos quatro e seis meses, conduz-no a pensar num mecanismo de apoptose celular, porém não programadas, que pudessem gerar substratos e o conjunto com os nutrientes da membrana oferecendo celulose e a digestão do ácido hialurônico, propiciaram nutrientes para esses fibroblastos produzirem abundante matriz conjuntiva com base em fibras de colágenos não especificadas na metodologia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altman RD, Lozada CJ. Practice Guidelines in the Management of Osteoarthritis **Cartilage**. 1998; suppl A: 22-4.

Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W. Tendons and ligaments morphological and biochemical comparison. **J Orthop Res**. 1984; 1: 257-265.

Anderson AF, Fu FH, Bert RM, et al. A controlled study of autologous chondrocyte implantation versus microfracture for articular cartilage lesions of the femur. 70 th **American Academy of Orthopaedic Surgeons** (AAOS) annual meeting proceedings: New Orleans. 2003; February 5-9.

Andriacchi TP, Mikosz RP, Hampton SJ, Galante JO. Model studies of the kinematics of the human knee joint. **J Biomech**. 1983; 16(1): 23-29.

Arnoczky SP, Dodds JA, Wickiewicz TL. Basic Science of the Knee. In John B. McGinty. **Operative Arthroscopy**, 2^a ed, Philadelphia, USA: Lippincott-Raven, 1996, cap. 17, p. 211-239.

Balazs EA. Viscoelastic properties of hyaluronic acid and biological lubrication. **Univ Mich Med Cent J**. 1968; suppl: 255-259.

Balazs EA, Denlinger JL. Viscosupplementation: A new concept in the treatment of osteoarthritis. **J Rheumatol**. 1993; (suppl 39) 20: 3-92.

Barland P, Vovikoff AB, Hamerman D. Electron microscopy of human synovial membrane. **J Cell Biol**. 1962; 14:207.

Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss M, Doherty M. Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. **Ann Rheum Dis**. 1977; 56:229-307.

Blacharski PA, Somerset JH, Murray DG. A three-dimensional study of the kinematics of the human knee. **J Biomech**. 1975; 8:375-384.

Bland JH, Cooper SM. Osteoarthritis: a review of the cell biology involved and evidence for reversibility. Management rationally related to known genesis and pathophysiology. **Semin Arthritis Rheum.** 1984; 14:106-133.

Bos PK, Degroot J, Budde M, Verhaar JA, van Osch GJ. Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: Implications for integrative cartilage repair. **Arthritis Rheum.** 2002 Apr; 46(4):976-85.

Bray DF, Frank CB, Bray RC. Cytochemical evidence for a proteoglycan-associated filamentous network in ligament extracellular matrix. **J Orthop Res.** 1990; 8:1-12.

Bray RC, Frank CB, Miniaci A. The Structure and Function of Diarthrodial Joints. In John B. McGinty. **Operative Arthroscopy**, 2^a ed, Philadelphia, USA: Lippincott-Raven, 1996, cap. 10, p. 105-143.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. **New Eng J Med.** 1994; 331:889-895.

Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation-technique and lon-term follow-up. **Injury.** 2008; 39 (Supl 1): 40-9.

Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries Repair. **J Bone Joint Surg.** 2003. 85:58-69

Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. **Clin Orthop Relat Res.** 2002:21-37.

Bugbee WD: Fresh Osteochondral Allografts, **J Knee Surg.** 2002 Summer; 15(3):191-5.

Bugbee WD and Ostenpowski MJ. Osteochondral Allograft Transplantation. In Raffy Mirzayan. **Cartilage Injury in the Athlete**, 1^a ed, New York, USA: Thieme, 2006, cap. 16, p. 158-168.

Butler DL, Noyes FR, Grood ES. Ligamentous restraints to anterior-posterior drawer in the human knee. **J Bone Joint Surg.** 1980; 62A: 259-270.

- Caplan AI. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. **Tissue Eng.** 2000; 6:1-7.
- Cherubino P, Grassi FA, Bulgheroni P, Ronga M. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. **J Orthop Surg** (Hong Kong). 2003;11:10-5.
- Chia SL, Gorna K, Gogolewski S, Alini M. Biodegradable elastomeric polyurethane membranes as chondrocyte carriers for cartilage repair. **Tissue Eng.** 2006; jul 12(7): 1945-53.
- Chowdhury P, Matyas JR, Frank CB. The epiligament of the rabbit MCL: a quantitative morphological study. 1989. **Connect Tissue Res** 1991; 274:33-50.
- Cohen M, Nery C, Peccin MS, Ressio CR, Asaumi ID, Lombello CB. Implante autólogo de condrocitos para o tratamento de lesão do côndilo femural e talo. **Einsten.** 2008; 6(1): 37-41
- De Filippis L, Gulli S, Caliri A, Romano C, Munao F, Trimarchi G, La Torre D, Fichera C, Pappalardo A, Triolo G, Gallo M, Valentini G, Bagnato G; Grupo OASIS (Osteoarthritis South Italy Study). Epidemiology and risk factors in osteoarthritis literature review data from "OASIS" study. **Reumatismo.** 2004; jul-sep 58(3): 169-84.
- Felson DT et al. Osteoarthritis; new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 2000;133:635-46.
- Fontana JD et al. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Appl Biochem Biotechnol.** 1990; 24/25 : 253-64.
- Fontana JD, Franco VC, De Souza SJ, Lyra IN, De Souza AM. Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("tea fungus") biofilm used in skin therapy. **Appl Biochem Biotechnol.** 1991; 28-29: 341-51.
- Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. **J Biomed Mater Res.** 1993; Jan 27(1): 11-23.
- Furman W, Marshall JL, Girgis FG. The anterior cruciate ligament. A functional analysis based on postmortem studies. **J Bone Joint Surg.** 1976; 58A(2); 179-185.

Gavenis K, Schnidt-Rohifing B, Mueller-Rath R, Andereya S, Schneider U. In Vitro Comparision of Six Different Matrix Systems for the Cultivation of Human Chondrocytes. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 2006 May-Jun;42(5-6):159-67.

Geyer U, Heinze T, Klemm D, Marsch S, Schumman D, Schumauder HP. Formation, derivatization and applicatons of bacterial cellulose. **Int J Biol Macromo.** 1994; 16(6): 343-7.

Ghadially FN. **Fine structure of synovial joints.** London: Buttre-Worths.1983.

Goldberg SS, Mirzayan R and Vangsness Jr T. Arthroscopic Management of the Early Arthritic Joint. In Raffy Mirzayan. **Cartilage Injury in the Athlete**, 1^a ed, New York, USA: Thieme, 2006, cap. 11, p.102-103.

Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivated (HYAFF@-11) into cartilage defects in rabbits. **Biomaterials.** 2001; 22:2417-2424.

Grood ES, Noyes FR, Butler DL. Ligamentous and capsular restraints preventing straight medial and lateral laxity in human cadaver knees. **J Bone Joint Surg.** 1981; 63A(8): 1257-1269.

Gross, J. **Structure and Biological Reactivity of Connective Tissue.** In Ashford, M. The Muskuloeskeletal System, 1^a ed, 1952, The Macmillan Co, New York.

Gross AE. Cartilage resurfacing: filling defects. **J Arthroplasty.** 2003 Apr; 18 (3 Suppl 1): 14-7.

Hardingham TE. Proteoglycans: Their structure, interactions, and molecular organizagion in cartilage. **Biochem Soc Trans.** 1981; 9:489-497.

Helenius G, Bäckdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P and Risberg Bo. In *vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. Wyley Interscience. 2005 Nov. (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.30570.

Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. **J Bone Joint Surg Am.** 2003; 85-A:185-92.

Hutechens S. Syntesis and Initial Characterization of a Calcium Deficient Hydroxyapatite Bacterial Cellulose Composite [dissertation]. 2004, University of Tennessee, Knoxville.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**, 10^a. ed, 2004, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Kennedy JC, Weinberg HW, Wilson AS. The anatomy and function of the anterior cruciate ligament. **J Bone Joint Surg**. 1974; 56A(2): 223-225.

Key JA. **The synovial membrane of joints and burse**. In: Hoeber PB. Ed. Special cytology II. 2nd ed. New York: Paul B. Hoeber.1932; 1055:76.

Khan AM and Fanton GS. Electrothermal Chondroplasty. In Raffy Mirzayan. **Cartilage Injury in the Athlete**, 1^a ed, New York, USA: Thieme, 2006, cap.12, p. 112-113.

Koh JL, Hangody L and Rathonyi GK. Osteochondral Autograft Transfer (OATS/Mosaicplasty).In Raffy Mirzayan. **Cartilage Injury in the athlete**, 1^a ed, New York, USA: Thieme, 2006, cap. 14, p. 124-139.

Leopold SS, Redd BB, Warme WJ, Wehrle PA, Pettis PD, Shott S. Corticosteroid compared with hyaluronic acid injections for the treatment of osteoarthritis of the knee. A prospective, randomized trial. **J Bone Joint Surg Am**. 2003; 85-A:1197-1203.

Lyon RM, Akeson WH, Amiel D, Kitabayashi, LR, Woo SL-Y. Ultrastructural differences between the cells of the medial collateral ligament and the anterior cruciate ligaments. **Clin Orthop**.1991; 272:279-286.

Lysholm J, Gillquist J. Evaluation of knee ligament surgery results with special emphasis on use of a scoring scale. **Am J Sports Med**. 1982; 10:150-4.

Markman C, Fracalanza SE, Novaes Jr AB, Novaes AB. Slow release of tetracycline hydrochloride from a cellulose membrane used in guided tissue regeneration. **J Periodontol**.1995;66(11):978-83.

Martin I, Shastri VP, Padera RF, Yang J, Mackay AJ, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. **J Biomed Mater Res.** 2001; 55:229-235.

Martson M, Viljano J, Hume T, Saukko P. Biocompatibility of cellulose sponges with bone. **Eur Surg Res.** 1998; 30:426-32.

Massone F. Técnicas anestésicas em suínos. **Anestesiologia veterinária, Farmacologia e técnicas:** 2ª ed, cap. 13, p. 141, 1994.

Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, Chao PH, Valhmu WB, et al. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. **J Biomech Eng.** 2000 122:52-60.

McGinty JB. **Operative Arthroscopy.** Lippincott-Raven.1996. Second edition:109.

Mello LR, Feltrin LT, Neto PTF, Ferraz F. Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. **Neurosurg.** 1997;86:143-50

Micheli LJ, Browne JE, Erggelet C, Fu F, Mandelbaum B, Moseley JB, Zurakowski D. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experiences and minimum 3-year follow-up. **Clin J Sports Med.** 2001 Oct; 11(4):223-8.

Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hy treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. **Arthritis Res Ther.** 2003;5(2): 54-67.

Navarro RA, Ballesteros JP. Hyaluronic acid injections viscosupplementation. In Raffy Mirzayan. **Cartilage Injury in the Athlete**, 1ª ed, New York, USA: Thieme, 2006, cap. 10, p. 92-93.

Nemir S, West JL. Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity. **Ann Biomed Eng.** 2010; 38(1): 2-20.

Nelson DL, Cox MM. **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 4ª ed, Sarvier. 2006. Cap. 12 468-470.

Ng KW, Kugler BS, Doty SB, Ateshian GA and Hung CT. Scaffold degradation elevates the collagen content and dynamic compressive modulus in engineered articular cartilage. **Osteoarthr Cartil.** 2009; 17(2): 228-234.

Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. **J. Bone and Joint Surg.** 1961; 52-757.

Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. **Clin Orthop Relat Res.** 2001; 389:5-8.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J. The pathophysiology of osteoarthritis and the implication of the use of hyaluronan and hylan as therapeutic agents in viscosupplementation. **J Rheumatol.** 1993; 20 (suppl 39): 19-24.

Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of Knee. **Clin Orthop.** 2000;74:212-234.

Rezende UM, Gurgel HM, Vilaça Junior PR, Huroba RK, Lopes AS, Phillipi RZ, Hernandez AJ. Diacehein versus glucosamine in a rat model of osteoarthritis. **Clinics** (São Paulo). 2006. Oct;61(5): 461-6.

Sage FP. Paralisia Cerebral. **Cirurgia Ortopédica de Campbell**, oitava edição. Ed. A.H. Crenshaw. 1997. Capítulo 46, p. 2509.

Salzmann GM, Paul J, Bauer JS, Woertler K, Sauerschnig M, Landwehr S, Imhoff AB and Schöttle PB. T2 assessment and clinical outcome following autologous matrix-assisted chondrocyte and osteochondral autograft transplantation. **Osteoarthrititis and Cartilage.** 2009; 17:1576-1582.

Sasha N, Aubin PP, Cheah HK, Davis AM, Agnidis Z, Goss AE. Long term clinical experience with fresh osteochondral allografts for articular knee defects in high demand patients. **Cell Tissue Banks.** 2002;3(3):175-8.

Scapinelli R. Studies on the vasculature of the human knee joint. **Acta Anatomica.** 1968; 70: 305-331.

Scapinelli R, Aglietti P, Baldovin M, Girom F, Tritge R. Biologic of the patella: currents status. **Clin Sports Med** 2002 Jul; 21(3): 547-73.

Schwartz MA, Ciccotti MG. Structure and Function of Cartilage Biology. In Raffy Mirzayan. **Cartilage Injury in the Athlete**, 1^a ed, New York, USA: Thieme, 2006, cap. 1, p. 3-9.

Seth P, Mirzayan R, Kharrazi D. Microfracture Technique. In Raffy Mirzayan. **Cartilage Injury in the Athlete**, 1^a ed, New York, USA: Thieme, 2006, cap. 13, p. 116-122.

Shubert, M. **Chemistry of Connective Tissue**. The Muskuloeskeletal System, 1952, The Macmillan Co, New York.

Spaglione NA, Miniaci A, Gillogly SD, Carter TR. Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee. **Arthroscopy**. 2002;18 (suppl 1):9-32.

Steadman JR, Rodkey WG, Brigs KK, Rodrigo JJ. The microfracture technique in the management of complete cartilage defects in the knee joint. **Orthopade**, 1999 Jan; 28(1): 26-32.

Suter ER, Majno G. Ultrastructure of the joint capsule in the rat: presence of two kinds of capillaries. **Nature**. 1964; 202: 920.

Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. Bacterial cellulose as a potencial sacaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**. 2005; Feb 26(4): 419-31.

Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjögren-Jansson E, CarlssonL, Peterson L, Brittberg M, Lindhal A. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritis patients. **Arthritis Res Ther**. 2005; 7(3): R560-R568.

Toffoletto O, Tavares A, Casarini DE, Redublo BM, Ribeiro AB: Farmacocinética da associação de glucosamina e sulfato de condroitina em humanos sadios do sexo masculino. **Acta Ortop Bras**. 2005; vol 13, 5:235-237.

Troum Om. Analgesics and Antiinflammatory Medications. In Raffy Mirzayan. **Cartilage injury in the Athlete**, 1^a ed, New York, USA: Thieme, 2006, cap. 8, p. 73-85.

Vandamme EJ, De Baets S, Vanbaelen A, Joiris K, De Wulf P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym Degrad Stab*. 1997; 59: 93-9.

Vannucci AB. *Osteoartrose*. **Rev Bras Med**. 2002; 59:39-46.

Vilahur G, Segalés E, Salas E, Badimon L. Effects of a novel platelet nitric oxide donor(LA816), aspirin, clopidogrel and combined therapy in Inhibiting flow-and-lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model. **Circulation**. 2004; 110: 1686-1693.

Wolfe F, Lane NE. The longterm outcome of osteoarthritis: rates and predictors of joint space narrowing in symptomatic patients with knee osteoarthritis. **J Rheumatol**. 2002; 29: 139-46.

9. ANEXO A

Centro Universitário de Araraquara

Rua Voluntários da Pátria, 1309 - Centro - Araraquara - SP
CEP 14801-320 - Caixa Postal 68 - Fone/Fax: (16) 3301-7100

www.uniara.com.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UNIARA

Araraquara, 16 de abril de 2007.

Parecer do projeto com o protocolo nº617

Título: “Avaliação dos efeitos da membrana de celulose bacteriana na superfície patelar lesada de suínos”.

Docente Responsável: Ana Maria Minarelli Gaspar

Ilmo. Senhor(a) Pesquisador(a)

Informamos que o projeto “**Avaliação dos efeitos da membrana de celulose bacteriana na superfície patelar lesada de suínos**” sob sua orientação, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIARA.

Estamos o trabalho estruturado conforme orientações contidas na resolução 196/96 de Conselho Nacional de Saúde, este Comitê apresenta **parecer favorável** a sua realização. Sendo assim, salvo melhor juízo, o projeto está **APROVADO**.

Atenciosamente.

Parecerista/Relator