
JOÃO PAULO CORTEZ DE SANT'ANNA

**Avaliação por imagem de composto de engenharia tecidual para o reparo
da cartilagem em modelo pré-clínico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes

SÃO PAULO
2021

JOÃO PAULO CORTEZ DE SANT'ANNA

**Avaliação por imagem de composto de engenharia tecidual para o reparo
da cartilagem em modelo pré-clínico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes

SÃO PAULO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sant'Anna, João Paulo Cortez de
Avaliação por imagem de composto de engenharia
tecidual para o reparo da cartilagem em modelo pré-
clínico / João Paulo Cortez de Sant'Anna. -- São
Paulo, 2021.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientador: Tiago Lazzaretti Fernandes.

Descritores: 1.Imagem por ressonância magnética
2.Células-tronco mesenquimal 3.Bioengenharia
4.Engenharia tecidual 5.Cartilagem articular
6.Terapia baseada em transplante de células e
tecidos 7.Pesquisa médica translacional

USP/FM/DBD-363/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À querida avó e educadora exemplar, **Maria do Loureto** (*in memoriam*).

Aos **meus pais e irmãs** pelo carinho presente em toda a minha formação.

À minha esposa **Melina**, pelo amor, companheirismo e apoio diários.

À **Alice**, pela presença inspiradora nas últimas semanas da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes**, pela orientação exemplar nesta dissertação e nas inúmeras atividades acadêmicas que acompanharam esta pesquisa.

Aos **Profs. Drs. Olavo Pires de Camargo, Gilberto Luís Camanho e Tarcísio E.P. de Barros Filho**, pela oportunidade de realizar esta pesquisa no Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao **Dr. Luiz Fernando Lima Reis**, pela confiança depositada para a realização deste trabalho em parceria com o Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês.

À **Dra. Daniela Bueno**, pela orientação e incentivo na realização deste trabalho.

Ao **Dr. Riccardo Gomes Gobbi** e à **Profa. Dra. Márcia Uchôa de Rezende**, pelos comentários corretos e pertinentes na banca do exame de qualificação.

Aos **Profs. Drs. Arnaldo José Hernandez e André Pedrinelli**, e aos **Drs. Adriano Marques de Almeida, Júlio Nardelli, Marco Antônio Ambrósio**, e demais membros do grupo de Medicina do Esporte, pela agradável convivência e incentivo à prática da pesquisa científica.

À **Carla Cristina Gomes Pinheiro**, e demais funcionários do Centro de processamento celular do Hospital Sírio-Libanês, pela colaboração irrestrita e ensinamentos diários sobre processamento celular.

Ao médico veterinário **Bruno Gregnanin Pedron** e demais profissionais do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês, pelo cuidado sério e respeitoso com todos os animais.

Ao **Khallil Taverna Chaim, Glaucia Aparecida Bento dos Santos** e demais profissionais do Projeto Plataforma de Imagem na Sala de Autópsia (PISA).

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia e do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À **Profa. Dra. Vera Demarchi Aiello**, pela agradável companhia e transmissão de conhecimento durante as avaliações histológicas.

À querida **Laura Rocha**, pelo auxílio na edição e revisão do texto.

A todos os alunos da Iniciação Científica e estagiários do Grupo de Medicina do Esporte pela participação nas diferentes etapas dessa pesquisa.

Às secretárias **Tânia Borges** e **Rosana Moreno**, e à bibliotecária **Andressa da Costa Santos Souza** e demais profissionais do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, pela ajuda constante durante os anos de pesquisa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Terminologia Anatômica. Sociedade Brasileira de Anatomia - CTA-SBA (2001), Editora Manole.

SUMÁRIO

	Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas	
	Lista de Figuras	
	Lista de Gráficos	
	Lista de Tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	7
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3.1	Engenharia tecidual.....	9
3.2	Avaliação clínica da cartilagem articular por ressonância magnética.....	14
3.2.1	Morfologia.....	16
3.2.2	Composição – Mapeamento em T2.....	22
3.2.3	Avaliação com diferentes intensidades de campos magnéticos..	25
3.3	Avaliação da cartilagem articular por histologia – sistema de pontuação ICRS-2.....	26
4	MÉTODOS.....	31
4.1	Protocolo de coleta de dados.....	32
4.2	Coleta e expansão das células-tronco mesenquimais.....	32
4.3	Desenvolvimento do composto de célula e matriz extracelular feito por engenharia tecidual (CET).....	35
4.4	Técnica cirúrgica.....	37
4.5	Cuidado pós-operatório e eutanásia.....	39
4.6	Avaliação por imagem de ressonância magnética 7-Tesla.....	40
4.6.1	Aquisição das imagens.....	40
4.6.2	Avaliação morfológica do reparo da cartilagem.....	41
4.6.3	Avaliação da composição do reparo da cartilagem.....	41
4.6.4	Avaliação histológica do reparo da cartilagem.....	43
4.7	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS	47

5.1	Dados demográficos.....	47
5.2	Avaliação por imagem da morfologia da cartilagem (MOCART 3D)	47
5.3	Avaliação por imagem da composição da cartilagem (Mapeamento em T2).....	51
5.4	Avaliação histológica (ICRS-2).....	54
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÃO.....	72
8	ANEXOS.....	74
9	REFERÊNCIAS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µm	Micrometro
3D	Tridimensional
ADI	Área de interesse
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asc-2P	L-ácido ascórbico 2-fosfato
BR1	Porco em miniatura brasileiro
CA	Cartilagem adjacente
CEM	Células estromais mesenquimais
CET	Composto de engenharia tecidual
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cl-	Cloreto
Cm	Centímetros
CN	Cartilagem nativa
CO ₂	Dióxido de carbono
CTE	Células-tronco embrionárias
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTPi	Células-tronco pluripotentes induzidas
DC	Defeito condral
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture</i>
DESS	<i>Double echo steady state</i>
DP	Desvio-padrão
EDTA	Etilenodiaminotetracético
et al.	E outros
FA	<i>Fraction anisotropy</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FoV	<i>Field of view</i>
FSE	<i>Fast spin echo</i>
GAG	Glicosaminoglicano
GRE	Gradiente eco ou <i>gradient recalled echo</i>

HC	Hospital das Clínicas
IAC	Implante Autólogo de Condrócitos
ICRS	<i>International Cartilage Repair Society</i>
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
Mapa T2	Mapeamento em T2
MEC	Matriz extracelular
MOCART	<i>Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue</i>
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
ms	Milissegundo
Na+	Sódio
OA	Osteoartrite
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PISA	Plataforma de Imagem na Sala de Autópsia
RM	Ressonância magnética
SE	Spin eco
SPGR	<i>Spoiled gradient recoiled echo</i>
T	Tesla
T2	Tempo de relaxamento em T2
TE	Tempo de eco
TEC	<i>Tissue engineered construct</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TR	Tempo de relaxamento
UI	Unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Células-tronco mesenquimais. Aumento: 10×. (Microscópio Olympus CK40).....	11
Figura 2 –	Imagem de RM em sequência 3D DESS de joelho de porco em miniatura em corte sagital (A) e corte coronal (B).....	18
Figura 3 –	MOCART 3D. Demonstração esquemática das variáveis: preenchimento do defeito, superfície e estrutura.....	22
Figura 4 –	Imagem de RM em sequência de Spin Eco ponderada em T2 com corte sagital de joelho de porco em miniatura. Mapeamento em T2 da cartilagem articular. A escala de cores indica o tempo de relaxamento em T2 em cada pixel da imagem (ms = milissegundo; T2 = tempo de relaxamento em T2).....	24
Figura 5 –	CEM indicada por setas vermelhas. Visualizado no microscópio óptico 40x (Olympus CK 40).....	34
Figura 6 –	Secagem do CET após destacamento e drenagem do meio. A: secagem e destacamento apenas de um CET (central) após aplicação de força com auxílio de pipeta. B: secagem e destacamento de 3 CET. (Barra branca = 10 mm).....	36
Figura 7 –	Joelho do porco em posição supina (A) e início da artrotomia medial (B)	37
Figura 8 –	Defeito da cartilagem (6 mm) na área de carga do côndilo femoral medial do membro posterior, após remoção da camada calcificada da cartilagem.....	38
Figura 9 –	Imagem de ressonância com corte sagital de joelho de porco e mapeamento T2 da topografia da cartilagem articular, mostrando áreas de interesse demarcadas em um mesmo corte. Retângulo vazado de borda preta: área de	

defeito da cartilagem. Retângulo vazado de borda branca: área de cartilagem adjacente. (Barra branca = 6 mm).....	42
Figura 10 – Ampliação da imagem de ressonância mostrada na figura 9. Destacando a divisão das áreas de interesse em região profunda e superficial. Retângulo vazado de borda preta: área de defeito da cartilagem. Retângulo vazado de borda branca: área de cartilagem adjacente. (Barra branca = 6 mm).....	43
Figura 11 – Avaliação da morfologia da cartilagem articular por imagem de RM 7-T na sequência 3D-DESS em cortes sagitais incluindo o maior diâmetro do defeito condral, 6 meses após a cirurgia. Comparação mostrando o resultado padrão, melhor e pior do grupo controle (A,B,C) e tratamento (D,E,F). (Dupla seta indica o tamanho do defeito da cartilagem criado – 6mm; Barra branca = local do defeito).....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Valores da pontuação da avaliação geral no escore MOCART 3D.....	49
Gráfico 2 – Valores da pontuação das variáveis Preenchimento (A), Integração ao osso subcondral (B) e Estrutura do tecido de reparo (C) do escore MOCART 3D.....	51
Gráfico 3 – Valores médios do T2 mostram diferença significativa entre as áreas de cartilagem adjacente e defeito condral no grupo submetido apenas ao defeito. Não houve diferença nos valores médios do T2 entre as áreas de interesse no grupo tratado (Defeito + CET), indicando semelhança na composição do tecido de reparo e a cartilagem saudável.....	52
Gráfico 4 – Valores médios do T2 calculados na zona profunda (pontos pretos) e superficial (triângulos vermelhos), ligados por uma reta, da cartilagem adjacente saudável (esquerda) e nas regiões submetidas ao defeito em cada joelho. A variação do T2 por zona mostra aumento significativo do valor médio na zona superficial em relação à zona profunda na cartilagem adjacente (A) e no grupo Defeito + CET (C). Não houve diferença nos valores do T2 entre as zonas no grupo Defeito (B).....	54
Gráfico 5 – Valor médio da Avaliação Geral do reparo da cartilagem pelo escore histológico ICRS-2.....	55
Gráfico 6 – Correlação da pontuação da Avaliação Geral do reparo da cartilagem entre os escores MOCART e ICRS-2.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis demográficas e valores basais dos animais envolvidos na pesquisa.....	31
Tabela 2 – Preenchimento do defeito da cartilagem.....	50

RESUMO

Sant'Anna JPC. *Avaliação por imagem de composto de engenharia tecidual para o reparo da cartilagem em modelo pré-clínico* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2021.

INTRODUÇÃO: A lesão condral articular causa limitações funcionais, dor e pode progredir para osteoartrite, o que causa elevado custo financeiro para o tratamento. As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam capacidade de expansão, diferenciação condrogênica, e de imunorregulação local, mostrando-se úteis para o tratamento das lesões condrais. O composto desenvolvido por engenharia tecidual (CET) é formado por células mesenquimais e matriz extracelular, sendo uma estratégia que evita a necessidade de arcabouço sintético ou de origem animal. O tratamento da lesão condral pode ser avaliado de forma não invasiva com a ressonância magnética (RM), que permite a análise da morfologia e da composição do tecido de reparo. **OBJETIVOS:** o objetivo primário desse estudo foi avaliar por ressonância magnética o reparo da lesão da cartilagem, utilizando o CET. E o secundário foi avaliar o tratamento por histologia e correlacionar com a avaliação por ressonância. **MÉTODOS:** O CET foi desenvolvido em centro de tecnologia celular tipo 2, certificado pela ANVISA, com células-tronco mesenquimais, seguindo as boas práticas em laboratório. Um defeito de cartilagem de 6mm de diâmetro foi realizado nos dois joelhos (membros posteriores) em 14 porcos em miniatura (BR1). O CET foi aplicado no defeito em um dos joelhos de cada animal. Após 6 meses, foi realizada eutanásia e ressonância magnética dos joelhos operados para avaliação da morfologia, com o sistema de pontuação MOCART 3D, e da composição de água e fibras de colágeno do tecido de reparo, pelo mapeamento em T2. O valor médio do T2 foi calculado na região em que foi realizado o defeito e em região adjacente com cartilagem saudável. Em cada região, o valor médio do T2 foi calculado na zona profunda e superficial. Por último, o reparo da cartilagem foi avaliado através de histologia pelo escore ICRS-2. **RESULTADOS:** O valor médio do MOCART no grupo submetido ao defeito sem tratamento foi de $46,2 \pm 13,4$, enquanto o grupo tratado com o CET teve valor médio da pontuação de $62,3 \pm 12,3$ ($p < 0,001$). A avaliação por mapeamento em T2 no grupo sem tratamento mostrou haver diferença estatística entre o valor médio do T2 da região do defeito condral ($50,9 \pm 2,4$) e da região da cartilagem saudável ($54,4 \pm 1,7$), ($p < 0,05$) o que indica diferença na composição entre as duas regiões. No grupo com tratamento, o valor médio do T2 na região que recebeu o CET foi de $53,4 \pm 2,1$ e não apresentou diferença em relação ao valor médio do T2 da cartilagem adjacente saudável, que foi de $54,7 \pm 2,2$ ($p = 0,7$). A avaliação histológica do reparo da cartilagem com o sistema ICRS-2 mostrou um valor médio de $43,5 \pm 4,3$ na avaliação geral do grupo submetido apenas ao defeito da cartilagem e um valor médio de $57,8 \pm 5,1$ no grupo submetido ao tratamento com o CET ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** A avaliação da morfologia e composição por ressonância

magnética e análise histológica mostraram que o defeito de cartilagem tratado por composto de engenharia tecidual foi responsável por uma cobertura maior e de melhor qualidade do defeito em relação ao grupo sem tratamento.

Descritores: Imagem por ressonância magnética; Célula-tronco mesenquimal; Bioengenharia; Engenharia tecidual; Cartilagem articular; Terapia baseada em transplante de células e tecidos; Pesquisa médica translacional

ABSTRACT

Sant'Anna JPC. *Imaging evaluation of tissue engineering construct for cartilage repair in a preclinical model* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

INTRODUCTION: The chondral joint damage causes functional limitations, pain and can progress to osteoarthritis, which causes a high financial cost for the treatment. Mesenchymal stem cells (MSC) are capable of expansion, chondrogenic differentiation, and local immunoregulation, proving to be useful for the treatment of chondral lesions. The compound developed by tissue engineering (TEC) is formed by mesenchymal cells and extracellular matrix, being a strategy that avoids the need for a synthetic framework or of animal origin. The treatment of chondral injury can be evaluated non-invasively with magnetic resonance imaging (MRI), which allows the analysis of the morphology and composition of the repair tissue. **OBJECTIVES:** The primary objective of this study was to evaluate by magnetic resonance the repair of cartilage damage using TEC. And the secondary was to evaluate the treatment by histology and correlate with the evaluation by resonance. **METHODS:** The TEC was developed in a type 2 cell technology center, certified by ANVISA, with mesenchymal stem cells, following good laboratory practices. A 6mm diameter cartilage defect was performed in both knees (hind limbs) in 14 miniature pigs (BR1). TEC was applied to the defect in one of the knees of each animal. After 6 months, euthanasia and MRI of the operated knees were performed to assess the morphology, with the MOCART 3D scoring system, and the composition of water and collagen fibers of the repair tissue, by T2 mapping. The mean T2 value was calculated in the region where the defect was made and in an adjacent region with healthy cartilage. In each region, the mean T2 value was calculated in the deep and superficial zone. Finally, cartilage repair was evaluated through histology using the ICRS-2 score. **RESULTS:** The mean value of MOCART in the group submitted to the defect without treatment was 46.2 ± 13.4 , while the group treated with CET had a mean score of 62.3 ± 12.3 ($p < 0.001$). The T2 mapping evaluation in the untreated group showed a statistical difference between the mean T2 value of the chondral defect region (50.9 ± 2.4) and the healthy cartilage region ($54, 4 \pm 1.7$), ($p < 0.05$) which indicates a difference in composition between the two regions. In the treatment group, the mean T2 value in the region that received the TSC was 53.4 ± 2.1 and showed no difference in relation to the mean T2 value of the healthy adjacent cartilage, which was of 54.7 ± 2.2 ($p = 0.7$). The histological evaluation of cartilage repair with the ICRS-2 system showed a mean value of 43.5 ± 4.3 in the general evaluation of the group submitted only to the cartilage defect and a mean value of 57.8 ± 5.1 in the group submitted to treatment with the CET ($p < 0.05$). **CONCLUSION:** The evaluation of morphology and composition by magnetic resonance and histological analysis showed that the cartilage defect

treated with tissue engineering construct was responsible for greater coverage and better quality of the defect compared to the untreated group.

Descriptors: Magnetic resonance imaging; Mesenchymal stem cells; Bioengineering; Tissue engineering; Cartilage, articular; Cell and tissue-based therapy; Translational medical research.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As lesões de cartilagem são muito prevalentes, estima-se que 63% da população apresente algum tipo de lesão condral nos joelhos. As lesões de espessura total da cartilagem são mais graves e acometem 6,2% dos adultos com menos de 40 anos de idade, assim como 36% dos atletas em atividade. A população praticante de esporte apresenta maior risco de lesão condral, que é causa de limitações clínicas importantes, piora da qualidade de vida e afastamento das atividades esportivas(1–3).

Os defeitos da cartilagem, quando não tratados, podem aumentar e ocasionar lesões no osso subcondral adjacente, provocando alterações na biomecânica e na homeostase da articulação como um todo. A morbidade causada por tal lesão pode forçar os pacientes a fazer mudanças indesejadas no estilo de vida, incluindo modificações e redução da atividade física. Esse processo pode resultar na perda de mobilidade, degeneração e no desenvolvimento precoce de osteoartrite do joelho, por exemplo(4,5).

A osteoartrite (OA) é a doença articular mais prevalente em países desenvolvidos, sendo a segunda causa mais comum de dor crônica e a maior causa de limitação física entre os idosos(6,7). A OA está relacionada também ao afastamento das atividades esportivas e à perda de dias de trabalho. Sendo a quarta principal causa de anos vividos com incapacidade. Clinicamente, o joelho é a articulação mais acometida, e estima-se que a osteoartrite no joelho esteja presente em 19% da população com mais de 45 anos(8).

A osteoartrite apresenta um elevado custo econômico. Custo esse não apenas relacionado ao gasto com tratamento, mas também ao prejuízo gerado pelos anos vividos com incapacidade. Em países ricos, calcula-se que a OA seja responsável por uma despesa de 1% a 2,5% do produto interno bruto(9).

Devido aos altos custos diretos e indiretos da osteoartrite, e a possibilidade de reduzi-los em caso de tratamento dos defeitos condrais em momento adequado, a avaliação de novas terapias para as lesões da cartilagem merece destaque e é de elevada relevância clínica.

A cartilagem é um tecido único, avascular e aneural, que possui limitada disponibilidade de células progenitoras condrogênicas e não se regenera prontamente após uma lesão(10). Apesar das diversas técnicas disponíveis na atualidade, a regeneração completa da cartilagem hialina danificada ainda é um desafio e não é possível em tratamentos sem o implante de células com tal capacidade(11).

Os procedimentos atuais que buscam reparar o tecido condral são a estimulação por microfratura, o enxerto autógeno e aloenxerto osteocondral, e as terapias com implante celular baseadas nos princípios da engenharia tecidual. A terapia celular inclui o uso de células com capacidade de restaurar o tecido condral, como o Implante Autólogo de Condrócitos (IAC) e o uso de células-tronco. O tratamento com implante de condrócitos requer a coleta de cartilagem íntegra do paciente, em um procedimento cirúrgico prévio(12). Evidências mostram que a disponibilidade de condrócitos pode estar diminuída em indivíduos com idade avançada, tanto em relação à quantidade quanto à qualidade dessas células(12,13).

Como alternativa ao IAC, a terapia celular com célula-tronco mesenquimal (CTM) tem recebido maior atenção nos estudos recentes, devido à relativa facilidade no processo de coleta do tecido, de expansão e de diferenciação celular, além do avanço da pesquisa no campo da engenharia tecidual(13). Tais motivos mostram que a terapia celular com o uso de CTM é uma opção promissora para a regeneração do tecido da cartilagem(10).

Essas células podem ser isoladas de diversos tecidos, tais como a medula óssea, a membrana sinovial ou sinóvia, o tecido adiposo e a polpa de dente(13). As células-tronco mesenquimais mostram capacidade de proliferação e diferenciação em condrócitos, e sintetizam moléculas consideradas marcadores específicos do tecido condral, como colágeno e proteoglicanos(14). Além disso, são capazes de regular a imunidade local, ao induzir o fenótipo anti-inflamatório dos macrófagos(15), e suportar o processo de criopreservação(16,17).

Além da escolha das células, outro ponto amplamente discutido na engenharia de tecidos é o método para a sua implantação no local de destino. O ambiente tridimensional (3D) apropriado, que mimetize o tecido a ser restaurado, é importante para otimizar a proliferação e diferenciação celular(13). Criar esse ambiente é função dos arcabouços que recebem as células. E estes precisam ser compatíveis com o ambiente onde serão introduzidos.

Um sistema de entrega de células sem a necessidade de um arcabouço externo é uma excelente alternativa. Para o reparo da cartilagem, foi desenvolvido um tecido livre de arcabouço, formado a partir de células mesenquimais e sua matriz extracelular, por um grupo de pesquisadores da

Universidade de Osaka, Japão, liderado pelo Dr. Norimasa Nakamura. A estrutura recebeu o nome de *Tissue engineered construct* ou Composto de engenharia tecidual (CET)(18).

A viabilidade do CET derivado de células mesenquimais foi demonstrada pelo seu implante em defeitos da cartilagem de porcos em miniatura(18,19).

Como demonstrado em estudos prévios, o porco em miniatura ou “*mini-pig*” é um modelo animal de grande porte adequado para ensaios pré-clínicos em diversas linhas de pesquisa(20,21). No Brasil, o porco em miniatura BR1 é o único exemplar nacional da espécie desenvolvido exclusivamente para pesquisa(22).

A avaliação do tratamento da lesão condral por ressonância magnética (RM) pode ser realizada através da avaliação da morfologia e da composição do tecido de reparo.

O sistema de pontuação MOCART (*Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue*) fornece dados semiquantitativos a partir da análise morfológica do reparo de tecido da cartilagem por imagem de RM e correlaciona-se com as avaliações macroscópica e histológica(23).

O MOCART é um sistema de graduação para o tecido condral e subcondral adjacente. A validade e a confiabilidade deste sistema foram analisadas previamente para a avaliação da qualidade do tecido de reparo da cartilagem após o implante autólogo de condrocitos no joelho(24,25).

A RM também pode ser utilizada para avaliar a composição do tecido formado no tratamento da lesão condral, pois o mapeamento em T2 (Mapa T2) é sensível às alterações da concentração de água e à direção das fibras de

colágeno contidas na cartilagem(26). O Mapa T2 apresenta correlação com a avaliação morfológica por imagem, utilizando o MOCART(27).

A força do campo magnético da RM é relacionada à qualidade da imagem e ao tempo de aquisição. A RM de 7,0T (ultra alto campo) fornece imagens com uma resolução mais alta, com maior relação sinal-ruído e voxels menores, o que permite maior precisão na avaliação do volume, menor efeito de volume parcial e maior contraste nas bordas de tecidos diferentes(28) em um tempo de aquisição mais curto que os campos convencionais de 1,5T e 3,0T(29,30).

A relevância clínica do presente estudo está em avaliar, através de um método de imagem não invasivo (ressonância magnética) em modelo animal de grande porte, uma tecnologia inovadora para o tratamento da lesão da cartilagem, ainda não existente no Brasil. O CET apresenta-se como opção para o tratamento de uma patologia de alta prevalência e impacto na saúde pública.

A hipótese principal do estudo é que o tratamento dos defeitos condrais em animais adultos de grande porte com o CET formado por células mesenquimais apresentará um melhor reparo da cartilagem, observado por avaliação de imagem por RM.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo primário deste estudo é avaliar o reparo da lesão da cartilagem, por ressonância magnética, após 6 meses do implante de composto de engenharia de tecidos (CET) no defeito da cartilagem, em um estudo translacional com animais de grande porte.

O objetivo secundário da pesquisa é realizar avaliação histológica do tratamento e a sua correlação com a avaliação por imagem de ressonância magnética.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Engenharia tecidual

Em 1993, **Langer e Vacanti**(31), descrevem a engenharia tecidual ou bioengenharia de tecidos como um campo multidisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências biológicas no desenvolvimento de substitutos biológicos que buscam a restauração, manutenção ou melhora da função de órgãos e tecidos acometidos por diferentes patologias.

Kuo et al.(32), em 2006, observam que a engenharia de tecidos para cartilagem é criticamente dependente da seleção de células apropriadas, da utilização de arcabouços biocompatíveis e do estímulo de fatores de indução. Os autores relatam o uso de condrócitos, células-tronco pluripotentes e células-tronco mesenquimais (CTM) como estratégia para o reparo de lesões da cartilagem.

O uso de condrócitos autólogos na bioengenharia para cartilagem foi mostrado por **Brittberg et al.**(33) em 1994. Os autores descrevem a primeira técnica para Implante Autólogo de Condrócitos (IAC). **Wood et al.**(34), em 2006, mostram que, para lesões de tamanho limitado, o IAC reduz dor e edema, mas é associado a morbidade no local de coleta dos condrócitos e perióstio.

Kuo et al.(32), em 2006, demonstram que, apesar dos bons resultados funcionais do paciente submetido ao tratamento com o IAC, os condrócitos coletados são expandidos *in vitro* e isso leva a perda do fenótipo. O que,

consequentemente, torna os condrócitos ineficazes para a regeneração da cartilagem hialina.

Células-tronco pluripotentes apresentam capacidade de diferenciação em múltiplos tipos de tecido, como as células-tronco embrionárias (CTE) ou células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi) (12). As CTE são derivadas de embriões na fase de blastocisto e da crista germinal do embrião, o que gera preocupações éticas(35–37). E as CTPi são desenvolvidas a partir da própria pele ou de células sanguíneas do paciente, através de técnica de transdução genética com fatores de transcrição específicos de CTE(12,38).

De acordo com **Toh et al.**(39) (2011) a natureza indiferenciada e a tendência de crescimento irrestrito das CTPi pode levar ao desenvolvimento de tumor, como a formação de teratoma *in vivo*.

Kuo et al.(32) (2006) e **Tuan et al.**(12) (2013) relatam que as células-tronco mesenquimais (CTM) são capazes de se diferenciar em tecido condral, adiposo e ósseo, e mostram potencial promissor para o reparo de lesões da cartilagem. Além disso, não apresentam as preocupações éticas que envolvem o uso de células-tronco embrionárias.

As CTM foram descritas inicialmente por **Friedenstein et al.**(40), em 1968, como células precursoras de fibroblastos capazes de formar colônias e de aderir ao plástico em cultura. E foram chamadas de unidades formadoras de colônia de fibroblastos (*colony forming unit/fibroblast*)(41,42). O termo mesenquimais foi descrito por **Arnold Caplan**(43), em 1991, relacionado a células que, mesmo na fase adulta, mantinham capacidade de proliferação e autorrenovação contínuas, além de se diferenciarem em tecidos de origem mesodérmica (**Figura 1**).

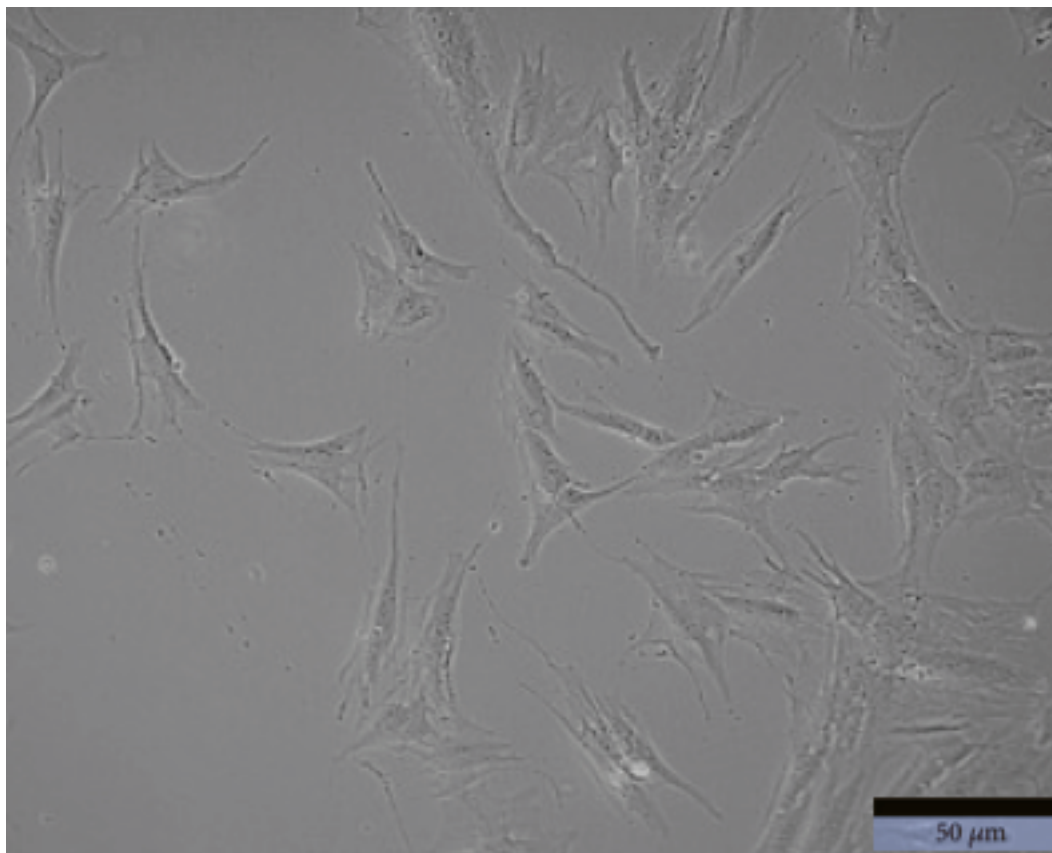


Figura 1 – Células-tronco mesenquimais. Aumento: 10 x (Microscópio Olympus CK40).

Fonte: Adaptada de Fernandes et al.(44) Reprodução autorizada (μm= micrometro)

Em 2005, **Horwitz et al.**(45), recomendaram a designação “células estromais mesenquimais multipotentes”. E **Dominici et al.**(46), em 2006, descreveram os critérios que as células deveriam seguir para serem referidas como mesenquimais multipotentes. Primeiro, as células devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições de cultura padrão. Em segundo lugar, devem expressar os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, em mais de 95% da população, enquanto menos de 2% da população celular pode expressar os marcadores CD45 (marcador leucocitário), CD34 (marcador

de progenitores hematopoiéticos e células endoteliais), CD14 ou CD11b (marcadores de monócitos e macrófagos), CD79a ou CD19 (marcadores de células B) e HLA-DR (marcador de células mesenquimais estimuladas). Terceiro, devem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*.

Caplan(42), em 2017, passou a designar as células-tronco mesenquimais de células sinalizadoras medicinais (*medicinal signaling cells*), e recomendou não utilizar o termo “célula-tronco”, indicando que a principal função dessas células *in vivo* não seria a diferenciação das células em tecido regenerativo ou de substituição, mas sim enviar sinais e estímulos que modificam o ambiente ao redor, funcionando como um remédio que promove atividades medicinais anti-inflamatória e regenerativa.

A partir deste momento, será utilizada a designação células estromais mesenquimais (CEM) em referência às células usadas nesta pesquisa, que são caracterizadas pelos critérios propostos por **Dominici et al.** (46). E será evitado o termo “tronco” em acordo com as orientações de **Arnold Caplan** (42).

Fernandes et al.(44), em 2018, mostraram que as CEM, além de apresentarem capacidade de diferenciação em diferentes linhagens e facilidade de coleta, apresentam habilidade para modular a resposta imunológica e inflamatória através da comunicação parácrina. Além disso, as CEM são imunologicamente privilegiadas, pois apresentam capacidade de coexistência por longo prazo com o hospedeiro e pequena rejeição imunológica devido à baixa expressão superficial dos principais antígenos do complexo de histocompatibilidade, o que as torna uma opção terapêutica atraente(15).

Uma nova estratégia, baseada nos princípios da engenharia tecidual, para o tratamento da lesão da cartilagem sem o uso de arcabouço teve sua eficácia mostrada por **Ando et al.**(18) em 2007. Trata-se de um composto formado de células e sua matriz extracelular, chamado de *Tissue engineered construct* ou Composto de engenharia tecidual (CET). Nessa técnica, as células mesenquimais são cultivadas em placas de 12 poços e formam uma estrutura tridimensional após estímulo mecânico(13).

De acordo com **Ando et al.**(18), o CET é viável no tratamento de lesões condrais de porcos imaturos. A partir da avaliação histológica e macroscópica, o estudo mostra melhora significativa na cobertura do defeito da cartilagem nos animais tratados com CET em relação aos animais em que foi realizado apenas o defeito da cartilagem. O tecido de reparo apresenta características mecânicas típicas da cartilagem nativa.

Em 2008, **Ando et al.**(13) relatam que o CET proveniente de CEM de humanos, testado *in vitro*, apresenta potencial condrogênico necessário para o reparo da cartilagem.

Em 2010, **Shimomura et al.**(19) mostram que a proliferação ou a capacidade de diferenciação em condrócitos das CEM porcinas não são dependentes da maturidade musculoesquelética. O CET derivado de CEM sinoviais promove o reparo da lesão condral em porcos imaturos e maduros sem evidência de reação imunológica. O tecido reparado pelo CET também apresenta propriedades viscoelásticas semelhantes à cartilagem normal, independentemente da maturidade esquelética.

Moriguchi et al.(47), em 2013, pesquisam o uso do CET em reparo da lesão meniscal em modelo suíno e os resultados sugerem que o CET é um

implante promissor para reparar lesões meniscais, apresentando efeito preventivo da degeneração meniscal e condral e do desenvolvimento de osteoartrite pós-traumática.

Em 2015, **Shimomura et al.**(48) mostram a capacidade adesiva do CET. A análise histológica e imuno-histoquímica comprova a adesão do CET de células mesenquimais humanas em cartilagem nativa.

Shimomura et al.(49), em 2018, realizam o primeiro estudo piloto humano com o composto produzido por bioengenharia celular (CET) proveniente de CEM. Através de avaliação por artroscopia, histologia e imagem de ressonância concluem que o CET é uma estratégia sem necessidade de arcabouço (*scaffold-free*), podendo ser utilizada para reparo da cartilagem articular por meio de um procedimento de implantação simples e sem suturas.

3.2 Avaliação clínica da cartilagem articular por ressonância magnética

Lauterbur(50), em 1973, demonstra pela primeira vez a produção de imagens com corte transversal pelo uso da ressonância magnética (RM), sugerindo seu uso para avaliação de objetos com estrutura heterogênea.

Em 1983, **Kean et al.**(51) na Inglaterra e **Moon et al.**(52) nos Estados Unidos, publicam estudos mostrando a capacidade da RM em avaliar diferentes tecidos da articulação do joelho como ligamentos e músculos. Mas não conseguem diferenciar a cartilagem articular de tecidos adjacentes.

Reicher et al.(53), em 1985, demonstram o uso da ressonância magnética para visualizar os tecidos articulares, demonstrando ser possível

distinguir os diferentes tecidos da articulação, como a cartilagem. No mesmo ano, **Baker**(54) chega à mesma conclusão. Porém, descreve a incapacidade de diferenciar os tecidos doentes dos saudáveis.

Em 1986, **Mandelbaum et al.**(55) relatam elevada sensibilidade e especificidade na detecção de lesões traumáticas do joelho, em meniscos e ligamentos cruzados, por RM. Mas ainda não demonstram a acurácia para detecção de lesões condrais.

Wojtys et al.(56), em 1987, mostram que a RM é uma técnica não invasiva adequada para a avaliação de defeitos da cartilagem hialina e sua resposta ao tratamento. Também relatam que a fraca resolução das imagens de RM dificulta a avaliação de pequenas lesões.

Em 1997, **Rübenstein et al.**(57) definem a resolução de 0,39 mm como a necessária para visualizar alterações morfológicas discretas, como fibrilações, da cartilagem articular. Os autores concluem que, nesse momento, as imagens de RM de rotina ainda não revelam com precisão alterações degenerativas precoces da cartilagem articular.

Atualmente, a tecnologia permite chegar aos padrões de resolução de imagem necessários para uma boa avaliação do tecido condral(58). Existem duas formas de avaliar os defeitos ou lesões da cartilagem e o seu reparo, sendo eles pela morfologia ou pela composição do tecido, as quais serão abordadas nos tópicos seguintes.

3.2.1 Morfologia

De acordo com **Crema et al.**(58), diferentes metodologias para aquisição de imagens de RM estão disponíveis. Para a avaliação da morfologia da cartilagem do joelho, as sequências de pulso mais usadas são a Spin Eco (SE), Gradiente Eco (GRE - *gradient recalled echo*) e *Fast Spin Echo* (FSE).

Os achados científicos relacionados à evolução das técnicas de aquisição das imagens de RM para a visualização da cartilagem articular são relatados a seguir.

Em 1984, **Li et al.**(59) mostram, pela primeira vez, o potencial da RM na sequência Spin Eco em avaliar estruturas articulares do joelho.

Em 1987, **Yulish et al.**(60) correlacionam lesões da cartilagem patelar em humanos, diagnosticadas por RM com sequência SE, com os achados da artroscopia e concluem que a ressonância apresenta elevada acurácia para detectar alterações morfológicas como edema, irregularidade da superfície condral e exposição do osso subcondral.

Spritzer et al.(61), em 1988, descrevem que imagens de RM tridimensionais mostram boa correlação com os achados artroscópicos nas lesões mais graves da cartilagem.

Em 1992, **Heron e Calvert**(62) mostram boa correlação entre os achados morfológicos da artroscopia e da imagem de ressonância *three-dimensional gradient recalled echo* (3D-GRE) na cartilagem hialina da patela em humanos. Relatam também que lesões degenerativas na fase inicial são de difícil visualização por RM.

Em 1993, **Vinitiski et al.**(63) concluem que a sequência de RM *Fast Spin Echo* (FSE) apresenta imagem mais nítida da cartilagem que a sequência Spin Eco (SE) convencional, além de reduzir o aparecimento de artefatos por movimentação.

Recht et al.(64), em 1996, demonstram alta resolução de imagem e excelente contraste cartilagem-osso com sequências otimizadas de 3D-GRE.

No mesmo ano, **Disler et al.**(65) concluem que a sequência de RM *Spoiled Gradient Recoiled Echo* (SPGR) com técnica para supressão de gordura permite maior sensibilidade na detecção de lesões da cartilagem hialina que a sequência SE.

Hardy et al.(66), também em 1996, demonstram a sequência 3D-DESS (*three-dimensional double echo steady state*), sendo esta uma otimização da sequência 3D-GRE.

Ruehm et al.(67), em 1998, avaliam a técnica de RM utilizando a sequência tridimensional 3D-DESS. Os autores relatam melhor eficácia diagnóstica em comparação à sequência Spin Eco (SE) para lesões da cartilagem patelar.

Em 2006, **Eckstein et al.**(68) concluem que a RM com sequência DESS permite análise precisa e acurada das lesões da cartilagem na articulação femoropatelar e possibilita avaliação quantitativa do volume e espessura da cartilagem.

Domayer et al.(69), em 2008, relatam que a sequência 3D-DESS fornece alta sensibilidade para análise da morfologia da cartilagem devido ao elevado contraste entre cartilagem e fluido articular. Além disso, a alta resolução permite medições quantitativas em curto tempo de aquisição (**Figura 2**).

Kijowski et al. e Ristow et al. (70,71), em 2009, estudam a aquisição de imagem tridimensional e mostram que a sequência FSE tridimensional (3D-FSE) apresenta melhor sensibilidade que a FSE em duas dimensões na avaliação de lesões da cartilagem.

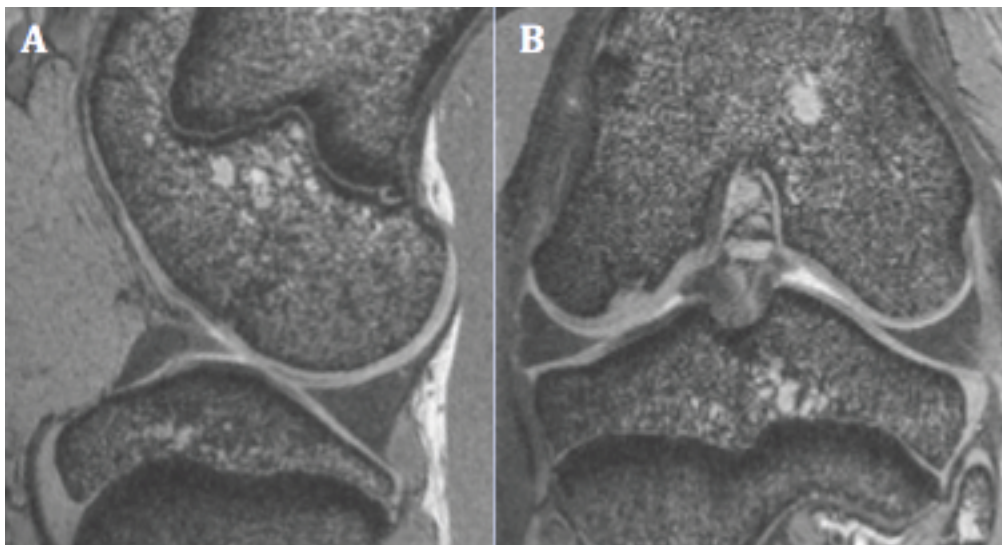


Figura 2 – Imagem de RM em sequência 3D DESS de joelho de porco em miniatura em corte sagital (A) e corte coronal (B)

Em 2011, **Roemer et al.**(72) demonstram que a ressonância com sequência DESS leva a uma maior visualização de lesões internas da cartilagem articular do que a sequência FSE.

MOCART (*Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue*)

O MOCART é um sistema de pontuação criado para possibilitar uma abordagem padronizada, reproduzível e semiquantitativa para avaliação da morfologia do reparo da cartilagem(23). Nesta pesquisa utilizou-se o sistema

MOCART para avaliação de imagem de ressonância tridimensional(73) (**Anexo A**).

Os primeiros sistemas de classificação estrutural de lesões da cartilagem são desenvolvidos para avaliação durante a artroscopia, como a classificação de Noyes e Outerbridge(58,74–76). Alguns autores utilizam modificações desses sistemas para quantificar as avaliações por imagem de RM(75,76).

Na pesquisa clínica, a avaliação morfológica da cartilagem com a RM é realizada utilizando métodos de pontuação semiquantitativos(58,77). Existem sistemas que avaliam alterações estruturais do tecido condral e subcondral adjacente, enquanto outros consideram alterações de todas as estruturas articulares do joelho(77).

Em 2004, **Marlovits et al.**(78) definem as nove variáveis do sistema MOCART (em tradução livre, *observação do tecido de reparo da cartilagem por ressonância magnética*). Esse sistema avalia o reparo condral e a região adjacente, não considerando características de outras estruturas da articulação, como ligamentos e meniscos(77,78).

Trattinig et al.(79), em 2005, introduzem uma pontuação para cada característica avaliada. Assim, é criada uma escala de pontos de 0 a 100, em que 0 indica pior qualidade e 100 melhor qualidade do tecido de reparo.

Em 2009, **Welsch et al.**(73) introduzem uma modificação no sistema para avaliação a partir de imagem de RM tridimensional, sendo chamado agora de MOCART 3D. Três variáveis são introduzidas: “interface óssea”, “osteófito condral”, “edema da medula óssea”.

Em 2014, **Goebel et al.**(23) incorporam uma escala de pontuação relacionada às características do MOCART 3D (**Anexo A**). Tal escala é

baseada na pontuação descrita por **Trattnig et al.**(79) e também vai de 0 a 100, em que 100 significa melhor qualidade do tecido de reparo. Os autores mostram que o sistema de pontuação MOCART 3D compartilha várias categorias semelhantes com sistemas de pontuação para avaliação histológica e concluem que o MOCART 3D apresenta confiabilidade para ser comparado com escores de avaliação histológica.

As variáveis do escore MOCART 3D são descritas abaixo em tradução livre e algumas são mostradas como figura (**Figura 3**):

1. Preenchimento do defeito – *Deffect fill* (0% a 200%): essa variável compara o preenchimento do defeito da cartilagem com a cartilagem nativa. É descrito com 100% quando o tecido de reparo tem o mesmo tamanho da cartilagem adjacente. É menor que 100% em caso de reparo menor, e maior que 100% quando a hipertrofia do reparo é visível;
2. Integração à borda do defeito – *Cartilage interface* (completa ou incompleta): descreve a integração à borda da cartilagem nativa. “Completo” significa que não há espaço entre o tecido de transplante e a cartilagem adjacente. Uma borda demarcada é um defeito pequeno;
3. Integração ao osso subcondral – *Bone interface* (completa ou incompleta): descreve a integração do transplante ao osso subcondral, bem como a integração de um possível retalho periosteal. Uma interface óssea completa implica que não há espaço entre essas estruturas;

4. Superfície do tecido de reparo – *Surface* (intacta ou lesionada): a superfície do transplante fica intacta quando é congruente;
5. Estrutura do tecido de reparo – *Structure* (homogêneo ou heterogêneo): a estrutura é vista como homogênea quando o transplante mostra as camadas típicas da cartilagem sobre todo o tecido reparador. Quando essa estrutura é perdida, o tecido de reparo deve ser declarado como não homogêneo, ou mostra uma formação de fenda;
6. Intensidade de sinal do tecido de reparo – *Signal intensity* (isointenso, levemente hiperintenso, muito hiperintenso): intensidade do sinal do tecido de reparo é classificada como normal quando parece tão intenso quanto a cartilagem nativa adjacente;
7. Osteófito condral – *Chondral osteophytes* (presente ou ausente): os osteófitos condrais podem surgir na região do transplante devido à técnica cirúrgica de diferentes procedimentos de reparo da cartilagem ou sem motivo conhecido. Idealmente, não há formações de osteófitos após o reparo da cartilagem;
8. Integridade da placa subcondral – *Subchondral bone plate* (0% a >75%): percentual da integridade da placa subcondral entre o tecido de reparo e o tecido ósseo, que parece intacta ou irregular;
9. Osso subcondral – *Subarticular spongiosa* (intacta ou com alterações): refere-se a alterações no osso subcondral, como cistos e esclerose;
10. Adesão – adhesions (presente ou ausente);
11. Edema ou derrame articular – *effusion* (presente ou ausente).

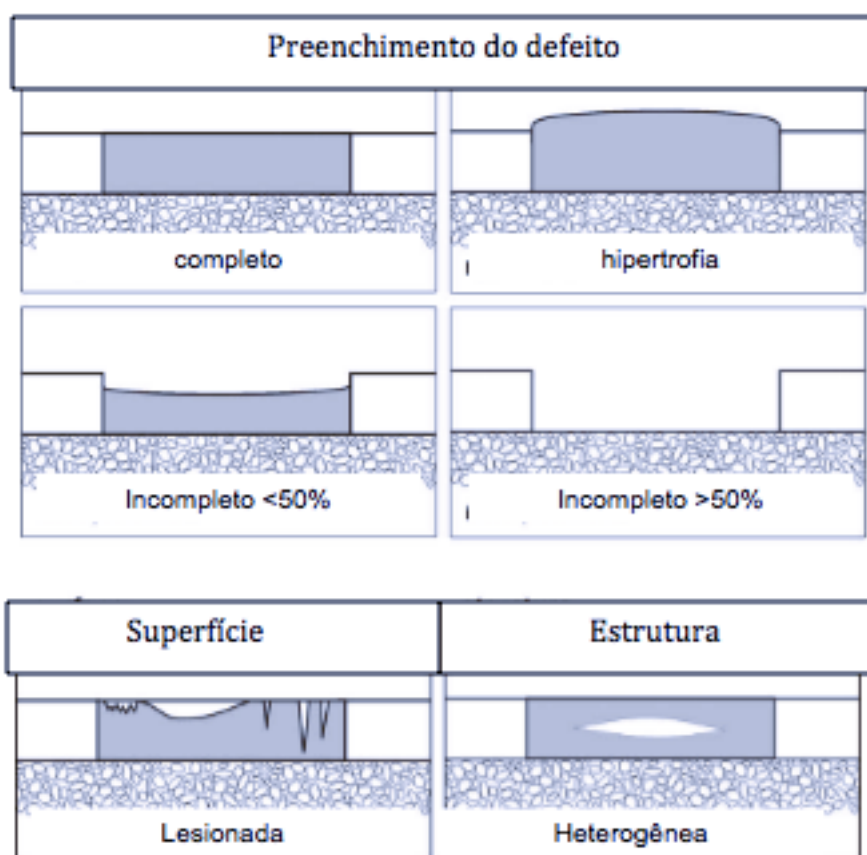


Figura 3 – MOCART 3D. Demonstração esquemática das variáveis: preenchimento do defeito, superfície e estrutura

Fonte: Adaptado de Marlovits et al.(78) (2004)

Vários autores(23,24,27,80,81) descrevem que o sistema MOCART apresenta elevada concordância entre os observadores e é útil na avaliação do tecido de reparo da cartilagem em ensaios clínicos randomizados.

3.2.2 Composição – Mapeamento em T2

A composição da cartilagem consiste em aproximadamente 67% de água na zona profunda a 74% de água na zona superficial, e 25% a 35% de matriz

extracelular sólida (MEC) em nível molecular(26,77). A MEC é composta por uma rede de fibrilas de colágeno e moléculas de proteoglicano, principalmente *aggrecans* que consistem em um núcleo proteico com glicosaminoglicanos (GAG). Os GAGs são carregados negativamente e compõem a maioria da “densidade de carga fixa” da MEC(26,27). A eletroneutralidade é mantida pela presença de cátions, principalmente sódio (Na⁺), e ânions, principalmente cloreto (Cl⁻), entre a cartilagem e o líquido articular. As propriedades biomecânicas da cartilagem se devem, em grande parte, ao fluxo e à distribuição de água na articulação da cartilagem(77,82).

As aquisições de ressonância magnética para avaliação da composição, como “mapeamento em T2” (Mapa T2), são sensíveis a mudanças específicas na composição química e na estrutura da cartilagem mesmo antes que ocorram alterações morfológicas graves. Essa informação pode complementar a avaliação da morfologia pela RM na definição da qualidade biomecânica do tecido de reparo da cartilagem(24,58,77,82) **(Figura 4)**.

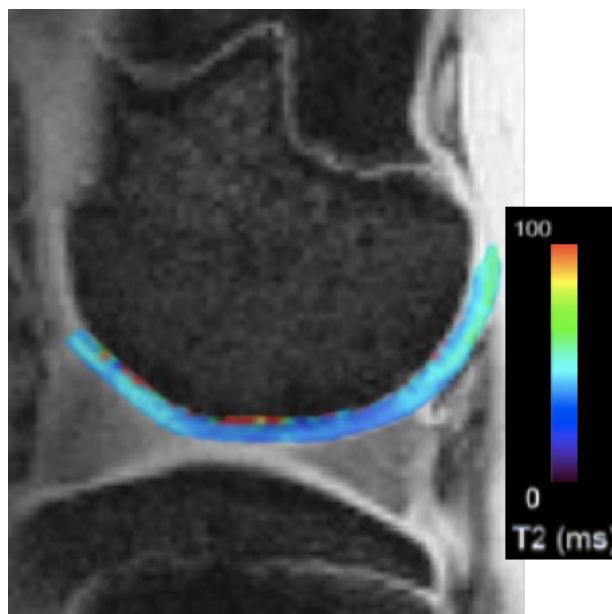


Figura 4 – Imagem de RM em sequência de Spin Eco ponderada em T2 com corte sagital de joelho de porco em miniatura. Mapeamento em T2 da cartilagem articular. A escala de cores indica o tempo de relaxamento em T2 em cada pixel da imagem (ms = milissegundo; T2 = tempo de relaxamento em T2)

A medida dos tempos de relaxamento (TR) em imagem de RM ponderada em T2 reflete alterações na orientação das fibras colágenas e, conseqüentemente, na concentração de água, a qual interage com essas macromoléculas na matriz extracelular da cartilagem articular (26,58,77,82).

Segundo **Trattnig et al.**(83), em 2006, a técnica de mapeamento em T2 pode ser usada para monitoramento *in vivo* das propriedades biomecânicas, alterações patológicas ou envelhecimento de várias camadas de cartilagem.

Em 2006, **White et al.**(84) demonstraram uma diferença do valor médio do T2 entre as regiões superficial e profunda da cartilagem articular, com aumento significativo do valor do T2 na zona superficial em relação à zona profunda.

De acordo com **Welsch et al.**(85), em 2008, o mapa T2 é indicado para monitorar a eficácia do reparo da cartilagem ao longo do tempo, com eventual

sucesso caracterizado pelo surgimento de uma rede de colágeno com forma e organização semelhantes às observadas na cartilagem normal.

Em estudos onde diferentes técnicas de reparo da cartilagem foram avaliadas, o mapeamento em T2 mostrou-se promissor para o monitoramento das alterações na cartilagem(58,77,83,86).

O mapa T2 pode ser implementado com relativa facilidade na maioria dos sistemas de ressonância magnética, já que sequências de pulsos e softwares para gerar o mapeamento em T2 estão disponíveis em pacotes comerciais(24,58,77).

3.2.3 Avaliação com diferentes intensidades de campos magnéticos

De acordo com **Crema et al.**(58) (2011), campos magnéticos variados estão disponíveis para aplicação na prática clínica e na pesquisa clínica com uso de RM. A intensidade de um campo magnético é definida pela sua força em T (Tesla) e é importante entender as vantagens das diferentes intensidades de força para avaliações morfológicas e composicionais da cartilagem.

O campo magnético com baixa intensidade (0,18–0,2 T) é inadequado para avaliação morfológica da cartilagem e não é recomendado para avaliação do reparo da cartilagem(87,88).

Segundo **Welsch et al.**(86) (2008), **Crema et al.**(58) (2011) e **Eckstein et al.**(89) (2016), o padrão mais disponível para avaliação das imagens de cartilagem é de 1,5 T. Essa força de campo é usada, na maioria dos estudos de ressonância magnética, para avaliações morfológicas e composicionais da

cartilagem do joelho. No entanto, os sistemas 3.0 T demonstram resultados promissores para otimizar a imagem morfológica e composicional da cartilagem do joelho.

De acordo com **Kijowski et al.**(70) (2009), o uso de altas forças de campo magnético leva a algumas dificuldades, como ao aumento da suscetibilidade magnética nos tecidos, as imagens tornam-se mais vulneráveis aos artefatos e a gravidade dos efeitos das alterações químicas cresce em relação linear com os aumentos na força do campo magnético.

Atualmente, vários centros possuem capacidade de geração de imagens em campo magnético de 7,0T ou mais, sendo aplicada principalmente em pesquisas(58). A força de campo de 7,0T tem sido utilizada em estudos para a avaliação morfológica e composicional da cartilagem do joelho e apresenta uma resolução mais alta em um tempo de aquisição mais curto(29,30).

Kraft et al.(90), em 2007, **Welsch et al.**(85), em 2008, e **Wang et al.**(91), em 2009, mostram bons resultados ao comparar diferentes sequências de RM em campo 7,0T com campos de menor intensidade. Os autores comprovam maior potencial na detecção de lesões discretas da cartilagem ao utilizar RM com campo de maior intensidade.

3.3 Avaliação da cartilagem articular por histologia – sistema de pontuação ICRS-2

O ICRS-2 (**Anexo B**) é o sistema de pontuação para avaliação histológica usado neste estudo. Tal sistema foi criado para permitir uma avaliação padronizada e semiquantitativa do reparo da cartilagem(92).

Em 1986, **O'Driscoll et al.**(93) desenvolvem o primeiro sistema para a avaliação semiquantitativa do reparo condral. Em seguida, outros métodos são propostos por diferentes autores como **Pineda et al.**(94) (1992), **Wakitani et al.**(95) (1994) e **Sellers et al.**(96) (1997).

Com o desenvolvimento de novas abordagens de tratamento, incluindo terapia celular, a necessidade de medidas objetivas de resultados e avaliação do tecido de reparo tornou-se cada vez mais importante. Em 2003, pesquisadores da *International Cartilage Repair Society* (ICRS), ou Sociedade Internacional para o Reparo da Cartilagem, desenvolvem um sistema de pontuação histológica para avaliar o tecido de reparo condral, baseado em seis variáveis, chamado **ICRS-1**(97).

Em 2010, **Mainil-Varlet et al.**(92) publicam um estudo para validação de um novo escore de pontuação, chamado **ICRS-2**, sendo uma evolução do ICRS-1 e baseado na avaliação de 14 diferentes categorias, as quais recebem pontuação de 0 (pior resultado) a 100 pontos (melhor resultado).

As categorias estão descritas abaixo, em tradução livre:

1. Morfologia do tecido: relacionada ao tipo de tecido observado (cartilagem hialina, fibrocartilagem ou tecido fibroso).
2. Coloração da matriz extracelular: indica o conteúdo de proteoglicanos.
3. Morfologia celular: as células associadas à cartilagem hialina são ovais, e as da fibrocartilagem são mais alongadas e em forma de fuso.
4. Agrupamento dos condrócitos: é considerado uma característica associada à degeneração. No entanto, sua presença em cartilagem imatura pode indicar remodelação do tecido cartilaginoso.

5. Arquitetura da superfície: a superfície lisa é necessária para uma articulação eficiente (pontuação de 100) e sinais de delaminação, ou rupturas são indicativos de reparo deficiente (pontuação 0).
6. Integração basal: integração ao osso subjacente. Sem integração basal (pontuação 0) e integração basal completa ao longo de toda a interface cartilagem-osso (pontuação 100).
7. Formação da *tidemark*: a *tidemark* separa a zona radial inferior da cartilagem da zona subjacente da cartilagem calcificada.
8. Alterações no osso subcondral: um osso subcondral anormal caracterizado por esclerose ou remodelação intensa recebe pontuação 0, enquanto a ausência de qualquer anormalidade é 100.
9. Inflamação: não é observada na cartilagem normal. Sua observação, como a presença de linfócitos, em tecido reparado é considerada uma característica negativa (pontuação 0).
10. Calcificação/ossificação anormal: isso é considerado patológico (pontuação 0). Sua ausência recebe pontuação 100.
11. Vascularização: A ausência de vasos no tecido de reparo recebe pontuação 100.
12. Avaliação da superfície: se estiver intacta com células alongadas e fibras de colágeno paralelas à superfície (pontuação 100).
13. Avaliação da zona média e profunda: na cartilagem hialina, esta zona é rica em proteoglicanos, sem fibras de colágeno detectáveis.
14. Avaliação geral da qualidade do tecido reparado: tecido fibroso (pontuação 0) e cartilagem articular típica (pontuação 100). A fibrocartilagem é graduada na faixa intermediária da escala.

Em 2011, **Hoemann et al.**(98) recomendam diretrizes para padronização da avaliação histológica nos estudos de reparo da cartilagem em modelos animais e ensaios clínicos. Os autores mostraram que o ICRS-2 representa uma melhoria em relação aos sistemas anteriores para classificação do reparo condral em termos de reprodutibilidade do leitor, e indicam o uso deste sistema para avaliação do reparo de cartilagem em pesquisas com animais e humanos.

4. MÉTODOS

4 MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental controlado em animais, com avaliação por ressonância magnética do reparo condral em 28 joelhos (membros posteriores) de 14 porcos em miniatura (BR1), na Plataforma de Imagem na Sala de Autópsia (PISA), na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Os animais eram do sexo feminino em fase adulta e apresentaram peso médio de 28,5kg e desvio-padrão (DP) de 2,6. A idade média dos animais no momento da cirurgia era 11,2 meses, com desvio-padrão de 0,8 (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Variáveis demográficas e valores basais dos animais envolvidos na pesquisa

	Idade	Peso inicial
Média	11,2 meses	28,5 Kg
DP	0,8	2,6

Fonte: dados da pesquisa – IOT HC-FMUSP, dez/2017 a jul/2020

Nota: DP = desvio-padrão; Kg= quilograma

Os procedimentos experimentais e cuidados com os animais foram conduzidos de acordo com a Lei 11794/2008 da Constituição Federal Brasileira, que regulamenta e estabelece “Procedimentos para o Uso Científico de Animais”. Os animais foram mantidos em baias individuais, alimentados duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês, número de aprovação CEUA P 2017-05 (**Anexo C**), e ao Comitê Científico do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, IOT nº 1336 (**Anexo D**).

4.1 Protocolo de coleta de dados

As informações sobre as características, cuidados e procedimentos relacionados aos animais nesta pesquisa foram coletadas seguindo as orientações do *ARRIVE Guidelines Checklist (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, Londres, Reino Unido)*(99) e mantidos em um repositório digital(100) (REDCap, projectredcap.org, Vanderbilt University, Nashville, TN, EUA).

4.2 Coleta e expansão das células-tronco mesenquimais

Utilizamos células estromais mesenquimais (CEM) humanas armazenadas e disponíveis para pesquisa no banco de tecido celular (biobanco) do Centro de Tecnologia Celular Tipo 2 (de acordo com a resolução de diretoria colegiada nº 09, ANVISA) do Hospital Sírio-Libanês, conforme aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital Sírio-Libanês

(São Paulo, Brasil) número 2017-05 e comissão científica do IOT, número 1336.

As CEM no biobanco foram mantidas em tanques de congelamento com temperatura de -196°C . Após descongelamento, o conjunto de células foi diluído em *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F-12; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY), suplementado com 10% Soro Humano (SH *from human male AB plasma*, Sigma-Aldrich, USA), plaqueado em garrafas de cultura de 25 cm^2 e mantido em uma atmosfera umidificada a 5% CO_2 e 37°C (101).

Para a expansão, as CEM foram cultivadas nas garrafas de 25 cm^2 com meio de cultura composto por DMEM/F-12, penicilina e estreptomicina a 100 UI/ml (*Penicillin-Streptomycin*; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) e aminoácidos não essenciais (*MEM Non-Essential Amino Acids Solution*; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) em atmosfera umidificada a 5% de CO_2 e 37°C . A troca do meio foi realizada três vezes por semana. Após atingirem a confluência de 80% era realizada a passagem das células para outras garrafas. Para cada passagem, as células foram lavadas com PBS (Gibco Invitrogen; pH 7.4, Grand Island, NY, USA), coletadas após tratamento com TrypLE™ *Express reagent* (Thermo Fisher Scientific, USA) e novamente plaqueadas nas garrafas. O plaqueamento ocorreu na diluição de 1:3 da primeira subcultura. As passagens celulares continuaram da mesma forma com diluição de 1:3 quando a confluência era atingida.

A cada passagem era observado, através de microscópio óptico (Olympus CK40), se as células mesenquimais mantinham morfologia típica de fibroblastos. Em seguida, era realizada a contagem celular com um citômetro

de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, USA), e os dados eram analisados usando o software Cell Quest (BD Biosciences, USA) (**Figura 5**).

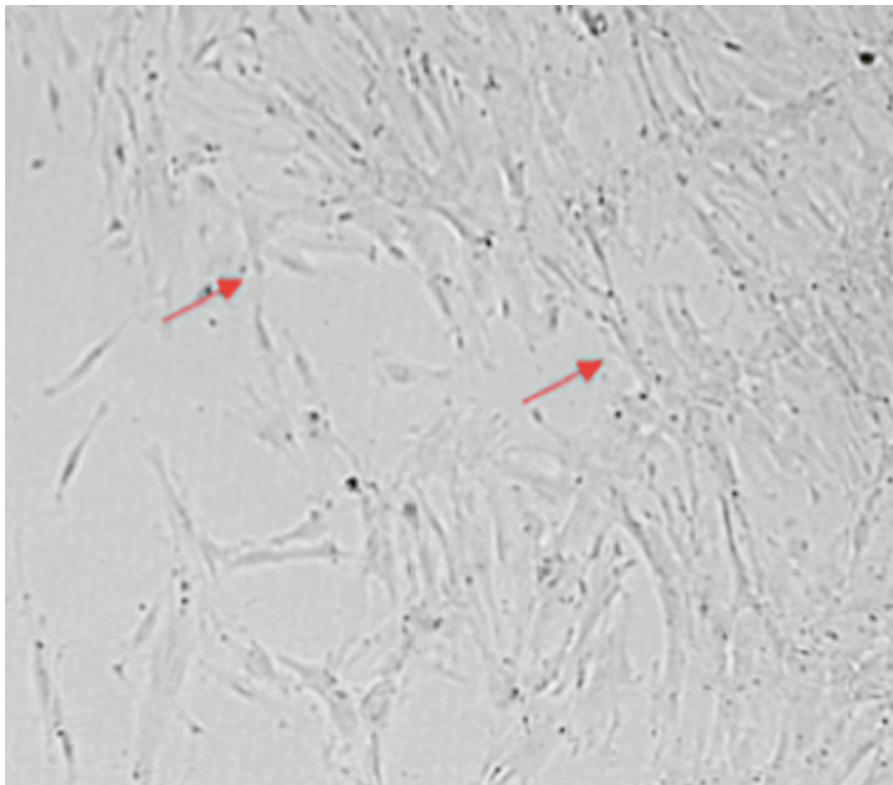


Figura 5 – CEM indicada por setas vermelhas. Visualizado no microscópio óptico 40x (Olympus CK 40)

As células foram cultivadas seguindo as boas práticas em laboratório, de acordo com as diretrizes do órgão regulador nacional (ANVISA, RDC nº 214), vigentes à época, para garantir os padrões de eficácia e segurança nos processos de manejo das células(44). As instalações de laboratório têm inspeções e fornecimento de relatórios regulares, treinamento de pessoal, manutenção de equipamentos de rotina e avaliações de risco e eventos adversos, além de infraestrutura para salas limpas, que inclui controle de fluxo de ar (filtro de ar particulado de alta eficiência) e antecâmaras para

equipamentos de proteção individual. Apenas células humanas podem ser processadas no laboratório. E todos os reagentes, do isolamento celular à criopreservação, são certificados e livres de príons e apirogênicos.

Todas as 14 linhagens previstas de células estromais mesenquimais foram caracterizadas utilizando a citometria de fluxo, seguindo as recomendações da *International Society for Cellular Therapy* (Sociedade Internacional para Terapia Celular) (46).

As células foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais: CD29-PE, CD31-FITC, CD34-FITC, CD44-PE, CD45-PE, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE e CD117-PE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Anticorpos de controle apropriados foram utilizados e as células analisadas pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (*Cell Quest Software*, Becton Dickinson), e mostraram reação positiva aos marcadores de células mesenquimais (CD29, CD73, CD105, CD90, CD166 e CD44) e reação negativa aos marcadores hematopoiéticos (CD34 e CD45) e endoteliais (CD31).

4.3 Desenvolvimento do composto de célula e matriz extracelular feito por engenharia tecidual (CET)

Após duas ou três passagens celulares, a expansão chegou ao número adequado de células para a formação do CET. As células mesenquimais foram coletadas das garrafas e armazenadas em uma placa de cultura com 12 poços a uma densidade de $4,0 \times 10^5$ células por cm^2 e cultivadas com meio de cultura

e 0,2 mmol de L-ácido ascórbico 2-fosfato (Asc-2P; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Depois de aproximadamente 15 dias de cultura, os complexos de células e matriz extracelular sintetizados pelas próprias células apresentaram uma estrutura em forma de camadas. Estes foram destacados dos poços após aplicação de movimentos suaves entre a placa e o substrato celular com o auxílio de uma pipeta. Os complexos destacados, deixados em suspensão, formavam uma estrutura tridimensional a partir da contração ativa do tecido. Isso levou ao desenvolvimento de um corpo esférico de alguns milímetros de espessura. Esse tecido recebeu o nome de CET (composto de células e matriz extracelular feito por engenharia tecidual) (**Figura 6**).

Os complexos foram retirados da placa de 12 poços e agrupados, formando um complexo maior que foi implantado nos defeitos da cartilagem durante a cirurgia.

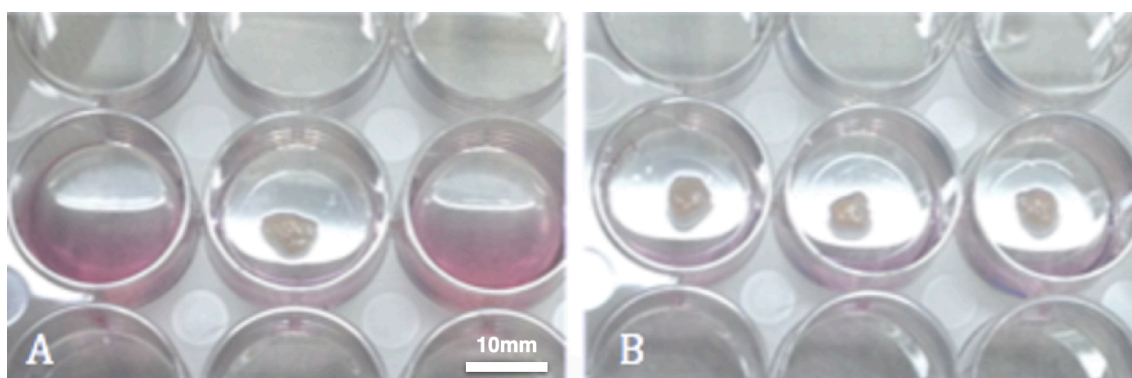


Figura 6 – Secagem do CET após destacamento e drenagem do meio. A: secagem e destacamento apenas de um CET (central) após aplicação de força com auxílio de pipeta. B: secagem e destacamento de 3 CET. (Barra branca = 10 mm)

4.4 Técnica cirúrgica

Antes do procedimento cirúrgico, foram registrados os dados de idade e peso do animal. Em seguida, os animais receberam quetamina e midazolam por via intramuscular. A indução da anestesia geral foi realizada com propofol e a manutenção da anestesia com isoflurano. A morfina foi utilizada para analgesia. Os porcos foram colocados em posição supina por sobre a mesa operatória. Realizou-se a antissepsia e assepsia de ambos os membros posteriores e campos estéreis foram posicionados.

Foi realizada artrotomia medial à patela, com incisão longitudinal de aproximadamente 5 cm de comprimento, nos membros posteriores, seguida de ressecção parcial da gordura infra-patelar para exposição adequada da cartilagem articular do côndilo femoral medial(102) (**Figura 7**).

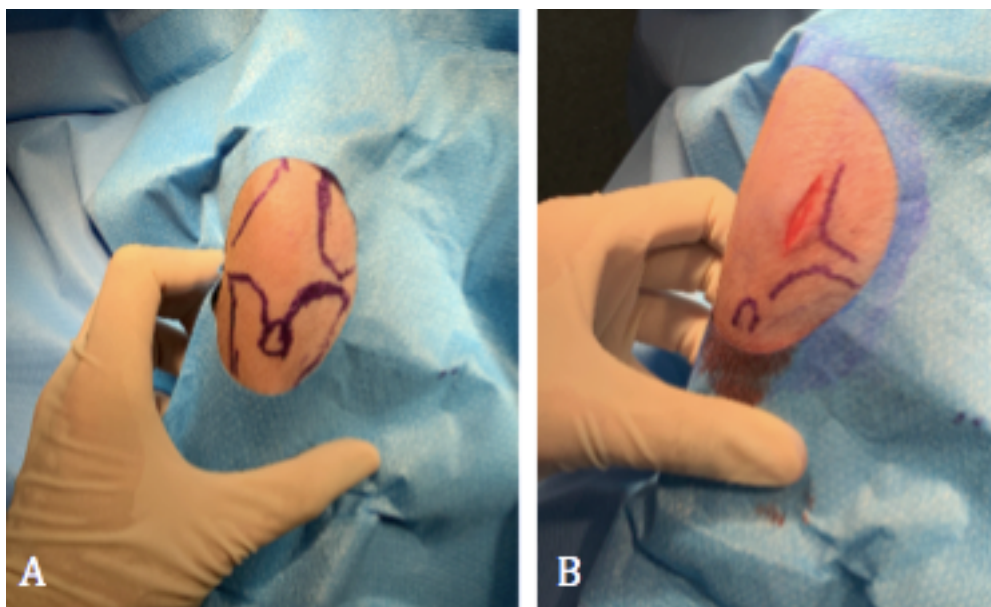


Figura 7 – Joelho do porco em posição supina (A) e início da artrotomia medial (B)

O acesso cirúrgico permitiu a visualização direta de todo o côndilo femoral medial. Um defeito de espessura total da cartilagem, medindo 6 mm de diâmetro, foi realizado na área de carga do côndilo nos dois membros posteriores de cada um dos 14 animais, utilizando um tubo de corte para extração de cilindros de cartilagem (Sistema OATS, Arthrex, Naples, FL, EUA). Em seguida, a camada basal calcificada da cartilagem foi removida com bisturi 15 (**Figura 8**).



Figura 8 – Defeito da cartilagem (6 mm) na área de carga do côndilo femoral medial do membro posterior, após remoção da camada calcificada da cartilagem

Em um dos joelhos de cada animal foi implantado o CET, e no outro joelho o defeito foi deixado sem preenchimento. Após o implante, o composto aderiu firmemente à superfície lesionada sem sutura(18). Não houve a

utilização de membrana ou qualquer outro tipo de arcabouço para a inserção do CET na lesão condral.

A escolha do joelho (esquerdo ou direito) a receber o CET em cada animal foi definida previamente por randomização, e armazenada por pesquisador não envolvido no procedimento cirúrgico e na avaliação posterior à eutanásia. No momento da cirurgia, o cirurgião era informado sobre qual lado receberia o CET.

A randomização foi gerada por programa disponível na página www.randomization.com, e utilizada a distribuição em blocos aleatórios de dois sujeitos, para garantir a distribuição randômica da amostra.

4.5 Cuidado pós-operatório e eutanásia

Os animais foram tratados no pós-operatório com tramadol, meloxicam e metamizol para controle de dor, durante os dois dias que permaneceram nas baias individuais, e cefazolina para a profilaxia de infecção. A descarga de peso e nutrição foram liberadas *ad libitum*.

Os porcos foram capazes de realizar descarga do peso após 12 horas do procedimento, e andaram normalmente após 10 dias.

Aos seis meses do pós-operatório, os animais foram eutanasiados com uma overdose de propofol e cloridrato de potássio. Os membros posteriores foram desarticulados na altura do quadril.

4.6 Avaliação por imagem de ressonância magnética 7-Tesla

4.6.1 Aquisição das imagens

Os membros desarticulados foram preparados para realização da coleta de imagem dos côndilos femorais, minutos após a eutanásia. A ressonância magnética (RM) de 7-Tesla (Magnetom 7 Tesla, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) com uma bobina de cabeça com um canal de transmissão e 32 canais de recepção (Nova Medical, Inc., Wilmington MA, EUA) foi utilizada para adquirir as imagens no espaço físico do Projeto PISA – Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

Foram coletadas imagens de ressonância de ambos os joelhos dos 14 animais, utilizando uma sequência baseada em gradiente eco (GRE) tridimensional, *double echo steady state* (3D-DESS, TR= 12.2 ms TE= 4.1 ms, FA=25°, voxel = 0,4 x 0,4 x 0,4 mm³, FoV 192 x 256 mm, *slice thickness* 0,4 mm, tempo de aquisição 10:52 min) para a avaliação morfológica. E outra do tipo spin eco 2D com multi-eco para avaliação da composição a partir da criação de um mapa T2 (TR = 10000 ms, 18 ecos, TE = 9 / 18 / 27 / 36 / 45 / 54 / 63 / 72 / 81 / 90 / 99 / 108 / 117 / 126 / 135 / 144 / 153 / 162; voxel = 0,6 x 0,6 x 2,0 mm³, FoV 93 x 229 mm, *slice thickness* 2,0 mm, tempo de aquisição 18:44 min).

4.6.2 Avaliação morfológica do reparo da cartilagem

A imagem de RM coletada para avaliação morfológica foi avaliada por um pesquisador, estando este cego em relação ao joelho que recebeu o tratamento e que foi submetido apenas ao defeito condral.

O tecido de reparo da cartilagem articular foi avaliado utilizando o escore de MOCART 3D(23,24) (**Anexo A**). A pontuação desse escore varia de 0 (sem reparo) a 100 pontos (reparo completo do defeito da cartilagem), e utiliza 11 categorias para classificar o reparo da cartilagem, descritas no capítulo revisão da literatura.

Para a pontuação em cada variável foram considerados os achados da imagem de ressonância magnética na sequência 3D-DESS, em cortes das incidências sagital e coronal.

4.6.3 Avaliação da composição do reparo da cartilagem

A avaliação da composição foi realizada a partir das imagens selecionadas de RM, em sequência de spin eco 2D na incidência sagital, submetidas ao mapeamento T2 com o uso do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

Foram selecionados três cortes sagitais consecutivos de cada joelho, em que um corte cobria o maior diâmetro do defeito da cartilagem, e os outros dois cobriam a sua periferia. Em cada corte foram demarcadas duas áreas de interesse (ADI) (69), sendo uma das ADI a região onde foi feito o defeito da

cartilagem (DC) e, a outra ADI, a região coberta por tecido condral intacto na área de carga, com superfície regular e sem alteração de sinal, referida como cartilagem adjacente (CA), a qual apresentava tamanho, formato e direção semelhantes ao tecido em que foi realizado o defeito, conforme mostrado na

Figura 9.

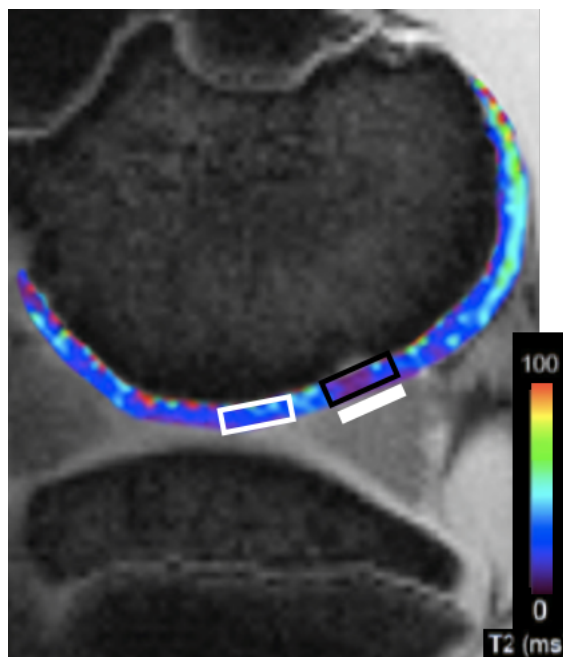


Figura 9 – Imagem de ressonância com corte sagital de joelho de porco e mapeamento T2 da topografia da cartilagem articular, mostrando áreas de interesse demarcadas em um mesmo corte. Retângulo vazado de borda preta: área de defeito da cartilagem. Retângulo vazado de borda branca: área de cartilagem adjacente. (Barra branca = 6 mm)

Após seleção das áreas, foi medido o valor médio do T2 em cada corte consecutivo nas áreas DC e CA de cada joelho (69).

Outra avaliação realizada foi a medida do valor médio do T2 nas zonas profunda e superficial das áreas de interesse, conforme descrito por **White et al.**(84). Para tal análise, as ADI já selecionadas foram igualmente divididas em regiões profunda e superficial, a partir do osso subcondral até o aspecto

superficial. Foi medido o valor médio do T2 em cada região separadamente(86) (Figura 10).

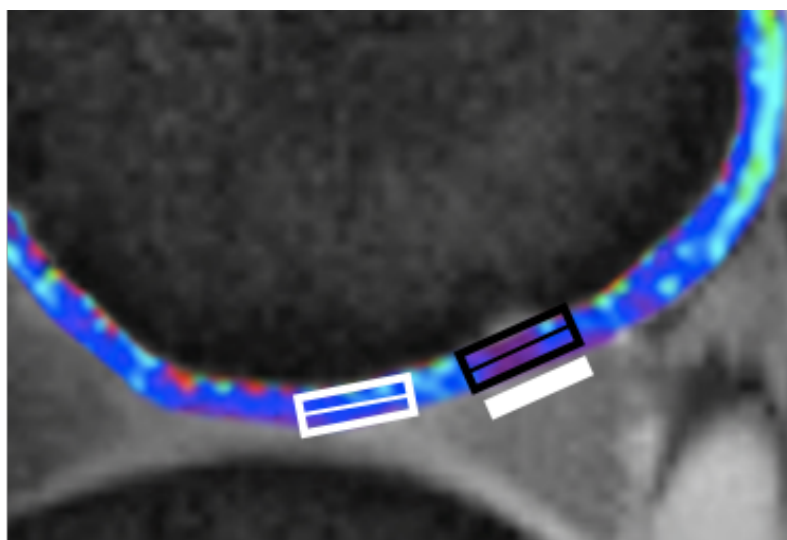


Figura 10 – Ampliação da imagem de ressonância mostrada na figura 9. Destacando a divisão das áreas de interesse em região profunda e superficial. Retângulo vazado de borda preta: área de defeito da cartilagem. Retângulo vazado de borda branca: área de cartilagem adjacente. (Barra branca = 6 mm)

4.6.4 Avaliação histológica do reparo da cartilagem

Após a ressonância magnética, ambos os joelhos foram dissecados e submetidos à avaliação microscópica dos defeitos da cartilagem. O bloco de aproximadamente 1,5 x 1,5 x 1,5 cm ao redor do defeito foi cortado; em seguida, o bloco de tecido foi fixado em paraformaldeído 4%, descalcificado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), processado para avaliação histológica com cortes de 4µm. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Dois cortes de cada animal foram corados com

azul de toluidina, para avaliação do critério coloração da matriz extracelular. Dois observadores cegos para o tratamento avaliaram a qualidade do reparo, utilizando o corte que mostrava o maior diâmetro do defeito.

Os pesquisadores utilizaram o escore de pontuação ICRS-2 para avaliar o tecido de reparo da cartilagem articular (**Anexo B**), e atribuíram uma pontuação para cada uma das 14 categorias avaliadas no sistema, de 0 (pior resultado) a 100 pontos (melhor resultado) (92).

4.7 Análise estatística

O tamanho amostral foi definido de acordo com estudos similares pré-clínicos com animais de grande porte e estudos em humanos, fase I e II, publicados em revistas de alto fator de impacto(102,103).

Os dados demográficos dos animais foram apresentados em forma de tabela. Para descrever as variáveis quantitativas com distribuição normal foram utilizadas medidas de tendência central e dispersão (média e desvio-padrão).

Valores comparados entre dois grupos em tempo único, como a pontuação no sistema MOCART 3D e no escore ICRS-2, foram analisados com teste-t de *student* pareado, pois os joelhos comparados eram dos mesmos porcos, e foram submetidos aos mesmos estímulos externos.

Os valores médios do T2 das áreas de interesse, defeito condral e cartilagem adjacente, foram analisados com teste-t de *student* pareado. Assim como os valores do T2 nas regiões profunda e superficial em cada ADI.

A correlação entre os diferentes escores de pontuação (MOCART e ICRS-2) foi medida com o coeficiente de correlação de Pearson. O Software Sigmaplot (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) foi utilizado nos cálculos estatísticos. O nível de significância estatística adotado foi igual a 5%, isto é, os resultados dos testes foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos

Os dados demográficos foram apresentados no tópico relacionado à metodologia.

O tempo entre a cirurgia e a eutanásia foi, em média, 6,4 meses com desvio-padrão de 0,8. Não houve intercorrências operatórias e pós-operatórias.

5.2 Avaliação por imagem da morfologia da cartilagem (MOCART 3D)

A **Figura 11** mostra as imagens em corte sagital que caracterizam os resultados padrão, melhor e pior de cada grupo na avaliação morfológica da cartilagem.

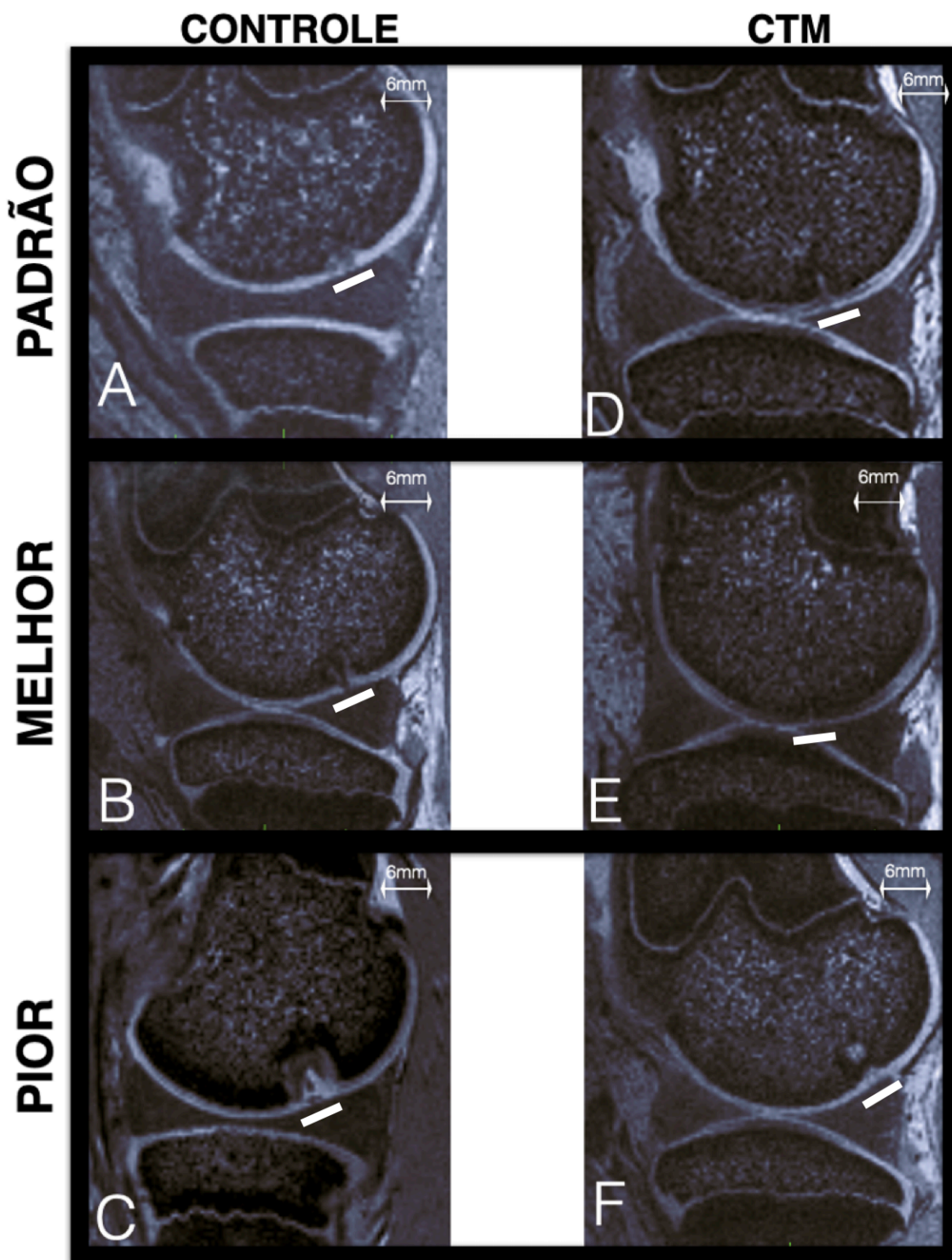
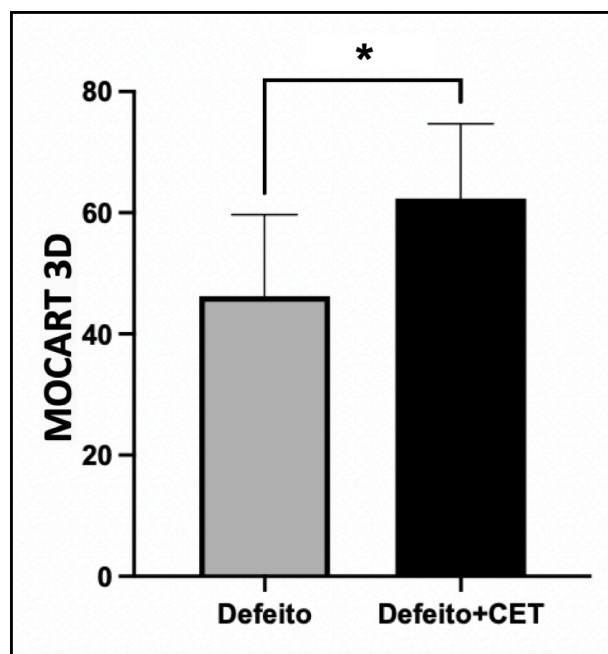


Figura 11 – Avaliação da morfologia da cartilagem articular por imagem de RM 7-T na sequência 3D-DESS em cortes sagitais incluindo o maior diâmetro do defeito condral, 6 meses após a cirurgia. Comparação mostrando o resultado padrão, melhor e pior do grupo controle (A,B,C) e tratamento (D,E,F). (Dupla seta indica o tamanho do defeito da cartilagem criado – 6mm; Barra branca = local do defeito)

A avaliação morfológica do reparo da cartilagem com o sistema de pontuação MOCART 3D mostrou que o reparo da cartilagem nos joelhos submetidos apenas à realização do defeito da cartilagem (Defeito) apresentou um resultado com a média de 46,2, e desvio-padrão de 13,4. Os joelhos submetidos ao tratamento do defeito condral com composto de engenharia tecidual (Defeito + CET) apresentaram um valor médio de 62,3, com desvio-padrão de 12,3. O valor médio do escore MOCART foi significativamente maior no grupo que recebeu o tratamento ($p < 0,001$) (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 – Valores da pontuação da avaliação geral no escore MOCART 3D



Fonte: dados da pesquisa – IOT HC-FMUSP, dez/2017 a jul/2020
Nota: CET = Composto de engenharia tecidual

A avaliação da variável “preenchimento do defeito da cartilagem” (*defect filling*), mostrou que no grupo submetido apenas ao defeito, 10 dos 14 joelhos apresentaram cobertura menor que 75%, enquanto no grupo submetido ao tratamento (Defeito + CET) a maioria dos defeitos teve preenchimento de 75% ou mais. Dos 14 tratados, 9 joelhos tiveram preenchimento maior que 75%, e 2 apresentaram cobertura completa da lesão (100%). Em nenhum animal foi verificado hipertrofia (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Preenchimento do defeito da cartilagem

Volume preenchido (%)	Defeito sem tratamento	Defeito + CET
	N	N
0-25	3	0
25-50	7	1
50-75	1	4
75-100	2	7
100	1	2
>100	0	0

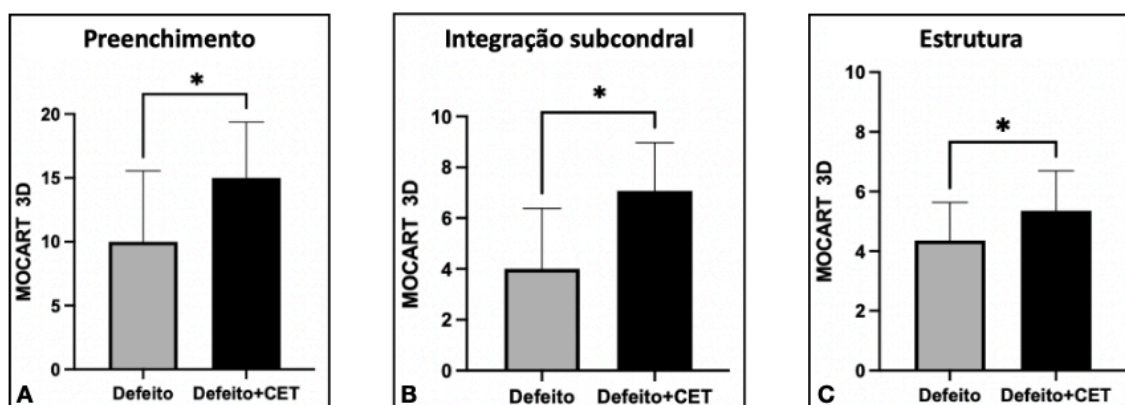
Fonte: dados da pesquisa – IOT HC-FMUSP, dez/2017 a jul/2020

Nota: CET = Composto de engenharia tecidual

O valor da pontuação da variável “preenchimento” varia de 0 a 20, e foi de $10 \pm 5,5$ no grupo Defeito e de $15 \pm 4,3$ no grupo que recebeu o CET (Defeito + CET) ($p < 0,01$). Outras duas variáveis apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os valores médios da variável “integração ao osso subcondral” (*bone interface*) foram significativamente maiores no grupo Defeito + CET ($7,0 \pm 1,9$) que no outro grupo ($4 \pm 2,3$), ($p < 0,001$), assim como o da variável “estrutura do tecido de reparo” (*Structure*) com valor de $4,3 \pm 1,2$ no

grupo submetido apenas ao defeito e $5,3 \pm 1,3$ no grupo que recebeu o CET ($p=0,04$) (**Gráfico 2**). Não houve diferença significativa no valor médio das outras variáveis do escore MOCART 3D entre os grupos.

Gráfico 2 - Valores da pontuação das variáveis Preenchimento (A), Integração ao osso subcondral (B) e Estrutura do tecido de reparo (C) do escore MOCART 3D



Fonte: dados da pesquisa – IOT HC-FMUSP, dez/2017 a jul/2020

Nota: CET = Composto de engenharia tecidual

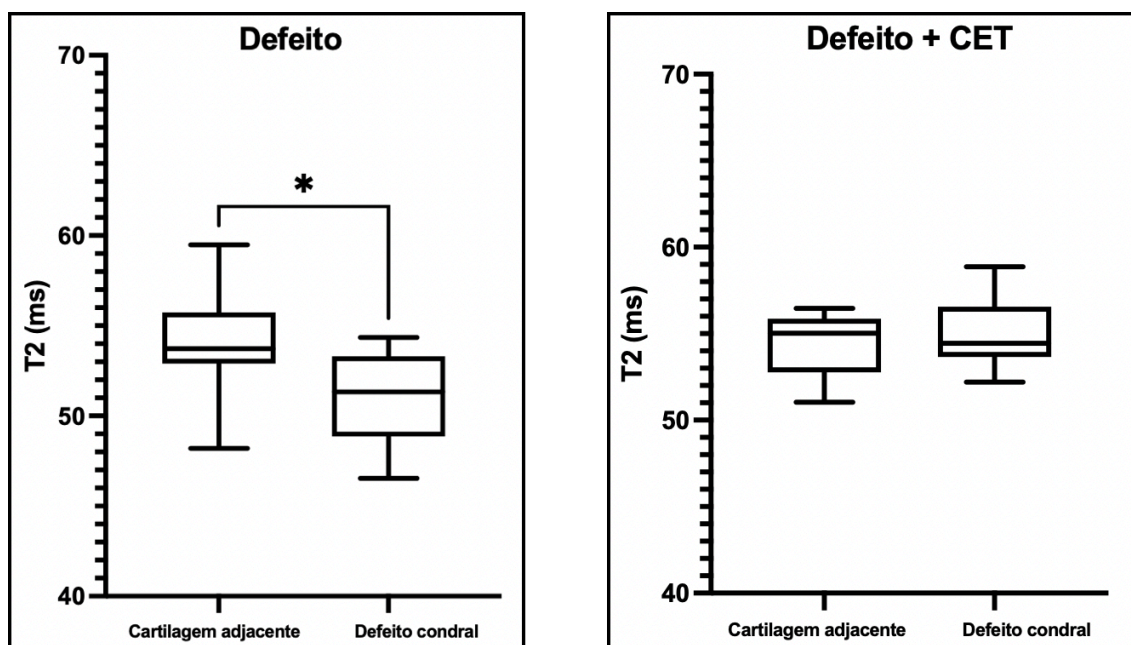
5.3 Avaliação por imagem da composição da cartilagem (Mapeamento em T2)

A avaliação da composição da cartilagem por mapeamento em T2 mostrou que no reparo condral do grupo sem tratamento, apenas submetido ao defeito da cartilagem, a região do defeito da cartilagem (DC) apresentou valor médio do T2 de 50,9 com desvio-padrão de 2,4. Significativamente diferente da cartilagem adjacente saudável, que apresentou valor médio do T2 de 54,4 com desvio-padrão de 1,7 ($p=0,02$). Isso significa que o defeito sem tratamento

apresentou diferença na composição em relação à cartilagem saudável após 6 meses (**Gráfico 3**).

Já os joelhos tratados com o composto de engenharia tecidual (Defeito + CET) não apresentaram diferença na composição em relação à cartilagem adjacente saudável. O valor médio do T2 na área do defeito condral desse grupo foi 53,4 com desvio-padrão de 2,1. E na área da cartilagem adjacente foi de $54,7 \pm 2,2$ ($p=0,7$).

Gráfico 3 – Valores médios do T2 mostram diferença significativa entre as áreas de cartilagem adjacente e defeito condral no grupo submetido apenas ao defeito. Não houve diferença nos valores médios do T2 entre as áreas de interesse no grupo tratado (Defeito + CET), indicando semelhança na composição do tecido de reparo e a cartilagem saudável



Fonte: dados da pesquisa - IOT HC-FMUSP, dez/2017 a jul/2020

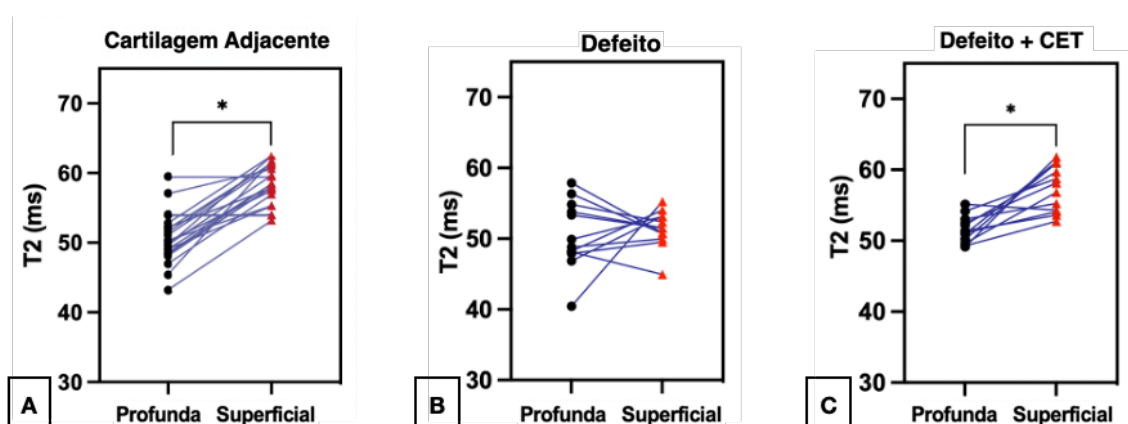
Nota: CET = Composto de engenharia tecidual

Ao medir o valor do T2 por zonas na área da cartilagem adjacente a diferença do valor médio do T2 entre as zonas profunda e superficial mostrou um padrão de aumento significativo do valor do T2 na zona superficial em relação à zona profunda em ambos os grupos. Foi medido o valor médio do T2 das zonas profunda e superficial na área da CA nos 28 joelhos. O valor do T2 na zona profunda da CA teve média de $50,6 \pm 2,9$ e na zona superficial teve média de $59,2 \pm 2,3$ ($p < 0,001$).

No grupo submetido apenas ao defeito não houve aumento significativo do valor do T2 na zona superficial em relação à zona profunda. O valor do T2 na zona profunda do DC no grupo Defeito teve média de $51,4 \pm 4,8$ e na zona superficial teve média de $50,5 \pm 2,6$ ($p = 0,5$). A variação dos valores médios do T2 por zonas na área de interesse Defeito Condral, em ambos os grupos, e da Cartilagem Adjacente está mostrada no **Gráfico 4**.

O mesmo padrão de aumento do valor médio do T2 da região profunda à região superficial, encontrado na cartilagem adjacente saudável, foi verificado na área submetida ao defeito condral e que recebeu o CET. O valor do T2 na zona profunda do defeito condral (DC) no grupo Defeito + CET teve média de $51,5 \pm 1,9$ e na zona superficial teve média de $57,2 \pm 3,2$ ($p < 0,001$).

Gráfico 4 – Valores médios do T2 calculados na zona profunda (pontos pretos) e superficial (triângulos vermelhos), ligados por uma reta, da cartilagem adjacente saudável (esquerda) e nas regiões submetidas ao defeito em cada joelho. A variação do T2 por zona mostra aumento significativo do valor médio na zona superficial em relação à zona profunda na cartilagem adjacente (A) e no grupo Defeito + CET (C). Não houve diferença na média dos valores do T2 entre as zonas no grupo Defeito (B)



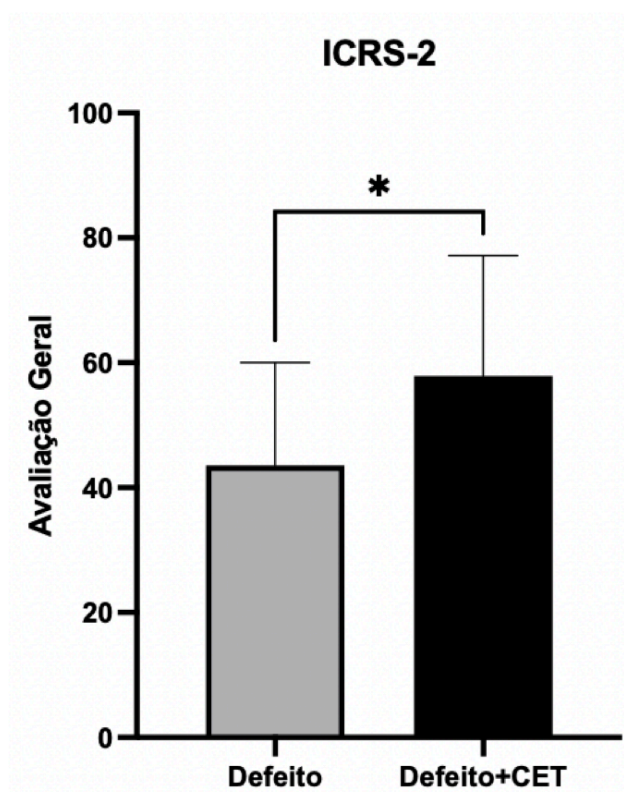
Fonte: dados da pesquisa - IOT HC-FMUSP, dez/2017 a jul/2020

Nota: CET = Composto de engenharia tecidual

5.4 Avaliação histológica (ICRS-2)

A avaliação histológica do reparo da cartilagem com o sistema de pontuação ICRS-2 a partir da variável “Avaliação Geral” mostrou que o reparo da cartilagem no grupo submetido apenas à realização do defeito da cartilagem apresentou um resultado com a média de 43,5 e desvio-padrão de 4,3. Os joelhos submetidos ao tratamento com o CET apresentaram um valor médio de 57,8 com desvio-padrão de 5,1 ($p < 0,05$). O valor médio do escore ICRS-2 foi significativamente maior no grupo que recebeu o tratamento (**Gráfico 5**).

Gráfico 5 – Valor médio da Avaliação Geral do reparo da cartilagem pelo escore histológico ICRS-2

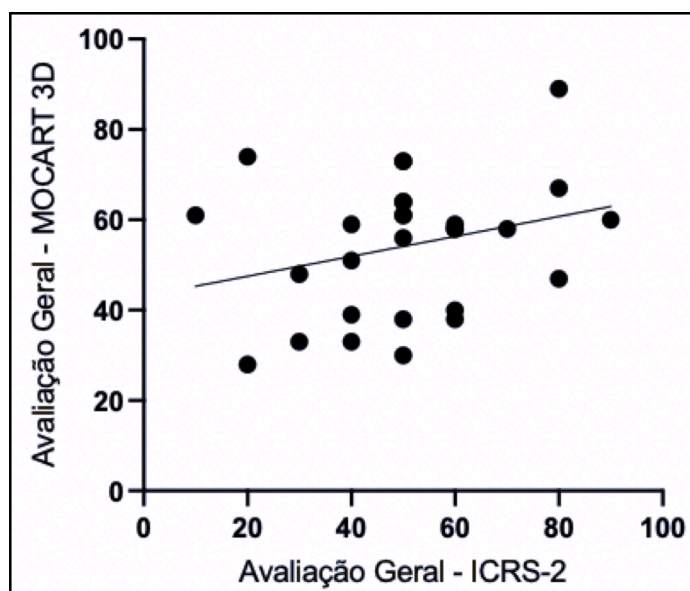


Fonte: dados da pesquisa - IOT HC-FMUSP, dez/2017 a jul/2020
Nota: CET = Composto de engenharia tecidual

Ao avaliar separadamente as outras 13 variáveis, foi encontrada diferença significativa entre os grupos apenas na variável Arquitetura da superfície (*Surface architecture*), que avalia a superfície do reparo. O valor médio da pontuação da variável Arquitetura da Superfície foi de $39,2 \pm 21,5$ no grupo Defeito e valor médio de $59,2 \pm 23,9$ no grupo Defeito + CET ($p=0,03$). Não houve diferença significativa no valor médio das outras variáveis do escore ICRS-2 entre os grupos.

Os resultados da avaliação geral do escore histológico ICRS-2 e do escore de avaliação morfológica por ressonância magnética MOCART 3D mostraram uma fraca correlação positiva, sem significância. O valor do coeficiente de Pearson foi 0,27 ($p=0,15$) (**Gráfico 6**).

Gráfico 6 – Correlação da pontuação da Avaliação Geral do reparo da cartilagem entre os escores MOCART e ICRS-2



Fonte: dados da pesquisa - IOT HC-FMUSP, dez/2017 a jul/2020

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A relevância clínica do presente estudo está em avaliar, através de método de imagem não invasivo (ressonância magnética) em modelo animal de grande porte, o reparo da cartilagem articular por uma tecnologia inovadora no Brasil, baseada nos princípios da engenharia tecidual. Além disso, a avaliação histológica permitiu estimar as características intrínsecas do novo tecido formado.

A engenharia tecidual, descrita em 1993 por **Langer e Vacanti**(31), aplica os princípios das ciências biológicas com a engenharia no desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar, conservar ou melhorar a função de órgãos e tecidos acometidos por diferentes patologias. A engenharia tecidual para cartilagem é criticamente dependente da seleção de células apropriadas, da utilização de arcabouços biocompatíveis e do estímulo de fatores de indução(32). O presente estudo avaliou uma estratégia de bioengenharia que utiliza células estromais mesenquimais (CEM), responsáveis pela produção do próprio arcabouço após os estímulos de alguns fatores, como o ácido ascórbico.

As CEM mostram-se adequadas para a estratégia de reparo da cartilagem ao apresentarem capacidade de diferenciação em diversas linhagens, facilidade de coleta e capacidade de manter as propriedades necessárias para a terapia celular após criopreservação, como mostrado por **Pinheiro et al.**(101), podendo assim ser conservadas em biobancos(46,101,104,105). Além disso, as CEM possuem habilidade para modular a resposta imunológica e inflamatória através da comunicação

parácrina. E são imunologicamente privilegiadas, pois apresentam capacidade de coexistência por longo prazo com o hospedeiro e pequena rejeição imunológica, devido à baixa expressão superficial dos principais antígenos do complexo principal de histocompatibilidade, de acordo com **Marti et al.**(106) e **Fernandes et al.** (15).

Os materiais usados como arcabouço devem ser biodegradáveis, não citotóxicos, mecanicamente competentes (semelhantes ao tecido circundante), capazes de regular a atividade celular e ter capacidade de serem moldados em diferentes tamanhos e formas(12). Diferentes tipos de arcabouços já foram aprovados para uso clínico por instituições governamentais reguladoras em diferentes países(107). No entanto, ainda existem problemas associados à segurança e eficácia a longo prazo desses materiais. De acordo com **Kuo et al.**(12), polímeros sintéticos, por exemplo, podem ter problemas potenciais com relação à degradação *in situ*.

Algumas técnicas de reparo da cartilagem por terapia celular sem o uso de arcabouço já foram testadas anteriormente em animais. Em 2012, **Ebihara et al.**(108) cultivaram condrócitos em camadas em poços de cultura celular. Tal estratégia seria potencialmente um bom sistema de entrega de células. No entanto, as células entregues não contêm uma matriz extracelular e a disponibilidade de um número limitado de células pode tornar difícil a cobertura efetiva de um grande defeito condral.

Nesta pesquisa, o CET foi preparado de acordo com a técnica descrita inicialmente por **Ando et al.**(18), em 2007. Na ocasião, os pesquisadores da Universidade de Osaka (Japão) mostraram a eficácia do CET no tratamento de

lesões da cartilagem em porcos em miniatura através da avaliação macroscópica, histológica e mecânica(18).

O CET não necessita de implantes para a fixação do enxerto, como suturas, pinos absorvíveis ou cola de fibrina(48). A adesividade do CET é uma propriedade que permite a integração segura do enxerto no local do tratamento. A capacidade de adesão do CET formado por células estromais mesenquimais porcinas foi mostrada por **Ando et al.** através de avaliação histológica(18). Em 2015, **Shimomura et al.**(48) mostraram que o CET com CEM humanas também apresentou aderência adequada, 5 minutos após ser colocado na lesão condral.

O uso do ácido ascórbico (Asc-2P) é um fator importante na preparação do CET. O Asc-2P aumenta significativamente a produção da matriz extracelular e a síntese de colágeno, proporcionando modificações morfológicas sem que haja a diferenciação das células em condrócitos (48,109). De acordo com **Pedroni et al.**(109), o uso do Asc-2P está associado também à longevidade celular, por aumentar a expressão de genes relacionados à atividade da telomerase. Além disso, o ácido ascórbico tem a capacidade de inibir a apoptose das CEM, mostrado por **Theruvath et al.**(110).

Recentemente, **Shimomura et al.**(49) (2018), deram um passo à frente e realizaram o primeiro estudo piloto em humanos com o composto de engenharia tecidual proveniente de CEM humanas. Através de avaliação por artroscopia, histologia e imagem de ressonância, concluíram que o CET poderia ser utilizado para o reparo da cartilagem articular, por meio de um

procedimento de implantação simples e sem suturas.

Referente ao modelo animal utilizado, o porco em miniatura brasileiro (BR1) apresentou-se como um modelo pré-clínico em animal de grande porte adequado para estudos envolvendo o uso de células mesenquimais humanas. Em 2015, **Fernandes et al.**(111) utilizaram o mesmo modelo animal para avaliar o reparo condral com células mesenquimais. E, assim como nesta pesquisa, os autores não observaram intercorrências durante a cirurgia ou no período pós-operatório. **Li et al.**(112), mostraram que o reparo condral em quatro porcos em miniatura, feito por CEM humanas com um arcabouço de policaprolactona, foi melhor que o reparo realizado pelo arcabouço com condrócitos, não ocorrendo reação imunológica no animal hospedeiro ao receber células humanas.

De acordo com **Mariano et al.** (113) e **Stramandinoli-Zanicotti et al.** (22), o BR1 apresenta maturidade sexual entre os 5 e 7 meses de idade. Seu peso aos 12 meses varia de 30 kg a 40 kg. O joelho dos porcos apresenta semelhança com relação à anatomia e à fisiologia dos humanos. Além disso, o BR1 também compartilha semelhanças com os humanos em termos de contagem de plaquetas, parâmetros de coagulação, taxa metabólica, estrutura óssea e características das células mesenquimais.

O tempo necessário para avaliar o reparo condral de forma adequada é importante tema de discussão. No presente estudo foram seguidas as recomendações da Sociedade Internacional para o Reparo da Cartilagem (*International cartilage repair society*) (ICRS), apresentadas por **Hoemann et al.** (98), recomendando que as avaliações histológicas nos estudos para reparo

condral em animais sejam feitas após 6 meses do tratamento, enquanto o recomendado em humanos é de um período mínimo de 12 meses.

O uso de tecnologias não invasivas como a imagem de ressonância magnética para avaliar a qualidade do tratamento da cartilagem hialina é de vital importância, pois essa técnica pode ser realizada em humanos e os resultados em estudo com modelo animal podem ser translacionados em futuros estudos clínicos. O reparo da lesão de cartilagem com uso do CET de células mesenquimais humanas foi avaliado através do MOCART 3D no estudo piloto publicado por **Shimomura et al.**(49) em 2018. Cinco pacientes que apresentavam lesões condrais de 1,5 cm² a 3 cm² receberam o CET. Não houve grupo controle. Após 2 anos, os pacientes apresentaram valor médio do MOCART de 92,0 ± 9,1, e nota máxima nas variáveis Preenchimento e Integração. O presente estudo, de forma semelhante, mostrou melhor resultado no grupo tratado com CEM. Porém, com valor médio do escore MOCART menor, de 62,3. Isso pode ser relacionado ao tempo de avaliação, sendo de 2 anos no estudo de Shimomura et al. em comparação com 6 meses de evolução no presente estudo com animais. Houve no estudo piloto de Shimomura et al. um tempo maior para a formação de um tecido condral com melhores características morfológicas. Os autores relataram, inclusive, um aumento do valor médio do MOCART entre o período de 6 meses e 2 anos(49).

A pesquisa de **Yamasaki et al.**(114), em 2019, avaliou também uma estratégia de engenharia tecidual sem necessidade de arcabouço para o reparo condral em 6 porcos, através da pontuação MOCART 2D. Os animais receberam o composto de CEM, formado por bioimpressora tridimensional, em

um dos joelhos, enquanto o outro foi submetido apenas ao defeito condral. Assim como no presente estudo, o uso das CEM apresentou melhor resultado para o escore MOCART. O reparo de 6 meses após o implante mostrou uma pontuação de 45,8 no grupo implantado e 20,0 no grupo controle, com diferença estatística.

Murata et al.(115), em 2020, também avaliaram uma técnica para o reparo condral com uso de CEM sem necessidade de arcabouço em coelhos, após 3 meses do implante. Os autores mostraram que o composto de CEM formado por bioimpressora apresentou pontuação do MOCART 2D maior nos defeitos implantados do que nos controles, submetidos apenas ao defeito condral. Porém, diferente do resultado encontrado nesta pesquisa, não houve diferença significativa na avaliação por imagem. O curto período de 3 meses entre a cirurgia e a avaliação da imagem é um fator que pode explicar o resultado. O estudo de **Theruvath et. al**(110), avaliou o reparo condral em porcos em miniatura realizado por uma estratégia de engenharia tecidual que usou CEM tratadas com ácido ascórbico e marcadas com nanopartículas de ferro, através do escore MOCART 2D. Os resultados mostraram que a pontuação MOCART, após 12 semanas do implante das CEM, foi maior de forma significativa no grupo tratado, em relação ao grupo que sofreu apenas o defeito condral.

Goebel et al.(23) mostraram que os escores MOCART 2D, usado por **Yamasaki et al.**(114), **Murata et al.**(115) e **Theruvath et. al**(110), e o MOCART 3D, usado no presente estudo e no de **Shimomura et al.**(49), têm forte correlação positiva. Porém, o MOCART 3D fornece uma pontuação, em

média, 16 pontos maior que o MOCART 2D. Dessa forma, a correlação é positiva, mas o viés em termos de diferença média de pontuação deve ser lembrado ao comparar o sistema 2D com o 3D(23).

A ressonância magnética é sensível a mudanças específicas na composição química e na estrutura da cartilagem mesmo antes que ocorram alterações morfológicas graves (24,58,77,82). A medida dos tempos de relaxamento (TR) em T2 na cartilagem articular pode ser representada por escala em cores ou cinza e, de acordo com **Rodrigues et al.**(74), reflete alterações na orientação das fibras colágenas e da concentração de água, a qual interage com essas macromoléculas na matriz extracelular.

Este estudo mostrou que o valor médio do T2 entre o tecido formado no defeito da cartilagem não teve diferença significativa ao encontrado na cartilagem adjacente saudável. Isto sugere uma semelhança na composição do tecido de reparo e da cartilagem saudável após 6 meses de tratamento. O estudo de **Theruvath et. al**(110) obteve resultados semelhantes ao comparar o valor do T2 nos defeitos condrais tratados com CEM preparadas com ácido ascórbico ao valor do T2 da cartilagem saudável após 12 semanas de tratamento. Os autores demonstraram que nos defeitos sem tratamento o valor médio do T2 era significativamente diferente da cartilagem saudável. O mesmo estudo utilizou a medida do valor do T2 para mostrar que as CEM com Asc-2P inibiram o estímulo de apoptose pela mitomicina, conforme discutido anteriormente (110).

Shimomura et al.(49) mostraram resultados semelhantes aos do presente trabalho, ao medir o valor médio do T2, 24 semanas após o tratamento, na região do defeito condral e da cartilagem saudável. Os mesmos

autores mediram o valor do T2 na 6ª semana após cirurgia, e verificaram que nesse momento os valores da região do defeito condral e da cartilagem saudável apresentavam diferença significativa. Também verificaram redução do valor médio do T2 da 6ª para a 24ª semana na região do defeito condral, e concluíram que a medida do valor do T2 em diferentes períodos pode indicar a maturação do tecido de reparo com o tempo.

A variação medida do valor do T2 nas regiões profunda e superficial da cartilagem refletem a variação da sua composição nessas diferentes regiões, de acordo com **White et al.**(84). Os autores mostraram, em modelo animal equino, que os valores médios do T2 da região condral superficial eram significativamente maiores que os da região profunda. O mesmo padrão foi percebido quando medimos o T2 nas regiões profunda e superficial da cartilagem saudável e defeito condral submetido ao tratamento com o CET no nosso estudo. **White et al.**(84) sugeriram que o valor elevado do T2 na região superficial está relacionado à maior concentração de água. No estudo piloto de **Shimomura et al.**(49) não foi encontrada diferença significativa ao calcular os valores do T2 nas diferentes zonas, mesmo após 2 anos de tratamento. Os autores mostram que, em um dos casos, a diferença da composição do tecido nas regiões profunda e superficial foi percebida na avaliação histológica, mas não foi detectada na medida do valor do T2 por zonas.

Outros autores, como **Welsch et al.** (85,116), **Schreiner et al.**(117) e **Shiomi et al.** (118), também utilizam a medida do valor médio do T2 por zonas superficial e profunda para avaliação do reparo condral, pois esta pode fornecer informações adicionais sobre o tecido de reparo da cartilagem em comparação com a avaliação da espessura total(77,116,119).

A análise da histologia pode ajudar a interpretar os achados da avaliação por imagem da cartilagem. E o uso de um escore para avaliação histológica pode facilitar a comparação dos resultados de diferentes estudos.

A avaliação histológica do CET em animais foi realizada pela primeira vez por **Ando et al.**(18), em 2007. Os autores compararam o reparo realizado pelo CET implantado em defeitos condrais no côndilo femoral medial de porcos, após 6 meses de cirurgia, com o grupo submetido apenas ao defeito, usando o escore ICRS-1. De forma semelhante ao presente estudo, a pontuação histológica do reparo no grupo da intervenção foi significativamente melhor que a do grupo não tratado. **Shimomura et al.**(49) realizaram a avaliação histológica do reparo da cartilagem de 5 pacientes, através de biópsia na 48ª semana após o tratamento com o CET, e utilizaram a pontuação ICRS-2, como neste estudo. Não houve comparação com outro grupo, e o reparo que recebeu o tratamento apresentou o valor médio de 80 ± 11 na avaliação geral do escore. Essa pontuação é maior que a encontrada nesta pesquisa, e a diferença pode ser relacionada ao tempo do tratamento de 48 semanas após a cirurgia, enquanto o reparo no presente estudo foi avaliado em torno de 6 meses (26 semanas) após a cirurgia.

Gardner et al.(120) (2019) também utilizaram a pontuação do ICRS-2 para avaliar o tratamento do defeito condral criado em joelhos de ratos a partir de um composto celular tridimensional formado por células-tronco embrionárias, entre 6 e 12 semanas após o implante. Os autores mostraram que o grupo tratado não apresentou diferença significativa do grupo controle na semana 6. Mas, na semana 12, foi mostrada melhora significativa no grupo que recebeu as células embrionárias. O estudo de **Fisher et al.**(121) avaliou o

tratamento de lesões condrais em 6 porcos em miniatura com um arcabouço de hidrogel de ácido hialurônico apenas, ou adicionado de células estromais mesenquimais, TGF- β 3, e ambos. Os autores compararam, 6 semanas após a cirurgia, o reparo das quatro estratégias de tratamento com a cartilagem saudável pelo escore do ICRS-2. Os autores concluíram que as quatro estratégias não formaram cartilagem com a mesma qualidade da cartilagem saudável em 6 semanas. E os quatro grupos de tratamento não apresentaram diferença estatística ao serem comparados.

Li et al.(112) compararam o reparo condral em porcos em miniatura realizado por um arcabouço de policaprolactona, arcabouço com CEM de humanos, ou arcabouço com condrócitos dos animais, após realizarem um defeito condral de 7 mm de diâmetro. A avaliação histológica com o escore ICRS-1 foi realizada 6 meses após a cirurgia e mostrou que os arcabouços com CEM levaram ao reparo mais completo dos defeitos.

Os escores de avaliação por imagem de ressonância e de avaliação histológica utilizam categorias semelhantes. E o estudo de **Goebel et al.** (23), em 2014, mostrou que a pontuação dos escores MOCART 2D e 3D se correlacionam positivamente com os escores de avaliação histológica, como o de Sellers e Wakitani, principalmente quando são comparadas categorias similares, como a avaliação geral. O presente estudo mostrou uma correlação positiva, mas sem significância estatística, nas categorias de avaliação geral dos escores MOCART 3D e ICRS-2. O estudo piloto de **Shimomura et al.**(49) mostrou a melhora do reparo condral com o CET através do escore MOCART 3D e do escore ICRS-2, e os resultados foram significantes em ambos os escores, como neste estudo. Porém, os autores não analisaram

estatisticamente a correlação entre os resultados. De forma similar, o estudo de **Adachi et al.**(122) avaliou o reparo condral com uma estratégia de bioengenharia em humanos e mostrou resultados com melhora significativa nos escores MOCART 3D e ICRS-2 após mais de 5 anos de seguimento.

Outros estudos avaliaram o reparo condral com escores de forma similar aos desta pesquisa, e encontraram significância estatística na correlação entre pontuação por imagem e por histologia. Em 2018, **Abbas et al.**(123) avaliaram o reparo condral, através do MOCART e ICRS-2, em coelhos que receberam CEM adicionadas a um arcabouço de ácido hialurônico, ou à cartilagem macerada, ou a ambos. E compararam os três grupos de tratamento com o que foi submetido apenas ao defeito condral. Os três grupos que receberam tratamento tiveram melhores resultados que o do defeito. O grupo com CEM, arcabouço e cartilagem macerada obteve as melhores pontuações, com média de 76,25 no MOCART e 75 no ICRS-2. Os autores relataram haver correlação entre o escore MOCART e o ICRS-2. **McCarthy et al.**(124) também correlacionaram os achados do MOCART após reparo condral com a avaliação histológica ICRS-2. Os autores avaliaram o reparo através do implante de condrocitos em humanos, e os resultados mostraram que os valores do MOCART em 1 ano após a cirurgia tinham correlação positiva com a avaliação clínica no mesmo momento. Além disso, a pontuação pelo escore ICRS-2 da biópsia do reparo, realizada em até 17 anos após a cirurgia, apresentou correlação positiva com o MOCART feito anteriormente. Os autores concluíram que a pontuação pela avaliação por imagem poderia ser usada para prever resultados clínicos de longo prazo.

Como uma das limitações deste estudo podemos citar a ausência de modelos animais do sexo masculino. Optamos por utilizar animais fêmeas no início do projeto de pesquisa como parte da estratégia para caracterizar a presença de células doadoras. Porém, indicar a origem das células formadoras do reparo não foi o escopo desta pesquisa. O presente estudo buscou mostrar a eficácia do CET para o reparo condral, e como discutido, as CEM apresentam capacidade de imunomodulação(15) e enviam sinais que modificam o ambiente ao redor e podem estimular as células hospedeiras no reparo tecidual(42).

Outra limitação é a ausência de um protocolo de avaliação do reparo condral por ressonância magnética. Ainda não existem publicações sobre a metodologia de avaliação por imagem de trabalhos científicos como existe para avaliação histológica e biomecânica(98). Este estudo seguiu a metodologia de pesquisas anteriores(84,85,122) para avaliação da morfologia e composição do reparo através da imagem, e os resultados servem como base para o estabelecimento de protocolos futuros. **Schreiner et al.**(125) publicaram um novo protocolo para avaliação morfológica, chamado MOCART 2.0, e incluíram as sequências para aquisição de imagem e um atlas para identificação das lesões nas recomendações. Mas, durante a confecção deste estudo, estes dados não estavam disponíveis. O estabelecimento de protocolos para a avaliação do reparo condral através da imagem, assim como pela histologia, será importante para a comparação e o desenvolvimento das técnicas de tratamento da lesão da cartilagem.

Este estudo apresentou uma estrutura de engenharia tecidual formada pelas próprias células e sua matriz extracelular como opção terapêutica de uma

patologia de alta prevalência e impacto na saúde pública. E, por não necessitar de um arcabouço artificial ou animal, apresenta maior segurança e pode reduzir custos do tratamento das lesões da cartilagem (48,49). Esse trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que estuda o uso das células estromais mesenquimais como terapia para lesões da cartilagem articular. Como etapas futuras, pesquisas clínicas fase I / II e "*first in human*" poderão ser realizadas a partir do presente estudo.

7. CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A avaliação da morfologia e composição do reparo condral, por imagem de ressonância magnética e análise histológica, mostrou que o defeito de cartilagem tratado por composto de células e matriz extracelular, feito por engenharia tecidual, foi responsável por uma cobertura maior e de melhor qualidade do defeito em relação ao grupo sem tratamento.

8. ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO A – Sistema de pontuação para avaliação morfológica do reparo de tecido da cartilagem. MOCART 3D

Category	Item	Points
Defect fill	0%	0
	0–25%	3
	25–50%	5
	50–75%	10
	75–100%	15
	100%	20
	100–125%	15
	125–150%	7
	150–200%	3
Cartilage interface	>200%	0
	Complete	10
	Demarcating border	8
	Defect visible < 50%	3
Bone interface	Defect visible > 50%	0
	Complete	10
	Partial delamination	5
Surface	Complete delamination/delamination of periosteal flap	0
	Intact	10
	Damaged < 50% depth	5
Structure	Damaged > 50% depth	0
	Homogeneous	10
	Inhomogeneous	5
Signal intensity	Cleft formation	2
	Absence of repair tissue	0
	Normal (identical to adjacent cartilage)	10
Chondral osteophytes	Nearly normal (slight areas of signal alteration)	5
	Abnormal (large areas of signal alteration)	0
	Absent	5
Integrity of subchondral bone plate	<50% of chondral thickness	3
	>50% of chondral thickness	0
	>75%	10
Subarticular spongiosa	50–75%	8
	25–50%	5
	0–25%	3
	0%	0
	Intact	10
	Granulation tissue	8
	Sclerosis	8
	Cyst	5
Granulation tissue and sclerosis	5	
Adhesions	Granulation tissue and cyst	2
	Sclerosis and cyst	2
	Granulation tissue, sclerosis and cyst	0
	Absent	3
Effusion	Yes	0
	Absent	2
Total points	Yes	0
		100

Fonte: Adaptado de Goebel et al.(23) (2014)

ANEXO B – Sistema de pontuação para avaliação histológica do reparo de tecido da cartilagem. ICRS-2

Histological Parameter	Score
1. Tissue morphology (viewed under polarized light)	0%: Full-thickness collagen fibers 100%: Normal cartilage birefringence
2. Matrix staining (metachromasia)	0%: No staining 100%: Full metachromasia
3. Cell morphology	0%: No round/oval cells 100%: Mostly round/oval cells
4. Chondrocyte clustering (4 or more grouped cells)	0%: Present 100%: Absent
5. Surface architecture	0%: Delamination, or major irregularity 100%: Smooth surface
6. Basal integration	0%: No integration 100%: Complete integration
7. Formation of a tidemark	0%: No calcification front 100%: Tidemark
8. Subchondral bone abnormalities/marrow fibrosis	0%: Abnormal 100%: Normal marrow
9. Inflammation	0%: Present 100%: Absent
10. Abnormal calcification/ossification	0%: Present 100%: Absent
11. Vascularization (within the repaired tissue)	0%: Present 100%: Absent
12. Surface/superficial assessment	0%: Total loss or complete disruption 100%: Resembles intact articular cartilage
13. Mid/deep zone assessment	0%: Fibrous tissue 100%: Normal hyaline cartilage
14. Overall assessment	0%: Bad (fibrous tissue) 100%: Good (hyaline cartilage)

Fonte: Adaptado de Mainil-Varlet et al.(92) (2010)

ANEXO C – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês, número de aprovação CEUA P 2017-05



**INSTITUTO SÍRIO-LIBANÊS
DE ENSINO E PESQUISA**

São Paulo, 02 de outubro de 2017.

Título do Projeto: CEUA P 2017-05 "Comparação entre estratégias de bioengenharia de tecido para regeneração da cartilagem articular utilizando células tronco provenientes da polpa de dente e da sinovial: estudo pré-clínico"

Pesquisador: Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes

Histórico do Processo

- Processo inicial recebido pela CEUA em: 26/09/2017
- Avaliado na reunião da CEUA de 02-10-2017

CONSIDERAÇÕES:

A Comissão de Ética no Uso de Animais avaliou os documentos apresentados, onde foram descritos os procedimentos e está de acordo com vínculo do projeto supracitado.

Cabe ressaltar que o pesquisador deverá manter a CEUA informada sobre o andamento de seu projeto através do envio de relatórios parciais (anualmente ou sempre que solicitado pela CEUA) e relatório final, além de comunicação sobre eventos inesperados e alterações no protocolo durante a execução do projeto.

Esta comissão avaliou o projeto proposto e solicita o máximo empenho para tentar minimizar o "N" de animais. Caso possível sugerimos a utilização de N=5 por grupo (N aprovado = 14, N sugerido = 10 animais)

Quanto ao formulário da CEUA favor, no item 9.4 adequar o tempo verbal do projeto, uma vez que esse projeto será realizado.

O projeto foi considerado "APROVADO" pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital Sírio Libanês, para ser executado conforme o planejamento apresentado.

Número de animais aprovados – 14 suínos

Prof. Dr. André Luis Montagnini
Coordenador da CEUA

ANEXO D – Aprovação da Comissão Científica do IOT HC-FMUSP, número de aprovação 1336

**DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO **Protocolo IOT nº 1336** **CEUA do Hospital Sírio Libanês – P2017-05 (animais)**

Pesquisador Responsável: Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes
Orientador: Prof. Arnaldo José Hernandez
Pesquisador Executante: João Paulo Cortez de Sant'Anna
Título: Comparação entre estratégias de bioengenharia de tecido para regeneração da cartilagem articular utilizando células tronco provenientes da polpa de dente e da sinóvia: estudo pré-clínico.
Grau de Pesquisa: Mestrado

PARA USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO CIENTÍFICA

Parecer da Comissão Científica do IOT:

- Aprovado (*Ad referendum*)
- Aprovado com restrições (corrigir e/ou completar)
- Aprovado o mérito, porém apresenta aspectos éticos complexos e/ou discutíveis (à CAPPesq)
- Não aprovado

São Paulo, 31 de outubro de 2017



Prof. Raphael Martus Marcon
Presidente da Comissão Científica

9. REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Perera JR, Gikas PD, Bentley G. The present state of treatments for articular cartilage defects in the knee. *Ann R Coll Surg Engl.* 2012 Sep;94(6):381–7.
2. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 1997 Aug 1;13(4):456–60.
3. Flanigan DC, Harris JD, Trinh TQ, Siston RA, Brophy RH. Prevalence of chondral defects in Athletes' Knees: A systematic review. Vol. 42, *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 2010. p. 1795–801.
4. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, et al. The subchondral bone in articular cartilage repair: Current problems in the surgical management. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):434–47.
5. Showery JE, Kusnezov NA, Dunn JC, Bader JO, Belmont PJ, Waterman BR. The Rising Incidence of Degenerative and Posttraumatic Osteoarthritis of the Knee in the United States Military. *J Arthroplasty.* 2016 Oct;31(10):2108–14.
6. Shen J, Chen D. Recent progress in osteoarthritis research. Vol. 22, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* NIH Public Access; 2014. p. 467–8.
7. Jaul E, Barron J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front public Heal.*

- 2017;5:335.
8. Wallace IJ, Worthington S, Felson DT, Jurmain RD, Wren KT, Maijanen H, et al. Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 29;114(35):9332–6.
 9. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. Vol. 393, *The Lancet*. 2019. p. 1745–59.
 10. Zainal Ariffin SH, Kermani S, Megat Abdul Wahab R, Senafi S, Zainal Ariffin Z, Abdul Razak M. In vitro chondrogenesis transformation study of mouse dental pulp stem cells. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:1–7.
 11. Sasaki H, Rothrauff BB, Alexander PG, Lin H, Gottardi R, Fu FH, et al. In Vitro Repair of Meniscal Radial Tear With Hydrogels Seeded With Adipose Stem Cells and TGF- β 3. *Am J Sports Med*. 2018;46(10):2402–13.
 12. Rocky S. Tuan AFC and BAK. Cartilage Regeneration. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013;21(5):303–311.
 13. Ando W, Tateishi K, Katakai D, Hart DA, Higuchi C, Nakata K, et al. In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Eng Part A*. 2008 Dec;14(12):2041–9.
 14. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Jul;412(412):196–212.
 15. Fernandes TL, Gomoll AH, Lattermann C, Hernandez AJ, Bueno DF, Amano MT. Macrophage: A Potential Target on Cartilage Regeneration.

- Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers; 2020. p. 111.
16. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005 Sep 27;80(6):836–42.
 17. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*. 2006 Oct;12(10):2813–23.
 18. Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, et al. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007;28(36):5462–70.
 19. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, et al. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials*. 2010 Nov 1;31(31):8004–11.
 20. Agay D, Scherthan H, Forcheron F, Grenier N, Hérodin F, Meineke V, et al. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: Development of a new minipig model. *Exp Hematol*. 2010 Oct;38(10):945–56.
 21. Moroni M, Lombardini E, Salber R, Kazemzede M, Nagy V, Olsen C, et al. Hematological changes as prognostic indicators of survival: Similarities between gottingen minipigs, humans, and other large animal models. Cardona P-J, editor. *PLoS One*. 2011 Sep 28;6(9):e25210.
 22. Stramandinoli-Zanicotti RT, Carvalho AL, Rebelatto CLK, Sassi LM,

- Torres MF, Senegaglia AC, et al. Brazilian minipig as a large-animal model for basic research and stem cell-based tissue engineering. Characterization and in vitro differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(3):218–27.
23. Goebel L, Zurakowski D, Müller A, Pape D, Cucchiaroni M, Madry H. 2D and 3D MOCART scoring systems assessed by 9.4T high-field MRI correlate with elementary and complex histological scoring systems in a translational model of osteochondral repair. *Osteoarthr Cartil.* 2014;22(10):1386–95.
24. Trattnig S, Domayer S, Welsch GW, Mosher T, Eckstein F. MR imaging of cartilage and its repair in the knee - A review. Vol. 19, *European Radiology*. Springer-Verlag; 2009. p. 1582–94.
25. Marlovits S, Singer P, Zeller P, Mandl I, Haller J, Trattnig S. Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: Determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur J Radiol.* 2006;57(1):16–23.
26. Mosher TJ, Dardzinski BJ. Cartilage MRI T2 relaxation time mapping: Overview and applications. Vol. 8, *Seminars in Musculoskeletal Radiology*. 2004. p. 355–68.
27. Krusche-Mandl I, Schmitt B, Zak L, Apprich S, Aldrian S, Juras V, et al. Long-term results 8 years after autologous osteochondral transplantation: 7 T gagCEST and sodium magnetic resonance imaging with morphological and clinical correlation. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20(5):357–63.

28. Pakin SK, Cavalcanti C, La Rocca R, Schweitzer ME, Regatte RR. Ultra-High-Field MRI of Knee Joint at 7.0T: Preliminary Experience. *Acad Radiol.* 2006 Sep 1;13(9):1135–42.
29. Krishnamoorthy G, Nanga RPR, Bagga P, Hariharan H, Reddy R. High quality three-dimensional gagCEST imaging of in vivo human knee cartilage at 7 Tesla. *Magn Reson Med.* 2017 May;77(5):1866–73.
30. Garnov N, Gründer W, Thörmer G, Trampel R, Turner R, Kahn T, et al. In vivo MRI analysis of depth-dependent ultrastructure in human knee cartilage at 7 T. *NMR Biomed.* 2013 Nov;26(11):1412–9.
31. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science (80-).* 1993 May 14;260(5110):920 LP – 926.
32. Kuo CK, Li W-J, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol.* 2006 Jan;18(1):64–73.
33. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6;331(14):889–95.
34. Wood JJ. Autologous Cultured Chondrocytes: Adverse Events Reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Jt Surg.* 2006 Mar 1;88(3):503.
35. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005 May 15;19(10):1129–55.
36. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819):154–6.
37. Nichols J, Smith A. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development.* 2011 Jan 1;138(1):3–8.

38. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
39. Toh WS, Lee EH, Cao T. Potential of Human Embryonic Stem Cells in Cartilage Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev Reports*. 2011 Sep 29;7(3):544–59.
40. Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar;6(2):230–47.
41. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393–403.
42. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1445–51.
43. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep 1;9(5):641–50.
44. Fernandes TL, Kimura HA, Pinheiro CCG, Shimomura K, Nakamura N, Ferreira JR, et al. Human synovial mesenchymal stem cells good manufacturing practices for articular cartilage regeneration. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2018;24(12):709–16.
45. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005 Jan 1;7(5):393–5.
46. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC,

- Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
47. Moriguchi Y, Tateishi K, Ando W, Shimomura K, Yonetani Y, Tanaka Y, et al. Repair of meniscal lesions using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from allogenic synovial MSCs in a miniature swine model. *Biomaterials*. 2013 Mar;34(9):2185–93.
48. Shimomura K, Ando W, Moriguchi Y, Sugita N, Yasui Y, Koizumi K, et al. Next Generation Mesenchymal Stem Cell (MSC)–Based Cartilage Repair Using Scaffold-Free Tissue Engineered Constructs Generated with Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cartilage*. 2015 Apr;6(2 Suppl):13–29.
49. Shimomura K, Yasui Y, Koizumi K, Chijimatsu R, Hart DA, Yonetani Y, et al. First-in-Human Pilot Study of Implantation of a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Generated From Autologous Synovial Mesenchymal Stem Cells for Repair of Knee Chondral Lesions. *Am J Sports Med*. 2018;46(10):2384–93.
50. Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*. 1973 Mar;242(5394):190–1.
51. Kean DM, Worthington BS, Preston BJ, Roebuck EJ, McKim-Thomas H, Hawkes RC, et al. Nuclear magnetic resonance imaging of the knee: Examples of normal anatomy and pathology. *Br J Radiol*. 1983 Jun;56(666):355–64.
52. Moon KL, Genant HK, Helms CA, Chafetz NI, Crooks LE, Kaufman L. Musculoskeletal applications of nuclear magnetic resonance. *Radiology*.

- 1983 Apr;147(1):161–71.
53. Reicher MA, Rauschnig W, Gold RH, Bassett LW, Lufkin RB, Glen W. High-resolution magnetic resonance imaging of the knee joint: Normal anatomy. *Am J Roentgenol.* 1985;145(5):895–902.
54. Baker DG, Schumacher HR, Wolf GL. Nuclear magnetic resonance evaluation of synovial fluid and articular tissues. *J Rheumatol.* 1985 Dec 1;12(6):1062–5.
55. Mandelbaum BR, Finerman GAM, Reicher MA, Hartzman S, Bassett LW, Gold RH, et al. Magnetic resonance imaging as a tool for evaluation of traumatic knee injuries. *Am J Sports Med.* 1986 Sep 23;14(5):361–70.
56. Wojtys E, Wilson M, Buckwalter K, Braunstein E, Martel W. Magnetic resonance imaging of knee hyaline cartilage and intraarticular pathology. *Am J Sports Med.* 1987 Sep 23;15(5):455–63.
57. Rübenstein JD, Li JG, Majumdar S, Markhsnkelman R. Image resolution and signal-to-noise ratio requirements for MR imaging of degenerative cartilage. *Am J Roentgenol.* 1997;169(4):1089–96.
58. Crema MD, Roemer FW, Marra MD, Burstein D, Gold GE, Eckstein F, et al. Articular Cartilage in the Knee: Current MR imaging techniques and applications in clinical practice and research. *Radiographics.* 2011 Jan 19;31(1):37–61.
59. Li KC, Henkelman RM, Poon PY, Rubenstein J. MR imaging of the normal knee. *J Comput Assist Tomogr.* 1984 Dec;8(6):1147–54.
60. Yulish BS, Montanez J, Goodfellow DB, Bryan PJ, Mulopulos GP, Modic MT. Chondromalacia patellae: Assessment with MR imaging. *Radiology.* 1987 Sep;164(3):763–6.

61. Spritzer CE, Vogler JB, Martinez S, Garrett WE, Johnson GA, McNamara MJ, et al. MR imaging of the knee: preliminary results with a 3DFT GRASS pulse sequence. *AJR Am J Roentgenol*. 1988 Mar 23;150(3):597–603.
62. Heron CW, Calvert PT. Three-dimensional gradient-echo MR imaging of the knee: comparison with arthroscopy in 100 patients. *Radiology*. 1992 Jun;183(3):839–44.
63. Vinitzki S, Mitchell DG, Einstein SG, Rao VM, Flanders AE, Schweitzer ME, et al. Conventional and fast spin-echo MR imaging: Minimizing echo time. *J Magn Reson Imaging*. 1993 May;3(3):501–7.
64. Recht MP, Piraino DW, Paletta GA, Schils JP, Belhobek GH. Accuracy of fat-suppressed three-dimensional spoiled gradient-echo FLASH MR imaging in the detection of patellofemoral articular cartilage abnormalities. *Radiology*. 1996 Jan 1;198(1):209–12.
65. Disler DG, McCauley TR, Kelman CG, Fuchs MD, Ratner LM, Wirth CR, et al. Fat-suppressed three-dimensional spoiled gradient-echo MR imaging of hyaline cartilage defects in the knee: comparison with standard MR imaging and arthroscopy. *AJR Am J Roentgenol*. 1996 Jul 19;167(1):127–32.
66. Hardy PA, Recht MP, Piraino D, Thomasson D. Optimization of a dual echo in the steady state (DESS) free-precession sequence for imaging cartilage. *J Magn Reson Imaging*. 1996 Mar 1;6(2):329–35.
67. Ruehm S, Zanetti M, Romero J, Hodler J. MRI of patellar articular cartilage: Evaluation of an optimized gradient-echo sequence (3D-DESS). *J Magn Reson Imaging*. 1998 Nov 1;8(6):1246–51.

68. Eckstein F, Hudelmaier M, Wirth W, Kiefer B, Jackson R, Yu J, et al. Double echo steady state magnetic resonance imaging of knee articular cartilage at 3 Tesla: A pilot study for the Osteoarthritis Initiative. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(4):433–41.
69. Domayer SE, Kutscha-Lissberg F, Welsch G, Dorotka R, Nehrer S, Gäbler C, et al. T2 mapping in the knee after microfracture at 3.0 T: correlation of global T2 values and clinical outcome - preliminary results. *Osteoarthr Cartil*. 2008 Aug 1;16(8):903–8.
70. Kijowski R, Davis KW, Woods MA, Lindstrom MJ, De Smet AA, Gold GE, et al. Knee Joint: Comprehensive Assessment with 3D Isotropic Resolution Fast Spin-Echo MR Imaging—Diagnostic Performance Compared with That of Conventional MR Imaging at 3.0 T. *Radiology*. 2009 Aug 1;252(2):486–95.
71. Ristow O, Steinbach L, Sabo G, Krug R, Huber M, Rauscher I, et al. Isotropic 3D fast spin-echo imaging versus standard 2D imaging at 3.0 T of the knee—image quality and diagnostic performance. *Eur Radiol*. 2009 May;19(5):1263–72.
72. Roemer FW, Kwok CK, Hannon MJ, Crema MD, Moore CE, Jakicic JM, et al. Semiquantitative assessment of focal cartilage damage at 3 T MRI: A comparative study of dual echo at steady state (DESS) and intermediate-weighted (IW) fat suppressed fast spin echo sequences. *Eur J Radiol*. 2011 Nov 1;80(2):e126–31.
73. Welsch GH, Zak L, Mamisch TC, Resinger C, Marlovits S, Trattnig S. Three-Dimensional Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue (MOCART) Score Assessed With an Isotropic Three-Dimensional

- True Fast Imaging With Steady-State Precession Sequence at 3.0 Tesla. *Invest Radiol.* 2009;44(9):603–12.
74. Rodrigues MB, Camanho GL. Avaliação da cartilagem do joelho pela ressonância magnética. *Rev Bras Ortop.* 2010;45(4):340–6.
75. Jungius K-P, Schmid MR, Zanetti M, Hodler J, Koch P, Pfirrmann CWA. Cartilaginous Defects of the Femorotibial Joint: Accuracy of Coronal Short Inversion Time Inversion-Recovery MR Sequence. *Radiology.* 2006 Aug;240(2):482–8.
76. Choi YS, Potter HG, Chun TJ. MR imaging of cartilage repair in the knee and ankle. *Radiographics.* 2008 Jul 1;28(4):1043–59.
77. Hayashi D, Li X, Murakami AM, Roemer FW, Trattnig S, Guermazi A. Understanding Magnetic Resonance Imaging of Knee Cartilage Repair: A Focus on Clinical Relevance. Vol. 9, Cartilage. SAGE Publications; 2018. p. 223–36.
78. Marlovits S, Striessnig G, Resinger CT, Aldrian SM, Vecsei V, Imhof H, et al. Definition of pertinent parameters for the evaluation of articular cartilage repair tissue with high-resolution magnetic resonance imaging. *Eur J Radiol.* 2004;52:310–9.
79. Trattnig S, Ba-Ssalamah A, Pinker K, Plank C, Vecsei V, Marlovits S. Matrix-based autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: Noninvasive monitoring by high-resolution magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging.* 2005 Sep 1;23(7):779–87.
80. Anderson DE, Williams RJ 3rd, DeBerardino TM, Taylor DC, Ma CB, Kane MS, et al. Magnetic Resonance Imaging Characterization and Clinical Outcomes After NeoCart Surgical Therapy as a Primary

- Reparative Treatment for Knee Cartilage Injuries. *Am J Sports Med.* 2017 Mar;45(4):875–83.
81. Welsch GH, Zak L, Mamisch TC, Paul D, Lauer L, Mauerer A, et al. Advanced morphological 3D magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) scoring using a new isotropic 3D proton-density, turbo spin echo sequence with variable flip angle distribution (PD-SPACE) compared to an isotropic 3D steady-stat. *J Magn Reson Imaging.* 2011;33(1):180–8.
82. Binks DA, Hodgson RJ, Ries ME, Foster RJ, Smye W, McGonagle D, et al. Quantitative parametric MRI of articular cartilage: A review of progress and open challenges. *Br J Radiol.* 2013;86(1023):20120163.
83. Trattinig S, Millington SA, Szomolanyi P, Marlovits S. MR imaging of osteochondral grafts and autologous chondrocyte implantation. *Eur Radiol.* 2007;17(1):103–18.
84. White LM, Sussman MS, Hurtig M, Probyn L, Tomlinson G, Kandel R. Cartilage T2 assessment: Differentiation of normal hyaline cartilage and reparative tissue after arthroscopic cartilage repair in equine subjects. *Radiology.* 2006;241(2):407–14.
85. Welsch GH, Mamisch TC, Hughes T, Zilkens C, Quirbach S, Scheffler K, et al. In vivo biochemical 7.0 tesla magnetic resonance: Preliminary results of dGEMRIC, zonal T2, and T2* mapping of articular cartilage. *Invest Radiol.* 2008 Sep;43(9):619–26.
86. Welsch GH, Mamisch TC, Domayer SE, Dorotka R, Kutscha-Lissberg F, Marlovits S, et al. Cartilage T2 assessment at 3-T MR imaging: In vivo differentiation of normal hyaline cartilage from reparative tissue after two

- cartilage repair procedures - Initial experience. *Radiology*. 2008 Apr;247(1):154–61.
87. Kladny B, Glückert K, Swoboda B, Beyer W, Weseloh G. Comparison of low-field (0.2 Tesla) and high-field (1.5 Tesla) magnetic resonance imaging of the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1995;114(5):281–6.
88. Woertler K, Strothmann M, Tombach B, Reimer P. Detection of articular cartilage lesions: Experimental evaluation of low- and high-field-strength MR imaging at 0.18 and 1.0 T. *J Magn Reson Imaging*. 2000 Jun 1;11(6):678–85.
89. Eckstein F, Peterfy C. A 20 years of progress and future of quantitative magnetic resonance imaging (qMRI) of cartilage and articular tissues- personal perspective. *Semin Arthritis Rheum*. 2016 Jun;45(6):639–47.
90. Kraft O, Theysohn JM, Maderwald S, Saylor C, Ladd SC, Ladd ME, et al. MRI of the knee at 7.0 tesla. *RoFo Fortschritte auf dem Gebiet der Rontgenstrahlen und der Bildgeb Verfahren*. 2007;179(12):1231–5.
91. Wang L, Wu Y, Chang G, Oesingmann N, Schweitzer ME, Jerschow A, et al. Rapid isotropic 3D-sodium MRI of the knee joint in vivo at 7T. *J Magn Reson Imaging*. 2009 Sep;30(3):606–14.
92. Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nestic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. *Am J Sports Med*. 2010;38(5):880–90.
93. O’Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint*

- Surg Am. 1986 Sep;68(7):1017–35.
94. Pineda SJ, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat.* 1992;143:335–40.
95. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 1994 Apr;76(4):579–92.
96. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 1997 Oct;79(10):1452–63.
97. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. Histological assessment of cartilage repair: A report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). In: *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A.* *J Bone Joint Surg Am;* 2003. p. 45–57.
98. Hoemann C, Kandel R, Roberts S, Saris DBF, Creemers L, Mainil-Varlet P, et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. *Cartilage.* 2011 Apr;2(2):153–72.
99. Kilkeny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol.* 2010 Aug;160(7):1577–9.
100. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG.

- Research electronic data capture (REDCap)—A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009 Apr 1;42(2):377–81.
101. Pinheiro CCG, Leyendecker Junior A, Tanikawa DYS, Ferreira JRM, Jarrahy R, Bueno DF. Is There a Noninvasive Source of MSCs Isolated with GMP Methods with Better Osteogenic Potential? *Stem Cells Int.* 2019 Nov 6;2019:1–14.
102. Murray MM. The effect of skeletal maturity on functional healing of the anterior cruciate ligament. *J Bone Jt Surg.* 2010 Sep 1;92(11):2039.
103. Park Y-B, Ha C-W, Lee C-H, Yoon YC, Park Y-G. Cartilage Regeneration in Osteoarthritic Patients by a Composite of Allogeneic Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronate Hydrogel: Results from a Clinical Trial for Safety and Proof-of-Concept with 7 Years of Extended Follow-Up. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Feb;6(2):613–21.
104. Dariolli R, Bassaneze V, Nakamuta JS, Omae SV, Campos LCG, Krieger JE. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. *PLoS One.* 2013;8(7):e67939.
105. Paes SM, Pupo YM, Cavenago BC, Fonseca-Silva T, Santos CC de O. Cryopreservation of mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a systematic review. *Restor Dent Endod.* 2021 May;46(2):e26.
106. Marti LC, Ribeiro AAF, Hamerschlak N. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Einstein (São Paulo).* 2011 Jun;9(2):224–8.
107. O’Grady JE, Bordon DM. Global regulatory registration requirements for collagen-based combination products: points to consider. *Adv Drug Deliv*

- Rev. 2003 Nov 28;55(12):1699–721.
108. Ebihara G, Sato M, Yamato M, Mitani G, Kutsuna T, Nagai T, et al. Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials*. 2012 May 1;33(15):3846–51.
109. Pedroni ACF, Diniz IMA, Abe GL, Moreira MS, Sipert CR, Marques MM. Photobiomodulation therapy and vitamin C on longevity of cell sheets of human dental pulp stem cells. *J Cell Physiol*. 2018 Oct 1;233(10):7026–35.
110. Theruvath AJ, Mahmoud EE, Wu W, Nejadnik H, Kiru L, Liang T, et al. Ascorbic Acid and Iron Supplement Treatment Improves Stem Cell–Mediated Cartilage Regeneration in a Minipig Model. *Am J Sports Med*. 2021;49(7):1861–70.
111. Fernandes TL, Shimomura K, Asperti A, Pinheiro CCG, Caetano HVA, Oliveira CRGCM, et al. Development of a Novel Large Animal Model to Evaluate Human Dental Pulp Stem Cells for Articular Cartilage Treatment. *Stem Cell Rev Reports*. 2015;14:734–43.
112. Li WJ, Chiang H, Kuo TF, Lee HS, Jiang CC, Tuan RS. Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: A pilot study. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(1):1–10.
113. Mariano M. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental: o Minipig br1. *Acta Cir Bras*. 2003 Oct;18(5):387–91.
114. Yamasaki A, Kunitomi Y, Murata D, Sunaga T, Kuramoto T, Sogawa T, et al. Osteochondral regeneration using constructs of mesenchymal stem cells made by bio three-dimensional printing in mini-pigs. *J Orthop Res*. 2019 Jun 24;37(6):1398–408.

115. Murata D, Kunitomi Y, Harada K, Tokunaga S, Takao S, Nakayama K. Osteochondral regeneration using scaffold-free constructs of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells made by a bio three-dimensional printer with a needle-array in rabbits. *Regen Ther*. 2020 Dec;15:77–89.
116. Welsch GH, Mamisch TC, Marlovits S, Glaser C, Friedrich K, Hennig FF, et al. Quantitative T2 mapping during follow-up after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation (MACT): Full-thickness and zonal evaluation to visualize the maturation of cartilage repair tissue. *J Orthop Res*. 2009 Jul 1;27(7):957–63.
117. Schreiner MM, Raudner M, Szomolanyi P, Ohel K, Ben-Zur L, Juras V, et al. Chondral and Osteochondral Femoral Cartilage Lesions Treated with GelrinC: Significant Improvement of Radiological Outcome Over Time and Zonal Variation of the Repair Tissue Based on T2 Mapping at 24 Months. *Cartilage*. 2020 Jun 4;1947603520926702.
118. Shiomi T, Nishii T, Nakata K, Tamura S, Tanaka H, Yamazaki Y, et al. Three-dimensional topographical variation of femoral cartilage T2 in healthy volunteer knees. *Skeletal Radiol*. 2013 Mar 22;42(3):363–70.
119. Badar F, Xia Y. Image interpolation improves the zonal analysis of cartilage T2 relaxation in MRI. *Quant Imaging Med Surg*. 2017 Apr;7(2):227–37.
120. Gardner OFW, Juneja SC, Whetstone H, Nartiss Y, Sieker JT, Veillette C, et al. Effective repair of articular cartilage using human pluripotent stem cell-derived tissue. *Eur Cells Mater*. 2019;38:215–27.
121. Fisher MB, Belkin NS, Milby AH, Henning EA, Söegaard N, Kim M, et al. Effects of Mesenchymal Stem Cell and Growth Factor Delivery on

- Cartilage Repair in a Mini-Pig Model. *Cartilage*. 2016 Apr;7(2):174–84.
122. Adachi N, Ochi M, Deie M, Nakamae A, Kamei G, Uchio Y, et al. Implantation of tissue-engineered cartilage-like tissue for the treatment for full-thickness cartilage defects of the knee. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc*. 2014 May 12;22(6):1241–8.
123. Abbas M, Alkaff M, Jilani A, Alsehli H, Damiati L, Kotb M, et al. Combination of Mesenchymal Stem Cells, Cartilage Pellet and Bioscaffold Supported Cartilage Regeneration of a Full Thickness Articular Surface Defect in Rabbits. *Tissue Eng Regen Med*. 2018 Oct;15(5):661–71.
124. McCarthy HS, McCall IW, Williams JM, Mennan C, Dugard MN, Richardson JB, et al. Magnetic Resonance Imaging Parameters at 1 Year Correlate With Clinical Outcomes Up to 17 Years After Autologous Chondrocyte Implantation. *Orthop J Sport Med*. 2018 Aug;6(8):2325967118788280.
125. Schreiner MM, Raudner M, Marlovits S, Bohndorf K, Weber M, Zalaudek M, et al. The MOCART (Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue) 2.0 Knee Score and Atlas. *Cartilage*. 2019 Aug 17;1947603519865308.