

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
AUTÓLOGAS NA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR DE JOELHOS  
DE COELHOS SUBMETIDOS A OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL**

**Larissa Correa Hermeto**  
Médica Veterinária

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
AUTÓLOGAS NA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR DE JOELHOS  
DE COELHOS SUBMETIDOS A OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL**

**Larissa Correa Hermeto**

**Orientador: Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Deffune**

Tese apresentada à  
Faculdade de Ciências Agrárias  
e Veterinárias – Unesp, Câmpus  
de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do  
título de Doutor em Cirurgia  
Veterinária.

**2014**

H488e Hermeto, Larissa Correa  
Efeito da terapia com células-tronco mesenquimais autólogas na regeneração da cartilagem articular de joelhos de coelhos submetidos a osteoartrite experimental / Larissa Correa Hermeto. -- Jaboticabal, 2014  
xxii, 71 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientador: Áureo Evangelista Santana  
Banca examinadora: Paola Castro Moraes, Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias, Fernando De Biasi, Raimundo Souza Lopes.  
Bibliografia

1. Cartilagem. 2. Tecido adiposo. 3. Terapia regenerativa. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.728.3:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS NA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR DE JOELHOS DE COELHOS SUBMETIDOS A OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL

**AUTORA:** LARISSA CORREA HERMETO

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. ELENICE DEFFUNE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. FERNANDO DE BIÁSI

Universidade Estadual de Londrina / Londrina/PR

Prof. Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dr. LUIS GUSTAVO GOSUEN-GONÇALVES DIAS

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 08 de dezembro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Larissa Correa Hermeto-** nasceu na cidade de Londrina– PR, em 1 de março de 1980. Em 2004, graduou-se em medicina veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e tornou-se mestre pela mesma instituição no início do ano de 2010. Em agosto de 2007, iniciou trabalho como médica veterinária no setor de Pequenos Animais na Faculdade Anhanguera de Dourados-MS e posteriormente assumiu cargo de docente nas disciplinas de Técnica Cirúrgica e Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais até fevereiro de 2011, quando encerrou suas atividades nesta Instituição para dar início ao curso de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."  
Albert Schweitzer

Aos animais que foram utilizados neste experimento, o meu respeito e  
gratidão.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela vida e saúde minha e de minha família, pois este é o maior bem que temos.

Aos meus **pais**, pelo carinho eterno, pela ajuda emocional e financeira, pela presença constante, pelo exemplo de força e determinação, sempre mostrando que temos que eternamente vencer obstáculos. Vocês são muito especiais, sem vocês esta jornada seria muito mais árdua.

Ao meu esposo **Wagner**, por apoiar meus objetivos acadêmicos. Pelo amor e paciência, por cuidar da nossa casa e animais durante os longos períodos de distância.

Ao meu solícito e querido orientador **Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana**, pela orientação, ajuda, paciência, e por ter me recebido de braços abertos desde o primeiro dia em que estive nesta Universidade.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Deffune**, pelos ensinamentos e auxílio, por todo aprendizado que obtive em seu laboratório.

À **Thaiane Cristine Evaristo**, por ter me ensinado como cultivar células de forma paciente, detalhada e generosa, por tantas dúvidas sanadas durante todo meu experimento.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu, em especial às colegas **Helga Caputo Nunes, Josy Campanhã Vicentini de Oliveira e Priscila Murador** pelo auxílio durante todo meu aprendizado.

Ao Médico Veterinário e amigo **Santiago Benites de Pádua**, pela grande ajuda durante toda essa jornada.



Ao Médico Veterinário e amigo **Paulo Henrique de Affonseca Jardim**, pela ajuda árdua com os procedimentos experimentais e cuidados com os animais, pelos trabalhos aos sábados, domingos e feriados.

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)**, por ter aceitado o desenvolvimento de parte do meu experimento nesta instituição. Ao **Prof. Dr. Rafael de Rossi**, que me recebeu no setor de Técnica Cirúrgica Animal, aos docentes **Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira**, **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli** que me receberam no Centro de Estudos em Células-Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica.

À médica veterinária patologista doutoranda-UFMS **Flávia Barbieri Bacha**, pelo auxílio nas avaliações macroscópicas e na manutenção dos animais durante o experimento.

Ao laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, em nome de **Dra. Márjorie de Assis Golim**, pela realização das análises.

Ao Instituto de Biociências (IB), UNESP, Botucatu (Departamento de Imunologia e Departamento de Histologia), em nome do docente **Luis Antonio Justulin Junior** e a pós doutoranda **Jaqueline de Carvalho Rinaldi**, pela realização das análises histomorfológicas.

Ao Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica, da Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA), UNESP, Botucatu, em nome da docente **Daisy Maria Favero Salvadori** e o pós doutorando **Renato Paschoal Prado**, pelas análises do teste do cometa.

Ao **Programa de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária** da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, UNESP, por ter me

recebido, pelas excelentes disciplinas ministradas, pelos cursos oferecidos, por todo conhecimento que pude adquirir através desta instituição durante este período.

Ao **Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, por conceder-me uma bolsa de estudos durante este período, o que tornou possível a realização deste trabalho.

Enfim,

A **todos** aqueles que me ajudaram, com carinho, paciência e pensamentos positivos para que este sonho se concretizasse.

**Muito obrigada!**

## SUMÁRIO

Página	
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE QUADROS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 O tecido cartilaginoso.....	2
2.1.1 Cartilagem hialina.....	3
2.1.2 Reparo espontâneo da cartilagem articular.....	4
2.2 Osteoartrite.....	5
2.2.1 Definição de osteoartrite.....	5
2.2.2 Causas de osteoartrite.....	6
2.2.3 Fisiopatologia da osteoartrite.....	7
2.2.4 Tratamentos para a osteoartrite.....	8
2.3 Células-tronco mesenquimais.....	10
2.4 Plasma rico em plaquetas.....	13
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Local de desenvolvimento.....	17
4.2 Animais e delineamento experimental.....	18
4.3 Indução da osteoartrite.....	19
4.4 Protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas.....	19
4.5 Obtenção, expansão, caracterização e diferenciação das CTM.....	20
4.5.1 Obtenção e expansão das CTM.....	20
4.5.2 Diferenciação condrogênica.....	21
4.5.3 Diferenciação adipogênica e osteogênica.....	23
4.5.4 Ensaio de viabilidade celular.....	23
4.5.5 Caracterização das CTM.....	23
4.6 Avaliações de danos citogenéticos pelo Teste do cometa.....	24
4.7 Análises macroscópicas.....	25
4.8 Análises histomorfológicas.....	26
4.9 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Valores médios de plaquetas no sangue total e PRP.....	27
5.2 Obtenção e expansão das CTM.....	28
5.3 Achados referentes à diferenciação das CTM em adipócitos, osteócitos condroblastos.....	28
5.3.1 Diferenciação adipogênica.....	29
5.3.2 Diferenciação osteogênica.....	30
5.3.3 Diferenciação condrogênica.....	31
5.4 Ensaio de viabilidade celular.....	32

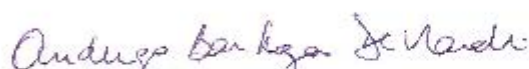
5.5 Caracterização das CTM por citometria de fluxo.....	32
5.6 Avaliação de danos citogenéticos pelo do Teste do cometa.....	34
5.7 Avaliação macroscópica.....	35
5.8 Avaliações histomorfológicas.....	36
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	50
8. REFERÊNCIAS.....	51

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 027838/12 do trabalho de pesquisa intitulado **"Efeito da terapia com células tronco mesenquimais autólogas na regeneração da cartilagem articular do Joelho de coelhos submetidos a osteoartrite experimental"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colegio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2012.

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2012.

  
**Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi**  
Coordenador - CEUA



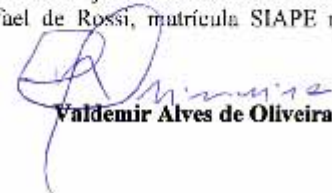
Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



RESOLUÇÃO Nº 215, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2012.

O PRESIDENTE EM EXERCÍCIO DO CONSELHO DE FACULDADE DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve **ad referendum**:

Opinar favoravelmente pela aprovação do Projeto de Pesquisa intitulado "**Efeito da terapia com células tronco mesenquimais autólogas na regeneração da cartilagem articular do joelho de coelhos submetidos a osteoartrite experimental**", a ser desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, com início em janeiro de 2013 e término em julho de 2014, sob a coordenação do Profº Drº Rafael de Rossi, matrícula SIAPE nº 0432494.

  
**Valdemir Alves de Oliveira**

## **EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS NA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR DE JOELHOS DE COELHOS SUBMETIDOS A OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL**

**RESUMO-** A cartilagem articular é um tecido que possui capacidade limitada de reparo após uma lesão aguda, e a eficácia dos tratamentos atuais geralmente resulta em alívio dos sintomas, e não em regeneração do tecido lesado. Incidindo sobre esta problemática, o objetivo do presente trabalho, foi avaliar o efeito da terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) autólogas na regeneração da cartilagem articular de joelhos de coelhos submetidos a osteoartrite experimental. Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia Branca, os quais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: GC (grupo controle); GPRP (grupo plasma rico em plaquetas); GCTM (grupo células-tronco mesenquimais autólogas indiferenciadas); GCTMdif (grupo células-tronco mesenquimais autólogas diferenciadas em condrócitos. Todos os animais foram induzidos a osteoartrite por meio da aplicação de solução de colagenase, e após quatro semanas receberam os tratamentos propostos para cada grupo. Após sessenta dias da terapia, os animais foram eutanasiados e as superfícies articulares foram submetidas a avaliações macroscópicas e histomorfológicas. Paralelamente foram realizadas diferenciações adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas das CTM, caracterizações das mesmas por meio de análise citométrica, e avaliações de danos citogenéticos pelo Teste do Cometa. Os resultados dos exames macroscópicos e histomorfológicos revelaram um melhor tecido de reparação nos grupos tratados com CTM. As análises citométricas apresentaram resultados de imunomarcações positivos para CTM, e as diferenciações revelaram que as CTM foram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteoblastos. Por meio do Teste do Cometa, foi possível notar que os danos citogenéticos aumentaram após a segunda passagem das CTM. Conclui-se que há efeitos benéficos da associação de CTM derivadas do tecido adiposo e plasma rico em plaquetas na regeneração da cartilagem articular de joelhos de coelhos submetidos a osteoartrite experimental, e não há diferença quando são utilizadas CTM indiferenciadas ou diferenciadas em condrócitos. Além disso, foi confirmada a plasticidade das CTM por meio das diferenciações adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas, positividade na citometria de fluxo, e foram detectados aumento de danos citogenéticos após a segunda passagem celular, analisados pelo Teste do Cometa.

**Palavras-chave:** terapia regenerativa, cartilagem, tecido adiposo.

## **EFFECTS OF AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS THERAPY IN THE REGENERATION OF RABBITS ARTICULAR CARTILAGE SUBMITTED TO EXPERIMENTAL KNEE OSTEOARTHRITIS**

**ABSTRACT-** The articular cartilage is a tissue that has limited capacity for repair after an acute injury, and the efficacy of current treatments usually results in relief of symptoms, and not in regeneration of damaged tissue. Focusing on this issue, the aim of this work was to evaluate the effect of therapy with autologous mesenchymal stem cells (MSC) in the regeneration of rabbits articular cartilage submitted to experimental knee osteoarthritis. Twenty four adult New Zealand White rabbits were randomly divided into four groups: GC (control group); GPRP (platelet rich plasma group); GCTM (undifferentiated autologous mesenchymal stem cells group); GCTMdif (chondrocyte differentiated autologous mesenchymal stem cells group). All animals were osteoarthritis-induced by application of collagenase solution, and four weeks after induction, they received the specific treatments to each group. After sixty days of therapy, the animals were sacrificed and articular surfaces were submitted to macroscopic and histomorphological evaluations. At the same time were performed adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of MSC, characterizations through cytometric analysis, and evaluation of cytogenetic damage by the Comet Assay. The macroscopic and histomorphological examinations revealed a better repair tissue in the groups treated with MSC. Cytometric analyzes showed positive results for MSC immunostaining, and differentiation showed that MSC were able to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts. Through the Comet Assay, it was noticeable that the cytogenetic damage increased after the second passage of the MSC. It was concluded that there are beneficial effects of the combination of MSC derived from adipose tissue and platelet-rich plasma in the regeneration of articular cartilage in knees of rabbits undergoing experimental osteoarthritis, and there is no difference when MSC are used undifferentiated or differentiated into chondrocytes. Furthermore, we confirmed the plasticity of MSC through adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation, positivity in flow cytometry, and increased cytogenetic damage after the second cell passage, analyzed by the Comet Assay.

**Keywords:** regenerative therapy, cartilage, adipose tissue.



## LISTA DE ABREVIATURAS

cm<sup>2</sup>: centímetros quadrados

CTE: células tronco embrionárias

CTM: células tronco mesenquimais

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGF: fator de crescimento epidérmico

FGF: fator de crescimento fibroblástico

GC: grupo controle

GCTM: grupo células tronco mesenquimais autólogas indiferenciadas

GCTMdif: grupo células tronco mesenquimais autólogas diferenciadas em condrócitos

GPRP: grupo plasma rico em plaquetas

HE: hematoxilina eosina

IGF: fator de crescimento semelhante a insulina

iPS: células induzidas à pluripotência

Kg: kilogramas

LMP: low melting point

mL: mililitros

mg: miligramas

OA: osteoartrite

PRP: plasma rico em plaquetas

PDGF  $\alpha$  e  $\beta$ : fator de crescimento derivado das plaquetas  $\alpha$  e  $\beta$

SFB: soro fetal bovino

TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 2: fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2

$\mu$ L: microlitros

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

**LISTA DE QUADROS**

	Página
Quadro 1. Aspecto macroscópico da superfície articular segundo escore de Yoshimi et al (1994). Campo Grande, 2013.....	26
Quadro 2. Escore histológico segundo Mankin et al. (1971), modificado. Campo Grande, 2013.....	27

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Registro fotográfico do sedimento de células após centrifugação a 300g. Seta vermelha indica o concentrado celular para diferenciação condrogênica. Campo Grande, 2013.....	22
Figura 2.	Registro fotográfico ilustrando a localização dos cortes realizados para preparo das laminas histológicas. 1-porção do côndilo medial, 2- porção do côndilo lateral. Campo Grande, 2013.....	26
Figura 3.	Ilustrações fotomicrográficas de confluência de células em cultivo. A: células em aderência e expansão, apresentando formato fibroblastóide e fluorescência, e a formação de <i>cluster</i> . Aumento de 20x. B: Confluência acima de 90%. Aumento 40X. Campo Grande, 2013.....	28
Figura 4.	Seções A-C: Células controle em meio de cultura DMEN Knockout. Seções B-D: células em meio diferenciador adipogênico apresentando vacúolos lipídicos intracelulares corados em vermelho (setas vermelhas). Aumento de 40x. Campo Grande, 2013. ....	29
Figura 5.	Seção A: Células controle mantidas em meio de cultura DMEN Knockout. Seções B-C: células estimuladas em meio diferenciador osteogênico e apresentando depósitos de cálcio corados em vermelho (setas pretas). Aumento de 40x. Campo Grande, 2013.....	30
Figura 6.	Diferenciação condrogênica e controle coradas em HE (Aumento de 40x). Seção A evidencia células controle mantidas em meio de cultura DMEN <i>Knockout</i> . Seção B coloca em evidência células mantidas em meio de cultura diferenciador condrogênico e revela intensa produção de matriz extracelular. Botucatu, 2014.....	31
Figura 7.	Diferenciação condrogênica de preparações coradas em Azul de Toluidina (aumento 100x). Seção A evidencia células controle mantidas em meio de cultura DMEN <i>Knockout</i> . Seção B evidencia células mantidas em meio de cultura diferenciador condrogênico, revelando intensa produção de matriz extracelular. Botucatu, 2014.....	31
Figura 8.	Desempenho dos anticorpos anti-CD90 <i>home made</i> e anti-CD73 com base na taxa de	

	fluorescência. Botucatu, 2013.....	33
Figura 9.	Desempenho dos anticorpos anti-CD90, anti-CD44 e anti-CD105, com base na taxa de fluorescência. Botucatu, 2013.....	33
Figura 10.	Avaliação de danos no DNA em células mesenquimais indiferenciadas. Células na primeira passagem (A), gráfico de análise inserido pelo <i>software</i> na primeira passagem (B) células na segunda passagem (C), gráfico de análise inserido pelo <i>software</i> na segunda passagem (D). As imagens A-D foram obtidas em aumento de 40x. Histograma resultante (E) - representando a quantificação dos danos nas duas passagens, dentro da variável <i>Tail Intensity</i> (Teste estatístico: t-Student, $p=0,004$ ). Histograma resultante (F) - representando a quantificação dos danos nas duas passagens, dentro da variável <i>Tail Moment</i> (Teste estatístico: t-Student, $p=0,009$ ). Botucatu, 2013.....	34
Figura 11.	Avaliação macroscópica segundo escore de Yoshimi et al (1994). Análise estatística através do teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ( $p=0.001$ ). Campo Grande, 2013.....	35
Figura 12.	Ilustração do escore macroscópico segundo Yoshimi et al. (1994). A- Grau 0: Superfície lisa e brilhante (amostra grupo GCTM); B- Grau 1: irregularidades superficiais leves (seta) (amostra grupo GCTMdif); C- Grau 2: defeitos de espessura e fibrilação (seta) (amostra grupo GPRP); D- Grau 3: erosão (seta) (amostra grupo GC). Campo Grande, 2013.....	36
Figura 13.	Fotomicrografias da superfície articular de animais dos diferentes grupos experimentais coradas em H.E, ilustrando os critérios empregados na execução do escore de Mankin. A: irregularidades na superfície articular (seta) (amostra grupo GCTM); B: <i>Pannus</i> (setas) (amostra grupo GPRP); C: fendas na superfície articular (seta) (amostra grupo GCTMdif); D: Fendas envolvendo a zona de transição (setas) (amostra grupo GPRP); E: Fendas envolvendo a zona radial (setas) (amostra grupo GPRP); F: Desorganização completa (setas) (amostra grupo GC). Barra=100 $\mu$ m. Botucatu, 2014.....	37
Figura 14.	Fotomicrografias representativas dos aspectos celulares na cartilagem articular em imagens coradas por H.E (A-D) e azul de toluidina (E-H). A e E: setas apontam condrócitos no interior de lacunas, celularidade normal, condrócitos dispostos em colunas (elipse) (amostra membro sadio); B e F:	

	diminuição da população de condrócitos (elipse) (amostra grupo GC); C e G: aumento da população de condrócitos dispostos de forma irregular (elipse) (amostra grupo GCTM); D e H: clones (elipses) (amostra grupo GCTMdif). Barra=100µm. Botucatu, 2014.....	38
Figura 15.	Ilustração da avaliação histológica conforme o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ( $p=0,01$ ). Botucatu, 2014.....	39
Figura 16.	Ilustração fotomicrográfica representativa da histoarquitetura da cartilagem articular do joelho de coelhos, coloração HE. Seção A: amostra do grupo GCTMdif apresentando <i>pannus</i> e irregularidades em superfície articular (seta). Seção B: amostra do grupo GCTM apresentando irregularidades na superfície articular (seta). Aumento de 10x. Botucatu, 2014.....	40
Figura 17.	Ilustração fotomicrográfica representativa da histoarquitetura da cartilagem articular do joelho de coelhos, coloração Azul de Toluidina. Seção A: amostra do grupo GCTMdif apresentando hiper celularidade difusa. Seção B: amostra do grupo GCTM apresentando hiper celularidade difusa e clones (seta). Aumento de 10x. Botucatu, 2014.....	41
Figura 18.	Ilustração fotomicrográfica representativa da histoarquitetura da cartilagem articular do joelho de coelhos, coloração HE. Seção A: amostra do grupo GPRP apresentando fendas nas zonas: superficial, de transição e profunda (setas). Seção B: amostra do grupo GC apresentando desorganização completa da estrutura histológica das camadas. Aumento de 10x. Botucatu, 2014.....	41
Figura 19.	Ilustração fotomicrográfica representativa da histoarquitetura da cartilagem articular do joelho de coelhos, coloração Azul de Toluidina. Seção A: amostra do grupo GPRP apresentando fendas profundas e exposição da zona de cartilagem calcificada (setas). Seção B: amostra do grupo GC apresentando fendas profundas e exposição de osso subcondral. Aumento de 10x. Botucatu, 2014.....	42

## 1. INTRODUÇÃO

A limitada capacidade de regeneração da cartilagem articular tem sido caracterizada como uma das maiores preocupações na área da ortopedia médica (SIMON e JACKSON, 2006), assim como na veterinária.

A osteoartrite (OA) é uma condição patológica complexa com perdas e danos à cartilagem articular, acompanhada de mudanças no osso subcondral e sinóvia (FINDLAY, 2010). A doença articular resultante de traumas, doenças degenerativas ou relacionadas com a idade apresenta grande desafio clínico devido à limitada capacidade de reparo da cartilagem articular. Esta limitada capacidade de autorreparação de defeitos osteocondrais tem estimulado o desenvolvimento de ampla variedade de novas estratégias de tratamento (CSAKI et al., 2008).

As técnicas disponíveis atualmente para o tratamento da OA podem resultar em alívio dos sintomas, mas não na regeneração do tecido lesado. A idealização e construção de um substituto biológico que recomponha a cartilagem articular nativa impõem o uso de células vivas que sejam capazes de sintetizar e manter a matriz cartilaginosa (BITTENCOURT, 2008).

Nesse contexto, é razoável afirmar que o tratamento convencional das degenerações do tecido cartilaginoso articular ainda constitui um desafio e, apesar do esforço e investimentos empreendidos, progride de forma lenta e com resultados pouco significativos. Entretanto, mesmo diante das referidas dificuldades, a medicina regenerativa avança de forma muito rápida e promissora, e abre a perspectiva de tornar-se modalidade de reparação e recomposição de vários tecidos, inclusive cartilaginoso, num futuro muito próximo. Pesquisas utilizando-se de células-tronco mesenquimais (CTM) adultas vêm se tornando cada vez mais populares em função da facilidade de acesso e abundância de tais células, e por não envolverem questões éticas tal qual como os ensaios com células-tronco embrionárias (CTE). Experimentos recentes têm demonstrado resultados promissores de regeneração do tecido cartilaginoso, ensejando a perspectiva de que terapias celulares em doenças ósseas e articulares poderão se beneficiar com o progresso dos ensaios *in vivo* e *in*

*vitro* com CTM dotadas de potencial para diferenciação em cartilagem (BURASTERO et al., 2010).

As CTM abrem possibilidades para uma lista crescente de usos terapêuticos, não só devido a sua capacidade de se diferenciar em todos os tecidos conjuntivos, incluindo osso, gordura e cartilagem, mas além disso, devido aos seus efeitos tróficos e anti-inflamatórios que contribuem para a cicatrização e regeneração dos tecidos. Pesquisas em curso começam a iluminar aspectos importantes dos nichos microambientais, que dão suporte à auto-renovação das CTM (SCHRAUFSTATTER et al., 2011) e, para Csaki et al. (2008), embora estudos de CTM em modelos animais tenham mostrado potencial significativo para diferenciação e reparo de cartilagem, tal fonte alternativa de células requer ainda pesquisas adicionais, e de tal forma mais bem controladas, para que a terapia regenerativa de afecções osteocondrais debilitantes, torne-se realidade. Para Agung et al. (2006), tais células detêm afinidade por tecido articular com a habilidade de localizar e participar no reparo das estruturas articulares lesionadas.

O plasma rico em plaquetas (PRP), autólogo, que concentra fatores de crescimento advindos das plaquetas, vem sendo considerado como uma modalidade de terapia celular para lesões teciduais e degeneração (NGUYEN et al., 2011). Um dos campos emergentes do PRP é avaliação do seu potencial terapêutico na regeneração da cartilagem articular e OA (FILARDO et al., 2013).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O tecido cartilaginoso**

O tecido cartilaginoso é uma modalidade especializada de tecido conjuntivo de consistência rígida. Desempenha a função de suporte de tecidos moles, reveste superfícies articulares, onde absorve choques, e facilita o deslizamento dos ossos nas articulações. Como os demais tipos de tecidos conjuntivos, o tecido cartilaginoso contém células, os condrócitos, e abundante material extracelular, que constitui a matriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).



Conforme as diversas necessidades funcionais do organismo, e segundo as fibras presentes na matriz, as cartilagens se diferenciam em três tipos: cartilagem hialina, que é a mais comum e abundante no organismo e cuja matriz possui colágeno tipo II; cartilagem elástica, que possui poucas fibrilas de colágeno tipo II e abundantes fibras elásticas; e a fibrocartilagem, que apresenta matriz constituída por densas e espessas fibras de colágeno tipo I (GARTNER e HIATT, 2007).

### **2.1.1 Cartilagem hialina**

A cartilagem hialina é um tecido conjuntivo ímpar, idealmente adaptado para atuar como absorvente elástico contra choques e como superfície de resistência contra desgastes (ROSEMBERG, 2005). Notavelmente, a cartilagem articular de adultos é avascular e não apresenta vasos linfáticos nem nervos (O'DRISCOLL, 1998). Porquanto não possui vasos sanguíneos, o tecido cartilaginoso é nutrido pelos capilares do conjuntivo envolvente (pericôndrio), e ademais, se as cartilagens articulares não possuem pericôndrio, são nutridas pelo líquido sinovial (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A capacidade da matriz extracelular em resistir a forças de compressão é devida à presença de uma matriz hidratada formada por glicosaminoglicanos e proteoglicanos. A resistência às forças de tensão se dá graças às fibras resistentes formadas por colágeno (GARTNER e HIATT, 2007). A matriz cartilaginosa hialina é formada por 40 a 50% de colágeno, sendo 90% predominantemente do tipo II; 25% de proteoglicanos, e 15% de glicoproteínas (BUCKWALTER et al., 2005). Outros tipos de colágenos como V, VI, IX, X e XI, e outros colágenos secundários, compõem a matriz cartilaginosa em menor concentração (MANDELBAUM et al., 1998). Além do colágeno, a matriz contém glicosaminoglicanos combinados por covalência com proteínas, formando proteoglicanos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). As glicosaminoglicanas presentes na cartilagem são condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, queratam-sulfato tipo II e ácido hialurônico (GARTNER e HIATT, 2007).

Os glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídeas longas, negativamente carregadas, em forma de bastão, formadas por unidades de dissacarídeos que se

repetem e têm a capacidade de se ligar a grandes quantidades de água. Os proteoglicanos constituem uma família de macromoléculas; sendo que cada um é constituído por uma proteína central à qual se ligam, covalentemente, glicosaminoglicanos (GARTNER e HIATT, 2007).

Por outro lado, os condrócitos, formados a partir de células mesenquimais indiferenciadas, são responsáveis por sintetizar a matriz cartilaginosa (BUCKWALTER et al., 2005). São células secretoras de colágeno, principalmente do tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas, como a condronectina, uma macromolécula com sítios de ligação para os condrócitos, fibras colágenas tipo II e glicosaminoglicanos, participando, assim, da associação do arcabouço macromolecular da matriz com os condrócitos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). A habilidade das células em aderir aos componentes da matriz extracelular é mediada em grande parte por glicoproteínas adesivas às células (GARTNER e HIATT, 2007).

A matriz contém cerca de 70 a 80% de água, ligada aos proteoglicanos (BURR, 2004). Macroscopicamente, a cartilagem articular é brilhante, lisa, branca e semi-rígida (SCHILLER e TEITELBAUM, 2002). Microscopicamente, a cartilagem articular divide-se em várias zonas: superficial, intermediária e mais profunda, sendo esta última ancorada ao osso subcondral (ALLAN et al., 2007).

A homeostase da cartilagem articular é alcançada graças a complexa interação entre a mecânica da articulação, fatores de crescimento, hormônios e envelhecimento (BUCKWALTER et al., 2005). No tecido adulto normal, ela é balanceada de forma a não haver nem perda, nem ganho de tecido. Estes processos são controlados por variedade de proteínas denominadas de fatores de crescimento e citocinas (PELLETIER et al., 1993).

### **2.1.2 Reparo espontâneo da cartilagem articular**

A reparação e a regeneração da cartilagem articular são processos completamente distintos e precisam ser adequadamente compreendidos. A reparação da cartilagem conduz a um tecido que partilha semelhanças estruturais com a cartilagem articular hialina no que diz respeito ao seu aspecto macroscópico ou tipo celular. No entanto, este tecido de reparação não forma a organização de

fibras em forma de arco, nem apresenta as zonas de estratificação bem definidas onde estão os condrócitos (HUNZIKER, 2002). As razões para a ineficiência da resposta reparadora após o dano inclui a inabilidade dos condrócitos em migrar ao local da injúria, a natureza avascular da cartilagem, e a ausência do coágulo de fibrina (MITHOEFER, 2013).

O tecido de reparo, em sua composição bioquímica é mais semelhante a um tecido fibroso do que à cartilagem hialina, e a sua competência mecânica é significativamente inferior àquela da cartilagem sadia. Assim, a cartilagem hialina nativa não é restabelecida neste processo de reparação (CAPLAN et al., 1997). Em contraste, a regeneração da cartilagem é definida como a restituição da cartilagem articular em sua condição original aos níveis histológico, bioquímicos e biomecânicos, tornando-se indistinguível da cartilagem sadia. Vale ressaltar que, em contraste com a reparação, a pronta regeneração dos tecidos ocorre apenas em embriões, sendo quase ausente em recém-nascidos e nunca observada em adultos (CAPLAN e GOLDBERG, 1999).

Na osteoartrite, a capacidade de reparação de cartilagem articular está comprometida. As lesões são geralmente extensas, o que não permite preenchimento suficiente do defeito (HUNZIKER, 2002). Assim, a deterioração da cartilagem permanece irreparável e progride ao longo do tempo (ORTH et al., 2014).

## **2.2 Osteoartrite**

### **2.2.1 Definição de osteoartrite**

A Osteoartrite (OA), também denominada doença articular degenerativa ou osteoartrose, pode ser definida, em termos patológicos, como a reparação aberrante e eventual degradação da cartilagem articular em associação com alterações no metabolismo ósseo subcondral periarticular, osteofitose, e um grau variável de inflamação sinovial (INNES, 2011). Segundo Mortellaro (2003), é caracterizada pela degeneração da cartilagem articular, com perda de matriz, fibrose, e formação de fissuras, e pode resultar em perda total da superfície articular.

### 2.2.2 Causas de osteoartrite

A OA é a forma mais comum de artrite em cães e gatos. Embora dados epidemiológicos consistentes sejam escassos, estima-se que aproximadamente 20% dos cães adultos estejam afetados (JOHNSTON,1997) e, segundo Hardie et al. (2002), mais de 90% dos gatos geriátricos mostraram evidência radiográfica da condição no esqueleto apendicular. Segundo Moore et al. (2001), a OA é a causa mais comum de dor crônica em cães, afetando aproximadamente 10 a 12 milhões de cães nos Estados Unidos. Em seres humanos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2002), a OA é a quarta principal causa de dor incapacitante no mundo. Para Lawrence et al. (2008), com relação à medicina ortopédica, a OA é a doença articular crônica mais incapacitante no mundo, sendo que apenas nos Estados Unidos, afeta 27 milhões de pessoas.

A OA pode ser classificada como primária ou secundária, dependendo da causa. A OA primária é um distúrbio do envelhecimento, no qual há degeneração cartilaginosa por razões desconhecidas. A OA secundária ocorre em resposta às anormalidades que causam instabilidade articular, sobrecarga, ou em resposta a outra afecção articular já reconhecida, como por exemplo uma infecção ou inflamação imunomediada (SCHULZ, 2008). A etiologia da OA em uma articulação isolada pode ser obscura; no caso de OA idiopática, e mais ainda no caso da osteoartrite secundária, a complexidade da condição se estende bem além da identificação de sua causa (INNES, 2011). Em seres humanos, OA idiopática generalizada é comum, e predisposição genética tem sido apontada (KELLGREN et al., 1963 apud INNES, 2011). Entretanto, devido a prevalência da OA em seres humanos e sua heterogeneidade clínica evidente, a causa genética precisa é difícil de definir. Além disso, está claro que múltiplos fatores genéticos podem contribuir para a incidência e severidade da doença, inclusive de acordo com a articulação afetada, sexo e raça (VALDES et al., 2008).

A idade também parece influenciar a susceptibilidade à OA, posto que o avanço cronológico da idade afeta a estrutura dos tecidos das articulações. Os condrócitos sintetizam moléculas de agrecana menos uniformes e menores proteínas de ligação funcionais, suas atividades mitótica e sintética diminuem, e sua

capacidade de resposta aos estímulos mecânicos anabólicos, bem como aos fatores de crescimento diminuem (MARTIN e BUCKWALTER, 2003).

O peso corporal parece aumentar o risco de algumas causas de início da OA, como a displasia coxofemoral. Van Hagen et al. (2005) relataram que, em uma ninhada de Boxers, o alto peso ao nascer mostrou-se associado ao aumento do risco à displasia coxofemoral. Já Whitehair et al. (1993) descreveram que o risco de ruptura do ligamento cruzado cranial aumenta em cães com maior peso corporal, duas condicionantes da OA secundária. Da mesma forma, para Lauten (2006), a obesidade e o sobrepeso são fatores de risco para a OA bem definidos na literatura.

A ruptura do ligamento cruzado cranial é uma das causas mais frequentes de OA na articulação do joelho (LEVINE et al., 2013) e, infelizmente, as reconstruções cirúrgicas não desaceleram a progressão da OA, pois mais de 50% dos pacientes desenvolvem OA no joelho reconstruído (LOHMANDER et al., 2004).

Fatores ambientais que podem contribuir para o risco ou para progressão da OA canina incluem variáveis como: nutrição, exercícios e condições de habitação. No entanto, poucos estudos têm explorado os efeitos dos fatores ambientais sobre o desenvolvimento ou a progressão da OA canina (INNES, 2011). Van Hagen et al. (2005) sugeriram que criadores de raças predispostas a OA de quadril deveriam manter os filhotes em pisos não escorregadios. Uma vez que tais condições estão intimamente relacionadas com o aumento da carga mecânica na articulação e, presume-se, que em grande parte, a OA é induzida pela tensão mecânica acumulada (HAYAMI et al., 2004). Várias artropatias podem desencadear a OA secundária, como a displasia coxofemoral, sendo uma das doenças ortopédicas mais comumente diagnosticadas em cães (DASSLER, 2003), e ainda, osteocondrite dissecante (MARTINEZ et al., 1997), não união do processo ancôneo (FOX et al., 1996) e luxação de patela (REMEDIOS et al., 1992).

### **2.2.3 Fisiopatologia da osteoartrite**

A fisiopatologia da OA envolve mudanças em todos os tecidos da cavidade articular. São observadas alterações no metabolismo e na morfologia da cartilagem articular, mudanças drásticas no metabolismo e arquitetura do osso subcondral,

formação de osteófitos e enteseófitos, inflamação sinovial e fibrose. O tecido perde rigidez à compressão e a resistência à tração, e a superfície se torna propensa a fibrilação. Com o avanço da doença, o tecido da cartilagem perde-se e surgem erosão e ulceração (INNÉS, 2011).

No geral, o processo fisiopatológico da osteoartrite pode ser dividido em três fases que se sobrepõem: no início, a matriz extracelular degrada em um nível molecular, o teor de água aumenta, o tamanho das moléculas de agrecano dentro do tecido diminui (LARK et al., 1997) e a estrutura da rede de colágeno é danificada, o que leva a redução da rigidez da cartilagem. Na segunda fase, os condrócitos tentam compensar este dano por meio do aumento na proliferação e em sua atividade metabólica, pela da formação de *clusters* celulares formados por clonagem, aparecendo rodeados por moléculas da matriz recém sintetizadas. Esta condição pode permanecer por vários meses a anos. Na terceira fase, os condrócitos são incapazes de manter a sua atividade de reparação com a consequente perda completa do tecido cartilaginoso (INNÉS, 2011). Além disso, há a hipótese de que ocorra reversão dos condrócitos ao estado indiferenciado ou imaturo. A progressão da OA é provavelmente atribuível à ação de moléculas de sinalização, tais como citocinas pró-inflamatórias que induzem a produção de enzimas de degradação da matriz enquanto suprime a síntese de matriz (AIGNER et al., 2007).

#### **2.2.4 Tratamentos para a osteoartrite**

Existem muitos tratamentos para a OA, mas a maioria deles tem como objetivo o alívio dos sintomas, e ficam aquém de proporcionar reparo biológico a longo prazo. O alívio dos sintomas pode ser obtido com uso de analgésicos, perda de peso, fisioterapia, entre outros (MOLLON et al., 2013).

Algumas evidências indicam que a redução da obesidade em cães com sinais clínicos de OA pode levar a melhora nas consequências manifestas no quadro clínico tais como claudicação (BUCKWALTER et al., 2005) e vários estudos em seres humanos mostram que o tratamento do sobrepeso e obesidade pode abrandar os sintomas (MESSIER, 2008).

As medicações usadas no tratamento para a OA tem o escopo de tratar os sintomas e incluem os chamados fármacos sintomáticos ou agentes modificadores estruturais (HOCHBERG et al., 1997). A primeira categoria tem como objetivo o alívio da dor, e a segunda categoria são designadas a retardar, parar ou reverter as alterações patológicas que ocorrem nos tecidos articulares. A primeira categoria inclui anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais, analgésicos como amantadina, gabapentina, opióides. Já na segunda categoria, também considerados nutracêuticos, estão os glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina, ácidos graxos essenciais, e antioxidantes (INNES, 2011). Estes compostos claramente promovem alívio da dor, e alguns estudos observaram evidências de que eles podem levar a alguma mudança estrutural na cavidade articular (HENROTIN et al., 2005). Entretanto, ainda há controvérsias quanto aos benefícios que os nutracêuticos proporcionam aos pacientes acometidos por OA (OWENS et al., 2004; WANDEL et al., 2010).

Outras modalidades terapêuticas incluem os tratamentos cirúrgicos como a condroplastia artroscópica, que visa retirar os fragmentos de cartilagem soltos na cavidade articular e que alivia a dor, mas não leva à regeneração, nem altera a progressão da OA (WIDUCHOWSKI et al., 2008); microfraturas, que estimulam o crescimento da fibrocartilagem; implantes de enxertos osteocondrais; mosaicoplastia; e na área de engenharia celular, o transplante autólogo de condrócitos (BEDI et al., 2010).

A artroplastia com próteses metálicas pode ser um recurso para substituir articulações severamente danificadas. Mas apesar de promover boa qualidade de vida, não é apropriada para indivíduos jovens, pois há risco de falha do implante ao longo dos anos e limitações funcionais impostas pela prótese, que podem dificultar determinadas atividades do indivíduo (MOLLON et al., 2013).

O tratamento ideal repousa no restabelecimento das propriedades de deslizamento da cartilagem e da habilidade de resistência ao desgaste dos componentes articulares, ao longo do tempo, algo que só pode ser alcançado com o repovoamento da falha tecidual com condrócitos capazes de produzir matriz hialina. Tal tratamento teoricamente melhoraria a mecânica da articulação e reduziria a progressão da osteoartrose. Assim sendo, e de acordo com alguns autores, a

esperança reside na evolução da engenharia de tecidos (MOLLON et al., 2013), mas, principalmente, na engenharia do tecido cartilaginoso e, imprescindivelmente, da produção de grande número de condrócitos capazes de produzir cartilagem hialina. Infelizmente, a fonte de células condrogênicas é o principal fator limitante para tal técnica, devido a baixa celularidade, pois apenas pequeno número de condrócitos autólogos pode ser colhido do indivíduo. Diante de tais dificuldades, outras inúmeras fontes de condrócitos tem sido pesquisadas tais como o cultivo de condrócitos, células induzidas à pluripotência (iPs), células tronco mesenquimais, e células- tronco embrionárias (MIKOS et al., 2006).

### **2.3 Células-tronco mesenquimais**

A terapia celular é uma forma de terapia biológica, que envolve o processo de introduzir novas células em tecidos morfofuncionalmente danificados, sendo apontada como alternativa revolucionária nos tratamentos de doenças especialmente degenerativas e relacionadas com a idade, e que se revela, atualmente, como sendo área promissora associada à engenharia tecidual, denominada medicina regenerativa (MOBASHERI et al., 2014).

Uma célula-tronco é um tipo especial de célula, que tem capacidade única de se renovar e de dar origem a tipos celulares especializados. A maioria das células do corpo, tais como células do coração ou células da pele, está empenhada em realizar uma função específica, já uma célula-tronco é independente e permanece desta forma, até que receba um sinal para desenvolver-se em uma célula especializada. Sua capacidade proliferativa combinada com a capacidade de tornar-se especializada demonstram que estas células apresentam potenciais únicos (BUCH, 2001).

As células-tronco podem ser classificadas segundo sua potencialidade: totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As totipotentes são as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero (SCHWIND et al., 2005); As pluripotentes são aquelas originadas das células internas do blastocisto, e originam centenas de tecidos que compõe o indivíduo, e são chamadas de células-tronco embrionárias (ZATZ, 2004). As



multipotentes são aquelas capazes de originar apenas um subgrupo de linhagens celulares (SCHWIND et al., 2005).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco multipotentes e não hematopoiéticas. A existência de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea foram descritas pela primeira vez na medula óssea por Friedenstein et al., em 1966. Eles encontraram, em uma cultura de células da medula óssea, uma população de células aderidas ao plástico em forma de fuso, semelhantes a fibroblastos. Também observaram em estudos posteriores que essas células possuíam capacidade para se diferenciar em colônias que lembravam pequenos depósitos de osso ou cartilagem (FRIEDENSTEIN et al., 1987).

Subsequentemente aos achados de Friedenstein e seus colaboradores, Pittenger et al. (1999) comprovaram que as CTM eram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos, por meio da manutenção das mesmas em condições favoráveis e sob a ação de estímulos específicos. Para os supracitados autores, tal achado significava uma chave para compreensão adicional da existência de células progenitoras de múltiplos tipos celulares, e uma injeção de estímulo na busca de novas terapias na regeneração de tecidos lesionados.

Além do mais, tem sido verificado que as CTM podem ser isoladas de inúmeras fontes tais como medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo, membranas fetais, líquido amniótico e músculo esquelético e outros numerosos tecidos de adultos (CARRANCIO et al., 2008). De acordo com Parker e Katz (2006), atualmente, as CTM derivadas da medula óssea e tecido adiposo são aquelas melhor estudadas e caracterizadas. Porém, a facilidade no acesso, obtenção, simplicidade no processamento e na quantidade de células obtidas fazem do tecido adiposo uma fonte elegível se comparada à medula óssea (TONCHEV et al., 2010).

Corroborando com esta assertiva, González et al. (2009) ressaltam que por muitos anos, as CTM derivadas da medula óssea foram consideradas como principal matéria prima para ensaios em engenharia tecidual, entretanto, a coleta destas células é considerada dolorosa e além disso, rende baixo número de CTM (LOCKE et al., 2009).

Para ser considerada uma célula-tronco mesenquimal, a Sociedade Internacional de Terapia Celular, listou os principais pré-requisitos, os quais são:

adesão em cultivo de monocamadas, diferenciação em condrócitos, osteócitos e adipócitos *in vitro*, e a presença ou ausência de determinados marcadores de superfície (DOMINICI et al., 2006). Os marcadores que devem estar presentes incluem CD73, CD90 e CD105, enquanto que os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 devem estar ausentes, ou serem negativos (CSAKI et al., 2007).

Ao longo dos últimos anos, a terapia com CTM, com vistas à regeneração da cartilagem tem ganhado popularidade devido a inúmeras razões, como a habilidade das CTM em se diferenciar em tecido conectivo incluindo a cartilagem hialina, além da facilidade de obtenção das mesmas em vários tecidos. Ademais, quando comparada ao transplante autólogo de condrócitos, não gera morbidade ao local doador, e tem capacidade expansão e proliferação mais intensa se comparados (LEE et al., 2012). Adicionalmente a estas características, estudos já demonstram seus efeitos parácrinos e imunomodulatórios, que influenciam favoravelmente células residentes e ainda não afetadas (AGGARWALL e PITTENGER, 2005; CAPLAN e DENNIS, 2006; MAGGINI et al., 2010;).

Além do exposto, Kim et al. (2010) asseveram que as CTM apresentam habilidade em promover a regeneração da cartilagem pois liberam fatores condrogênicos biologicamente ativos, como o fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 e a proteína morfogenética óssea-4. Neste mesmo diapasão, inúmeras publicações são encontradas referentes a distúrbios articulares tratados com CTM, tanto em ensaios experimentais de defeitos condrais (LEE et al., 2007; YAMAZOE et al., 2007; KOGA et al., 2008; STECK et al., 2009; GUO et al., 2010; MOKBEL et al., 2011; ZHANG et al., 2011), osteoartrite experimental (MURPHY et al., 2003; GRIGOLO et al., 2009; TOGHRAIE et al., 2011; SATO et al., 2012; DESANDO et al., 2013; SINGH et al., 2104; SONG et al., 2014) osteonecrose de cabeça femoral (FEITOSA et al., 2010), quanto em ensaios clínicos como: pacientes humanos portadores de osteoartrite (WAKITANI et al. 2002; VARMA et al., 2010; DAVATCHI et al., 2011; EMADEDIN et al., 2012; OROZCO et al., 2013; WONG et al., 2013; JO et al., 2014; KOH et al., 2014), cães portadores de osteoartrite (BLACK et al., 2007; BLACK et al., 2008; GUERCIO et al., 2012; VILLAR et al., 2013), osteonecrose de cabeça femoral (PAK, 2012), defeitos condrais (HALEEM et al., 2010; KASEMKIJWATTANA et al., 2011; LEE et al., 2012), pseudoartrose (GIANNOTTI et

al., 2013), e ainda revisões sistemáticas sobre a terapia com CTM em defeitos condrais e OA, como potencial fonte de reparo para a cartilagem (CSAKI et al., 2008; MOBASHERI et al., 2009; HOLLANDER et al., 2010; PASTIDES et al., 2013; PEETERS et al., 2013; ORTH et al., 2014).

Apesar do avanço das pesquisas avaliando a utilização das CTM em defeitos condrais e OA, para Desando et al. (2013) dados funcionais sobre a ação das CTM derivadas do tecido adiposo no tratamento da OA ainda são escassos. Até a presente data, não há consenso se há regeneração articular e/ou efeitos imunomodulatórios (JORGENSEN, 2010; DESANDO et al., 2013), uma vez que estes promovem diminuição da dor e melhora no desempenho locomotor (PAK, 2012). De outra parte, outros questionamentos levantados, apontam sobre qual a melhor fonte tecidual de CTM para tratar a OA (MOBASHERI et al., 2014; VAN BUUL et al., 2014), qual número mínimo celular para se obter uma melhora clínica e qual número de aplicações necessárias (DESANDO et al., 2013) qual método de aplicação é mais eficiente e se há necessidade de um biomaterial associado a esta terapia, sendo que o estágio da OA ou do defeito condral seja crucial nesta decisão (NOTH et al., 2008; KOH et al., 2014; MOBASHERI et al., 2014), e ainda se as passagens celulares e expansões clonais são capazes de alterar a integridade genômica das CTMs (FROELICH et al., 2013). Devido a isto, para Parekkadan e Milwid (2010), mais pesquisas são necessárias para ajudar a entender desde a biologia básica das CTMs até seus efeitos terapêuticos.

## **2.4 Plasma rico em plaquetas**

O plasma rico em plaquetas (PRP) é definido como uma concentração autóloga de plaquetas em pequeno volume de plasma (MARX, 2001), e é considerado uma terapia regenerativa emergente para injúria tecidual e degeneração (NGUYEN et al., 2011).

O PRP foi descrito pela primeira vez em 1997, por Whittman et al., para reparação de tecidos na cirurgia maxilo-facial. O PRP é também conhecido como plasma autógeno de plaquetas, plasma rico em fatores de crescimento, plasma

enriquecido com plaquetas, concentrado de plaquetas e gel de plaquetas (FOSTER et al., 2009).

O PRP é uma forma simples e eficiente de se obter alta concentração de fatores de crescimento através da separação de plaquetas do sangue total, e o mesmo habilita a liberação local e progressiva destes fatores de crescimento e proteínas, promovendo propriedades únicas para remodelamento tecidual, cicatrização e promoção da angiogênese (ANITUA et al., 2006).

A obtenção do PRP é relativamente simples e não onerosa. Consiste, basicamente, em centrifugações do sangue total. Após a primeira centrifugação, poderá ser observado o plasma sobrenadante, os primeiros 50% desse plasma correspondem ao plasma pobre em plaquetas, sendo descartado junto com a zona de névoa e o restante das hemácias. O correspondente aos outros 50% do plasma deverão ser novamente centrifugados, e poderá ser observado novamente o plasma sobrenadante e ao fundo as plaquetas que precipitaram. O plasma deverá ser novamente separado e a solução restante agitada e pipetada, se obtendo com esse procedimento o PRP (FOSTER et al., 2009).

As plaquetas são as primeiras células que alcançam o local da injúria e apresentam considerável reserva de fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras. Esta combinação de agentes bioativos pode mediar o processo de recuperação dos tecidos (VELNAR et al., 2009).

Cada plaqueta carrega aproximadamente de 50 a 80  $\alpha$ -grânulos, os quais são liberados durante a ativação plaquetária (FROJMOVIC e MILTON, 1982). Este conteúdo contém centenas de proteínas solúveis, que são os chamados fatores de crescimento: fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF $\alpha$  e  $\beta$ ), fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), e fator de crescimento fibroblástico (FGF). Entre os fatores de crescimento, o PDGF e TGF- $\beta$ 1 têm sido reportados como sendo os mais importantes no processo de cicatrização através do aumento da proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (MCCARREL e FORTIER, 2009), que juntamente com o IGF são apontados como estimulantes da diferenciação, proliferação e migração de CTMs (ELDER e THOMASON, 2014).

A presença de fatores de crescimento em abundância no PRP estimula a produção de proteoglicanos pelos condrócitos (GAISSMAIER et al., 2008). Os benefícios da aplicação do PRP intra-articular refletem-se na diminuição dos sinais clínicos associados à OA. Há redução da claudicação e da efusão sinovial, o principal sinal relatado pela literatura é a redução significativa da dor articular (EL-SHARKAWY et al., 2007). Neste sentido, pesquisas com uso do PRP para o tratamento de lesões em cartilagem articular têm sido publicadas desde 2010 (KON et al., 2013), e a eficácia deste tratamento é interesse dos ortopedistas pelo seu potencial regenerativo, comparado às terapias convencionais (CHANG et al., 2014). Filardo et al. (2013) fortalecem este interesse afirmando que a literatura recente apresenta dados recentes do uso do PRP em cartilagem degenerada (FILARDO et al., 2013). Para Smyth et al. (2013), o PRP se apresenta como um potente estimulante biológico para tecidos lesionados com baixo potencial de recuperação, como a cartilagem, especificamente no tratamento da OA e lesões condrais.

A injeção intra-articular do PRP atua não apenas na cartilagem especificamente, ela também pode influenciar em todo o ambiente articular, e alguns estudos *in vitro* confirmam este efeito em outras fontes celulares como as CTM, onde as duas fontes agem sinergicamente para a regeneração tecidual. Esta atividade “quimioatrativa” do PRP pode contribuir para o recrutamento de outros tipos celulares, que irão migrar aos tecidos danificados, e assim, estimulando a resposta ao reparo (KRUGER et al., 2012). Estudos como de Moroz et al. (2013) alertam para esta característica. Os autores observaram que o lisado plaquetário utilizado como arcabouço no cultivo de CTMs promove a formação de células de formato arredondado, acumuladas em lacunas, com deposição típica de matriz extracelular por condrócitos, concluindo que este arcabouço plaquetário é capaz de estimular as CTM a se diferenciarem em condrócitos. Com experimentos semelhantes, Mifune et al. (2013); Hildner et al. (2013); Drengk et al. (2009); Zaky et al. (2008) observaram que o PRP promoveu alta taxa de proliferação, adesão e migração de CTM durante o cultivo em diferenciação condrogênica, e Mishra et al. (2009) documentaram este mesmo comportamento celular e ainda relataram que o marcador condrogênico molecular SOX9 se apresentava aumentado.

Ball et al. em 2012, afirmaram que as CTMs expressam abundantes receptores dos fatores de crescimento plaquetários PDGF $\alpha$  e PDGF $\beta$ . No ano de 2012, os mesmos autores, demonstraram que os fatores de crescimento presentes no PRP atuam como veículo e são possíveis potencializadores dos efeitos das CTM. Nesta linha de raciocínio, alguns pesquisadores utilizaram o PRP como veículo para a aplicação das CTM em cães portadores de OA (GUERCIO et al., 2012; VILAR et al., 2013), e em humanos portadores osteonecrose femoral (PAK, 2012).

Kon et al. (2013), apesar de concordar com os potenciais benefícios do PRP, destaca que os resultados apresentados na literatura são muitas vezes contraditórios, principalmente em estudos clínicos, mas para Filardo et al. (2013), apesar de alguns resultados controversos, a maioria dos achados afirma que o PRP estimula a proliferação de condrócitos, sem afetar o seu fenótipo, e ainda aumenta a produção de moléculas da matriz extracelular. Estas características do PRP se comprovaram através de resultados positivos em modelos animais em estudos clínicos e pré-clínicos em lesões focais agudas de cartilagem, assim como no complexo ambiente da degeneração articular causada pela OA.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

No presente estudo pretende-se adicionar luzes às áreas de ortopedia médica e veterinária, em particular, e à medicina regenerativa, em geral, posto que a aplicação de tal conhecimento cobre diferentes espécies, fortalecendo a ampla linha de pesquisas com células-tronco e, principalmente, enriquecendo as propostas de terapias em doenças articulares degenerativas. Assim, este ensaio tem como escopo geral avaliar o potencial das células-tronco mesenquimais autólogas na regeneração da cartilagem articular do joelho de coelhos submetidos a osteoartrite experimental.

### **3.2 Objetivos específicos:**

- Obtenção, isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de coelhos;
- Monitoramento de indicadores de fenótipo das células- tronco de coelhos pela técnica de citometria de fluxo;
- Avaliação dos danos citogenéticos pelo do Teste do Cometa;
- Indução e diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de coelhos;
- Avaliações macroscópica e histomorfológica, do efeito da terapia com células-tronco mesenquimais autólogas, na regeneração da cartilagem articular do joelho de coelhos submetidos a osteoartrite experimental.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local de desenvolvimento**

O experimento foi desenvolvido junto às instituições e respectivos laboratórios que se seguem: Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), UFMS, Campus de Campo Grande (Laboratório de Técnica Cirúrgica Animal); CETROGEN (Centro de Estudos em Células-Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica), UFMS, Campus de Campo Grande, (Hospital Universitário); Hemocentro e Laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, Campus de Botucatu; Instituto de Biociências (IB), UNESP, Campus de Botucatu (Departamento de Imunologia e Departamento de Histologia); Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica, da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), UNESP, Campus de Botucatu.

A metodologia e os aspectos éticos e legais, propostos na consecução do presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual

Paulista (UNESP) – Jaboticabal em reunião no dia 07 de dezembro de 2012, sob protocolo 027839/12.

#### 4.2 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos ou fêmeas, com peso entre 3,0 e 4,0 kg, provenientes de criatório particular localizado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Os coelhos foram mantidos em baias, alojados em dulpa, com oferta de ração comercial apropriada para a espécie e água “*ad libitum*”. As referidas baias eram providas de “ninhos” e “tocas” para enriquecimento ambiental e conforto dos animais.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em quatro grupos experimentais, constituídos de seis coelhos cada e denominados:

- GC (grupo controle): aplicação de solução salina, no volume de 0.5 mL, por via intra-articular;
- GPRP (grupo plasma rico em plaquetas): aplicação de PRP, no volume de 0.5 mL, por via intra-articular;
- GCTM (grupo células tronco mesenquimais autólogas indiferenciadas): aplicação de células-tronco mesenquimais autólogas indiferenciadas, suspendidas em 0.5 mL de PRP, por via intra-articular;
- GCTMdif (grupo células tronco mesenquimais autólogas diferenciadas em condrócitos): aplicação de células-tronco mesenquimais autólogas diferenciadas em condrócitos, suspendidas em 0.5 mL de PRP, por via intra-articular;

Foram feitas uma aplicação por animal, em cada joelho direito, após quatro semanas da indução da osteoartrite. Para o procedimento, todos os animais foram anestesiados com 30 mg/kg de cloridrato de cetamina<sup>1</sup> e 5 mg/kg de xilazina<sup>2</sup> por via intramuscular. O local da aplicação da terapia foi determinado tendo como referência o espaço entre a patela e o sulco troclear, logo abaixo do ligamento patelar.

---

<sup>1</sup>Vetanarcol®- König do Brasil Ltda- SP-Brasil

<sup>2</sup> Kensol®- König do Brasil Ltda- SP-Brasil



### 4.3 Indução da osteoartrite

O método de indução da osteoartrite foi realizado conforme modelo de Kikuchi et al. (1998). Para o procedimento, os coelhos foram anestesiados conforme descrito acima. Foi realizada a tricotomia e a anti-sepsia do joelho direito e conduzida a aplicação de colagenase<sup>3</sup>. A solução foi preparada com 2 mg de colagenase em 0,5 mL de PBS estéril<sup>4</sup>. Para a aplicação da solução, os coelhos foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o joelho direito foi semiflexionado, a patela foi localizada e fixada entre os dedos do aplicador. A seguir, foi feita a aplicação intra-articular utilizando-se de uma seringa de insulina com agulha 13 x 4,5 tendo-se como referência o espaço entre a patela e o sulco troclear, imediatamente caudal ao ligamento patelar, acima da tuberosidade tibial. Ao término da recuperação anestésica, os animais foram mantidos em suas baias, com livre movimentação. Após quatro semanas da indução da osteoartrite, cada animal de cada grupo recebeu uma aplicação do tratamento previamente estabelecido.

### 4.4 Protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas

O PRP foi preparado conforme protocolo de Vendramin et al. (2006). Colheram-se, por venipunção jugular, 10 mL de sangue em seringas estéreis e descartáveis banhadas em 0,6 mL de citrato de sódio a 10%<sup>5</sup>. Após a colheita, o sangue foi transferido para um tubo falcon de 15 mL. O sangue foi, então, centrifugado a 300g por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, os 2/3 superiores do sobrenadante plasmático foram removidos e transferidos para outro tubo Falcon e submetidos à nova centrifugação a 640g por 10 minutos. Ato contínuo, a porção superior do novo sobrenadante plasmático foi desprezada, até a remanescência de um volume de 0,5 mL. Assim obtido, o PRP foi ressuscitado em 0,05 mL de gliconato de cálcio a 10%<sup>6</sup> e, imediatamente, injetado na cavidade articular, autologicamente. Cabe lembrar que, para efeito de controle do número de

---

<sup>3</sup> Collagenase type II-*Clostridium histolyticum* Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>4</sup> Phosphate buffered saline- Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>5</sup> Citrato de sódio-JP® S.A Ribeirão Preto- SP-Brasil

<sup>6</sup> Gliconato de cálcio-Isofarma®- Eusébio- CE-Brasil

plaquetas injetadas na cavidade articular, recolheram-se alíquotas de 5 µL do sangue total e do PRP, de cada unidade experimental, para contagem plaquetária, através do aparelho Sysmex XT<sup>7</sup>.

## **4.5 Obtenção, expansão, diferenciação e caracterização das CTM**

### **4.5.1 Obtenção e expansão das CTM**

As células-tronco mesenquimais utilizadas neste ensaio foram extraídas do tecido adiposo. A coleta do tecido adiposo foi realizada de forma identificada de cada animal do grupo GCTM e GCTMdif. No grupo GCTM o tecido adiposo foi coletado duas semanas após a indução da OA, e no grupo GCTMdif, o tecido adiposo foi coletado duas semanas antes do dia da indução da OA, para que dessa forma, as células estivessem prontas para a aplicação nas exatas quatro semanas após a indução da OA.

O tecido adiposo foi colhido como a seguir: após quinze minutos da aplicação de cetamina<sup>1</sup> e xilazina<sup>2</sup> nas doses já previamente referidas, realizou-se tricotomia e antissepsia da região dorsal, entre as escápulas. Foi realizada anestesia infiltrativa com lidocaína<sup>8</sup> mediante quatro aplicações subcutâneas, infiltrando o anestésico lentamente, de modo linear, duas paralelamente e duas transversalmente a crista das escápulas, na dose total de 7 mg/kg. Após três minutos, com auxílio de bisturi, incizou-se a pele e procedeu-se à divulsão do tecido subcutâneo para exposição do tecido adiposo. Ato contínuo, fragmentos de tecido adiposo foram coletados e depositados em uma placa de Petri e pesados imediatamente em balança de precisão.

Aproximadamente 5 gramas de tecido adiposo foram coletados e envasados em tubo Falcon, contendo 50 mL de meio HEPES<sup>9</sup> associado a 1% da solução de Antibiótico-Antimicótico<sup>10</sup> o qual permaneceu refrigerado por 24 horas. Após este

---

<sup>7</sup> XT- Series Automated Hematology - Sysmex Corporation®- Kobe- Japão

<sup>8</sup> Xylestesin®- Cristália- São Paulo-SP- Brasil

<sup>9</sup>HEPES Sodium Salt- Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>10</sup>Antibiotic Antimycotic- Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

período, os fragmentos de tecido adiposo foram removidos do meio e lavados com PBS estéril<sup>4</sup> e recolocados em placa de Petri com meio HEPES<sup>9</sup>, na proporção de 2 mL de meio para cada grama de tecido adiposo. Então, foi adicionada a solução enzimática de Colagenase<sup>3</sup> na proporção de 2 mg de colagenase para cada mL de meio e a supracitada placa foi colocada na estufa, ou seja, em atmosfera úmida a 5% de CO<sup>2</sup> e 37° C durante 15 horas. Após essa ação enzimática, a reação foi inativada com soro fetal bovino<sup>11</sup> (SFB). O material foi centrifugado por 10 minutos a 300g, cujo sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura DMEM Knockout<sup>12</sup> suplementado com 10% de SFB. Foi retirada uma alíquota de 30 µl do *pellet* para a contagem celular em câmara de Neubauer. Em seguida, foi realizado o plaqueamento em frascos de 25cm<sup>2</sup> de área de cultura e deu-se seguimento à cultura com o meio DMEM Knockout<sup>12</sup> suplementado com 10% de SFB. As células permaneceram em estufa a 37°C, com 5% de CO<sup>2</sup>, sendo o meio de cultura trocado a cada 48h, até as células adquirirem a confluência de 80% no frasco de cultura aderente. Após atingirem a confluência estas células foram tripsinizadas em solução a 0,25% de tripsina<sup>13</sup> e contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> de área de cultura. Após a segunda passagem, as células dos animais do grupo GCTM foram contadas e aplicadas no respectivo animal, as quais eram suspendidas em PRP autólogo. Já, as células dos animais do grupo GCTMdif foram preparadas para serem diferenciadas em condrócitos.

#### 4.5.2 Diferenciação condrogênica

Após a segunda passagem, as células do grupo GCTMdif, foram contadas em câmara de Neubauer e, após o que, transferidas para um tubo falcon de 15 mL (Figura 1). O tubo, contendo as células em meio de cultura DMEM Knockout<sup>12</sup> 10% SFB, foi mantido em estufa por duas horas. Após este período, o meio foi aspirado e foi adicionado o meio de cultura STEMPRO Condrogenesis Differentiation Kit<sup>14</sup>. As

<sup>11</sup> Fetal Bovine Serum- Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>12</sup> Dulbecco's Modified Eagle's Medium Knockout - Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>13</sup> Trypsin-EDTA- Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

células permaneceram em cultura por 21 dias com trocas do meio de cultura a cada 72 horas. Após 21 dias, as células foram suspensas em PRP autólogo e aplicadas em cada animal conforme previamente descrito. Em dois animais foi coletada uma quantidade maior de tecido adiposo para que as alíquotas fossem preparadas em duplicata para avaliações histomorfológicas. Os processos de coleta e cultivo foram mantidos exatamente como descritos. Após a segunda passagem, as células foram distribuídas em dois tubos falcon contendo aproximadamente  $3 \times 10^6$  células. Em um tubo, as células foram mantidas em meio de cultura DMEM Knockout<sup>12</sup> 10% SFB, como controle, e outro tubo, mantido com o meio de cultura STEMPro Chondrogenesis Differentiation Kit<sup>14</sup>. Após 21 dias, os *pellets* foram fixados em formol tamponado a 10% por quinze minutos, mantidos em concentrações crescentes de álcool por três minutos cada, e incluídos em parafina. Em seguida foram seccionados em micrótomo cortes de 3 micrômetros, hidratados e corados com hematoxilina-eosina<sup>15</sup> (HE) e azul de toluidina<sup>15</sup>.

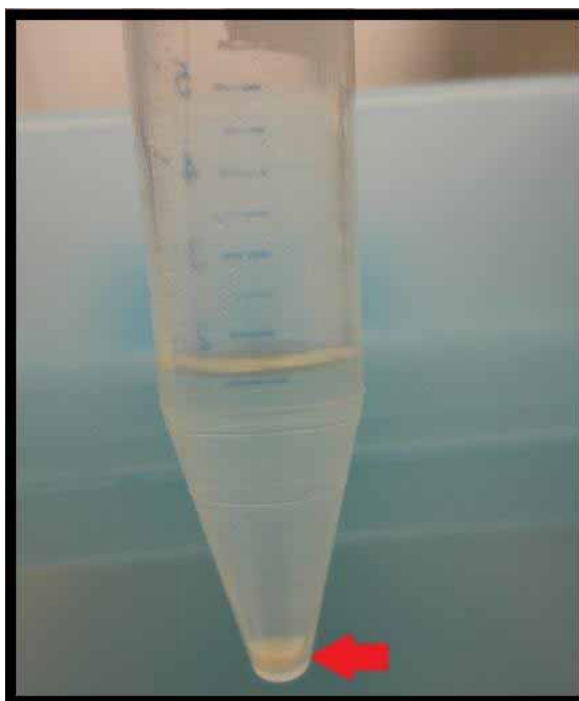


Figura 1. Registro fotográfico do sedimento de células após centrifugação a 300g. Seta vermelha indica o concentrado celular para diferenciação condrogênica. Campo Grande, MS, 2013.

<sup>15</sup> Química Especializada Erich LTDA, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>14</sup> StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

### 4.5.3 Diferenciação adipogênica e osteogênica

Após a segunda passagem, uma alíquota de  $2 \times 10^5$  células foi utilizada para a indução da diferenciação em adipócitos e osteócitos. Após a tripsinização, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços e subgrupadas em três tratamentos: meio de cultura STEMPro Adipogenesis Differentiation Kit<sup>16</sup>, meio de cultura STEMPro Osteogenesis Differentiation Kit<sup>17</sup> e meio DMEM Knockout<sup>12</sup> 10% SFB como controle.

As células permaneceram em cultura por 14 dias, cujas trocas do meio deram-se três vezes na semana. Após 14 dias, realizou-se análise dos componentes celulares, utilizando-se dos corantes *Oil Red O*<sup>18</sup> para células em diferenciação adipogênica, *Alizarin red*<sup>19</sup> para aquelas com diferenciação osteogênica, e as células controle coradas com ambos os corantes.

### 4.5.4 Ensaio de viabilidade celular

Após todas as tripsinizações recolheram-se 20  $\mu$ L de suspensão celular aos quais foram acrescentados 20  $\mu$ L de azul de trypan<sup>20</sup>. Em seguida, com auxílio de uma pipeta de Pasteur graduada, foram pipetados 20  $\mu$ L da mistura supracitada, e preenchidos ambos os retículos de uma câmara de Neubauer, limpa e desengordurada. As contagens celulares foram feitas nos quatro quadrados angulares, do referido retículo de Neubauer e, tomando-se em conta a diluição das células, dimensões dos quadrados angulares e altura da câmara de Neubauer, determinou-se o número de células, de acordo com a fórmula: Número de células = número de células viáveis/4 x 2 =  $10^4$ .

### 4.5.5 Caracterização das CTMs

---

<sup>16</sup> StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit Gibco®- Life Technologies Carlsbad

<sup>17</sup> StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>18</sup> Oil Red O®- Sigma Aldrich, /Saint Louis MO- Estados Unidos

<sup>19</sup> Alizarin Red®- ®- Sigma Aldrich, /Saint Louis MO- Estados Unidos

<sup>20</sup> Trypan Blue Stain (0,4%)- Gibco®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

Após a segunda passagem, uma alíquota de  $1 \times 10^6$  de cada animal, foi submetida à análise citométrica. A caracterização das células-tronco foi realizada pela reação antígeno anticorpo por meio do uso de anticorpos específicos. Fundamentalmente, a técnica citométrica permite a classificação e separação das distintas populações celulares com base nos seus marcadores de superfície e/ou intracitoplasmáticos, ou seja, em função dos antígenos presentes na superfície celular/intracelular e granularidade interna, e da intensidade de fluorescência. Para tanto, é necessário a existência de um fluxo hidrodinâmico para deslocamento das células, em fileira indiana e sua submissão a um feixe de luz que excite o fluorocromo ligado a um anticorpo específico. Neste ensaio as amostras foram analisadas com o concurso de um citômetro de fluxo FACS Calibur<sup>21</sup>, no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu.

Foram utilizados os anticorpos anti-*mouse* CD44<sup>22</sup>, anti-*mouse* CD90<sup>21</sup> anti-*mouse* CD105<sup>22</sup>, anti-*mouse* CD73<sup>22</sup>, e o anticorpo monoclonal anti-CD90 produzido pelo Laboratório de Pesquisa de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. A obtenção de anticorpos monoclonais foi realizada com antígenos apresentados em sua forma integral, proteínas de membrana, utilizando-se CTMs previamente isoladas de medula óssea de coelhos. O laboratório em questão seguiu rigoroso protocolo incluindo: imunização, fusão celular, *screening*, clonagem, novo *screening*, amplificação dos clones, determinação de classe e subclasse de imunoglobulina e confirmação da monoclonalidade (MOROZ, 2009).

#### 4.6 Avaliações de danos citogenéticos pelo do Teste do cometa

Foram retiradas amostras de seis garrafas de diferentes animais do grupo GCTM para a realização do teste. Após a primeira e a segunda passagem uma alíquota de  $1 \times 10^6$  foi destinada para a realização do Teste do Cometa. Após a tripsinização, cada *pellet* foi separado em um tubo Falcon, e 20  $\mu$ L de suspensão celular foi depositado com 120  $\mu$ L de agarose LMP (1,5%)<sup>23</sup>, a 37°C, em lâmina pré-

---

<sup>21</sup> BD Biosciences - San Jose, CA, Estados Unidos

<sup>22</sup> Biolegend- San Diego, CA, Estados Unidos

<sup>23</sup> Ultra pure Low Melting point agarose-Invitrogen®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

coberta com agarose normal (5%)<sup>24</sup>. Recobriu-se com lamínula de vidro e resfriou-se a 4°C, por 20 minutos. As lâminas foram imersas em solução de lise por duas horas. Em seguida, transferiu-se as células para o tampão de eletroforese, por 20 minutos, para desnaturação e, após, procedeu-se a eletroforese com tampão pH=12.0, a 4°C, por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas, secas ao ar livre e fixadas em álcool etílico absoluto, por 10 minutos. Para análise das células, as lâminas foram coradas com 100 µL do corante Sybr Green<sup>25</sup>. As preparações foram submetidas à microscopia de fluorescência<sup>26</sup> (Nikon®), no aumento de 40x. Foram contadas 50 células por lâmina, as quais foram avaliadas por intermédio do programa Comet Assay IV<sup>27</sup>.

#### 4.7 Análises macroscópicas

Decorridos sessenta dias das aplicações intra-articulares, os animais foram eutanasiados. Resumidamente, os animais foram primeiramente anestesiados com 30 mg/kg de cloridrato de cetamina<sup>1</sup> e 2 mg/kg de xilazina<sup>2</sup> por via intramuscular. Decorridos quinze minutos, foi cateterizado a veia safena de cada animal, e aplicou-se overdose intravenosa de tiopental<sup>28</sup>, seguida de 5 mL de cloreto de potássio<sup>29</sup>. Imediatamente após a eutanásia, o fêmur direito foi coletado, retirado a musculatura e cápsula articular, e designado o sulco troclear e os côndilos medial e lateral para avaliação através de escore macroscópico. O fêmur esquerdo de dois animais foi coletado para posterior utilização nas análises histológicas como controle negativo.

O aspecto macroscópico da superfície articular foi avaliado e mensurado através do escore segundo Yoshimi et al. (1994) tal qual ilustrado na Tabela 1. Esta avaliação foi realizada de forma cega.

---

<sup>24</sup> Ultra pure agarose- Invitrogen®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>25</sup> Syber Green- Invitrogen®- Life Technologies Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>26</sup> Nikon®- Melville, NY, Estados Unidos

<sup>27</sup> Comet Assay IV v4.3- Perspective Instruments®- UK

<sup>28</sup> Thiopentax®-Cristália- São Paulo-SP- Brasil

<sup>29</sup> Cloreto de potássio®- Halex Istar®- Goiânia-GO-Brasil

Quadro 1. Aspecto macroscópico da superfície articular segundo escore de Yoshimi et al (1994). Campo Grande, 2013.

Aspecto	Escore
Superfície lisa, brilhante, branca e semi-rígida	0
Irregularidades superficiais leves, cartilagem apresentando descoloração e edema	1
Defeitos de espessura e fibrilação	2
Erosão	3
Ulceração	4
Perda da cartilagem	5

#### 4.8 Análises histomorfológicas

Logo após a avaliação macroscópica, as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%. Os tecidos foram descalcificados por duas semanas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA<sup>30</sup>) a 10% e mantidos em álcool 70% por cinco dias. As porções laterais e mediais dos côndilos femorais foram selecionadas conforme a Figura 2 e foram feitos cortes de 5 micrômetros de espessura, montados em lâminas e submetidos à coloração de HE e azul de toluidina, as quais foram examinadas por meio de microscopia óptica. As amostras foram observadas e graduadas segundo Mankin escore modificado (Quadro 2). As análises e a graduação do escore foi realizada de forma cega.

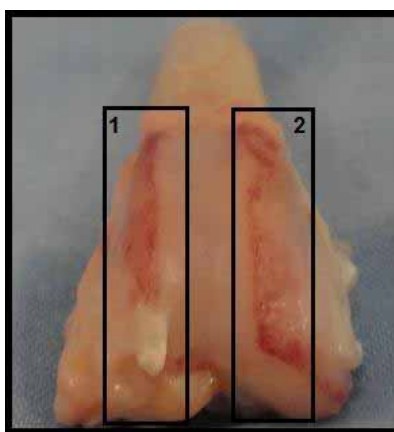


Figura 2. Registro fotográfico ilustrando a localização dos cortes realizados para preparo das lâminas histológicas. 1- porção do côndilo medial, 2- porção do côndilo lateral. Campo Grande, MS, 2013.

<sup>30</sup> EDTA Bisódico. Ecibra®. São Paulo-SP- Brasil.



Quadro 2. Escore histológico segundo Mankin et al. (1971), modificado. Campo Grande, 2013.

<b>1. ESTRUTURA</b>	
Normal	0
Irregularidades na superfície	1
<i>Pannus</i> e irregularidades na superfície	2
Fendas na zona de transição	3
Fendas na zona radial	4
Fendas na zona calcificada	5
Desorganização completa	6
<b>2. CÉLULAS</b>	
Normal	0
Hiper celularidade difusa	1
“cloning”	2
Hipocelularidade	3

#### 4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa Instat<sup>31</sup>, considerando  $p < 0,05$  como significativo. Os dados obtidos por meio dos escores macroscópico e histomorfológico foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal- Wallis seguido do teste de Dunn. Os dados obtidos por meio do ensaio do cometa foram submetidos ao teste paramétrico *T-student*. Foi realizada estatística descritiva dos dados da citometria de fluxo, contagens plaquetárias e contagens celulares das células- tronco mesenquimais.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Valores médios de plaquetas no sangue total e PRP

Todos os animais apresentaram valores médios de plaquetas dentro da amplitude referida para a espécie em questão. Assim, neste ensaio, obteve-se número médio de plaquetas, no sangue total, de  $287.16 \pm 8.89/\mu\text{L}$  e, no PRP, de  $997.42 \pm 48.01/\mu\text{L}$ . Como pode ser verificado, houve aumento acima de três vezes

<sup>31</sup> Instat® GraphPad Software- La Jolla, CA, USA

na concentração de plaquetas, na medida em que submeteu-se o sangue total à centrifugação, por duas vezes, para obtenção do PRP.

## 5.2 Obtenção e expansão das CTM

Verificou-se que após a coleta do tecido adiposo, que o processo de digestão enzimática desenvolveu-se com sucesso em todas as amostras obtidas. Após quarenta e oito horas do plaqueamento obteve-se adesão das células iniciais, em pequeno número, distribuídas em colônias dispersas, no frasco de cultura (*clusters*), até o momento em que se encontraram, formando confluência acima de 90%, momento no qual foi realizada a passagem (Figura 3). Imagens captadas em microscópio óptico invertido<sup>32</sup>.

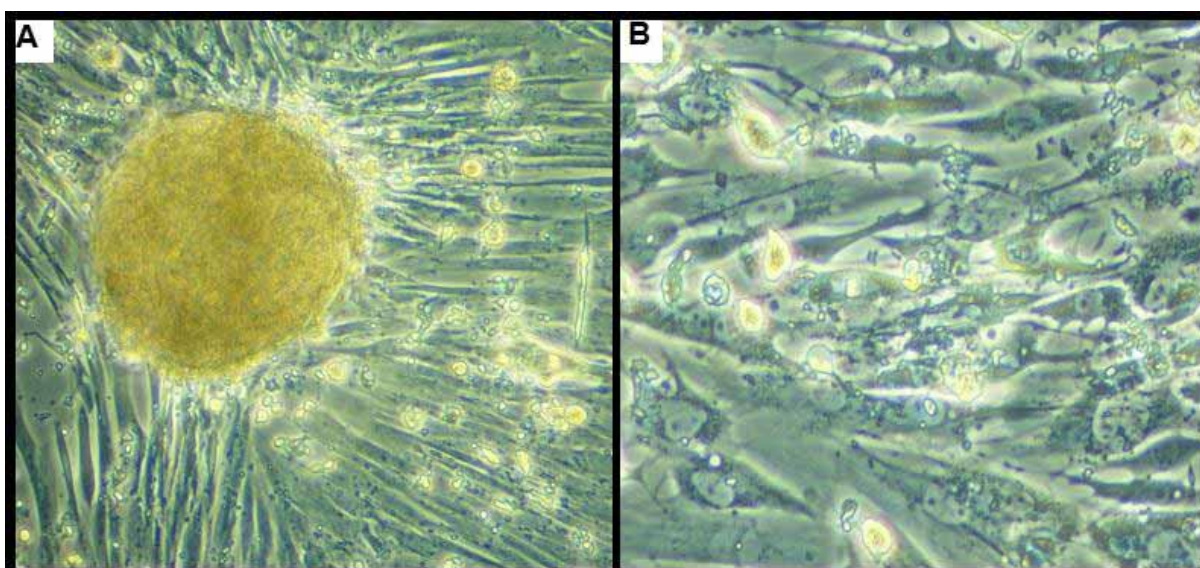


Figura 3. Ilustrações fotomicrográficas de confluência de células em cultivo. A: células em aderência e expansão, apresentando formato fibroblástico e fluorescência, e a formação de *cluster*. Aumento de 20x. B: Confluência acima de 90%. Aumento 40X. Campo Grande, MS, 2013.

## 5.3 Achados referentes à diferenciação das CTM em adipócitos, osteoblastos e condroblastos

<sup>32</sup> Axiovert 200®, Zeiss- Oberkochen, Alemanha

### 5.3.1 Diferenciação adipogênica

Após duas semanas de exposição ao meio indutor de diferenciação adipogênica, as células apresentaram a formação de vacúolos lipídicos intracelulares. Tais evidências de diferenciação estão ilustradas na Figura 4. Nas seções 4 B-D, é possível observar, após coloração pelo *Oil Red O*, grande quantidade de gotículas de gordura intracitoplasmática, positivamente corada. A seção 4 A-C apresenta as células controle (não estimuladas), que foram mantidas em meio de cultura DMEN Knockout, e não se observa a presença de vacúolos lipídicos intracelulares.

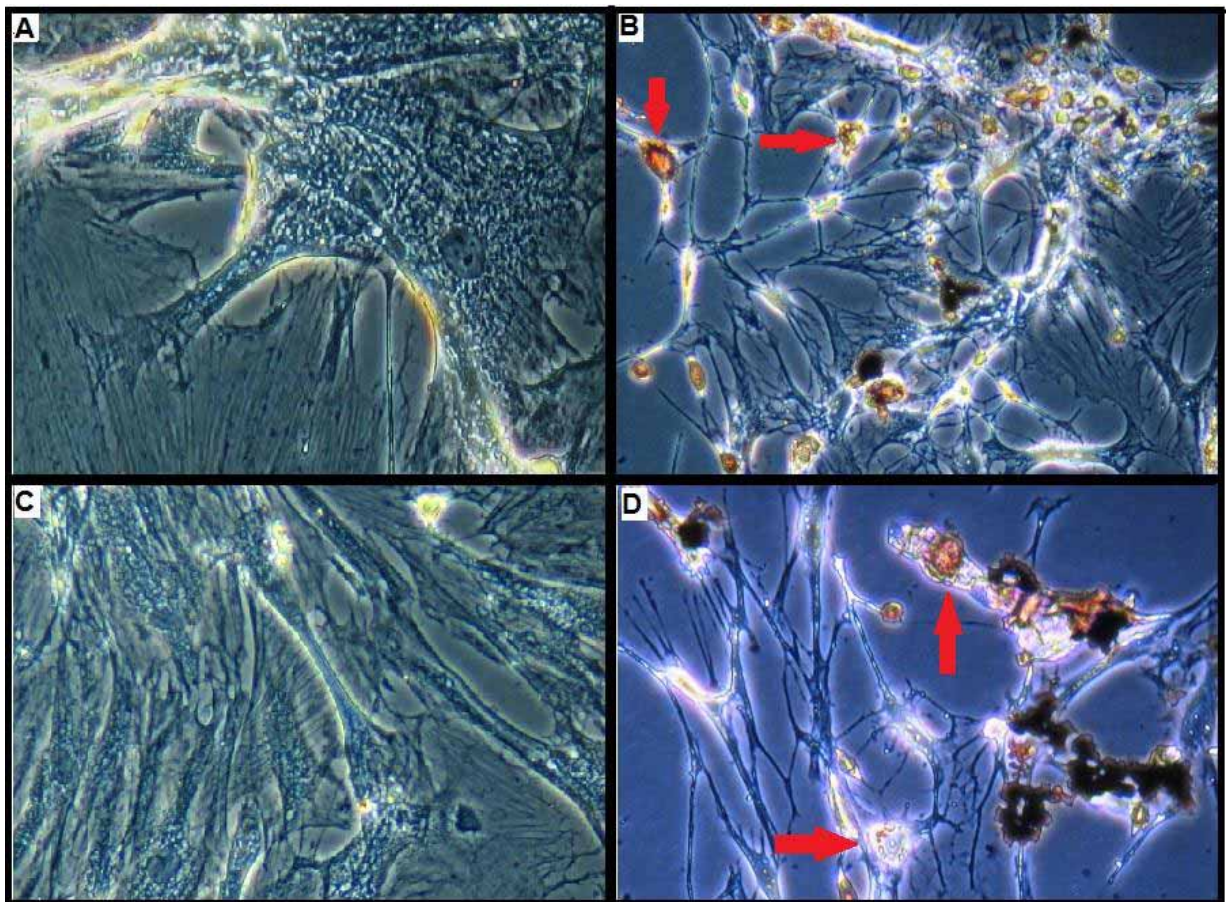


Figura 4. Seções A-C: Células controle em meio de cultura DMEN Knockout. Seções B-D: células em meio diferenciador adipogênico apresentando vacúolos lipídicos intracelulares corados em vermelho (setas vermelhas). Aumento de 40x. Campo Grande, MS, 2013.

### 5.3.2 Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica foi confirmada pela presença de deposição de matriz mineral extracelular confirmada pelo corante *Alizarin Red*. Na Figura 5, seções B-D é possível observar estes depósitos de cálcio corados em vermelho e preto, e nas seções A-C, ausência desta característica, sendo estas células mantidas como controle com o meio de cultura DMEN *Knockout*.

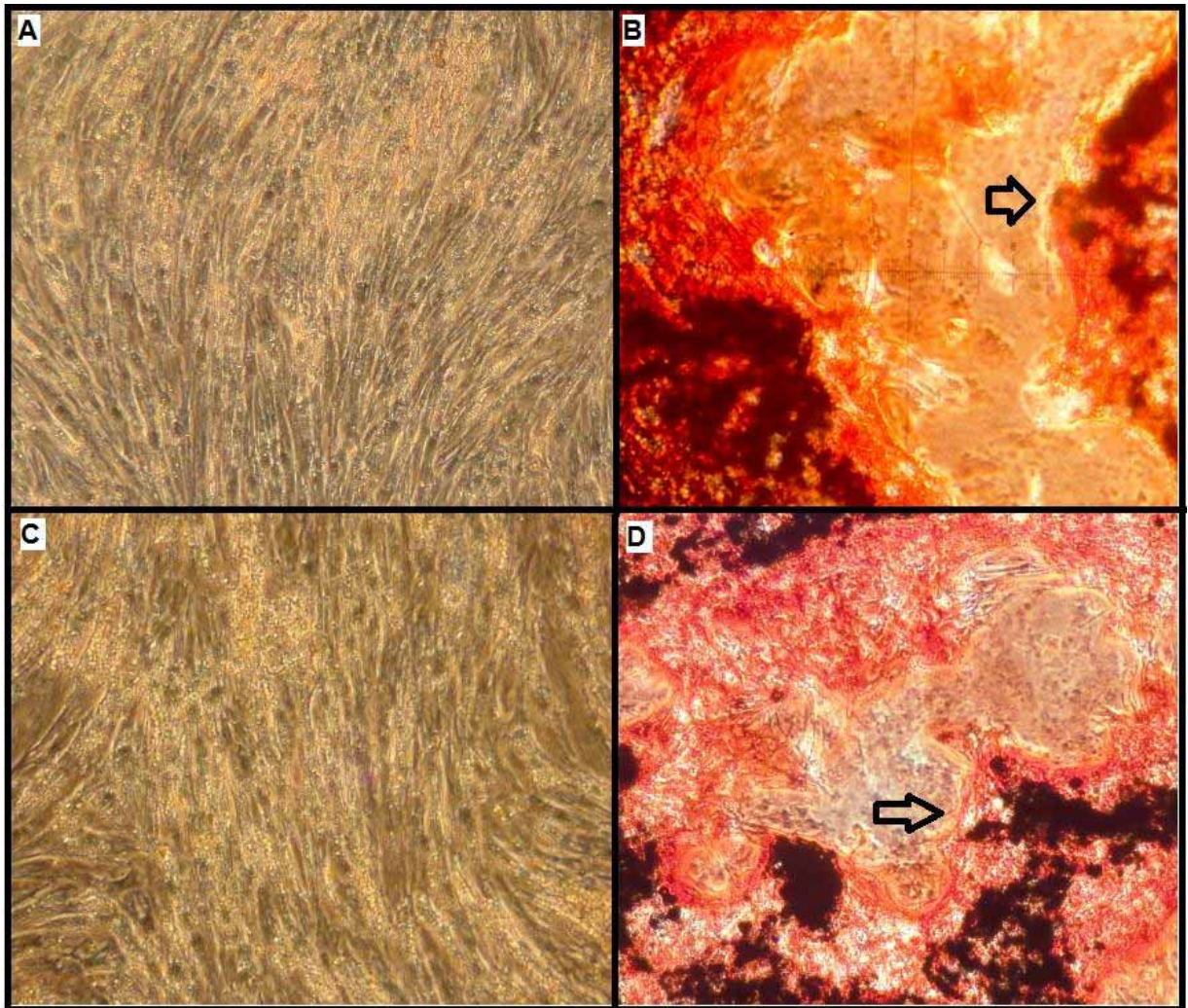


Figura 5. Seção A: Células controle mantidas em meio de cultura DMEN *Knockout*. Seções B-C: células estimuladas em meio diferenciador osteogênico e apresentando depósitos de cálcio corados em vermelho (setas pretas). Aumento de 40x. Campo Grande, MS, 2013.

### 5.3.3 Diferenciação condrogênica

Nas Figuras 6 e 7 acham-se ilustradas imagens dos *pellets* utilizados na diferenciação condrogênica e seus controles, coradas em HE e Azul de Toluidina respectivamente. É possível observar intensa produção de matriz extracelular nos *pellets* diferenciados (Figura 6-B e Figura 7-B). Nos *pellets* não diferenciados não se observa matriz, apenas células isoladas (Figura 6-A e Figura 7-A).

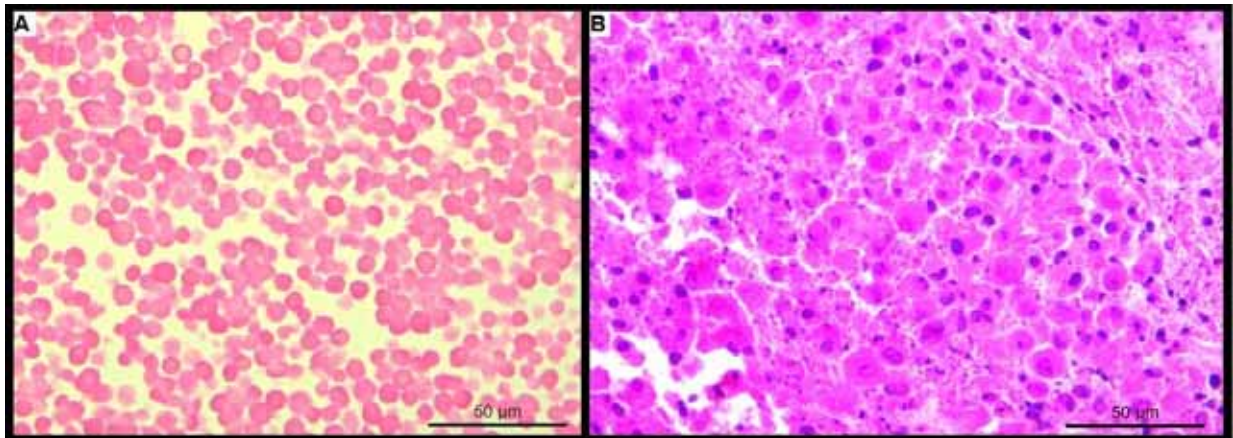


Figura 6. Diferenciação condrogênica e controle coradas em HE (Aumento de 40x). Seção A evidencia células controle mantidas em meio de cultura DMEN *Knockout*. Seção B coloca em evidência células mantidas em meio de cultura diferenciador condrogênico e revela intensa produção de matriz extracelular. Botucatu, SP, 2014.

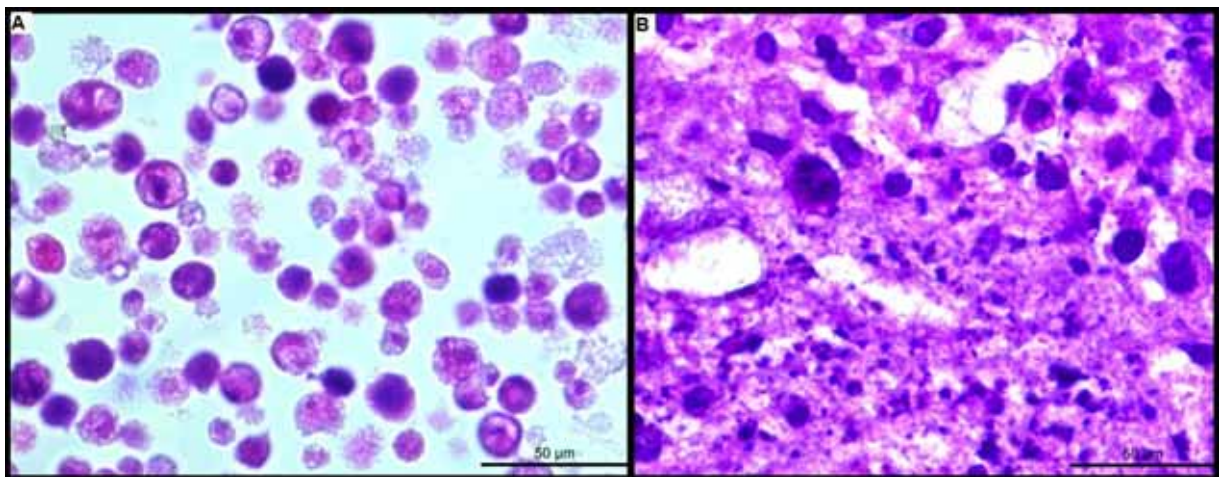


Figura 7. Diferenciação condrogênica de preparações coradas em Azul de Toluidina (aumento 100x). Seção A evidencia células controle mantidas em meio de cultura DMEN *Knockout*. Seção B evidencia células mantidas em meio de cultura diferenciador condrogênico, revelando intensa produção de matriz extracelular. Botucatu, SP, 2014.

#### 5.4 Ensaio de viabilidade celular

A quantidade média de células injetadas na cavidade articular de animais dos grupos GCTM e GCTMdif foi de  $3,79 \times 10^6 \pm 0,09$  células, cuja viabilidade previamente testada havia sido de  $96,33 \% \pm 0,38$ .

#### 5.5 Caracterização das CTM por citometria de fluxo

Nas Figuras 8 e 9 estão registrados os dados de 12 amostras correspondentes a 12 unidades experimentais ensaiadas. Para cada amostra determinou-se o padrão de autofluorescência em duplicata. O número médio de eventos por amostra girou em torno de  $14.186 \pm 0,46$  eventos.

Como pode ser observado, a Figura 8 coloca em evidência a superioridade do anticorpo monoclonal anti-CD90 *home made*. Observa-se que para apenas uma amostra/unidade experimental (animal 7) o desempenho não alcançou 100%, mesmo assim, mostrou-se francamente positivo (66,76%). O anti-CD73 apresentou resultados de imunomarcações acima de 90% em nove dos doze animais avaliados, sendo que a média de intensidade de fluorescência, nestes casos, atingiu 82,1%. Por outro lado, como pode ser apreciado na Figura 9, verifica-se que o reagente comercial anti-CD90 apresentou uma curva de desempenho mais fraca que os demais anticorpos utilizados, apresentando imunomarcagem celular negativa para todas as amostras analisadas e, por conseguinte, decorrente baixa intensidade de fluorescência da ordem de 2,99%. Os anticorpos CD 44 e CD 105 apresentaram grande variação nos resultados de imunomarcagem. Para o anti-CD44, a média da intensidade de fluorescência foi de 64,67%. Em contrapartida, para o anticorpo anti-CD105 tal intensidade foi de apenas 37,65%.

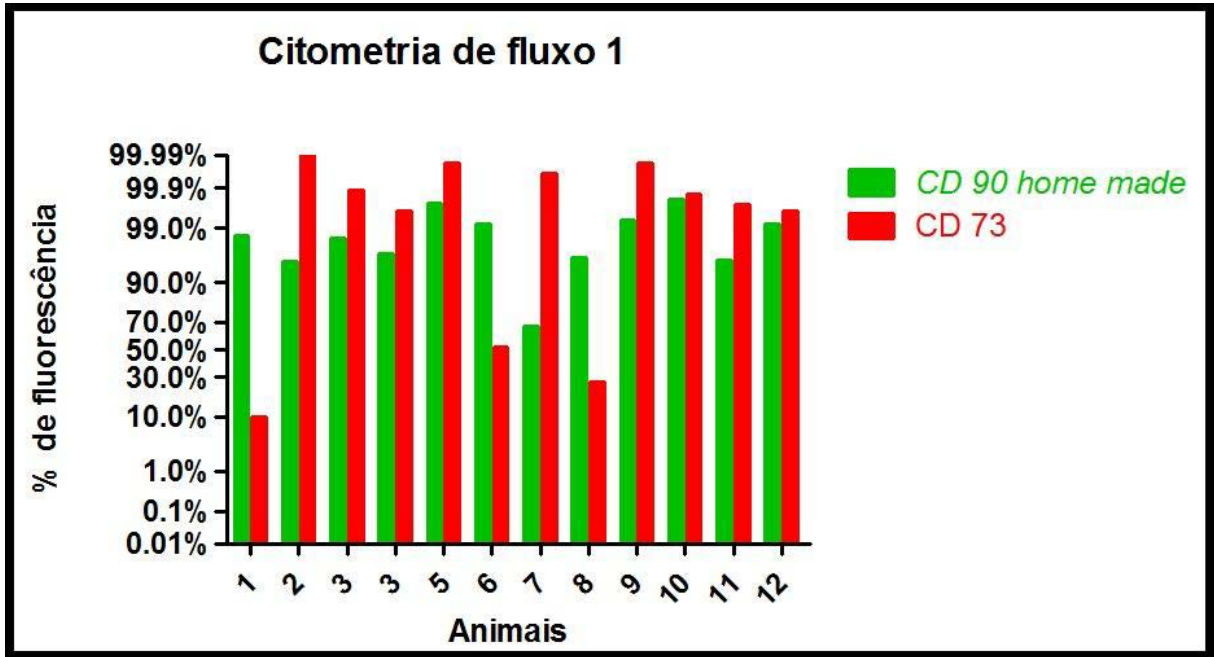


Figura 8. Desempenho dos anticorpos anti-CD90 *home made* e anti-CD73 com base na taxa de fluorescência. Botucatu, SP, 2013.

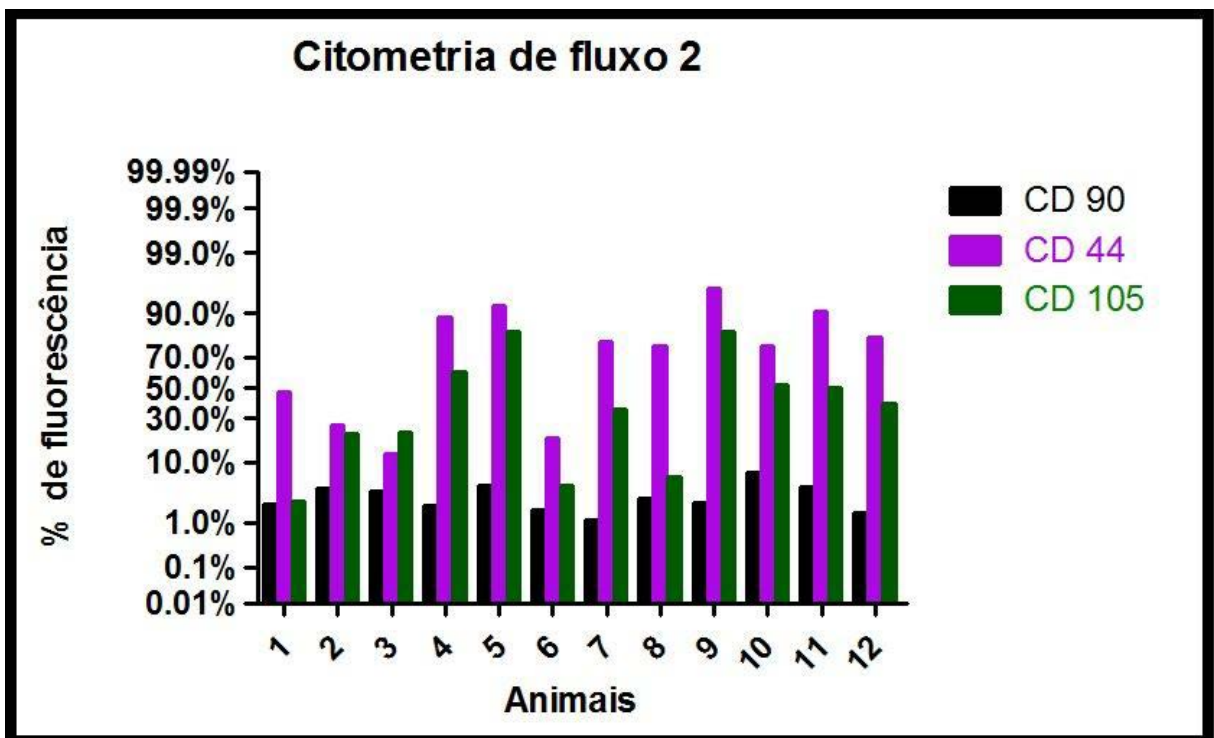


Figura 9. Desempenho dos anticorpos anti-CD90, anti-CD44 e anti-CD105, com base na taxa de fluorescência. Botucatu, SP, 2013.

## 5.6 Avaliação de danos citogenéticos através do Teste do Cometa

A Figura 10 ilustra o comportamento das células diante do teste do cometa (A-D), sendo este um teste de genotoxicidade que detecta danos primários no DNA, através da estimativa da porcentagem de DNA na cauda do cometa. Os gráficos inseridos na Figura 10 (E-F) revelam os resultados encontrados. Com base na análise estatística (*software tail intensity* e *tail moment*), verificou-se que os danos aumentaram após a segunda passagem. Avaliando os danos dentro da variável *tail intensity*, na primeira passagem foi obtida média de  $9,50 \pm 0,60$  e, na segunda, de  $25,80 \pm 4,32$  (T *student*  $p= 0,004$ ). Já, tomando-se por base a variável *tail moment*, na primeira passagem foi obtida média de  $0,0122 \pm 0,0006$  e, na segunda, de  $0,0687 \pm 0,017$  (T *student*  $p= 0,009$ ).

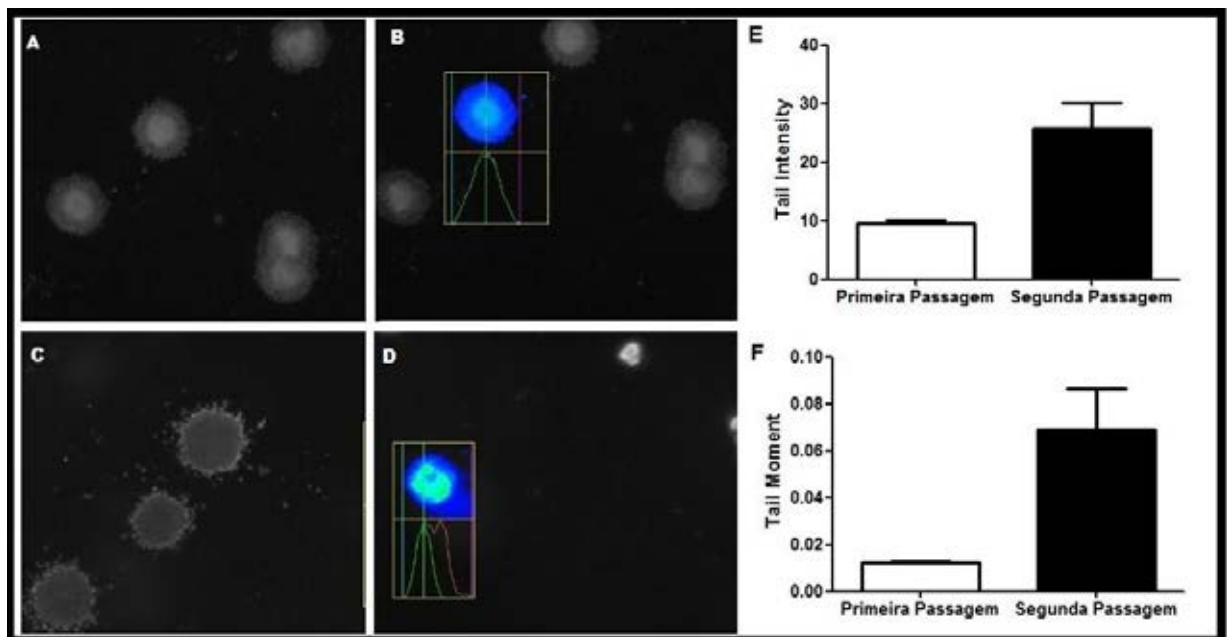


Figura 10. Avaliação de danos no DNA em células mesenquimais indiferenciadas. Células na primeira passagem (A), gráfico de análise inserido pelo *software* na primeira passagem (B) células na segunda passagem (C), gráfico de análise inserido pelo *software* na segunda passagem (D). As imagens A-D foram obtidas em aumento de 40x. Histograma resultante (E) - representando a quantificação dos danos nas duas passagens, dentro da variável *Tail Intensity* (Teste estatístico: t-Student,  $p=0,004$ ). Histograma resultante (F) - representando a quantificação dos danos nas duas passagens, dentro da variável *Tail Moment* (Teste estatístico: t-Student,  $p=0,009$ ). Botucatu, SP, 2013.



### 5.7 Avaliação macroscópica

Os grupos tratados com células-tronco, GCTM e GCTMdif, apresentaram escores que sinalizaram melhor aspecto quando comparados aos grupos GC e GPRP. Em dois animais do grupo GCTM e em um animal do grupo GCTMdif foi graduado o escore 0, como uma superfície de aspecto macroscopicamente normal, enquanto que em todos os animais dos grupos que não receberam células-tronco verificou-se escore de 2 a 3, sendo que em nenhum animal experimental observou-se os escores mais altos, com ulceração e perda de cartilagem. As diferenças entre animais tratados e não tratados com células-tronco mostraram-se significativas, conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn ( $p=0.001$ ), e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos GCTM e GCTMdif, assim como entre os grupos GC e GPRP, como bem demonstrado na Figura 11. Na Figura 12 acham-se ilustrados os padrões de lesões à análise macroscópica, da superfície articular, segundo escore de Yoshimi et al (1994).

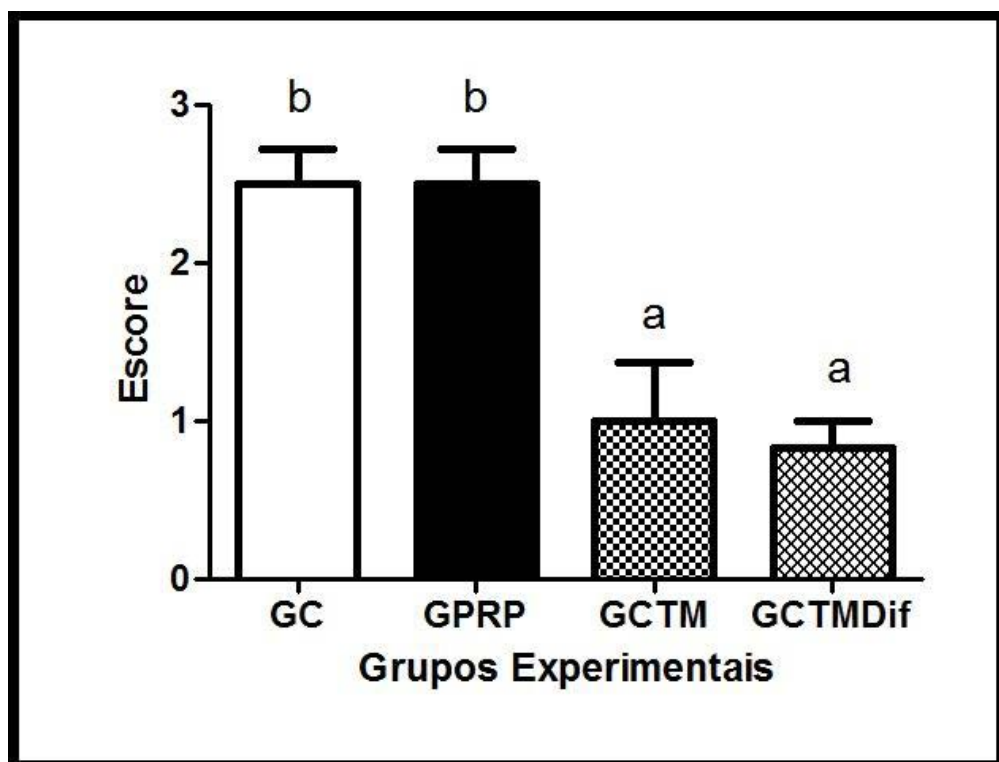


Figura 11. Avaliação macroscópica segundo escore de Yoshimi et al (1994). Análise estatística através do teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ( $p=0.001$ ). Campo Grande, MS, 2013.

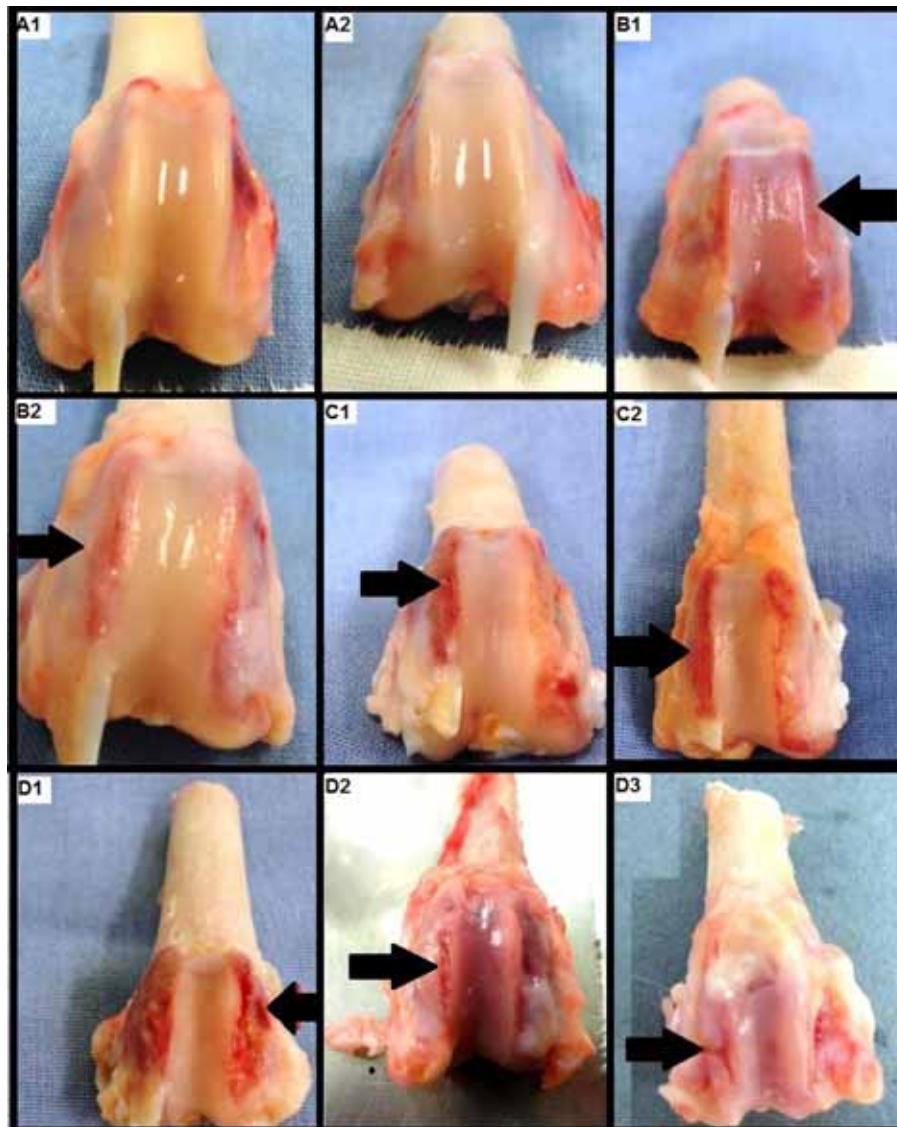


Figura 12. Ilustração do escore macroscópico segundo Yoshimi et al. (1994). A1 e A2- Grau 0: Superfície lisa e brilhante (amostras grupo GCTM); B1 e B2- Grau 1: irregularidades superficiais leves (seta) (amostras grupo GCTMdif); C1 e C2- Grau 2: defeitos de espessura e fibrilação (seta) (amostras grupo GPRP); D1, D2 e D3- Grau 3: erosão (seta) (amostras grupo GC). Campo Grande, MS, 2013.

### 5.8 Avaliações histomorfológicas

Os cortes histológicos foram avaliados de acordo com o escore de Mankin et al. (1971) modificado, e corados em HE e Azul de Toluidina, cujos números crescentes correspondem a maior quantidade de lesões do tecido articular avaliado. A Figura 13 ilustra diferentes padrões de lesões encontrados, evidenciando os critérios utilizados na avaliação do quesito estrutura tecidual. Na Seção 13A é possível observar algumas irregularidades na superfície articular, na 13B, as setas

apontam para a proliferação do tecido conjuntivo e sua aderência à superfície da cartilagem (*pannus*). Nas seções 13C-D-E, as setas apontam para diferentes localizações de fendas; sejam, superficiais, em zona de transição e em zona radial, respectivamente. Na seção 13F é possível notar completa desorganização tecidual.

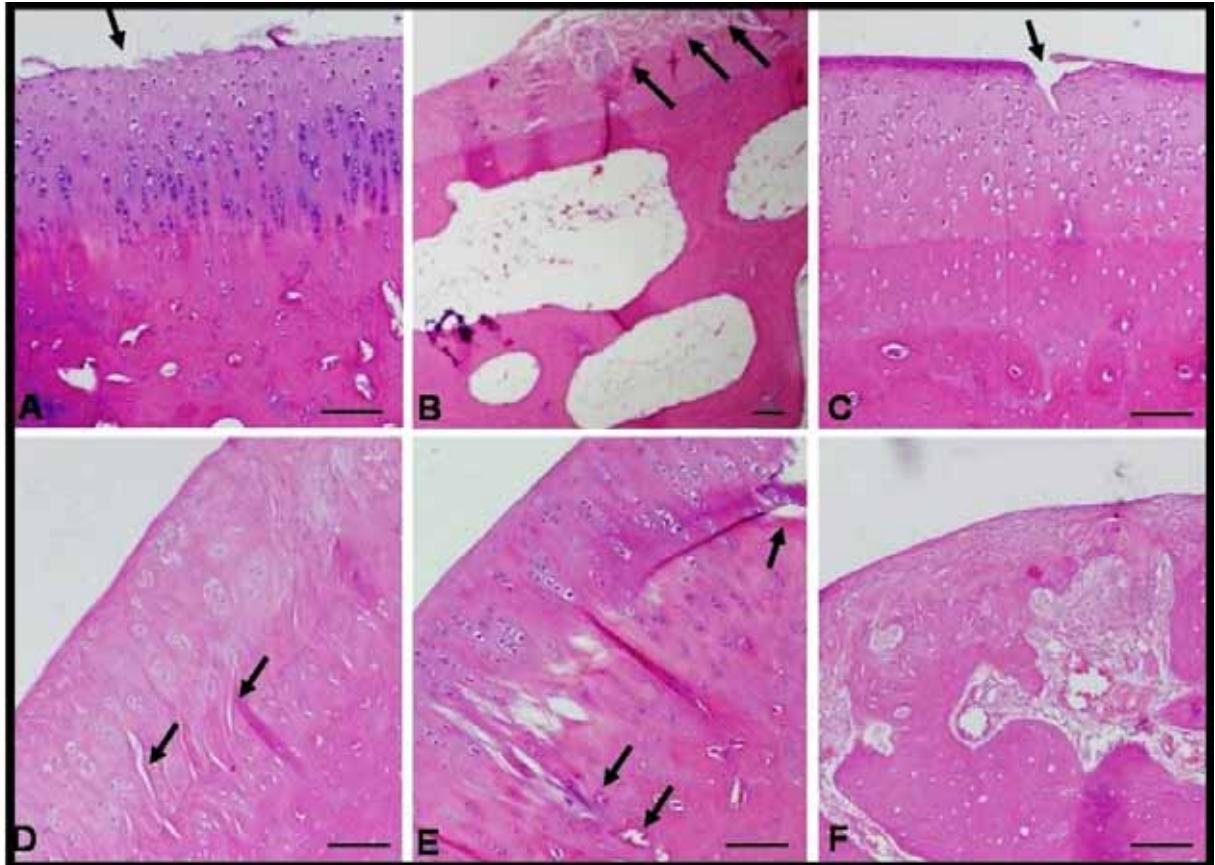


Figura 13. Fotomicrografias da superfície articular de animais dos diferentes grupos experimentais coradas em H.E, ilustrando os critérios empregados na execução do escore de Mankin. A: irregularidades na superfície articular (seta) (amostra grupo GCTM); B: *Pannus* (setas) (amostra grupo GPRP); C: fendas na superfície articular (seta) (amostra grupo GCTMdif); D: Fendas envolvendo a zona de transição (setas) (amostra grupo GPRP); E: Fendas envolvendo a zona radial (setas) (amostra grupo GPRP); F: Desorganização completa (setas) (amostra grupo GC). Barra=100µm. Botucatu, SP, 2014.

Na Figura 14, estão ilustradas fotomicrografias representativas dos aspectos celulares na cartilagem articular, colorações HE (A-D) e azul de toluidina (E-H). As seções 14A e E apontam celularidade graduada em escore normal. As setas apontam condrócitos no interior de lacunas, apresentando-se distribuídos de maneira heterogênea ao longo de sua espessura, ou seja, na região superficial as

células apresentam-se relativamente mais isoladas e dispostas paralelamente à superfície articular (elipse), enquanto que nas regiões intermediária, os condrócitos estão dispostos em grupos isogênicos perpendiculares à superfície articular. Nas seções 14B e F, observa-se diminuição da população de condrócitos (elipse) e, contrariamente, nas seções C e G é possível notar o aumento das populações de condrócitos dispostos de forma irregular (elipse), sendo que estas hipercelularidades apresentam condrócitos não distribuídos em fileiras perpendiculares à superfície, mas sim dispostos aleatoriamente. Nas seções 14D e H as elipses apontam para clones de condrócitos.

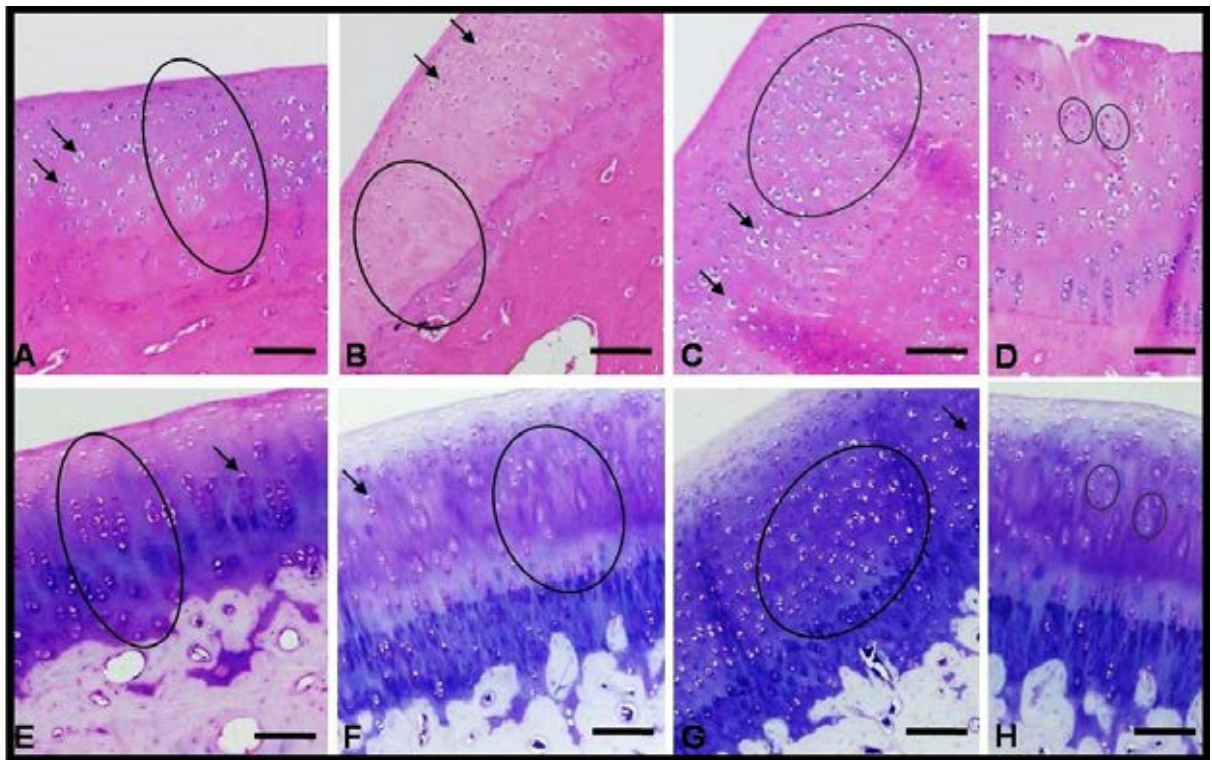


Figura 14. Fotomicrografias representativas dos aspectos celulares na cartilagem articular em imagens coradas por H.E (A-D) e azul de toluidina (E-H). A e E: setas apontam condrócitos no interior de lacunas, celularidade normal, condrócitos dispostos em colunas (elipse) (amostra membro sadio); B e F: diminuição da população de condrócitos (elipse) (amostra grupo GC); C e G: aumento da população de condrócitos dispostos de forma irregular (elipse) (amostra grupo GCTM); D e H: clones (elipses) (amostra grupo GCTMdif). Barra=100µm. Botucatu, SP, 2014.

Analisando as diferenças entre os grupos segundo avaliações histomorfológicas, foi possível notar que todas as camadas superficiais mostraram-se irregulares, em todas as secções de cartilagem avaliadas de todos os grupos. Mas, predominantemente nos grupos GCTM e GCTMdif os escores levantados foram menores do que quando comparados com os grupos GC e GPRP. Os graus de degeneração mais severos foram observados nos grupos GC e GPRP. Ao observar-se a Figura 15 é possível confirmar tal assertiva, sendo ela estatisticamente significativa com base no teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn ( $p=0,01$ ).

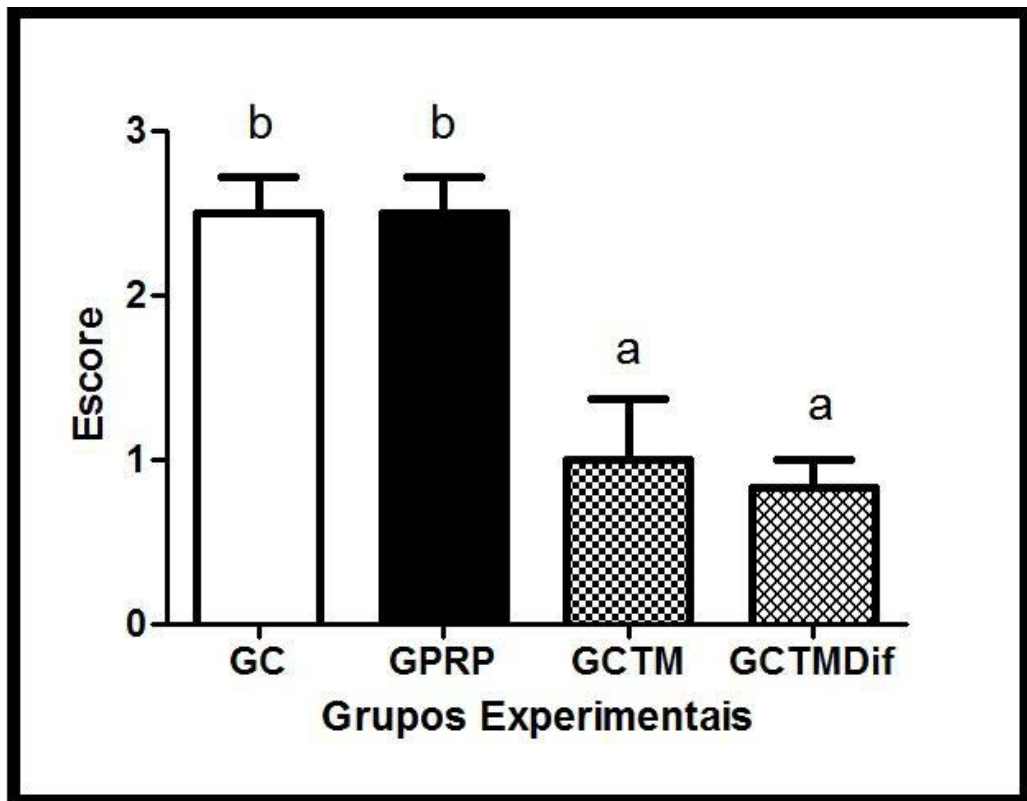


Figura 15. Ilustração da avaliação histológica conforme o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ( $p=0,01$ ). Botucatu, SP, 2014.

A Figura 16 e 17 ilustram fotomicrografias representativas da histoarquitetura da cartilagem articular dos grupos GCTM e GCTMdif, em coloração HE e azul de toluidina, respectivamente. Na figura 16, é possível observar na seção A, superfície apresentando *pannus* e irregularidades na superfície, sendo esta seção uma

amostra do grupo GCTMdif. Na seção B, notam-se pequenas áreas de irregularidades da camada superficial, sendo esta seção uma amostra do grupo GCTMdif. Na Figura 17, seção A, observa-se a camada superficial sem irregularidades, mas é possível notar a hiper celularidade intensa, sendo esta imagem uma amostra do grupo GCTMdif. De modo semelhante, na seção B, imagem de uma amostra do grupo GCTM, é possível notar hiper celularidade e ainda com a presença de clones (elipse).

As imagens ilustradas nas Figuras 18 e 19 mostram que nos grupos GC e GPRP as rupturas e fendas apresentaram-se mais profundas (setas), sendo que em algumas áreas ocorreram perdas das camadas superficial e profunda e conseqüente exposição da zona calcificada. Já, nos animais tratados com células-tronco, é possível observar, ainda de acordo com as ilustrações supracitadas (Figuras 16 e 17), que as lesões não se apresentaram tão profundas, sendo mais superficiais.

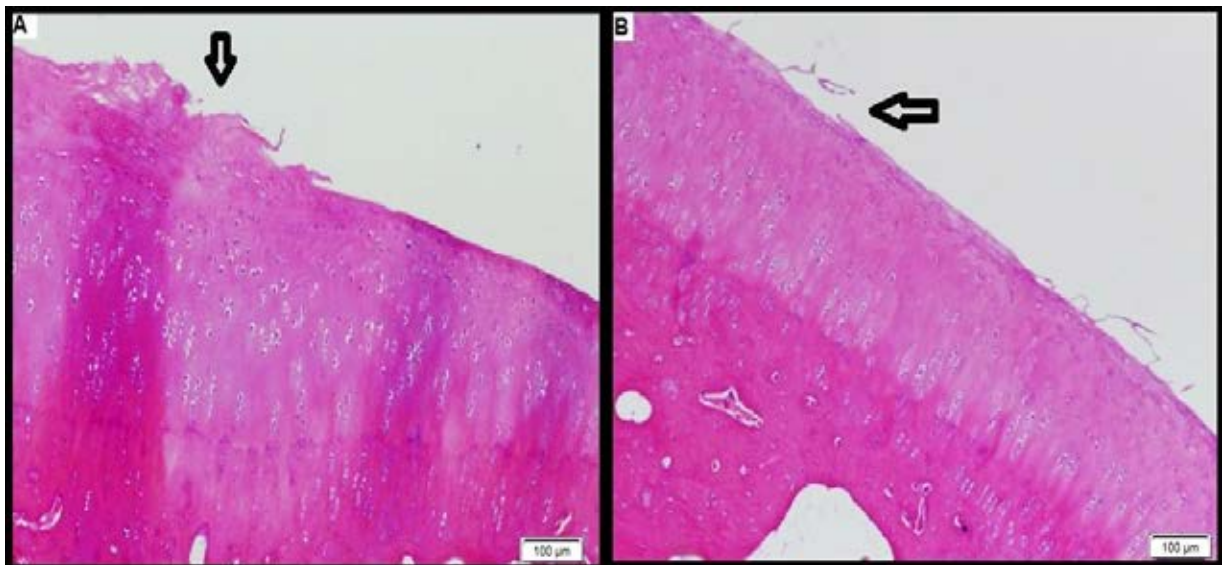


Figura 16. Ilustração fotomicrográfica representativa da histoarquitetura da cartilagem articular do joelho de coelhos, coloração HE. Seção A: amostra do grupo GCTMdif apresentando *pannus* e irregularidades em superfície articular (seta). Seção B: amostra do grupo GCTM apresentando irregularidades na superfície articular (seta). Aumento de 10x. Botucatu, SP, 2014.

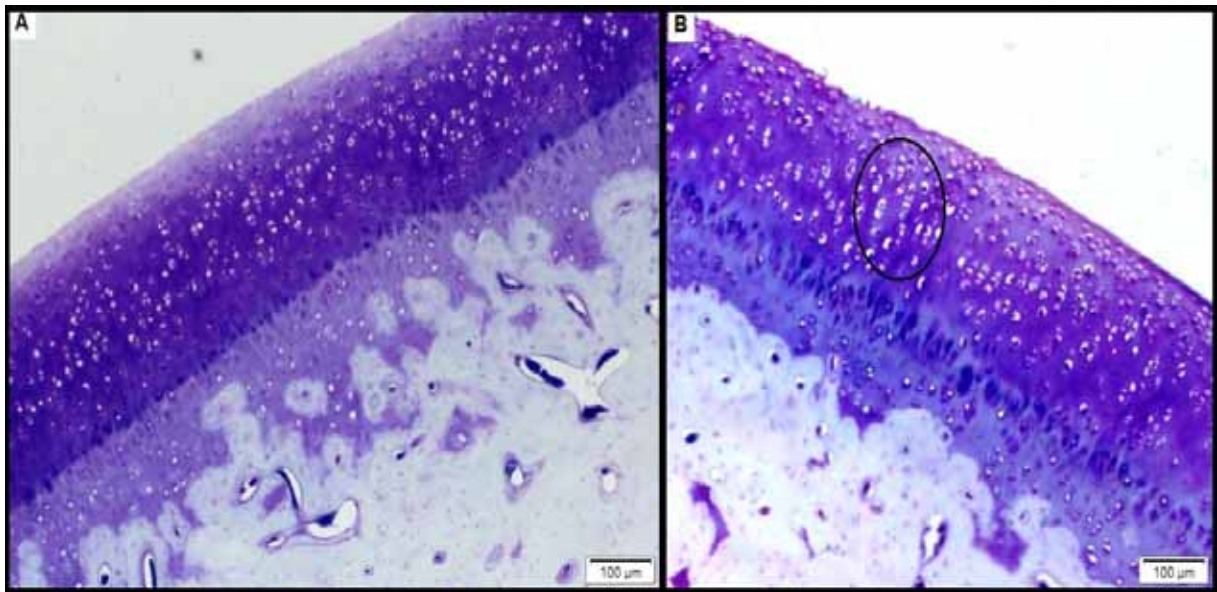


Figura 17. Ilustração fotomicrográfica representativa da histoarquitetura da cartilagem articular do joelho de coelhos, coloração Azul de Toluidina. Seção A: amostra do grupo GCTMdif apresentando hipercelularidade difusa. Seção B: amostra do grupo GCTM apresentando hipercelularidade difusa e clones (seta). Aumento de 10x. Botucatu, SP, 2014.

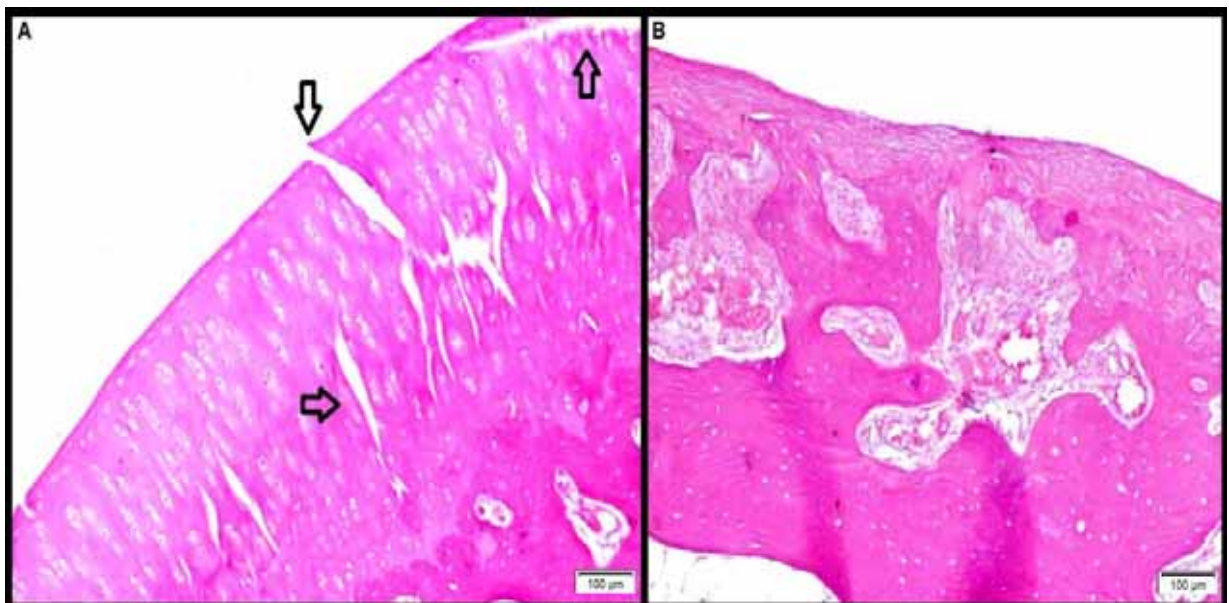


Figura 18. Ilustração fotomicrográfica representativa da histoarquitetura da cartilagem articular do joelho de coelhos, coloração HE. Seção A: amostra do grupo GPRP apresentando fendas nas zonas: superficial, de transição e profunda (setas). Seção B: amostra do grupo GC apresentando desorganização completa da estrutura histológica das camadas. Aumento de 10x. Botucatu, SP, 2014.

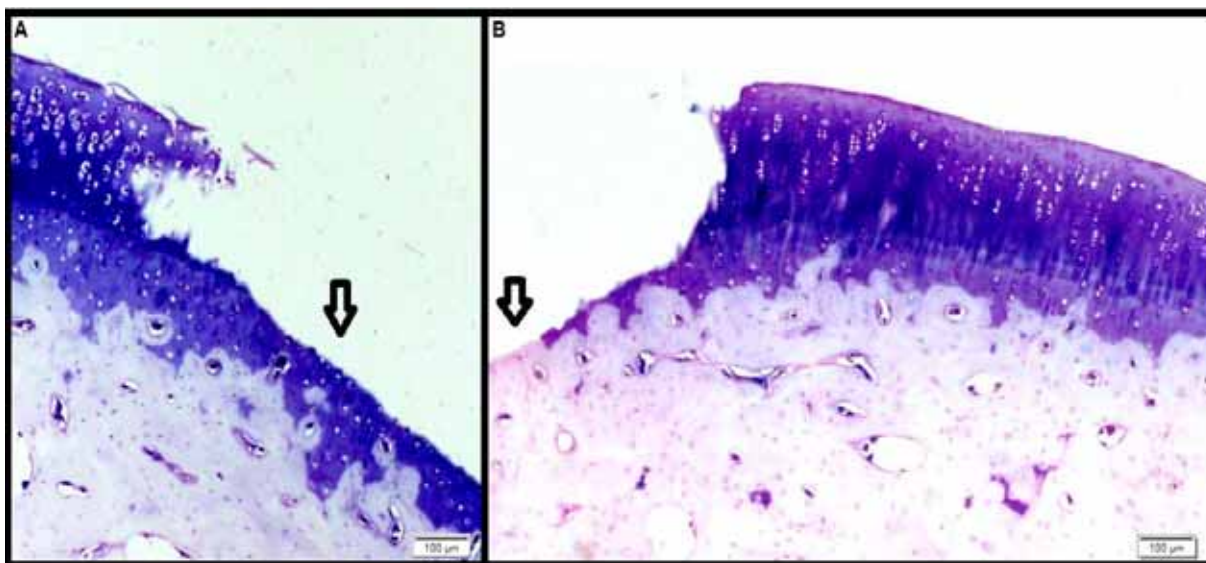


Figura 19. Ilustração fotomicrográfica representativa da histoarquitetura da cartilagem articular do joelho de coelhos, coloração Azul de Toluidina. Seção A: amostra do grupo GPRP apresentando fendas profundas e exposição da zona de cartilagem calcificada (setas). Seção B: amostra do grupo GC apresentando fendas profundas e exposição de osso subcondral. Aumento de 10x. Botucatu, SP, 2014.

## 6. DISCUSSÃO

A partir da premissa de que o tratamento da osteoartrite, e dos defeitos condrais, representa um dos maiores desafios na prática ortopédica, tal qual asseverado há cerca de uma década por Hunter e Felson (2006) e, mais consentaneamente, por Makris et al. (2014) e, além disso, face à ampla casuística de envolvimento da articulação do joelho nas referidas perturbações osteocondrais, a utilização de modelos animais representa uma estratégia no reconhecimento das variáveis envolvidas em tais afecções articulares, bem como na instituição de novas abordagens de tratamento, inclusive reconstitutivo.

A aplicação de colagenase intra-articular foi realizada em todos os animais sem complicações, e os mesmos mantiveram-se com o comportamento normal para espécie logo após a recuperação anestésica, não alterando ingestão hídrica e alimentar. O referido método apresenta-se menos invasivo quando comparado a metodologias experimentais cirúrgicas (KIKUCHI et al., 1998), proporcionando menor estresse aos animais, além do período de indução da OA ser de apenas



quatro semanas, e nos métodos de ruptura de ligamentos e menisco, leva cerca de oito a doze semanas para atingir a degeneração esperada (GRIGOLO et al., 2009).

Também, os resultados aqui obtidos indicam que o protocolo de obtenção de plasma rico em plaquetas mostrou-se satisfatório, pois segundo Whitlow et al. (2008), a concentração de plaquetas no PRP deve ser três a cinco vezes superior àquela presente no sangue total. Conforme assertiva de Carmona (2007), que também trabalhou com PRP, as plaquetas são normalmente ativadas previamente com o gluconato de cálcio a 10%, para que ocorra a liberação dos fatores de crescimento presentes nos seus  $\alpha$ -grânulos intracitoplasmáticos.

Neste ensaio, a escolha do tecido adiposo como fonte de CTM deveu-se ao fato do referido tecido apresentar maior quantidade de CTM quando comparado a outros tecidos como, por exemplo, a medula óssea (BUSSER et al., 2014). Além disso, há enorme facilidade na coleta de CTM. Estes et al. (2010), asseveram que as CTM derivadas do tecido adiposo apresentam maior potencial de diferenciação condrogênica. A digestão enzimática utilizando-se da colagenase seguiu as recomendações de Zuk et al. (2001), que descreveram primeiramente o método de extração das CTM do tecido adiposo, e que até os dias atuais, ainda é o método mais amplamente utilizado (MARKARIAN et al., 2014).

Morfologicamente, de acordo com os resultados obtidos neste ensaio, as células cultivadas *in vitro* mantiveram características de CTM. As referidas células apresentaram rápida aderência e expansão. A população celular obtida mostrou-se heterogênea, mas a maioria das células apresentou-se com formato alongado, justaposta e provida de prolongamentos, tipicamente fibroblastóides, exibindo dois nucléolos inseridos na massa cromatínica nuclear, apresentando autofluorescência, e corroborando os achados delimitados por vários autores, especialmente aqueles de Chamberlain et al. (2007).

A plasticidade das CTM foi confirmada pelas diferenciações adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas, seguindo protocolo de Pittenger et al. (1999). Conforme tais autores, na diferenciação adipogênica é possível observar a presença de vacúolos lipídicos, e na diferenciação osteogênica a camada de matriz extracelular rica em cálcio, depositada sobre a placa de cultura. A diferenciação condrogênica necessita de dois importantes componentes, quais sejam, ambiente

tridimensional e fatores de crescimento específicos, conforme protocolo conduzido neste experimento, onde a confirmação da diferenciação condrogênica evidenciou-se pela produção de matriz extracelular a partir de CTM adequadamente estimuladas. Vale ressaltar que os procedimentos aqui adotados, com relação às três diferenciações de CTM adiposas, atendem os requisitos necessários, segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006).

À citometria de fluxo, o número médio de eventos analisados nas diferentes amostras foi de  $14.186 \pm 0,46$ , acima do mínimo internacionalmente estipulado (HEDLEY e KEENEY, 2013). A média de intensidade de fluorescência, utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD90 de coelho *home made*, foi de 95,29%, com valor mínimo de 66,76% para o animal 7 e valor máximo de 99,72%. Com relação à utilização do painel de anticorpos comercializados, deve ser ressaltado que não fora encontrado nenhum anticorpo que tivesse especificidade contra CTM de coelho. Foram utilizados anticorpos monoclonais contra epítomos de CTM de rato com o intuito de testar sua possível reação cruzada com CTM de coelho. O anti-CD73 apresentou resultados de imunomarcações acima de 90%, em nove de doze animais avaliados, confirmando a caracterização de CTM. Os anticorpos anti-CD 44 e anti-CD 105 apresentaram grande variação nos resultados de imunomarcagem, e para o anti-CD90 comercial, o resultado foi negativo para todas as amostras de coelho, analisadas, ficando com uma média de intensidade de fluorescência de 2,99%, muito próximo da média de autofluorescência que foi de 1,95%. Portanto, o mesmo não apresenta reatividade cruzada com o coelho. No entanto, este anticorpo foi controlado com CTM de rato, obtendo 99,43% de média de intensidade de fluorescência, descartando-se a hipótese de que o anticorpo não estivesse funcionando. Levando-se em consideração que o anti-CD 90 tem sido utilizado como marcador positivo para células tronco mesenquimais em diferentes espécies (CSAKI et al., 2007), e que o mercado não dispõe de muitos marcadores para pesquisas em coelhos, a confirmação foi realizada com o uso do anticorpo monoclonal *home made*, produzido pelo Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.

O uso de CTM em ensaios experimentais, clínicos e terapêuticos, tem crescido nos últimos anos. No entanto, ainda existe o questionamento de quão

seguros são esses procedimentos para os pacientes que recebem o transplante. Uma das maiores desvantagens das técnicas de engenharia tecidual é o período de cultivo *in vitro*, longo e complexo. Tal fato está associado às exigências de segurança dos produtos gerados e ao alto custo de produção. É evidente que, nos ensaios de aplicação clínica, tanto a manipulação das células quanto o período de cultivo devem ser minimizados o quanto possível (GRAD et al., 2011). Assim, procurando atender a esse requisito fundamental, realizou-se neste ensaio a avaliação de danos citogenéticos, através do Teste do Cometa, com vistas à análise do padrão de possíveis lesões genômicas entre a primeira e a segunda passagem celular, posto que a manutenção da estabilidade genômica das células tronco, em procedimentos *in vitro*, é de grande interesse para a terapia celular, especialmente com relação à garantia da qualidade das células. Além disso, é essencial para processos de auto-renovação e diferenciação em outros tipos celulares (PARK e GERSON, 2005).

Neste ensaio, verificou-se que os danos aumentaram após a segunda passagem, cujos achados vão ao encontro daqueles reportados por Fuchs et al. (2012), que relataram que o aumento no número de passagens coincidiu com maior frequência de danos ao DNA. Já Froelich et al. (2013) avaliaram os danos da 1ª à 10ª passagens, e relataram que não houve uma relação diretamente proporcional entre os níveis de danos avaliados pelo Teste do Cometa e passagens. No entanto, estes últimos autores também relatam que danos cromossômicos puderam ser observados por meio do Ensaio de Aberração Cromossômica, mesmo onde o Teste do Cometa não detectara alterações. Esse mesmo achado também é relatado por Bochkov et al. (2006) e Nikitina et al. (2011). Desta forma, os resultados encontrados neste estudo alertam para três fortes preocupações inerentes à terapia celular, quais sejam: manipulação celular, tratamento enzimático e integridade genômica, ou seja, três condições diretamente relacionadas à segurança do tratamento fundamentado no transplante de células-tronco. É sabido que o tratamento enzimático pode afetar a quantidade e a qualidade das células isoladas, e a duração do mesmo também altera as propriedades celulares de forma progressiva, principalmente por modificações no ambiente celular natural (BUSSER et al., 2014). Para Faustini et al. (2010), quanto menor a manipulação celular, maior

a segurança e eficácia na terapia com células-tronco. Aliás, em função dessa grande preocupação, experimentos recentes como aqueles de Busser et al. (2014) preconizam a extração de células sem tratamento enzimático.

De outra parte, é importante considerar que apesar do aumento de danos relatados por vários autores e, definitivamente, encontrados neste presente estudo e, admitindo-se o importante papel das células-tronco adultas na reconstituição natural dos tecidos, acredita-se que tais células apresentem mecanismos de reparação de DNA diferenciados das demais células do organismo adulto. Para Frosina (2009), as células-tronco protegem seu genoma por meio do aumento da capacidade de reparação do DNA, e neste sentido, podem reduzir a taxa de proliferação e aumentar a atividade de proteínas envolvidas com o fenômeno da reparação natural .

O PRP foi utilizado como veículo para aplicação das CTM, dado que investigações mais recentes evidenciaram que fatores de crescimento presentes no PRP agem como carreadores e podem potencializar, estimular ou até mesmo estender os efeitos das CTM (KAKUDO et al., 2008; BALL et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2012; VILAR., 2013). Muitos destes fatores, como o TGF- $\beta$ 1, FGF e PDGF, são apontados como promotores da condrogênese e condroprotetores (FORTIER et al., 2002; STEWART et al., 2007; BRANDL et al., 2010; LEE et al., 2010).

Assim, tal qual os resultados alcançados neste experimento, Saito et al. (2009), não observaram diferenças entre os grupos tratados com PRP e o grupo controle, mas quando as plaquetas foram inseridas em forma de microesferas, o grupo que recebeu esta forma de PRP apresentou menor severidade da OA. Contrariamente, Kwon et al. (2012), utilizando modelo de osteoartrite experimental com colagenase, observaram melhores aspectos macroscópicos e histológicos nos animais que receberam o PRP, sugerindo que o PRP pode suprimir os efeitos catabólicos da colagenase ou aumentar a resposta anabólica da cartilagem degenerada. Estes resultados contraditórios podem ser explicados devido ao fato dos autores terem alcançado um aumento médio de 8,2 vezes na concentração plaquetária, e assim, o número de fatores de crescimento estar em maior quantidade. Por outro lado, Mifune et al. (2013), avaliaram os efeitos do PRP e das CTM, associados ou não, na osteoartrite experimental em ratos, e também não

observaram diferenças entre os grupos tratados com PRP e o grupo controle, mas de modo semelhante, relataram que os grupos tratados com PRP associado às CTM apresentaram melhores escores histomorfológicos, com maior número de células produzindo colágeno tipo II. Corroborando os achados precedentemente citados, pesquisas recentes apontam a terapia com CTM como uma ferramenta terapêutica válida no tratamento da OA. Os efeitos benéficos da utilização terapêutica de CTM foram relatados em modelos experimentais conduzidos, dentre outros, por Toghraie et al. (2011), Guercio et al. (2012), Lee et al. (2012), Ter Huurne et al. (2012), Desando et al. (2013), Song et al. (2014) e, também agora, neste ensaio.

A injeção intra-articular direta das células-tronco mesenquimais foi realizada de maneira simples e prática, e os animais não apresentaram edema ou desconforto após a aplicação. Tecnicamente, os achados aqui alcançados revelam tratar-se de uma abordagem simples para a aplicação das CTM e coincidente com relatos de outros autores (UCCELLI et al., 2007; MOKBEL et al., 2011). Além do mais, o protocolo experimental utilizado neste ensaio na obtenção, cultivo, expansão e transplante de CTM adiposas, enseja resultados positivos, pois Noth et al. (2008) apontam que injeções intra-articulares de CTM são efetivas nos estágios iniciais da OA, quando as lesões estão localizadas na superfície da cartilagem. Asseveram, no entanto, que há necessidade de arcabouços quando há invasão ao osso subcondral em grandes áreas da cartilagem. Este ponto de vista foi também referido por Lee et al. (2007), cujos autores sugerem a necessidade de arcabouços para que uma quantidade suficiente de células seja englobada e que assim a condrogênese seja induzida.

Os animais tratados com CTM apresentaram aspectos macroscópicos da superfície articular melhores do que aqueles dos demais grupos, resultados concordantes com aqueles relatados por Grigolo et al. (2009) e Singh et al. (2014). Neste particular, vale a pena ressaltar que, em dois animais do grupo GCTM e em um animal do grupo GCTMdif, fora observada superfície articular lisa e brilhante, sem sinais de degeneração, achados também relatados por Desando et al. (2013), nos quais as articulações de coelhos tratadas com CTM apresentaram-se sem sinais de degeneração ao escore macroscópico.

Conforme demonstrado nas imagens histomorfológicas, os grupos tratados com células-tronco apresentaram escores que apontaram danos mais localizados nas camadas superficial e média da cartilagem, sendo que nos grupos não tratados com células-tronco, as fendas se apresentaram mais profundas, atingindo a camada de cartilagem calcificada e em alguns pontos o osso subcondral, dados semelhantes encontrados por Mokbel et al. (2011), no qual observaram que o implante intralesional de CTM resulta no acréscimo do número de células progenitoras do próprio tecido, incrementando o potencial de regeneração, tropismo pelo tecido lesado e diferenciação celular. Nesta mesma assertiva, Desando et al. (2013) também observaram melhores escores histológicos nos grupos tratados com CTM, que apresentaram maior espessura de cartilagem, e, à análise imunohistoquímica, aumento na expressão de colágeno tipo II. Singh et al. (2014) observaram desorganização estrutural e hipocelularidade de condrócitos nos grupos não tratados com CTM, coincidentemente com os achados deste estudo.

Não foi possível observar diferenças entre os grupos tratados com células-tronco diferenciadas em condrócitos e células-tronco indiferenciadas, tanto no escore macroscópico quanto no escore histomorfológico. Chen et al. (2013), avaliaram o efeito da aplicação de CTM em OA temporomandibular em coelhos, e também compararam a diferença entre células diferenciadas em condrócitos e não diferenciadas. Reportaram que os grupos tratados com CTM apresentaram reparo da cartilagem e retardaram a progressão da OA, sendo que, decorridas quatro semanas após o tratamento, o grupo tratado com CTM diferenciadas apresentou melhores resultados, mas esta diferença não foi observada decorridas 24 semanas, ou seja, sinalizando que possivelmente o reparo inicial foi mais rápido no grupo diferenciado, mas que em longo prazo o resultado foi semelhante, dados amplamente corroborados neste estudo. Estes achados podem sugerir que possivelmente as células diferenciadas agiram mais rapidamente por estarem já comprometidas com a linhagem condrogênica, especialmente na dimensão dos marcadores de superfície (receptores aos fatores estimuladores de colônias), enquanto que as células não diferenciadas, “não comprometidas com a linhagem condrogênica”, ou seja com expressão reduzida de receptores para estimuladores de colônia para condrócitos, necessitaram primeiramente da interação com o

microambiente articular, aumento de receptores para fatores estimuladores de colônias condrogênicas, levando-as a diferenciação condrogênica, e assim em longo prazo, não se observou diferenças significativas. Estas afirmações vão ao encontro dos achados de Chen et al. (2009) que reportaram que a condrogênese das CTM pode ser desencadeada pela matriz extracelular, fatores de crescimento e o meio indutor, e que para eficácia terapêutica, as CTM devem ser diferenciadas em condrócitos, já dentro do ambiente intra-articular, junto aos defeitos condrais.

Confirmando os presentes resultados, a literatura afirma que as CTM são capazes de se diferenciarem em um fenótipo celular específico, dependendo do ambiente em que estão residentes. A interação entre as CTM e a matriz extracelular pode ser fator fundamental para a diferenciação das CTM em condrócitos (DJOUAD et al., 2007). Para Birmingham et al., (2007), o microambiente da OA pode influenciar a capacidade das CTM em regenerar a cartilagem articular ou matriz do osso subcondral, que podem responder conforme os diferentes estímulos, devido a fatores de sinalização secretados pelos condrócitos ou osteoblastos residentes. Csaki et al. (2008) afirmam que a diferenciação *in vivo* das CTM é iniciada pela interação de moléculas sinalizadoras emitidas por células locais e vizinhas, transduzidas via extra ou intracelular, por estímulo dos receptores de membrana das CTM, citocinas e fatores de crescimento solúveis, proteínas da matriz extracelular como proteoglicanos e colágeno ou por interação direta com os condrócitos residentes. No entanto, os mecanismos subjacentes de interações célula-célula no microambiente da OA, que influencia a diferenciação condrogênica e osteogênica das CTM ainda não foram completamente elucidados, nem totalmente entendidos. Além disso, os fatores que podem modular o fenótipo condrogênico das CTM ainda não estão, compreensivamente, bem estabelecidos (LEYH et al., 2014).

## 7. CONCLUSÃO

Com base nas condições em que foram realizados os diversos ensaios deste experimento conclui-se que:

- O protocolo de coleta, isolamento e expansão das CTM, derivadas do tecido adiposo de coelhos, revela-se satisfatório e propicia a obtenção de um número viável de células;
- A caracterização das CTM por meio de citometria de fluxo mostra-se factível e de fácil condução utilizando-se de anticorpos anti-CD90 *home made* e anti-CD73 comercial;
- A capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM adiposas revela-se bem sucedida e atesta sua plasticidade;
- O Teste do Cometa revela-se adequado ao estudo dos danos citogenéticos e atesta seu aumento após a segunda passagem celular;
- Houve efeitos benéficos da associação de CTM derivadas do tecido adiposo e plasma rico em plaquetas na regeneração da cartilagem articular de joelhos de coelhos submetidos a osteoartrite experimental, comprovado pelas análises macroscópicas e histomorfológicas;
- Não houve diferença no sucesso do tratamento da OA experimental, no período analisado, quando são utilizadas CTM indiferenciadas ou diferenciadas em condrócitos;
- O modelo de estudos mostra-se factível para outras espécies animais, inclusive para dar suporte à medicina regenerativa em geral.



## 8. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, Washington, USA, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2005.

AGUNG, M.; OCHI, M.; YANADA, S.; ADACHI, N.; IZUTA, Y.; YAMASAKI, T.; TODA, K. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, Luxemburgo, v. 14, n. 12, 1307–1314, 2006.

AIGNER, T.; HAAG, T.; MARTIN, J.; BUCKWALTER, J. Osteoarthritis: aging of matrix and cells—going for a remedy. **Current Drug Targets**, Notre Dame, USA, v. 8, n.2, p. 325–331, 2007.

ALLAN, K.S.; PILLIAR, R.M.; WANG, J.; GRYNPAS, M.D.; KANDEL, R.A. Formation of biphasic constructs containing cartilage with a calcified zone interface. **Tissue Engineering**, Califórnia, USA, v. 13, n. 1, p. 167–177, 2007.

ANITUA, E.; SANCHEZ, M.; NURDEN, A.T.; NURDEN, P.; ORIVE, G.; ANDIA, I. New insights into and novel for platelet-rich fibrin therapies. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 227–34, 2006.

BALL, S.G.; SHUTTLEWORTH, A.; KIELTY, C.M. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling regulates Oct4 and Nanog expression, cell shape, and mesenchymal stem cell potency. **Stem Cells**, Massachusetts, USA, v. 30, n. 3, p. 548–560, 2012.

BEDI, A.; FEELEY, B.T.; WILLIAMS 3<sup>rd</sup> R.J. Management of articular cartilage defects of the knee. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, USA, v.92, n.4, p. 994–1009, 2010.

BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G.L.; MCHUGH, P.E.; SHAW, G.; BARRY, F.P.; MCNAMARA, L.M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. **European Cells and Materials**, Suíca, v. 12, n. 23, p.13–27, 2012.

BITTENCOURT, R.A.C. **Cultura de Condrócitos para uso terapêutico: reconstrução de cartilagem**. 2008. 159 f. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia, área de concentração: Agressão, Reparação, Regeneração e Transplante de Tecidos e de Órgãos)- Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

BLACK, L.L.; GAYNOR, J.; ADAMS, C.; DHUPA, S.; SAMS, A.E.; TAYLOR, R.; HARMAN, S.; GINGERICH, D.A.; HARMAN, R. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. **Veterinary Therapeutics**, USA, v. 9, n. 3, p. 192-200, 2008.

BLACK, L.L.; GAYNOR, J.; GAHRING, D.; ADAMS, C.; ARON, D.; HARMAN, S.; GINGERICH, D.A.; HARMAN, R. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. **Veterinary Therapeutics**, USA, v. 8, n. 4, p. 272-284, 2007.

BOCHKOV, N.P.; VORONINA, E.S.; KOSYAKOVA, N.V.; LIEHR, T.; RZHANINOVA, A.A.; KATOSOVA, L.D.; PLATONOVA, V.I.; GOLDSHTEIN, D.V. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, Germany v. 143, n. 1, p. 122-6, 2007.

BRANDL, A.; ANGELE, P.; ROLL, C.; PRANTL, L.; KUJAT, R.; KINNER, B. Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. **Journal of Orthopaedic Research**, Illinois, USA, v. 28, n. 3, p. 354-360, 2010.

BUCH, TW. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research. **Directions National Institutes of Health**. Department of Health and Human Services, Washington, USA, p.33-45, 2001

BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J.; GRODZINSKY, A.J. Articular cartilage and osteoarthritis. **Instructional Course Lectures**, Illinois, USA, v. 54, p. 465-480, 2005.

BURASTERO, G.; SCARFI, S.; FERRARIS, C.; FRESIA, C.; SESSAREGO, N.; FRUSCIONE, F.; MONETTI, F.; SCARFO, F.; SCHUPBACH, P.; PODESTA, M.; GRAPPIOLO, G.; ZOCCHI, E.; The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. **Bone**, Philadelphia, USA, v. 47, n.1, p. 117-126, 2010.

BURR, D.B. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, New Jersey, USA v. 12, p. 20-30, 2004.

BUSSER, H.; DE BRUYN, C.; URBAIN, F.; NAJAR, M.; PIETERS, K.; RAICEVIC, G.; MEULEMAN, N.; BRON, D.; LAGNEAUX, L. Isolation of Adipose-Derived Stromal Cells Without Enzymatic Treatment: Expansion, Phenotypical, and Functional Characterization. **Stem Cells and Development**, New York, USA, v. 23, n. 19, p. 2390-2400, 2014.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemical**, Massachusetts, USA, v. 98, n.5, p. 1076–1084, 2006.

CAPLAN, A.I.; ELYADERANI, M.; MOCHIZUKI, Y.; WAKITANI, S.; GOLDBERG, V.M. Principles of cartilage repair and regeneration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, USA, v. 342, p. 254–269, 1997.

CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, USA, v. 367, p. 12-16, 1999.

CARMONA, J. U.; ARGÜELLES, D.; CLIMENT F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: A preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, Barcelona, Espanha, v.27, n.4, p.167-170, 2007.

CARRANCIO, S.; LÓPEZ-HOLGADO, N.; SÁNCHEZ-GUIJO, F.M.; VILLARÓN, E.; BARBADO, V.; TABERA, S.; DÍEZ-CAMPELO, M.; BLANCO, J.; SAN MIGUEL, J.F.; DEL CANIZO, M.C. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. **Experimental hematology**, Philadelphia, v.36, n.8, p.1014-1021, 2008.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. **Stem Cells**, Massachusetts, USA, v. 25, n. 11, p. 2739-49, 2007.

CHANG, K.V.; HUNG, C.H.; ALIWARGA, F.; WANG, T.G.; HAN, D.S.; CHEN, W.S. Comparative Effectiveness of Platelet-Rich Plasma Injections for Treating Knee Joint Cartilage Degenerative Pathology: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Philadelphia, USA, v. 95, n. 3, p. 562-575, 2014.

CHEN, K.; MAN, C.; ZHANG, B.; HU, J.; ZHU, S.S. Effect of in vitro chondrogenic differentiation of autologous mesenchymal stem cells on cartilage and subchondral cancellous bone repair in osteoarthritis of temporomandibular joint. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 240-248, 2013.

CHEN, W.H.; LIU, H.Y.; LO, W.C.; WU, S.C.; CHI, C.H.; CHANG, H.Y.; HSIAO, S.H.; WU, C.H.; CHIU, W.T.; CHEN, B.J.; DENG, W.P. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 30, n. 29, p. 5523-5533, 2009.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, Germany, v. 128, n. 6, p. 507–520, 2007.

CSAKI, C.; SCHNEIDER, P.R.A.; SHAKIBAEI, M. Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering. **Annals of Anatomy**, Philadelphia, USA, v. 190, n. 5, p. 395-412, 2008.

DASSLER, C.L. Canine hip dysplasia: diagnosis and nonsurgical treatment. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3 ed, Philadelphia, Saunders, 2003, p. 2019–2020.

DAVATCHI, F.; ABDOLLAHI, B.S.; MOHYEDDIN, M.; SHAHRAM, F.; NIKBIN, B. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. **International Journal of Rheumatic Disease**, Massachusetts, USA, v. 14, n. 2, p. 211-215, 2011.

DESANDO, G.; CAVALLO, C.; SARTONI, F.; MARTINI, L.; PARRILLI, A.; VERONESI, F.; FINI, M.; GIARDINO, R.; FACCHINI, A.; GRIGOLO, B. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. **Arthritis Research & Therapy**, London, UK, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2013.

DJOUAD, F.; DELORME, B.; MAURICE, M.; BONY, C.; APPARAILLY, F.; LOUIS-PLANCE, P.; CANOVAS, F.; CHARBORD, P.; NOEL, D.; JORGENSEN, C. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. **Arthritis Research & Therapy**, London, UK, v. 9, n. 2, p. 1-12, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.L.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Philadelphia, USA, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DRENGK, A.; ZAPF, A.; STURMER, E.K.; FROSCH, F.H. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. **Cells Tissues Organs**, Switerzland, v. 189, n. 5, p. 317–326, 2009.

ELDER, S.; THOMASON, J. Effect of Platelet-Rich Plasma on Chondrogenic Differentiation in Three-Dimensional Culture. **The Open Orthopaedics Journal**, Sharjah, Emirados Árabes, v. 4, n. 8, p. 78-84, 2014.

EL-SHARKAWY, H.; KANTARCI, A.; DEADY, J.; HASTURK, H.; LIU, H.; ALSHAHAT, M.; VAN DYKE, T. E. Platelet-rich plasma: growth factors and pro and anti-inflammatory properties. **Journal of Periodontology**, Chicago, USA, v.78, n.4, p.661-669, 2007.

EMADEDIN, M.; AGHDAMI, N.; TAGHIYAR, L.; FAZELI, R.; MOGHADASALI, R.; JAHANGIR, S.; FARJAD, R.; BAGHABAN ESLAMINEJAD, M. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. **Archives of Iranian Medicine**, Iran, v.15, n. 7, p. 422-428, 2012.

ESTES, B.T.; DIEKMAN, B.O.; GIMBLE, J.M.; GUILAK, F. Isolation of adipose derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. **Nature Protocols**, London, UK, v. 5, n. 7, p. 1294-1311, 2010.

FAUSTINI, M.; BUCCO, M.; CHLAPANIDAS, T.; LUCCONI, G.; MARAZZI, M.; TOSCA, M.C.; GAETANI, P.; KLINGER, M.; VILLANI, S.; FERRETTI, V.V.; VIGO, D.; TORRE, M.L. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. **Tissue Engineering Part C: Methods**, New York, USA, v. 16, n. 6, p. 1515–1521, 2010.

FEITOSA, M.L.T.; FADE, L.; BRAGA, P.C.B.B.; WENCESLAU, C.V.; KERKIS, I.; JÚNIOR, E.H.B.; MARTINS, J.F.P.; MARTINS, D.S.; MIGLINO, M.A.; AMBRÓSIO, C.E. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head. Preliminary results. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 25, n. 5, p.426-422, 2010.

FILARDO G.; KON E.; ROFFI A.; DI MATTEO B.; MERLI ML.; MARCACCI, M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, Luxemburgo, Disponível em: DOI 10.1007/s00167-013-2743-1. 26 november 2013.

FINDLAY, D.M. If good things come from above, do bad things come from below? **Arthritis Research & Therapy**, London, UK, v. 12, n. 3, p. 119, 2010.

FORTIER, L.A.; MOHAMMED, H.O.; LUST, G.; NIXON, A.J. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, USA, v. 28, n. 3, p. 276–288, 2002.

FOSTER, T. E.; PUSKAS, B. L.; MANDELBAUM, B. R.; GERHARDT, M. B.; RODEO, S. A. Platelet-Rich Plasma from basic science to clinical applications, **The American Journal of Sports Medicine**, Chicago, USA, v.37, n.11, p. 2259-2272, 2009.

FOX, S.M.; BURBIDGE, H.M.; BRAY, J.C.; GUERIN, S.R.; ox, S.M., Burbidge, H.M., Bray, J.C. Ununited anconeal process: lag-screw fixation. **Journal of American Animal Hospital Association**, Denver, USA, v. 32, n. 1, p. 52–56, 1996.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHYAN, R.K.; GERASIMOV, U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. **Cell and Tissue Kinetics**, Massachusetts, USA, v. 20, n. 3, p. 263-272, 1987.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, New Zealand, v. 16, n. 3, p. 381–390, 1966.

FROELICH, K.; MICKLER, J.; STEUSLOFF, G.; TECHNAU, A.; TIRADO, M.R.; SCHERZED, A.; HACKENBERG, S.; RADELOFF, A.; HAGEN, R.; KLEINSASSER, N. Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion in vitro. **Cytotherapy**, Philadelphia, USA, n. 7, p. 767-781, 2013.

FROJMOVIC, M.; MILTON, J. Human platelet size, shape, and related functions in health and diseases. **Physiological Reviews**, Maryland, USA, v. 62, n. 1, p. 185-261, 1982.

FROSINA, G. DNA repair in normal and cancer stem cells, with special reference to the central nervous system. **Current Medicinal Chemistry**, Cambridge, UK, v. 16, n. 7, p. 854-866, 2009.

FUCHS, R.; STELZER, I.; DREES, C.M.P.; REHNOLT, C.; SCHRAML, E.; SADJAK, A.; SCHWINGER, W. Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v. 36, n. 1, p. 113–117, 2012.

GAISSMAIER, C.; KOH, J. L.; WEISE, K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. **Injury**, Philadelphia, USA, v.39, n.1, p.88-96, 2008.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Matriz Extracelular, Cartilagem e Tecido ósseo. In: **Tratado de histologia em cores**. 3 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, Cap. 4 e 7, p. 71-75 e 133-138, 2007.

GIANNOTI, S.; BOTTAI, V.; GHILARDI, M.; DELL'OSSO, G.; FAZZI, R.; TROMBI, L.; PETRINI, M.; GUIDO, G. Treatment of pseudoarthrosis of the upper limb using expanded mesenchymal stem cells: a pilot study. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Roma, Italy, v. 17, n. 2, p. 224-227, 2013.

GONZÁLEZ, M.A.; GONZALEZ-REY, E.; RICO, L.; BUSCHER, D.; DELGADO, M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Arthritis & Rheumatology**, Massachusetts, USA, v. 60, n. 4, p. 1006–1019, 2009.

GRAD, S.; EGLIN, D.; ALINI, M.; STODDART, M.J. **Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: a review. Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, USA, v. 469, n. 10, p. 2764-2772, 2011.

GRIGOLO, B.; LISIGNOLI, G.; DESANDO, G.; CAVALLO, C.; MARCONI, E.; TSCHON, M.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; GIARDINO, R.; FACCHINI, A. Osteoarthritis Treated with Mesenchymal Stem Cells on Hyaluronan-Based Scaffold in Rabbit. **Tissue Engineering Part C: Methods**, New York, USA, v. 15, n. 4, p. 647-658, 2009.

GUERCIO A, DI MARCO P, CASELLA S, CANNELLA V, RUSSOTTO L, PURPARI G, DI BELL S, PICCIONE G. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. **Cell Biology International Immediate Publication**, Massachusetts, USA, v. 36, n. 2, p. 189-194, 2012.

GUO, X.; PARK, H.; YOUNG, S.; KRETLOW, J.D.; VAN DEN BEUCKEN, J.J.; BAGGETT, L.S.; TABATA, Y.; KASPER, F.K.; MIKOS, A.G.; JANSEN, J.A. Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 39-47, 2010.

HALEEM, A.M.; SINGERGY, A.A.; SABRY, D.; ATTA, H.M.; RASHED, L.A.; CHU, C.R.; EL SHEWY, M.T.; AZZAM, A.; ABDEL AZIZ, M.T. The clinical use of human culture-expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on platelet-rich fibrin glue in the treatment of articular cartilage defects: a pilot study and preliminary results. **Cartilage**, California, USA, v. 4, p. 253-261, 2010.

HARDIE, E.M.; ROE, S.C.; MARTIN, F.R. Radiographic evidence of degenerative joint disease in geriatric cats: 100 cases (1994–1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Illinois, USA, v. 220, n. 5, p. 628-632, 2002.

HAYAMI, T.; PICKARSKI, M.; WESOLOWSKI, G.A.; MCLANE, J.; BONE, A.; DESTEFANO, J.; RODAN, G.A.; DUONG LE, T. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. **Arthritis & Rheumatology**, Massachusetts, USA, v. 50, n. 4, p. 1193-1206, 2004.

HEDLEY, B.D.; KEENEY, M. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. **International Journal of Laboratory Hematology**, Massachusetts, USA, v. 35, n. 3, p. 344-350, 2013.



HENROTIN, Y.A.; SANCHEZ, C.; BALLIGAND, M. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, USA, v. 170, n.1, p. 113–123, 2005.

HILDNER, F.; EDER, M.J.; HOFER, K.; ABERL, J.; REDL, H.; VAN GRIENSVEN, M.; GABRIEL, C.; PETERBAUER-SCHERB, A. Human platelet lysate successfully promotes proliferation and subsequent chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells: a comparison with articular chondrocytes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Massachusetts, USA, v. 5, n.3. p. 113-124, 2013.

HOCHBERG, M.C.; ALTMAN, R.D.; BRANDT, K.D.; MOSKOWITZ, R.W. Design and conduct of clinical trials in osteoarthritis: preliminary recommendations from a task force of the Osteoarthritis Research Society. **The Journal of Rheumatology**, Toronto, Canada, v. 24, n. 4, p.792-794, 1997.

HOLLANDER, A.P.; DICKINSON, S.C.; KAFIENAH, W. Stem Cells and Cartilage Development: Complexities of a Simple Tissue. **Stem Cells**, Massachusetts, USA v.28, p.1992–1996, 2010.

HUNTER, D.J.; FELSON, D.T. Osteoarthritis. **British Medical Journal**, London, UK, v. 332, n. 7542, p. 639-42, 2006.

HUNZIKER, E.B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. **Osteoarthritis and Cartilage**, New Jersey, USA, v.10, n.6, p. 432–463, 2002.

INNES, J.F. Arthritis. In: **Veterinary Surgery Small Animal**. TOBIAS, K.M.; JOHNSTONE, S.A. London, UK, Elsevier, cap.68, v.1, p. 3033-3070, 2011.

JO, C.H.; LEE, Y.G.; SHIN, W.H.; KIM, H.; CHAI, J.W.; JEONG, E.C.; KIM, J.E.; SHIM, H.; SHIN, J.S.; RA, J.C.; OH, S.; YOON, K.S. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. **Stem Cells**, Massachusetts, USA, v.32, n.5, p. 1254–1266, 2014.

JOHNSTON, S.A. Osteoarthritis: joint anatomy, physiology, and pathobiology. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, Philadelphia, USA, v. 27, n. 4, p. 699-723, 1997.

JORGENSEN, C. Mesenchymal stem cells immunosuppressive properties: is it specific to bone marrow-derived cells? **Stem Cell & Research Therapy**, London, UK, v. 1, n. 15, p.1-2, 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido cartilaginoso. In: **Histologia básica**. 11° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 110-114.

KAKUDO, N.; MINAKATA, T.; MITSUI, T.; KUSHIDA, S.; NOTODIHARDJO, F.Z.; KUSUMOTO, K. Proliferation-promoting effect of platelet rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Philadelphia, USA, v. 122, n. 5, p. 1352–1360, 2008.

KASEMKIJWATTANA, C.; HONGENG, S.; KESPRAYURA, S.; RUNGSINAPORN, V.; CHAIPINYO, K.; CHANSIRI, K. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells implantation for cartilage defects: two cases report. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, Thailand, v. 94, n. 3, p. 395-400, 2011.

KIKUCHI, T.; SAKUTA, T.; YAMAGUCHI, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. **Osteoarthritis and Cartilage**, New Jersey, USA v. 6, n.3, p. 177-186, 1998.

KIM, B.S.; KANG, K.S.; KANG, S.K. Soluble factors from ASCs effectively direct control of chondrogenic fate. **Cell Proliferation**, Massachusetts, USA, v. 43, n. 3, p. 249-261, 2010.

KOGA, H.; SHIMAYA, M.; MUNETA, T.; NIMURA, A.; MORITO, T.; HAYASHI, M.; SUZUKI, S.; JU, Y.J.; MOCHIZUKI, T.; SEKIYA, I. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. **Arthritis Research & Therapy**, London, UK, v. 10, n. 4, p. 1-10, 2008.

KOH, Y.G.; CHOI, Y.J.; KWON, O.R.; KIM, Y.S. Second-Look Arthroscopic Evaluation of Cartilage Lesions After Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees. **The American Journal of Sports Medicine**, Chicago, USA, v. 42, n. 7, p. 1628-1637, 2014.

KON, E.; FILARDO, G.; MATTEO, B.D.; MARCACCI, M. PRP for the treatment of cartilage pathology. **The Open Orthopaedics Journal**, Sharjah, Emirados Árabes, v. 3, n. 7, p. 120–128, 2013.

KRUGER, J.P.; HONDKE, S.; ENDRES, M.; PRUSS, A.; SICLARI, A.; KAPS, C. Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. **Journal of Orthopaedic Research**, Illinois, USA, v. 30, n. 6, p. 845–852, 2012.

KWON, D.R.; PARK, G.Y.; LEE, S.U. The effects of intra-articular platelet-rich plasma injection according to the severity of collagenase-induced knee osteoarthritis in a rabbit model. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p. 458–465, 2012.

LARK, M.W.; BAYNE, E.K.; FLANAGAN, J.; HARPER, C.F.; HOERRNER, L.A.; HUTCHINSON, N.I.; SINGER, I.I.; DONATELLI, S.A.; WEIDNER, J.R.; WILLIAMS, H.R.; MUMFORD, R.A.; LOHMANDER, L.S. Aggrecan degradation in human cartilage: evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, USA, v. 100, n.1, p. 93-106, 1997.

LAUTEN, S.D.; Nutritional risks to large-breed dogs: from weaning to the geriatric years. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, Philadelphia, USA, v. 36, n. 6, p. 1345-1359, 2006.

LAWRENCE, R.C.; FELSON, D.T.; HELMICK, C.G.; ARNOLD, L.M.; CHOI, H.; DEYO, R.A.; GABRIEL, S.; HIRSCH, R.; HOCHBERG, M.C.; HUNDER, G.G.; JORDAN, J.M.; KATZ, J.N.; KREMERS, H.M.; WOLFE, F. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. **Arthritis & Rheumatology**, Massachusetts, USA, v. 58, n. 1, p. 26–35, 2008.

LEE, C.H.; COOK, J.L.; MENDELSON, A.; MOIOLI, E.K.; YAO, H.; MAO, J.J. Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. **The Lancet**, Amsterdam, v. 376, n. 9739, p. 440-448, 2010.

LEE, J.M.; IM, G.I. SOX trio-co-transduced adipose stem cells in fibrin gel to enhance cartilage repair and delay the progression of osteoarthritis in the rat. **Biomaterials**, London, UK, v. 33, n. 7, p. 2016-2024, 2012.

LEE, K.B.; HIU, J.H.; SONG, I.C.; ARDANY, L.; LEE, E.H. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. **Stem Cells**, Massachusetts, USA, v. 25, p. 2964-2971, 2007.

LEE, K.B.; WANG, V.T.; CHAN, Y.H.; HUI, J.H. A novel, minimally-invasive technique of cartilage repair in the human knee using arthroscopic microfracture and injections of mesenchymal stem cells and hyaluronic acid e a prospective comparative study on safety and short-term efficacy. **Annals, Academy of Medicine, Singapore**, v. 41, p. 511-517, 2012.

LEVINE, J.W.; KIAPOUR, A.M.; QUATMAN, C.E.; WORDEMAN, S.C.; GOEL, V.K.; HEWETT, T.E.; DEMETROPOULOS, C.K. Clinically relevant injury patterns after an anterior cruciate ligament injury provide insight into injury mechanisms. **The American Journal of Sports Medicine**, Chicago, USA, v. 41, n. 1, p. 385–395, 2013.

LEYH, M.; SEITZ, A.; DURSELEN, L.; SCHAUMBURGER, J.; IGNATIUS, A.; GRIFKA, J.; GRASSEL, S. Subchondral bone influences chondrogenic differentiation and collagen production of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and articular chondrocytes. **Arthritis Research & Therapy**, London, UK, v. 16, n. 5, p. 2014

LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, P.R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. **ANZ Journal of Surgery**. New Zealand, v. 79, n. 4, p.235–244, 2009.

LOHMANDER, L.S.; OSTENBERG, A., ENGLUND, M.; ROSS, H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. **Arthritis & Rheumatology**, Massachusetts, USA, v. 50, n. 10, p. 3145–3152, 2004.

MAGGINI, J.; MIRKIN, G.; BOGNANNI, I.; HOLMBERG, J.; PIAZZÓN, I.M.; NEPOMNASCHY, I.; COSTA, H.; CAÑONES, C.; RAIDEN, S.; VERMEULEN, M.; GEFFNER, J.R. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. **Plos One**, San Francisco, USA, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2010.

MAKRIS, E.A.; GOMOLL, A.H.; MALIZOS, K.N.; HU, J.C.; ATHANASIOU, K.A. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. **Nature Reviews Rheumatology**, London, UK, p.1-14, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2014.157>>

MANDELBAUM, B.R.; BROWNE, J.E.; FU, F.; MICHELI, L.; MOSELY, J.C.; ERGGELET, C.; MINAS, T.; PETERSON, L. Articular cartilage lesions of the knee. **The American Journal of Sports Medicine**, Chicago, USA, v. 26, p. 853-861, 1998.

MANKIN, H.J.; DORFMAN, H.; LIPPIELLO, L.; ZARINS, A.; Biochemical and Metabolic abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-Arthritic Human Hips. II Correlation of Morphology with Biochemical and Metabolic Data. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, USA, v. 53, n.3, p.523-537, 1971.

MARKARIAN, C.F.; FREY, G.Z.; SILVEIRA, M.D.; CHEM, E.M.; MILANI, E.M.; ELY, P.B.; HORN, A.P.; NARDI, N.B.; CAMASSOLA, M. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. **Biotechnology Letters**, Germany, v. 36, n. 4, p. 693-702, 2014.

MARTIN, J.A.; BUCKWALTER, J.A. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, USA, v. 85, n. 2, p.106-110, 2003.

MARTINEZ, S.A.; CORONADO, G.S. Acquired conditions that lead to osteoarthritis in the dog. **Veterinary Clinical North America Small Animal Practitioners**, Philadelphia, USA, v. 27, n.4, p. 759–775, 1997.

MARX, RE. Platelet Rich plasma (PRP): What is PRP and What is not? **Implant Dentistry**, Philadelphia, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.

MCCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. **Journal of Orthopaedic Research**, Illinois, USA, v. 27, p. 1033–1042, 2009.

MESSIER, S.P. Obesity and osteoarthritis: disease genesis and nonpharmacologic weight management. **Rheumatic Disease Clinics of North American**, Maryland, USA, v. 34, n. 3, p. 713-729, 2008.

MIFUNE, Y.; MATSUMOTO, T.; TAKAYAMA, K.; OTA, S.; LI, H.; MESZAROS, L.B.; USAS, A.; NAGAMUNE, K.; GHARAIBEH, B.; FU, F.H.; HUARD, J. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. **Osteoarthritis and Cartilage**, New Jersey, USA, v. 21, n. 1, p. 175–185, 2013.

MIKOS, A.G.; HERRING, S.W.; OCHAREON, P.; ELISSEEFF, J.; LU, H.H.; KANDEL, R.; SCHOEN, F.J.; TONER, M.; MOONEY, D.; ATALA, A.; VAN DYKE, M.E.; KAPLAN, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Engineering complex tissues. **Tissue Engineering**, California, USA, v. 2, n. 12, p. 3307- 3339, 2006.

MISHRA, A.; TUMMALA, P.; KING, A.; LEE, B.; KRAUS, M.; TSE, V.; JACOBS, C.R. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. **Tissue Engineering Part C: Methods**, New York, USA, v. 15, n. 3, p. 431–435, 2009.

MITHOEFER, K. Complex articular cartilage restoration. **Sports Medicine and Arthroscopic Review**, Philadelphia, USA, v. 21, n. 1, p. 31-37, 2013.

MOBASHERI, A.; CSAKI, C.; CLUTTERBUCK, A.L; RAHMANZADEH, M.; SHAKIBAEI, M. Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: Applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy. **Histology and Histopathology**, Spain, v. 24, n. 3, p. 347-366, 2009.

MOBASHERI, A.; KALAMEGAME, G.; MUSUMECI, G.; BATT, M.E. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. **Maturitas**, Philadelphia, USA, v. 78, n. 3, p. 188-198, 2014.

MOKBEL, A.; EL-TOOKHY, O.; SHAMAA, A.A.; SABRY, D.; RASHED, L.; MOSTAFA, A. Homing and efficacy of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in experimental chondral defects in dogs. **Clinical and Experimental Rheumatology**, Pisa, Italy, v. 29, n. 2, p. 275-284, 2011.

MOLLON, B.; KANDEL, R.; CHAHAL.; THEODOROPOULOS, J. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. **Osteoarthritis and Cartilage**, New Jersey, USA, v. 21, p. 1824- 1833, 2013.

MOORE, G.E.; BURKMAN, K.D.; CARTER, M.N.; PETERSON, M.R. Causes of death or reasons for euthanasia in military working dogs: 927 cases (1993-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Illinois, USA, v. 219, p. 209–214, 2001.

MOROZ, A. **Avaliação de novas propostas em arcabouços tridimensionais (3D) para cultura de células-tronco mesenquimais e condrogênese**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica)-Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

MOROZ, A.; BITTENCOURT, R.A.C.; ALMEIDA, R.P.; FELISBINO, S.L.; DEFFUNE, E. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: An improved approach in cartilage tissue engineering. **Platelets**, London, UK, v. 24, n. 3, p. 219-225, 2013.

MORTELLARO, C.M. Pathophysiology of osteoarthritis. **Veterinary Research Communications**, Philadelphia, USA, v. 27, n. 1, p. 75–78, 2003.

MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B.; BARRY, F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatology**, Massachusetts, USA, v. 48, n. 12, p. 3464-3474, 2003.

NGUYEN, R.T.; BORG-STEIN, J.; MCLNNIS, K. Applications of platelet-rich plasma in musculoskeletal and sports medicine: an evidence-based approach. **Physical Medicine and Rehabilitation**, Illinois, USA, v.3, 226-50, 2011.

NIKITINA, V.A.; CHAUSHEVA, A.L.; ZHANATAEV, A.K.; OSIPOVA, E.Y.; DURNEV, A.D.; BOCHKOV, N.P. Assessment of DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal stromal cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, Germany, v. 151, n. 4, p. 550-552, 2011.

NOTH, U.; STEINERT, A.F.; TUAN, R.S. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, London, UK, v. 4, n. 7, p. 371-380, 2008.

O'DRISCOLL, S.W. The healing and regeneration of articular cartilage. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 80, n. 12. p. 1795–1812, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The World Health Report 2002**. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, p. 197.

OROZCO, L.; MUNAR, A.; SOLER, R.; ALBERCA, M.; SOLER, R.; HUGUET, M.; SENTÍS, J.; SÁNCHEZ, A.; GARCÍA-SANCHO, J. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. **Transplantation**, Philadelphia, USA, v. 97, n. 11, p. 1535–1541, 2013.

ORTH, P.; REY-RICO, A.; VENKATESAN, J.K.; MADRY, H.; CUCCHIARINI, M. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, Auckland, New Zealand, v. 7, p. 1–17, 2014.

OWENS, S.; WAGNER, P.; VANGSNESS, C.T.J.R. Recent advances in glucosamine and chondroitin supplementation. **The Journal of Knee Surgery**, New York, USA, v.17, n.4, p.185-193, 2004.

PAK, J. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. **Pain Physician**, Massachusetts, USA, v. 1, n. 1, p. 75-85, 2012.

PAREKKADAN, B.; MILWID, J.M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, California, USA, v. 15, n. 12, p. 87–117, 2010.

PARK, K.; GERSON, S.L. DNA repair defects in stem cell function and aging. **Annual Review of Medicine**, California, USA, v. 56, p. 495-508, 2005.

PARKER, A.M.; KATZ, A.J. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. **Expert Opinion in Biological Therapy**, Switzerland, v. 6, n. 6, p. 567-578, 2006.

PASTIDES, P.; CHIMUTENGWENDE-GORDON, M.; MAFFULLI, N.; KHAN, W. Stem cell therapy for human cartilage defects: a systematic review. **Osteoarthritis and Cartilage**, New Jersey, USA, v. 21, n. 5, p. 646-654, 2013.

PEETERS, C.M.M.; LEIJS, M.J.C.; REIJMAN, M.; VAN OSCH, G.J.V.M, BOS, P.K. Safety of intra-articular cell-therapy with culture-expanded stem cells in humans: a systematic literature review. **Osteoarthritis and Cartilage**, New Jersey, USA, v. 10, 1465-1473, 2013.

PELLETIER, J.P.; DIBATISTA, J.A.; ROUGHLEY, P.; McCOLLUM, R.; MARTEL-PELLETIER, J. Cytokines and inflammation in the cartilage degradation. **Rheumatic Disease Clinics of North American**, Maryland, USA, v. 19 n. 3, p. 545-65, 1993.



PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Washington, USA, v. 284, p. 143–147, 1999.

REMEDIOS, A.M.; BASHER, A.W.; RUNYON, C.L.; FRIES, C.L. Medial patellar luxation in 16 large dogs. A retrospective study. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, USA, v. 21, n. 1, p. 5–9, 1992.

RODRÍGUEZ, F.J.; VALDÉS, T.; CARRILO, J.M.; RUBIO, M.; MONLEON, M.; GARCÍA, D.M.; GARCÍA, M.; CUGAT, R.; MORENO, V. Platelet-rich plasma favors proliferation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells in methacrylate-endcapped caprolactone porous scaffold niches. **Journal of Functional Biomaterials**, Basel, Switzerland, v. 3, n. 3, p. 556–568, 2012.

ROSEMBERG, L.C. Articular cartilage lesions: a practical guide to assessment and treatment. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, USA, v. 87, p. 921-922, 2005.

SAITO, M.; TAKAHASHI, K.A.; ARAI, Y.; INOUE, A.; SAKAO, K.; TONOMURA, H.; HONJO, K.; NAKAGAWA, S.; INOUE, H.; TABATA, Y.; KUBO, T. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. **Clinical and Experimental Rheumatology**, Pisa, Italy v. 27, n. 2, p. 201–207, 2009.

SATO, M.; UCHIDA, K.; NAKAJIMA, H.; MIYAZAKI, T.; GUERRERO, A.R.; WATANABE, S.; ROBERTS, S.; BABA, H. Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, London, UK, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2012.

SCHILLER, A.L.; TEITELBAUM, S.L. Ossos e articulações. In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p 1289-1363.

SCHRAUFSTATTER, I.U.; DISCIPIOI, R.G.; KHALDOYANIDI, S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. **Frontiers in Bioscience**, California, USA, v.1, n.17, p.2271-2288, 2011.

SCHULZ, K. Afecções Articulares: Doença articular degenerativa. In: FOSSUM, TW. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed., São Paulo, Mosby Elsevier; 2008. cap. 33, p.1155.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SIMON, T.M.; JACKSON, D.W. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, Philadelphia, USA, v. 14, n. 3, p. 146-154, 2006.

SINGH, A.; GOEL, S.C.; GUPTA, K.K.; KUMAR, M.; ARUN, G.R.; PATIL, H.; KUMARASWAMY, V.; JHA, S. The role of stem cells in osteoarthritis: An experimental study in rabbits. **Bone and Joint Research**, London, UK, v. 3, n. 2, p. 32–37, 2014.

SMYTH, N.A.; HALEEM, A.M.; MURAWSKI, C.D.; DELAND, J.T.; KENNEDY, J.G. The effect of platelet-rich plasma on autologous osteochondral transplantation: an in vivo rabbit model. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, USA, v.95, n.24, p.2185-2193, 2013.

SONG, F.; TANG, J.; GENG, R.; HU, H.; ZHU, C.; CUI, W.; FAN, W. Comparison of the efficacy of bone marrow mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep model. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Wisconsin, USA, v. 7, n. 4, p. 1415-1426, 2014.

STECK, E.; FISCHER, J.; LORENZ, H.; GOTTERBARM, T.; JUNG, M.; RICHTER, W. Mesenchymal Stem Cell Differentiation in an Experimental Cartilage Defect: Restriction of Hypertrophy to Bone-Close Neocartilage. **Stem Cells and Development**, New York, USA, v. 18, n. 7, p. , 2009.

STEWART, A.A.; BYRON, C.R.; PONDENIS, H.; STEWART, M.C. Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, USA, v. 68, n. 9, p. 941–945, 2007.

TER HUURNE, M.; SCHELBERGEN, R.; BLATTES, R.; BLOM, A.; DE MUNTER, W.; GREVERS, L.C.; JEANSON, J.; NOEL, D.; CASTEILLA, L.; JORGENSEN, C.; VAN DEN BERG, W.; VAN LENT, P.L. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intra articular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatology**, Massachusetts, USA, v. 64, n. 11, p. 3604-3613, 2012.

TOGHRAIE, F.S.; CHENARI, N.; GHOLIPOUR, M.A.; FAGHIH, Z.; TORABINEJAD, S.; DEHGHANI, S.; GHADERI, A. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. **The Knee**, London, UK, v. 18, n. 2, p. 71–75, 2011.

TONCHEV, A.B.; BELTOWSKI, J.; FIORE, M.; RANCIÉ, G.; CHECHI-KOSTOVA, K.; BOJANIC, V.; KOSTOV, D.D.; CHALDAKOV, G.N. Adipobiology of stem cell-based therapy: secretome insight. **Biomedical Reviews**, Bulgaria, v.21, 57-63, 2010.

UCCELLI, A.; PISTOIA, V.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression. **Trends in Immunology**, Amsterdam, v. 28, n. 5, p. 219–226, 2007.

VALDES, A.M.; DOHERTY, M.; SPECTOR, T.D. The additive effect of individual genes in predicting risk of knee osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, UK, v. 67, n. 1, p. 124-127, 2008.

VAN BUUL, G.M.; SIEBELT, M.; LEIJIS, M.J.C.; BOS, P.K.; WAARSING, J.H.; KOPS, N.; WEINANS, H.; VERHAAR, J.A.; BERNSEN, M.R.; VAN OSCH, G.J. Mesenchymal Stem Cells Reduce Pain But Not Degenerative Changes in a Mono-Iodoacetate Rat Model of Osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, Illinois, USA, v. 32, n. 9, p. 1167-1174, 2014.

VAN HAGEN, M.A.E.; DUCRO, B.J.; VAN DEN BROEK, J.; KNOL, B.W. Incidence, risk factors, and heritability estimates of hind limb lameness caused by hip dysplasia in a birth cohort of Boxers. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, USA, v. 6, n. 2, p. 307-312, 2005.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**, London, UK, v. 37, p. 1528–1542, 2009.

VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M.; PEREIRA, M.S.; FRANCO, T.R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p.24-28, 2006.

VILAR, J.M.; MORALES, M.; SANTANA, A.; SPINELLA, G.; RUBIO, M.; CUERVO, B.; CUGAT, R.; CARRILO, J.M. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. **BMC Veterinary Research**, London, UK, v. 9, n. 131, p. 1-6, 2013.

WANDEL, S.; JUNI, P.; TENDAL, B.; NUESCH, E.; VILLIGER, P.M.; WELTON, N.J.; REICHENBACH, S.; TRELLE, S. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: Network meta-analysis. **British Medical Journal**, London, UK, v.341, p. 4675, 2010.

WHITEHAIR, J.G.; VASSEUR, P.B.; WILLITS, N.H. Epidemiology of cranial cruciate ligament rupture in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Illinois, USA, v. 203, n. 7, p. 1016-1019, 1993.

WHITMAN, D.H.; BERRY, R.L.; GREEN, D.M. Platelet Gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, USA, v. 55, n. 11, p. 1294-99, 1997.

WIDUCHOWSKI, W.; LUKASIK, P.; KWIATKOWSKI, G.; FALTUS, R.; SZYLUK, K.; WIDUCHOWSKI, J.; KOCSBY, Z. Isolated full thickness chondral injuries. Prevalance and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. **Acta Chirurgiae Orthopaedicae Traumatologiae Cechoslovaca**, Praha, Czech Republic, v. 75, n. 5, p. 382- 386, 2008.

WHITLOW, J.; SHACKELFORD, A.; SIEVERT, A.; SISTINO, J. Barriers to the acceptance and use of autologous platelet gel. **Perfusion**, London, UK, v.23, n.5, p. 283-289, 2008.

WONG, K.L.; LEE, K.B.; TAI, B.C.; LAW, P.; LEE, E.H.; HUI, J.H. Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. **Arthroscopy**, Winston-Salem, USA, v. 29, n. 12, p. 2020–2028, 2013.

YAMAZOE, K.; MISHIMA, H.; TORIGOE, K.; IJIMA, H.; WATANABE, K.; SAKAI, H.; KUDO, T. Effects of atelocollagen gel containing bone marrow-derived stromal cells on repair of osteochondral defect in a dog. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, Japan, v. 69, n. 8, p. 835-839, 2007.

YOSHIMI, T.; KIKUCHI, T.; OBARA, T.; YAMAGUCHI, T.; SAKAKIBARA, Y.; ITOH, H.; IWATA, H.; MIURA, T. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. . **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, USA, v.298, p. 296-304, 1994.

ZAKY, S.H.; OTTONELLO, A.; STRADA, P.; CANCEDDA, R.; MASTROGIACOMO, M. Platelet lysate favours in vitro expansion of human bone marrow stromal cells for bone and cartilage engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Massachusetts, USA, v. 2, n. 8, p. 472–481, 2008.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 18, n. 51, p. 247-256, 2004.

ZHANG, Y.; FUYOU, W.; CHEN, J.; NING, Z.; YANG, L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus bone marrow nucleated cells in the treatment of chondral defects. **International Orthopaedics**, Belgium, v. 36, n. 5, p. 1079-1086, 2011.