

CYNTHIA DO PRADO VENDRUSCOLO

**BIOMATERIAIS E TERAPIA CELULAR  
NA REPARAÇÃO DA CARTILAGEM  
ARTICULAR EM EQUINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade “Júlio de  
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para a  
obtenção do grau de médico veterinário

Preceptor: Profa. Adj. Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu

2011

CYNTHIA DO PRADO VENDRUSCOLO

**BIOMATERIAIS E TERAPIA CELULAR  
NA REPARAÇÃO DA CARTILAGEM  
ARTICULAR EM EQUINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade “Júlio de  
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para a  
obtenção do grau de médico veterinário

Área de Concentração: Cirurgia de Grande Animais

Preceptor: Profa. Adj. Dra. Ana Liz Garcia Alves

Coordenador de Estágios: Profa. Dra. Jane Megid

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Vendruscolo, Cynthia do Prado.

Biomateriais e terapia celular na reparação da cartilagem articular em equinos / Cynthia do Prado Vendruscolo. – Botucatu, 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501070

1. Cartilagem articular. 2. Articulações - Doenças. 3. Cavalo - Doenças.

Palavras-chave: Cartilagem hialina; Cavalo; Células tronco mesenquimais; Hidrogel; Osteoartrite.

VENDRUSCOLO, CYNTHIA DO PRADO. Biomateriais e terapia celular na reparação da cartilagem articular em equinos. Botucatu, 2011. 19p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Cirurgia de Grandes Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

A cartilagem articular é a estrutura que reveste as extremidades ósseas nas regiões em que dois ossos se articulam, permitindo a movimentação. Ela possui mecanismos intrínsecos e extrínsecos de reparação ineficientes, resultando normalmente em formação de fibrocartilagem após a lesão. Esta reparação tem resistência, rigidez e características de utilização inferiores quando comparado à cartilagem hialina. As células tronco mesenquimais possuem o potencial de regenerar tecidos sem a produção de cicatriz, e devido a essa característica ela é muito estudada. Porém para que ela tenha o seu máximo potencial condrogênico, se faz necessário a utilização de arcabouço estrutural e fatores de crescimento. Os biomateriais exercem a função de arcabouço para as células permitindo que elas fiquem aderidas, cresçam e produzam matriz extracelular, gerando a reparação com formação de cartilagem hialina. Neste sentido, o objetivo do presente estudo é prover informação sobre os diversos estudos que utilizaram terapia celular e/ou biomateriais para produzir cartilagem hialina.

Palavras chave: osteoartrite, cavalo, regeneração, cartilagem hialina.

VENDRUSCOLO, CYNTHIA DO PRADO. *Biomaterials and cell therapy to repair articular cartilage in horses*. Botucatu, 2011. 19p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Cirurgia de Grandes Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

#### ABSTRACT

Articular cartilage is the structure that coats the bone ends in regions where two bones are articulated, allowing movement. It has inefficient intrinsic and extrinsic mechanisms of repair, usually resulting in fibrocartilage formation after injury. Such repair have lower strength, stiffness and usability features when compared to hyaline cartilage. The mesenchymal stem cells have the potential to regenerate tissue without the production of scar, and because of this feature it is well studied. But to have its maximum chondrogenic potential, it is necessary to use scaffolds and growth factors. Biomaterials play the role of scaffold for the cells allowing them to become attached, grow and produce extracellular matrix, leading to formation of repair with hyaline cartilage. In this sense, the purpose of this study is to provide information on the various studies using cell therapy and / or biomaterials to produce hyaline cartilage.

Keywords: osteoarthritis, horse, regeneration, hyaline cartilage.

## SUMÁRIO

Resumo .....	4
<i>Abstract</i> .....	5
1 INTRODUÇÃO .....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	7
2.1 Cartilagem articular – composição, lesão e reparação .....	7
2.2 Células tronco mesenquimais e biomateriais .....	11
3 CONCLUSÃO .....	16
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	16

## 1 INTRODUÇÃO

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado que reduz o atrito da articulação na extremidade de ossos longos (VINATIER *et al.*, 2009). Esta está sujeita a diversas lesões traumáticas e doenças degenerativas como osteoartrite, levando a defeitos cartilaginosos severos que podem ser acompanhados de dor, imobilidade, rigidez e destruição progressiva da articulação (BARNEWITZ *et al.*, 2006).

Sua reparação ainda é um desafio, apesar do desenvolvimento de tratamentos cirúrgicos como microfraturas, abrasão artroplástica e espongilização, que são utilizados com o intuito de recrutar células tronco mesenquimais (CTM), ao penetrar no osso subcondral (MILLER *et al.*, 2010).

As CTMs surgiram como uma terapia promissora para regenerar a cartilagem hialina, devido ao seu potencial em se diferenciar em diversas células especializadas, entre elas o condrócito. Para auxiliar nesta diferenciação os biomateriais são utilizados, proporcionando um ambiente tridimensional (3D) no qual as células podem se aderir, multiplicar e sintetizar nova matriz extracelular, resultando na sua regeneração.

Tendo em vista estes fatos, discutir-se-ão sobre as características da cartilagem articular, suas lesões e mecanismos de reparação, e ainda sobre utilização de CTM e biomateriais como adjuvantes para sua reparação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cartilagem articular – constituição, lesão e reparação

A cartilagem articular normal apresenta-se leitosa e opaca nas regiões mais espessas e com uma coloração azulada nas regiões mais finas, sendo formada principalmente pela cartilagem hialina. Ela é um tecido constituído de *agrecans* resistentes à compressão, de colágeno que é forte e resistente à tensão e de um fluído com livre movimentação carregando íons móveis (STASHAK, 2006). Existem variações na espessura, densidade celular, composição da matriz e propriedades mecânicas dentro da mesma articulação, entre articulações e entre espécies, entretanto, todas articulações sinoviais consistem dos mesmos componentes, mesma estrutura geral e possui as mesmas funções (BUCKWALTER & MANKIN, 1997).

A cartilagem articular é dividida em quatro camadas:

1. Camada tangencial ou superficial – é formada por condrócitos achatados ou ovoides e fibras colágenas orientadas tangencialmente. Esta camada funciona como uma barreira ao sistema imune. Se ocorrer a sua destruição haverá não só alterações de propriedades mecânicas e estruturais como estímulo para resposta imune inflamatória (BUCKWALTER & MANKIN, 1997).
2. Camada intermediária ou de transição – contém condrócitos largos que podem ser únicos ou pareados e fibras colágenas orientadas de forma aleatória.
3. Camada radiada ou profunda – nesta camada os condrócitos estão arranjados em colunas verticais separadas por fibras colágenas que apresentam de maneira geral um arranjo radial.
4. Camada calcificada – composta por cartilagem mineralizada e condrócitos em vários estágios de degeneração.

O condrócito é a célula arredondada que pode apresentar diferentes formas, tamanhos e, provavelmente, funções nas camadas cartilagosas. Para manter a homeostase tecidual a célula detecta alterações na composição da matriz através da interação com fragmentos provenientes da degradação dos componentes e responde com a síntese de macromoléculas, de tipos e em quantidades apropriadas (BUCKWALTER & MANKIN, 1997). Outro mecanismo que interfere na atividade do condrócito é a intensidade de carga sobre a articulação, que provoca a deformação da matriz produzindo sinais mecânicos, elétricos e fisioquímicos resultando na estimulação das células (BUCKWALTER & LANE, 1996). Se a articulação não se movimentar, a atividade de degradação superará a síntese dos proteoglicanos (PG) da matriz. Já o aumento do uso articular altera a composição e a organização da matriz (BUCKWALTER, 1995).

A matriz extracelular (MEC) é um complexo de colágenos, fibrilas, PG amorfos, glicoproteínas e água (FREEMAN, 1972).

Os tipos de colágenos presentes na MEC são II, VI, IX, X e XI, sendo o principal o tipo II, com 90 a 95% do total. A organização das fibrilas em uma malha densa que se estende pelo tecido resulta em rigidez á tração e resistência da cartilagem articular e contribui com a coesão através da ligação mecânica com os grandes PGs. Os colágenos tipo II, IX e XI são os principais responsáveis pelas ligações cruzadas que conferem resistência. Já o tipo VI, parece cercar os condrócitos sendo importante na adesão destes na matriz (MARCELINO & MCDEVITT, 1995).

Os PGs consistem de um núcleo de proteína e uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) (POOLE *et al.*, 2000), ocupando os espaços entre as fibrilas



colágenas, o que resulta em maior resistência a compressão (STASHAK, 2006). Os GAGs encontrados na cartilagem são o ácido hialurônico, sulfato de condroitina, sulfato de queratan e sulfato de dermatan (BUCKWALTER & MANKIN, 1997). A cartilagem articular contém duas classes principais de PGs: os grandes agregados de monômeros de PGs ou *agrecan* e os pequenos PGs incluindo a decorina, biglican e fibromodulina (POOLE *et al.*, 2000), estes últimos se ligam a macromoléculas da matriz auxiliando na sua estabilização (BUCKWALTER & MANKIN, 1997). Os PGs conferem carga negativa a MEC, resultando em resistência físico-química e também afetando a permeabilidade da cartilagem (STASHAK, 2006).

As glicoproteínas são proteínas de ligação como a condronectina, que acredita-se participar na adesão de condrócitos à superfície do colágeno tipo II, fibronectina, adesão de células a moléculas e superfícies e a proteína oligomérica de matriz cartilaginosa (BUCKWALTER & MANKIN, 1997).

A cartilagem não possui vasos e nervos, sendo que sua nutrição se dá através da difusão de nutrientes provenientes do líquido sinovial. A pressão intermitente exercida na cartilagem durante o movimento da articulação é necessária para que o líquido flua através da cartilagem levando nutrientes para a célula e eliminando seus detritos (STASHAK, 2006).

Todos os componentes da cartilagem normal interagem proporcionando as características mecânicas e físicas de: 1) uma matriz permeável e resistente à compressão, 2) uma rede fibrosa capaz de sustentar forças elevadas de pressão, 3) um líquido que flui quando sob pressão ou deformação e que ajuda na dissipação do estresse elevado no tecido e 4) uma pressão pelo inchaço que resulta em matriz inchada com água (STASHAK, 2006).

Durante a vida, os condrócitos degradam e sintetizam as macromoléculas da matriz. Os mecanismos que controlam esse balanço ainda não são totalmente compreendidos, mas as citocinas parecem ter um importante papel, sendo as principais a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento dependente de insulina-I (IGF-I) e fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), sendo que os dois primeiros agem na destruição da MEC e os dois últimos na sua síntese (BUCKWALTER & MANKIN, 1997).

A lesão ocorre quando há trauma nas estruturas da articulação e osso subcondral, que resultará em aumento das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e TNF- $\alpha$ . Estas por sua vez estimularão os condrócitos a liberarem e ativarem as enzimas metaloproteinases

(MMP), entre elas as colagenases e estromelinases, e serino-proteinases e a produzir a prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), que destruirão fibrilas colágenas, PGs e glicoproteínas, culminando com a degradação da MEC. Além disso, a  $PGE_2$  é a responsável pela vasodilatação, desmineralização óssea, ativação do plasminogênio, liberação de ciclooxigenases, sensibilização das terminações nervosas e aumento da dor (MCWRAITH & TROTTER, 1996). Para controlar a atividade destas enzimas existem os inibidores teciduais de metaloproteinases que bloqueiam a sua atividade, mantendo o equilíbrio.

Após a lesão ocorre normalmente a cicatrização, restauração da integridade estrutural e da função, ou reparo, reposição das células lesadas ou perdidas e da matriz por novas células e matriz, mas não necessariamente restaurando a estrutura e função originais como ocorre na regeneração. Isso é resultado da resposta limitada da cartilagem à lesão tecidual, devido à baixa atividade mitótica e de síntese ineficiente das células e vascularização inexistente, e incapacidade de resposta natural de reparo partindo de tecidos adjacentes em produzir tecidos com propriedades morfológicas, bioquímicas e biomecânicas da cartilagem articular, formando normalmente fibrocartilagem (STASHAK, 2006). Participando desta etapa temos o IGF-I e TGF- $\beta$  que estimulam a síntese da MEC e a proliferação celular (BUCKWALTER & MANKIN, 1997).

A fim de se produzir um melhor tecido de reparação na cartilagem, vários estudos são feitos com células tronco mesenquimais (CTM). Uma das várias razões para a atenção as CTM é que estas células possuem o potencial de regenerar tecidos sem a produção de cicatriz, que é geralmente associado ao processo de reparação (FRISBIE, 2007).

Para se obter regeneração da cartilagem três componentes são necessários: células, arcabouço estrutural e fatores de crescimento (FORTIER & SMITH, 2007). As CTM podem se diferenciar em condrócitos, sendo a fonte de células, mediante um arcabouço estrutural em 3 D, que pode ser obtido através de biopolímeros, e fatores de crescimento específicos para induzir a diferenciação, IGF-I, TGF- $\beta$  e proteína óssea morfogênica (VIDAL *et al.*, 2008). Com base nestes fatores discutir-se-á sobre a interação dos biopolímeros e as CTM na regeneração de lesões na cartilagem hialina.

## 2.2 Células tronco mesenquimais e biomateriais

Células tronco (CT) são definidas como células indiferenciadas que possuem a habilidade de se dividir por período indefinido em cultura e transformar-se em células altamente especializadas de cada tipo de tecido (mesoderma, endoderma e ectoderma). Existem duas grandes categorias de CT, embrionária e derivadas de tecido adulto (FORTIER, 2009). As CTM são células multipotentes podendo se diferenciar em várias linhagens celulares dentro da sua origem germinativa, mesoderma, endoderma e ectoderma (FORTIER, 2005).

As CTM derivadas de tecido adulto podem ser obtidas da medula óssea, gordura, músculo e diversos outros tecidos incluindo cartilagem (BARBERO *et al.*, 2003), osso trabeculado (NOTH *et al.*, 2002) e tendão (SALINGCARNBORIBOON *et al.*, 2003), sendo as derivadas da medula óssea e do tecido adiposo as mais utilizadas. Vários fatores devem ser considerados ao se optar pelas células tronco derivadas de tecido adiposo (CTMDA) ou de medula óssea (CTMMO) como a facilidade do procedimento para coleta, número de células coletadas, capacidade e eficiência de se diferenciar em vários tecidos mesenquimais, assim como a morbidade associada com o procedimento de coleta (FRISBIE & SMITH, 2010).

Existem inúmeros estudos comparando o potencial condrogênico das CTMDA e CTMMO (IM *et al.*, 2005; KISIDAY *et al.*, 2011; VIDAL *et al.*, 2008; FRISBIE *et al.*, 2009). Nos experimentos de Im *et al.* (2005), Kisiday *et al.* (2011) e Vidal *et al.* (2008) foram observados resultados melhores com as CTMMO com maior produção de MEC, comprovados pela maior produção de PGs (coloração de Safarin O), produção de colágenos tipo II (técnicas de imunohistoquímica) e diferenciação das CTM em condrócitos com formato arredondado e distribuídos homoganeamente na MEC (análise histológica através de cortes corados com hematoxilina e eosina (HE)). Já Frisbie *et al.* (2009) observaram melhora com a utilização das CTMMO, diminuição dos níveis de PGE<sub>2</sub>, e com as CTMDA houve aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ , que é ativador das MMP, sendo prejudicial para a cartilagem.

Os produtos contendo CTMs podem ser divididos em duas grandes categorias. A primeira categoria inclui os não expandidos que incluem a medula óssea com ou sem concentração, concentrado de células nucleadas do sangue do cordão umbilical, fração vascular estromal do tecido adiposo e o plasma rico em plaquetas. A segunda inclui as

culturas expandidas, produtos autólogos e halogênicos, incluindo CTMMO, CTMDA, CTM do cordão umbilical e CTM do tecido da medula (BORJESSON & PERONI, 2011).

Em estudo conduzido por McIlwraith *et al.* (2010) foi criada, com o auxílio de artroscópio, uma lesão de 1 cm<sup>2</sup> nos dois côndilos mediais femorais de dez cavalos, com debridamento do osso subcondral seguido de microfraturas. Após um mês uma das lesões, escolhidas aleatoriamente, foi tratada com aplicações intra-articulares de 20 x 10<sup>6</sup> CTMMO e ácido hialurônico (HA) e outra só com HA, seguido de um protocolo de fisioterapia. Com a avaliação artroscópica após seis meses, foi observada uma melhora significativa na rigidez e qualidade do tecido nas lesões tratadas com as células. Além disso, a análise imunohistoquímica revelou maiores níveis de *agrecans* no mesmo grupo, indicando que as CTM utilizadas melhoraram a reparação da cartilagem.

Wilke *et al.* (2007) provocaram doze lesões de 15 mm nas articulações femoropatelares de seis equinos. O grupo experimental recebeu o tratamento com CTM da medula óssea e fibrina autóloga, que serviu como arcabouço 3 D para as células, e o outro apenas com fibrina, seguido de fisioterapia. Na avaliação artroscópica após 30 dias do tratamento observou-se a lesão completamente preenchida e homogênea no grupo tratado com as células, obtendo os melhores escores e classificações artroscópicas em todos os parâmetros. Na biópsia aos 30 dias houve aumento na coloração de azul de toluidina, indicando maior conteúdo de PGs, e melhor aparência dos condrócitos, embora nos escores avaliados a melhora não tenha sido significativa entre os grupos. Na análise macroscópica após oito meses não houve diferença. Já na avaliação histológica observou-se melhora fraca na ligação a cartilagem articular, aumento no conteúdo de proteoglicanos nas camadas mais profundas, não havendo diferença no conteúdo de colágeno tipo II. Estes resultados indicam uma condrogênese incompleta das CTM.

Em um estudo (FERRIS *et al.*, 2009) retrospectivo apresentado no Congresso da Associação Americana de Médicos de Equinos (AAEP) abrangendo 97 equinos e 101 lesões tratadas com CTMMO, cinquenta e dois de sessenta e um (85%) lesões em tecidos moles e vinte e nove de quarenta (70%) lesões ortopédicas foram recuperadas e os animais voltaram a trabalhar normalmente. O acompanhamento médio foi de vinte e um meses, sendo o intervalo de sete a trinta e nove meses. Estes dados confirmam os relatos de casos de sucesso no tratamento de lesões musculoesqueléticas com o uso das CTMMO.

Com o intuito de auxiliar as CTM, os biopolímeros são utilizados para promover a reparação da cartilagem, ao prover um arcabouço para a adesão, crescimento e

diferenciação das células, e ainda podendo agir como veículo de proteínas e genes para regenerar o tecido funcional (STOOP, 2008).

Primeiramente, o material deve agir como estrutura de suporte para as células e possuir suficiente força mecânica, suportando *in vivo* as forças durante o movimento da articulação. Segundo, algum nível de bioatividade deve ser oferecido para acomodar a adesão e migração celular. Além disso, os materiais devem ser biodegradáveis e remodelar assim que a nova cartilagem é formada e substitui a construção original. Logo, a matriz não deve ser tóxica, nem atraente e não pode estimular as células inflamatórias, sendo ainda não imunogênica, fatores estes que podem ser prejudiciais para a regeneração tecidual. Finalmente, o arcabouço estrutural deve ser de fácil manuseio durante a utilização clínica, permitindo a fixação do material no local desejado (STOOP, 2008). Outro item importante é o tamanho dos poros e a porosidade do biomaterial que determinará o balanço da integridade do material, suporte nutricional e invasão celular para o sucesso do tecido (ROTTER *et al.*, 2007), sendo que a porosidade da cartilagem articular normal é de 78% (ARMSTRONG *et al.*, 1982).

Os materiais utilizados são variados como o colágeno, ácido hialurônico, fibrina, polímeros naturais baseados em açúcares, polilactida, poliglicolida e seus copolímeros (poli (D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)) (ROTTER *et al.*, 2007), misturas de materiais e até polímeros derivados da própria MEC da cartilagem (CHENG *et al.*, 2009).

Malicev *et al.* (2007) testou *in vitro* o cultivo de condrócitos humanos em arcabouço de colágeno e gel de fibrina e em colágeno apenas. No primeiro as células se aderiram, distribuíram-se uniformemente pelo meio, sintetizaram mais colágeno tipo II, *agrecans*, mantendo o seu formato arredondado e função, provando ser um bom meio para condrogênese. Já no cultivo em colágeno as células não aderiram tão bem, mudaram de aparência, ficando mais alongadas e em formato fibroblastóide, sintetizando predominantemente colágeno tipo I, indicando um pobre potencial para o cultivo de cartilagem. Utilizando-se também o colágeno, só que desta vez equino, com condrócitos de coelhos Franceschi *et al.* (2005) obtiveram uma boa integração ao tecido adjacente após três meses do tratamento, e após seis meses era possível observar a completa degradação do biomaterial e uma mistura de cartilagem hialina e fibrocartilagem. Ao final do experimento, com doze meses, observaram no grupo tratado com células e colágeno a formação de cartilagem hialina bem organizada, com células distribuídas homogeneamente e com grande presença de PGs, contradizendo os resultados obtidos por Malicev *et al.* (2007).

Em outro estudo *in vitro* (CHENG *et al.*, 2009) foi testado um biomaterial derivado da MEC da cartilagem de suínos juntamente com CTMDA, derivadas da lipoaspiração de humanos, sem a adição de TGF- $\beta$ . As células foram submetidas à cultura por quatro passagens para depois serem cultivadas no meio proposto. Os marcadores positivos para condrogênese de *agrecans* e colágeno tipo II aumentaram e os negativos de colágeno tipo I não teve diferença e do tipo X diminuiu. Na análise imunohistoquímica foi observado aumento do conteúdo de PGs e colágeno tipo II, revelando a habilidade condrogênica do meio mesmo sem a utilização de TGF.

A ação condrogênica *in vitro* sobre CTMMO de coelhos da associação de fibrina e HA foi testada por Park *et al.* (2011). As células foram previamente cultivadas em monocamada a fim de aumentar a sua quantidade. Finalmente,  $5 \times 10^6$  células foram colocadas no arcabouço de fibrina e HA,  $5 \times 10^6$  células no alginato e  $5 \times 10^5$  no *pellet*, na presença e ausência de TGF- $\beta$ . As culturas foram analisadas com um dia, uma, duas e quatro semanas. A viabilidade celular, conteúdo de sulfato de GAG, colágeno tipo II, expressão de fatores condrogênicos e as propriedades mecânicas foram todos maiores no grupo da fibrina e HA, não havendo diferença com a adição do TGF- $\beta$ . No grupo com alginato e do *pellet* houve uma melhora significativa nos parâmetros avaliados com a adição do fator de crescimento, sendo que o último grupo apresentou os piores resultados. Porém na avaliação mecânica o grupo com alginato não melhorou, tanto na presença quanto na ausência de TGF- $\beta$ , e no *pellet*, devido a seu reduzido tamanho, houve falha em mensurar esta variável.

O HA, após modificações químicas, também pode ser utilizado como biomaterial. Em um estudo (SOLCHAGA *et al.*, 1999) testou-se duas preparações do ácido, esponja de ACP (modificação por reações cruzadas por condensação) e de HYAFF 11 (modificação através de esterificação por grupos benzil). As CTMMO de cinquenta coelhos foram expandidas durante duas semanas e  $5 \times 10^6$  células foram semeadas em cada meio, que foi banhado previamente com fibronectina. O cultivo em cerâmica com fibronectina foi considerado controle. Os compostos com as células de cada coelho foram implantados nas costas de dois ratos, sendo que um foi eutanasiado com três semanas e outro com seis semanas depois do implante. Os compostos com ACP não foram recuperados, pois houve uma rápida degradação, dissolvendo-se em sete a dez dias *in vitro*. No grupo com HYAFF 11 houve formação de osso, cartilagem e tecido fibroso, variando muito entre os diferentes progenitores de CTM. Com três semanas a quantidade

de tecido positivo foi duas vezes maior do que o controle, quantidade esta que se manteve com seis semanas.

Há ainda estudos (KANG *et al.*, 2005) com biomateriais sintéticos como o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), que foi utilizado como microesferas injetáveis, possibilitando sua utilização em procedimentos minimamente invasivos. Neste estudo, condrócitos de coelho foram misturados ao PLGA e imediatamente injetados por via subcutânea em ratos atímicos. As microesferas puderam ser injetadas sem obstrução ou formação de agregados com agulhas de 18, 20, 22 e 24 G. As análises histológicas com quatro e nove semanas revelaram que houve a formação de cartilagem madura e bem formada, evidenciada pelos condrócitos nas lacunas e sem vascularização. As demais análises demonstraram a produção de sulfato de GAGs e colágeno tipo II, não havendo formação do tipo I.

O plasma rico em plaquetas (PRP) ao ser ativado forma um gel que também pode ser utilizado como arcabouço para as CTM, tendo o advento de ser rico em diversos fatores de crescimento e ter a possibilidade de ser injetado via transcutânea. Em um estudo realizado por Yamada (2011) foram criadas lesões condrais em ambos os membros pélvicos de um centímetro de diâmetro na tróclea medial femoral de oito equinos. O tecido adiposo foi coletado e submetido posteriormente ao processamento e cultivo durante trinta dias ou até a terceira passagem. Os grupos experimentais foram com CTMDA, PRP, CTMDA e PRP e controle, sendo compostos de quatro lesões cada. Os grupos com PRP receberam aplicações com 30, 45, 60 e 75 dias após a indução, sendo que no grupo com as células no dia 30 foi aplicado, com o auxílio do artroscópio, o gel de PRP com CTM. No grupo com CTMDA apenas, o implante com 30 dias foi feito com as células semeadas em gel de plasma pobre em plaquetas. Ao final de 150 dias foi realizada a artroscopia e biópsia das lesões. Nos grupos tratados com PRP foram observados os menores graus de claudicação, sugerindo um efeito analgésico. Houve fibrose em todos os grupos com predominância de colágeno tipo III, porém no grupo controle, o qual apresentou mais fibrose, havia maior quantidade de colágeno tipo I. A análise de azul de toluidina revelou maior marcação nos grupos tratados com PRP, indicando maior síntese de PGs.

### 3 CONCLUSÃO

As CTM associadas aos biomateriais tem se mostrado como uma potencial alternativa terapêutica para melhorar a qualidade da reparação da cartilagem hialina. Porém ainda há muitas dúvidas como o momento de aplicação, quantidade de células adequada, quantidade e frequência de aplicação dos fatores de crescimento para estimular a condrogênese e a fonte mais apropriada. Quanto aos biomateriais deve-se desenvolver um material que mais se aproxime da MEC original, favorecendo o crescimento e diferenciação das CTM resultando na produção de cartilagem hialina de alta qualidade.

### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, C.G.; MOW, V.C. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. **Journal of Bone and Joint Surgery (American)**, v.64A, p.88–94, 1982.

BARBERO, A.; PLOEGERT, S.; HEBERER, M.; MARTIN, I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. **Arthritis & Rheumatism**, v.48, p.1315–1325, 2003.

BARNEWITZ, D.; ENDRES, M.; KRÜGER, I.; BECKER, A.; ZIMMERMANN, J.; WILKE, I.; RINGE, J.; SITTINGER, M.; KAPS, C. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. **Biomaterials**, v.27, p.2882-2889, 2006.

BORJESSON, D.L.; PERONI, J.F. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.31, p. 109-123, 2011.

BUCKWALTER, J. A. Activity vs. rest in the treatment of bone, soft tissue and joint injuries. **Iowa Orthopaedic Journal**, v.15, p.29-42, 1995.

BUCKWALTER, J. A.; LANE, N. E. Aging, sports and osteoarthritis. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v.4, p.276-287, 1996.

BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J. Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 79, p. 600-611, 1997.



- CHENG, N.C.; ESTES, B.T.; AWAD, H.A.; GUILAK, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. **Tissue Engineering: Part A**, v.15, n.2, p.231-241, 2009.
- FERRIS, D.J.; KISIDAY, J.D.; MCILWRAITH, C.W.; HAGUE, B.A.; MAJOR, M.D.; SCHNEIDER, R.K.; ZUBROD, C.J.; WATKINS, J.J.; KAWCAK, C.E.; GOODRICH, L.R. Clinical follow-up of horses treated with bone marrow-derived stem cells for musculoskeletal lesions. **AAEP Proceedings**, v.55, p.59-60, 2009.
- FORTIER, LA. Stem cells: classifications, controversies and clinical applications. *Veterinary Surgery*, v.34, p.415-423, 2005.
- FORTIER, L.A.; SMITH, R.K.W. Evidence for stem cells in cartilage regeneration. **AAEP Proceedings**, v.43, p.329-334, 2007.
- FORTIER, L.A. Stem cells for cartilage and tendon regeneration. In: PROCEEDINGS OF THE 11<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, Brazil, 2009.
- FRANCESCHI, L.; GRIGOLO, B.; ROSETI, L.; FACCHINI, A.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; TSCHON, M.; GIARDINO, R. Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. **Journal of Biomedical Material Research**, v.75A, p.612-622, 2005.
- FREEMAN, M.A.R. **Adult articular cartilage**. New York: Grune & Stratton, 1972.
- FRISBIE, D.D. Novel therapy of acute joint disease. **AAEP Proceedings – Focus on Lameness and Imaging**, p.46-50, 2007.
- FRISBIE, D.D.; KISIDAY, J.D.; KAWCAK, C.E.; WERPYP, N.M.; MCILWRAITH, C.W. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, p. 1675-1680, 2009.
- FRISBIE, D.D.; SMITH, R.K.W. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. **Equine Veterinary Journal**, v.42, n.1, p.86-89, 2010.
- IM, G.; SHIN, Y.W.; LEE, K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 10, p. 845-853, 2005.
- KANG, S.W.; JEON, O.; KIM, B.S. Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering. **Tissue Engineering**, v.11, n.3/4, p.438-447, 2005.

- KISIDAY, J.D.; LEE, C.M.; MCILWRAITH, W.; FRISBIE, D.D. Induction of bone marrow mesenchymal stem cell chondrogenesis following short-term suspension culture. **Journal of Orthopaedic Research**, v.29, p.26-32, 2011.
- MALICEV, E.; RADOSAVLJEVIC, D.; VELIKONJA, N.K. Fibrin gel improved the special uniformity and phenotype of human chondrocytes seeded on collagen scaffolds. **Biotechnology and Bioengineering**, v.96, p.364-370, 2007.
- MARCELINO, J.; MCDEVITT, C. A. Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1249, p.180-188, 1995.
- MCILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: WB Saunders, 1996.
- MCILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D.; KAWACAK, C.E.; WERPYP, N.M.; RODKEY, W.G. Use of bone marrow-derived culture-expanded mesenchymal stem cells to augment healing of chondral defects treated with microfracture. **AAEP Proceedings**, p.27-28, 2010.
- MILLER, R.E.; GRODZINSKY, A.J.; VANDERPLOEG, E.J.; LEE, C.; FERRIS, D.J.; BARRET, M.F.; KISIDAY, J.D.; FRISBIE, D.D. Effect of self-assembling peptide, chondrogenic factors and bone marrow-derived stromal cells on osteochondral repair. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.1608-1619, 2010.
- NOTH, U.; OSYCZKA, A.M.; TULI, R.; HICKOK, N.J.; DANIELSON, K.G.; TUAN, R.S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.20, p.1060–1069, 2002.
- PARK, S.H.; CHOI, B.H.; PARK, S.R.; MIN, B.H. Chondrogenesis of rabbit mesenchymal stem cells in fibrin/hyaluronan composite scaffold *in vitro*. **Tissue Engineering: Part A**, v.17, n.9, p.1277-1286, 2011.
- POOLE, A. R.; ROSEMBERG, L. C; REINER, A.; IONESCU, M.; BOGOCH, E.; ROUGHLEY, P. J. Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v.14, p.681-689, 1996.
- RADICE, M.; BRUN, P.; CORTIVO, R.; SCAPINELLI, R.; BATTALIARD, C.; ABATANGELO, G. Hyaluronan-based biopolymers as a delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.50, p.101-109, 2000.

ROTTER, N.; BÜCHELER, M.; HAISCH, A.; WOLLENBER, B.; LANG, S. Cartilage tissue engineering using resorbable scaffolds. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.1, p.411-416, 2007.

SOLCHAGA, L.A.; DENNIS, J.E.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repairs of bone and cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v.17, n.2, p.205-213, 1999.

SALINGCARNBORIBOON, R.; YOSHITAKE, H.; TSUJI, K., OBINATA, M.; AMAGASA, T.; NIFUJI, A.; NODA, M. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. **Experimental Cell Research**, v.287, n. 2, p.289–300, 2003.

STASHAK, T.S. **Claudicação em equinos**. 5. ed. São Paulo: Roca, 2006. 1093p.

STOOP, R. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. **Injury, International Journal of the Care of the Injured**, v.39, sup.1, p.S77-87, 2008.

VIDAL, M.A.; ROBINSON, S.O.; LOPEZ, M.J.; PAULSEN, D.B.; BORKHSENIUS, O.; JOHNSON, J.R.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Surgery**, v.37, p.713-724, 2010.

VINATIER, C.; MRUGALA, D.; JORGENSEN, C.; GUICHEUX, J.; NOËL, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.5, p.307-314, 2009.

WILKE, M.M.; NYDAM, D.V.; NIXON, A.J. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v.25, p.913-925, 2007.

YAMADA, A.L.M. **Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos**. 2011. 148p. Tese (Mestrado em Cirurgia e Anestesiologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.