

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA

**“EFEITO DO IMPLANTE AUTÓLOGO DE PLASMA RICO
EM PLAQUETAS (PRP) E CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS NA REPARAÇÃO DE LESÕES
CONDRAIS ARTICULARES INDUZIDAS
EXPERIMENTALMENTE EM EQÜINOS”**

ANA LÚCIA MILUZZI YAMADA

BOTUCATU - SP
Junho de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA

**“EFEITO DO IMPLANTE AUTÓLOGO DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) E CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA
REPARAÇÃO DE LESÕES CONDRAIS ARTICULARES
INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM EQÜINOS”**

ANA LÚCIA MILUZZI YAMADA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, Área de
Cirurgia Veterinária, para obtenção
do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Liz
Garcia Alves

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos Jun
Watanabe

BOTUCATU - SP
Junho de 2011

Yamada, Ana Lúcia Miluzzi.

Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em eqüinos / Ana Lúcia Miluzzi Yamada. - Botucatu, 2011

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Co-Orientador: Marcos Jun Watanabe

Capes: 50501070

1. Artrosopia veterinária. 2. Equino. 3. Células-tronco.

Palavras-chave: Articulação; Artrosopia; Células-tronco; Equino; Plasma rico em plaquetas.

ANA LÚCIA MILUZZI YAMADA

BOTUCATU, 14 DE JUNHO DE 2011

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves

Presidente da Banca e Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

Membro da Banca

Departamento de Clínica Médica - VCM

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

Profa. Dra. Ligia Souza Lima Silveira da Mota

Membro da Banca

Departamento de Genética

Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP - Botucatu

Agradecimentos

À Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves, agradeço a oportunidade concedida. Agradeço o incentivo e a atenção. Nesses anos de trabalho em conjunto teve uma influência positiva e fundamental no meu caminho, até aqui percorrido. Acrescentou informação, teoria, ensinamentos e acima de tudo, formação pessoal. Muito Obrigada pela Orientação e pela Amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe pela Co-Orientação, pela vital colaboração e Amizade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino e ao Andrei Moroz pela colaboração e intensa participação nesse trabalho.

À Ana Paula Bordon pela colaboração e atenção nas etapas realizadas em conjunto.

À Profa. Dra Regina Kiomi Takahira e aos Residentes do Laboratório Clínico pela colaboração durante a execução desse trabalho

Ao Professores Dr. Carlos Alberto Hussni e Dr. Celso Antônio Rodrigues pela participação e colaboração durante esse percurso.

Ao Prof. Dr. Luciano Barbosa pela colaboração na parte estatística do trabalho.

Às Professoras Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin e Dra. Ligia Souza Lima Silveira da Mota pela participação na Banca Examinadora e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos Dr. Carlos Alberto Hussni e Dr. Edivaldo Aparecido Nunes Martins pela composição da suplência da Banca Examinadora.

Ao Armando de Mattos Carvalho e à Patrícia Galvão Gomes de Oliveira pelo apoio teórico, técnico, pela intensa participação e colaboração durante essa fase, sem vocês seria difícil a execução desse trabalho, obrigada!

À aluna de graduação Diana Leocata de Queiroz pelo apoio incondicional, pela Amizade e companheirismo. Obrigada Amiga!

Aos residentes do Serviço de Cirurgia de Grandes Animais: Juliana de Moura Alonso, Cristina de Faria Mantovani e Karoline Alves Rodrigues pela colaboração e Amizade.

Aos funcionários Clotilde Gonçalves de Oliveira e José Jairo Zucari pela paciência e fundamental auxílio.

A todos os colegas de Pós Graduação, pela colaboração e momentos de descontração.

As fundamentais participantes, minhas oito éguas, pela paciência e bom comportamento, sem elas nada seria possível!

A minha família, pelo amor e apoio incondicional. À minha mãe, base da minha carreira e vida pessoal, a maior responsável por tudo o que sou hoje. Por todos os obstáculos que enfrentamos juntas e por tudo o que ela representa e sempre representará na minha vida. Ao meu Irmão pelo eterno companheirismo e ao meu Pai, sempre presente, amoroso e voluntarioso. Amo muito todos vocês!

À minha cadelinha, sempre olhando por mim ai de cima!

Ao Giovane Olivo, pelo amor, fundamental ajuda e paciência na fase final.

À FAPESP, pela bolsa de Mestrado concedida e pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução desse projeto de forma adequada.

E a todos que participaram de forma direta ou indireta nessa fase da minha vida.

“

Há Momentos

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem
em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas.

O futuro mais brilhante
é baseado num passado intensamente vivido.
Você só terá sucesso na vida
quando perdoar os erros
e as decepções do passado.

A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar
duram uma eternidade.

”

Clarice Lispector

Sumário

	PÁG.
Agradecimentos.....	i
Lista de figuras.....	vi
Lista de quadros e tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	02
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1. A cartilagem articular.....	05
2.2. Lesões da cartilagem articular.....	07
2.3. Tratamentos.....	10
2.4. Células tronco mesenquimais.....	10
2.5. Plasma rico em plaquetas.....	15
3. JUSTIFICATIVA.....	22
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivos gerais.....	24
4.2. Objetivos específicos.....	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1. Experimentação.....	26
5.2. Animais e fase de ambientação.....	26
5.3. Delineamento experimental.....	27
5.4. Exames radiográficos.....	28
5.5. Realização da lesão na cartilagem articular.....	29
5.6. Plasma rico em plaquetas.....	32
5.6.1. Coleta.....	32
5.6.2. Implante isolado do plasma rico em plaquetas	33
5.7. Células tronco mesenquimais do tecido adiposo.....	34
5.7.1. Coleta de tecido adiposo.....	34
5.7.2. Extração da fração vascular estromal.....	34
5.7.3. Cultivo, expansão e caracterização das células tronco mesenquimais....	35
5.7.4. Implante isolado das células tronco mesenquimais.....	37
5.7.5. Implante das células tronco mesenquimais associada ao PRP.....	37
5.8. Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais.....	38
5.8.1. Exame clínico.....	38
5.8.2. Exame físico, químico e citológico do líquido sinovial.....	39
5.8.3. Análise de prostaglandina (PGE₂) no líquido sinovial.....	40
5.9. Análise macroscópica da cartilagem articular.....	41
5.10. Análise histopatológica e histoquímica.....	41
5.11. Análise estatística.....	42
6. RESULTADOS.....	44
6.1. Exames radiográficos.....	44
6.2. Lesões na cartilagem articular.....	44
6.3. Implantes.....	44

6.4.	Plasma rico em plaquetas.....	45
6.5.	Células tronco mesenquimais.....	46
6.6.	Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais.....	49
6.6.1.	Exames clínicos.....	49
6.6.2.	Exame físico, químico e citológico do líquido sinovial.....	51
6.6.3.	Análise da prostaglandina no líquido sinovial.....	60
6.7.	Análise macroscópica da cartilagem articular.....	63
6.8.	Análise histopatológica e histoquímica.....	67
7.	DISCUSSÃO.....	72
7.1.	Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais.....	76
7.1.1.	Exame clínico.....	76
7.1.2.	Exame físico, químico e citológico do líquido sinovial.....	80
7.1.3.	Análise da prostaglandina no líquido sinovial.....	83
7.2.	Análise macroscópica da cartilagem articular.....	85
7.3.	Análise histopatológica e histoquímica.....	87
8.	CONCLUSÃO.....	93
9.	REFERÊNCIAS.....	95
	TRABALHO CIENTÍFICO.....	107

Lista de Figuras

FIGURA		PÁG.
01.....	Animal 2 do G1 ao final da fase de ambientação e confirmação do estado de higidez para inclusão no grupo experimental.....	31
02.....	Equipamento artroscópico. Monitor a cores (1), Insuflador de CO ₂ (2), Sistema de lâminas motorizadas – Shaver (3), Câmera (4), Gravador de DVD (5), Fonte de Luz (6), Bomba de fluido – Arthropump (7), estabilizadores de energia (8), cilindro de CO ₂ (9), pedal do Shaver (10) e pedal do Arthropump (11) do membro pélvico direito.....	32
03.....	Camisa artroscópica (a) sendo inserida pela incisão de pele e fáscia, na articulação femoropatelar.....	32
04.....	Procedimento artroscópio da articulação femoropatelar direita. Câmera (A); Conjunto de óptica e camisa artroscópica (B); com cabo de luz (C); conector da bomba de fluido (D).....	32
05.....	Vista caudal do equino contido em tronco para coleta de tecido adiposo (seta).....	38
06.....	Incisão a cinco centímetros lateralmente da linha média da base cauda e coleta de tecido adiposo (seta) (A). Separação mecânica do tecido adiposo (B).....	38
07.....	Exame de claudicação. Animal ao trote (A) e posição no teste de flexão forçada (B).....	42
08.....	Coleta de líquido sinovial. Posição da agulha no local da punção (C) e aspiração do líquido sinovial (D).....	42
09.....	Imagem artroscópica da indução da lesão em T-0. Utilização da broca na destruição da cartilagem articular (A). Medição do diâmetro da lesão em T-0. A pinça “ <i>Ferris-Smith</i> ” possui 1 cm de amplitude de abertura máxima (B).....	48
10.....	Imagem artroscópica da lesão condral em T-30 antes da aplicação do tratamento (A). Observa-se a irregularidade da superfície da cartilagem ao redor da lesão (seta) e sinovite (B).....	48
11.....	Imagem artroscópica da lesão condral em T-30. Aplicação do tratamento no local da lesão no G1 (A). Período de secagem do tratamento no G2 (B) e no G3 (C).....	48
12.....	Valores médios da contagem global de células nucleadas realizada no líquido sinovial, durante os momentos analisados e nos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4).....	57
13.....	Valores percentuais médios na citologia diferencial das células mononucleares realizada no líquido sinovial durante os momentos analisados e nos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4).....	59
14.....	Valores percentuais médios na citologia diferencial dos linfócitos realizada no líquido sinovial durante os momentos analisados e nos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4).....	59
15.....	Valores percentuais médios na citologia diferencial dos neutrófilos realizada no líquido sinovial durante os momentos analisados e nos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4).....	60
16.....	Concentração de PGE ₂ de G1. Valores em picograma por mililitro (pg/mL). Momentos de T-0 a T-150. Resumo descritivo em média e desvio padrão de G1.....	61

17.....	Concentração de PGE ₂ de G2. Valores em picograma por mililitro (pg/mL). Momentos de T-0 a T-150. Resumo descritivo em média e desvio padrão de G2.....	61
18.....	Concentração de PGE ₂ de G3. Valores em picograma por mililitro (pg/mL). Momentos de T-0 a T-150. Resumo descritivo em média e desvio padrão de G3.....	62
19.....	Concentração de PGE ₂ de G4. Valores em picograma por mililitro (pg/mL). Momentos de T-0 a T-150. Resumo descritivo em média e desvio padrão de G4.....	62
20.....	Imagens artroscópica das articulações em T-150. Observam-se proliferações provenientes do tecido neoformado (seta) no G1 (A). A pinça tipo “ <i>Ferris-Smith</i> ” coleta do tecido neoformado no G2 (B). Proliferações (seta) e bom preenchimento no G3 (C) e falhas de preenchimento e irregularidades ao redor das lesões (setas) no G4 (D).....	66
21.....	Imagens artroscópica das articulações em T-150. Remoção do tecido neoformado para a biópsia com auxílio de cureta no G1 (A). Coleta de tecido neoformado bem aderido com a pinça tipo “ <i>Ferris-Smith</i> ” no G2 (B). Palpação e exame com a “ <i>probe</i> ” no G3 (C). Falhas de preenchimento, irregularidade e fibrilações (setas) no G4 (D).....	67
22.....	Fotomicroscopia de luz em T-150. G1 (A) e G4 (D) apresentam fibras desorganizadas e células fibroblastóides. G2 (B) e G3 (C) apresentam melhor aspecto histopatológico, áreas com maior organização celular, células arredondadas e lacunas (condrócitos). H&E. Objetiva: 20x.....	69
23.....	Fotomicroscopia de luz em T-150. Tecido de reparação com poucos condrócitos (seta) no G1 (A). Tecido com maior quantidade de condrócitos no G2 (B) Pericôndrio fibroso existente (seta) no G4 (C). Área de transição da cartilagem normal e fibrocartilagem, com condrócitos mortos e lacunas vazias (seta) no G4 (D). H&E. Objetiva: A, B e C 40x; D 20x.....	69
24.....	Fotomicroscopia de luz polarizada de G1 (A), G2(B), G3 (C) e G4(D) em T-150. O G4 apresenta fibras espessas e predominância da cor amarela ou vermelha (colágeno tipo I). Os grupos 1, 2 e 3 apresentam fibras mais finas e predominância da cor verde (colágeno tipo III) Picrosírius Red. Objetiva: 40x.....	70
25.....	Fotomicroscopia de luz de G1 (A), G2(B), G3 (C) e G4(D) em T-150. O G1 apresentou fraca coloração. Os grupos 2 e 3 apresentam maior quantidade de condrócitos, matriz territorial e interterritorial corada em azul. O G4 apresentou fibras desorganizadas, poucas células e nenhuma coloração. Azul de Toluidina. Objetivas: A, C e D 40x; B 20x.....	70

Lista de Quadros e Tabelas

QUADRO	PÁG.
01..... Esquema organizacional do delineamento experimental.....	28
02..... Resposta esperada para os marcadores CD utilizados na caracterização das CTM.....	36
03..... Contagem plaquetária no sangue total, concentração plaquetária no PRP, fator de multiplicação da concentração plaquetária (Aumento) e a taxa de enriquecimento plaquetário em porcentagem (Enriquecimento) de cada animal de G2 e G3.....	46
04..... Quantidade de tecido adiposo coletado por animal, número de células mononucleares inicialmente cultivadas, viabilidade celular inicial (%), número de células aplicadas em cada lesão, viabilidade celular no momento da aplicação (%) e o número de passagens realizadas para cada animal de G1 e G3.....	47
05..... Resultados observados após a caracterização das CTM em G1 e G3.....	47
06..... Características observadas no exame macroscópico da cartilagem articular em T-150 para todos os grupos.....	64
07..... Características observadas no exame macroscópico da cartilagem articular em T-150 para todos os grupos.....	65
TABELA	PÁG.
01..... Mediana dos escores de claudicação e valores de p dos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento.....	50
02..... Mediana dos escores de claudicação e valores de p dos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento, após a flexão forçada da articulação femoropatelar.....	50
03..... Média da densidade do líquido sinovial nos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento.....	53
04..... Mediana dos escores de proteína do líquido sinovial e valores de p nos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento.....	53
05..... Mediana dos escores de fibrinogênio do líquido sinovial e valores de p nos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento...	54
06..... Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial do grupo 1, animais 1 e 2, em todos os tempos do experimento.....	54
07..... Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial do grupo 2, animais 3 e 4, em todos os tempos do experimento.....	55
08..... Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial do grupo 3, animais 5 e 6, em todos os tempos do experimento.....	55
09..... Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial do grupo 4, animais 7 e 8, em todos os tempos do experimento.....	56
10..... Média da contagem total de células nucleadas no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4, em todos os tempos do experimento.....	56
11..... Média relativa de células mononucleares, em porcentagem, no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4, em todos os tempos do experimento.....	57

12.....	Média relativa de linfócitos, em porcentagem, no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4, em todos os tempos do experimento.....	58
13.....	Média relativa de neutrófilos, em porcentagem, no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4 em todos os tempos do experimento.....	58
14.....	Média da concentração de PGE ₂ no líquido sinovial e valores de <i>P</i> dos grupos 1, 2, 3 e 4 em todos os momentos do experimento..	63

Lista de Abreviaturas e Símbolos

3D	Três dimensões	rpm	Rotações por minuto
AIES	Anti-inflamatório esteroide	SC	Subcutâneo
AINES	Anti-inflamatório não esteroide	T	Tempo
ANOVA	Análise de variância	TGF	Fator de crescimento transformador
CD	Cluster Designation	TNF	Fator de necrose tumoral
cm ²	Centímetros quadrados	UI	Unidade internacional
CO ₂	Gás carbônico	UI/Kg	Unidade por quilograma
CTM	Células tronco mesenquimais	VEGF	Fator de Crescimento vascular
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	α	Alfa
DP	Desvio Padrão	μL	Microlitro
DVD	Digital vídeo disc	μm ²	Micrômetro quadrado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético		
EGF	Fator de crescimento endotelial		
ELISA	Teste imunoenzimático		
FGF	Fator de crescimento fibroblástico		
<i>g</i>	força centrífuga <i>g</i>		
G	Gauge		
G1	Grupo 1		
G2	Grupo 2		
G3	Grupo 3		
G4	Grupo 4		
h	Hora		
H&E	Hematoxilina e Eosina		
H ₂ CO ₃	Ácido carbônico		
HEPES	Meio de cultivo		
IGF	Fator de crescimento insulínico		
IgG	Imunoglobulina G		
IL-1	Interleucina 1		
IM	Intramuscular		
IV	Intravenoso		
mg/dL	Miligrama por decilitro		
mg/kg	Miligrama por quilograma		
mg/mL	Miligrama por mililitro		
mL	Mililitro		
mm ³	Milímetro cúbico		
mmHg	Milímetros de mercúrio		
N	Normal		
n ^o	Número		
°C	Graus Celsius		
<i>P</i>	Valor de <i>P</i>		
PDGF	Fator de crescimento de plaquetas		
pg/mL	Picograma por mililitro		
PGE ₂	Prostaglandina E ₂		
PPP	Plasma pobre em plaquetas		
PRP	Plasma rico em plaquetas		
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro		

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 eqüinos”**. Botucatu, 2011. 111p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO

Lesões na cartilagem articular representam um desafio para a Medicina Veterinária devido ao limitado potencial intrínseco de reparação. As células tronco mesenquimais (CTM) e o plasma rico em plaquetas (PRP) vêm sendo utilizados na reparação condral pela capacidade de imunomodulação, quimiotaxia, por diminuir a degradação da cartilagem articular e exercer efeito anti-inflamatório. Esse trabalho estudou a eficácia das CTM e do PRP no tratamento de lesões condrais articulares, experimentalmente induzidas em equinos, apresentando os benefícios e os principais obstáculos encontrados na aplicação clínica e cirúrgica de equinos. Para isso, foi induzida uma lesão condral, na tróclea medial femoral dos dois membros pélvicos de oito animais. Após 30 dias da indução dessa lesão os animais, divididos em quatro grupos, receberam os tratamentos propostos: com CTM (Grupo 1); PRP (Grupo 2); CTM e PRP (Grupo 3) e um controle sem tratamento (Grupo 4). As avaliações dos parâmetros clínico-laboratoriais foram realizadas antes da indução da lesão (T-0), quinzenalmente até 120 dias e aos 150 dias (T-150). Avaliações macroscópicas, histopatológicas e histoquímicas foram realizadas em T-0 e T-150. Pôde-se observar discreta melhora clínico-laboratorial dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Os exames macroscópicos, histopatológicos e histoquímicos revelaram um melhor tecido de reparação nos grupos tratados, principalmente nos grupos 2 e 3. Sendo assim, o implante autólogo de CTM e do PRP apresentou efeitos benéficos no tratamento de lesões condrais, experimentalmente induzidas em equinos.

Palavras-chave: Articulação; Artroscopia; Células Tronco; Equino; Plasma Rico em Plaquetas.

YAMADA, A. L. M. “**Effect of autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) and Mesenchymal Stem Cells in the treatment of chondral articular defects experimentally induced in horses**”. Botucatu, 2011. 111p. Thesis (Master in Veterinary Medicine) – Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

ABSTRACT

Articular cartilage defects represent a challenge for Veterinary Medicine due to the limited intrinsic potential of repair. Mesenchymal Stem Cells (MSC) and Platelet-Rich Plasma (PRP) have been used in cartilage repair to promote immunomodulation, chemotaxis, to decrease the degradation of articular cartilage and to take antiinflammatory effect. This work aims to study the use of intralesional MSC and the PRP in the treatment of articular cartilage defects induced experimentally in horses, noting the benefits and challenges encountered in implementing clinical-surgical in horses. For this purpose, both patellofemoral joints of eight animals were approached by arthroscopic surgery to perform a cartilage defect, on the medial femoral trochlea. After 30 days of induction the animals, who were divided into four groups, received treatment with: MSC (Group 1), PRP (Group 2), MSC and PRP (Group 3) and a control without treatment (Group 4). The clinical and laboratory assessments were performed every 15 days in 120 days, with last analysis in day 150. The macroscopic and morphologic analyses were performed at 0 and 150 day. There were clinical and laboratory improvement in the treated groups compared with control group. The macroscopic and morphological analysis showed a better tissue repair in the treated groups, mainly in groups 2 and 3. Thus, the implantation of autologous MSC and PRP showed beneficial effects in the treatment of chondral lesions, experimentally induced in horses.

Keywords: Arthroscopy; Horse; Joint; Platelet Rich Plasma; Stem Cells.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As lesões na cartilagem articular representam um desafio para a Medicina Veterinária devido ao limitado potencial intrínseco de reparação. Apesar dos progressos realizados na cirurgia artroscópica e nos fármacos utilizados na terapêutica da osteoartrite, o tratamento de grandes defeitos condrais ainda estimula diversas pesquisas no campo da bioengenharia. As claudicações representam a maior causa de afastamento dos animais das atividades esportivas, o que decorre em um grande prejuízo para a economia eqüestre. A osteoartrite pode representar até 35% das causas de claudicação em equinos, se tornando a mais comum. Tal enfermidade é preocupante devido à solidez de instalação e a característica degenerativa da doença, representando um fator determinante no desempenho e na agregação de valor dos animais atletas (STASHAK, 2006; SCHLUETER & ORTH, 2004; BROMMER, 2005; RASERA, 2007).

Em cavalos de esportes e na osteoartrite a cartilagem articular é freqüentemente danificada. A ausência de vasculatura, que resulta no não fornecimento para o tecido de células progenitoras provenientes do sangue, e o lento mecanismo de “*turnover*” da cartilagem implicam em mecanismos de reparação insatisfatórios, com formação exclusiva de tecido fibrocartilaginoso e manutenção da inflamação articular. Por isso, diversas técnicas cirúrgicas e terapias medicamentosas que recuperem a integridade estrutural e funcional da cartilagem hialina articular são pesquisadas, mas ainda sem o completo sucesso. A bioengenharia combina fatores de crescimento, arcabouços (“*scaffold*”) e fontes celulares visando à regeneração tecidual. O potencial da bioengenharia em tecidos condrais tem sido utilizado para contornar o limitado potencial de reparação cartilaginosa, reduzir a formação da fibrocartilagem e bloquear o ciclo inflamatório articular, resultando em menor morbidade e no tratamento completo da osteoartrite. Implantes de células tronco mesenquimais (CTM) e do plasma rico em plaquetas (PRP) em lesões condrais demonstram

ser promissores, já representando uma alternativa terapêutica (VINATIER et al., 2009).

Este trabalho teve por objetivo verificar a eficácia das CTM e do PRP, como fonte de fatores de crescimento, no tratamento de lesões condrais, citando os benefícios e os principais obstáculos encontrados na aplicação clínica e cirúrgica em equinos.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

As articulações sinoviais têm como principais funções permitir a movimentação e transferir forças. São compostas pelas superfícies articulares de pelo menos dois ossos, revestidas por cartilagem articular do tipo hialina, além da cápsula articular e ligamentos que estabilizam a articulação. A cavidade formada é preenchida por líquido sinovial, que exerce a lubrificação, absorção de choque, nutre os condrócitos e participa ativamente do “turnover” da matriz extracelular. O conhecimento das principais estruturas das articulações sinoviais é fundamental para o melhor entendimento das enfermidades articulares e dos tratamentos (STASHAK, 2006; MCILWRAITH, 2005^a).

2.1. A CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem hialina é um tecido conjuntivo ímpar, idealmente adaptado para atuar como um absorvente elástico contra choques e como superfície de resistência contra desgastes (ROSEMBERG, 2005). É composta por condrócitos e matriz extracelular, organizados em várias camadas, se tornando hipertrófica e mineralizada quando próxima ao osso subcondral. Os condrócitos diferem na sua caracterização em cada uma das diferentes camadas correspondendo menos de 5% da cartilagem. A matriz extracelular corresponde de 20 a 30%, sendo esta constituída por proteoglicanos, glicoproteínas, principalmente por colágeno tipo II e por água intersticial (60 a 80%) (STASHAK, 2006; SCHLUETER & ORTH, 2004). O colágeno tipo II corresponde a 95% do colágeno total e é encontrado em fibrilas formando ligações cruzadas em rede tri-dimensional. A concentração da matriz extracelular eleva-se nas camadas mais profundas da cartilagem, o que proporciona forma, rigidez, e dá força de tração ao tecido (SCHLUETER & ORTH, 2004; MCILWRAITH, 2005^a). As forças de tração nas fibras de colágeno estão em equilíbrio osmótico com os proteoglicanos, conferindo a característica de resistência e viscoelasticidade (BROMMER, 2005).

No animal adulto, a cartilagem articular é desprovida de inervação, organização linfática e vasos, o que implica no reduzido influxo de células progenitoras do sangue ou da medula óssea e consequente limitado mecanismo reparatório (STASHAK, 2006; BROMMER, 2005). A nutrição da cartilagem é realizada pela difusão do líquido sinovial (STASHAK, 2006). A reparação depende de processos intrínsecos e extrínsecos, intimamente correlacionados com a matriz extracelular. Os fatores intrínsecos são limitados devido ao baixo potencial mitótico dos condrócitos, pela produção ineficaz de colágeno, proteoglicanos e enzimas anabólicas. Na reparação de lesões cartilaginosas existe uma grande quantidade de tecido fibroso e fibrocartilaginoso, contendo cerca da metade de colágeno tipo II e glicosaminoglicanos presentes em uma cartilagem normal. A formação desse tecido é resultante da escassa migração de elementos mesenquimais presentes no osso subcondral, e corresponde ao processo extrínseco de reparação, sendo extremamente limitado em zonas superficiais da cartilagem articular (FRISBIE et al., 2002; MCILWRAITH, 2005^a; FORTIER et al., 2010).

Nos tratamentos para a osteoartrite, se almeja sempre uma reparação de melhor qualidade ou, quando possível, atingir a regeneração tecidual. O acréscimo da diferenciação de condrócitos, produção de matriz extracelular, proteoglicanos e colágeno no local da lesão melhoram a qualidade da reparação tecidual e resultam no decréscimo dos mediadores inflamatórios no líquido sinovial. A reparação constituída de fibrose ou fibrocartilagem não confere o retorno estrutural e mecânico cartilaginoso, perpetuando a liberação de fatores inflamatórios, dor e degradação da cartilagem articular (FRISBIE et al., 2002; MCILWRAITH, 2005^a). Desta forma, estudos recentes buscam superar os desafios do processo de reparação da cartilagem e proporcionar a regeneração do tecido cartilaginoso por meio da estimulação dos mecanismos de reparação endógenos, terapia celular e utilização de biomateriais (MCILWRAITH, 2005^a; CARMONA et al., 2007; VINATIER et al., 2009).

2.2. LESÕES DA CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular é o principal alvo das alterações degenerativas da osteoartrite. Esse tecido, em estado normal, se apresenta estrategicamente posicionado nas extremidades dos ossos para desempenhar duas funções: banhado em líquido sinovial ele assegura os movimentos livres virtualmente sem atrito dentro da articulação e distribui as cargas através da superfície, permitindo que os ossos subjacentes absorvam os choques e o peso sem serem danificados. Estas funções requerem que a cartilagem articular seja elástica e apresente alta resistência contra tensão (ROSEMBERG, 2005). A osteoartrite é definida como uma desordem das articulações, considerando um grupo de distúrbios que resultam em um final comum: deterioração progressiva da cartilagem articular, acompanhada de alterações ósseas e de tecidos moles, como sinovite e capsulite. Em estágios mais avançados, a osteoartrite é caracterizada por grande perda da integridade cartilaginosa, resultando em dor, deformações ósseas, esclerose subcondral, fibrose e redução da função da articulação (SCHLUETER & ORTH, 2004; MCILWRAITH, 2005^a; VEIGA, 2008).

Existem diferentes teorias para o desenvolvimento da osteoartrite. A primeira consiste em que a osteoartrite seja decorrente de uma cartilagem previamente comprometida por alguma outra doença, como a osteocondrose ou a instabilidade articular. Outra teoria afirma que a osteoartrite é desencadeada primeiramente por alterações físicas no osso subcondral, como o trauma constante (SCHLUETER & ORTH, 2004; MCILWRAITH, 2005^a; VEIGA, 2008; RASERA, 2007; SUTTON et al., 2009). O trauma repetitivo e forças biomecânicas suprafisiológicas na cartilagem articular, mesmo esta apresentando-se hígida, alteram a integridade físico-química da matriz extracelular e, igualmente ocasiona microfraturas, rompendo as ligações de colágeno. Pequenas lesões da cartilagem e, principalmente, do osso subcondral ativam a quimiotaxia de fatores inflamatórios e a produção de enzimas catabólicas pelos condrócitos (MCILWRAITH, 2005^a; STASHAK, 2006; SUTTON et al., 2009). Em consequência, há o desencadeamento de inflamação cíclica, sinovite, capsulite, esclerose do osso subcondral, degradação enzimática da cartilagem articular, apoptose celular, perda de

glicosaminoglicanos, destruição da matriz extracelular e da rede de colágeno. Essa série de fatores tem como resultado final a quebra estrutural e funcional da cartilagem articular, e corrobora com a característica degenerativa e progressiva da osteoartrite (MCILWRAITH, 2005^a; NESIC et al., 2006).

O osso subcondral participa ativamente do processo desencadeador da osteoartrite. Essa estrutura é responsável pela manutenção das camadas mais profundas da cartilagem articular, é capaz de liberar enzimas catabólicas e anabólicas, realiza a integração entre a cartilagem e osso, e ainda carrega células e moléculas durante o processo de reparação condral (SCHLUETER & ORTH, 2004; MCILWRAITH, 2005^a). O osso subcondral pode sofrer remodelamento normal, excessivo, que consiste na esclerose, ou necrose. Quando há a lesão do osso subcondral, em conjunto com a degradação da cartilagem articular, o coágulo sanguíneo formado no osso é substituído por fibrina, a partir da medula óssea. Consequentemente, células mesenquimais são transportadas para lesão, auxiliando na reparação condral e subcondral. Mesmo nesse tipo de reparação há formação exclusiva de fibrocartilagem, não havendo retorno funcional e mantendo a liberação de fatores inflamatórios (SCHLUETER & ORTH, 2004; STASHAK, 2006; FORTIER et al., 2010).

Os mediadores pró-inflamatórios catabólicos são fartamente encontrados em articulações comprometidas pela enfermidade e compõem um importante método de avaliação do grau de implicação articular (BERTONE et al., 2001; HAUPT et al., 2005; LEY et al., 2007; SUTTON et al., 2009). A cápsula articular responde ativamente a esses fatores pró-inflamatórios. Há o aumento de vascularização, hipertrofia e liberação de interleucinas pelos sinoviócitos, perpetuando o ciclo inflamatório e principalmente, provocando dor, efusão sinovial e redução da mobilidade articular (STASHAK, 2006; VEIGA, 2008). Os mediadores inflamatórios, atualmente conhecidos na fisiopatologia das doenças articulares, incluem as metaloproteinases, agreganases, prostaglandinas, radicais livres, fator de necrose tumoral e citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas, sendo a interação dessas moléculas essencial no desenvolvimento da doença (HARDY, 1998; BERTONE et al., 2001; FRISBIE et al., 2002; MCILWRAITH, 2005^a).

As citocinas são responsáveis por grande parte da destruição de proteínas e da cartilagem articular, podem exercer função a partir do plasma ou por via autócrina nos condrócitos (GAISSMAIER et al., 2008). Estudos sugerem que a IL-1 e o TNF-alfa modulam a síntese das metaloproteinases pelos condrócitos e sinoviócitos. A IL-1 estimula a produção exagerada de colágeno tipo I e tipo III, que são prejudiciais na reparação da cartilagem articular, que possui normalmente o colágeno tipo II (MCILWRAITH, 2005^a). A IL-1 também é responsável pelo aumento de PGE₂ no líquido sinovial e pela liberação de radicais livres, como o óxido nítrico (SCHLUETER & ORTH, 2004). A PGE₂ é responsável pela sensibilização de terminações nervosas sensoriais e aumento da dor. Além disso, essas moléculas reduzem a quantidade de proteoglicanos na matriz extracelular, causam vasodilatação, desmineralização óssea, ativação do plasminogênio e aumento da liberação das ciclooxigenases (MCILWRAITH, 2005^a; GRAUW et al., 2006). As prostaglandinas estão em quantidades aumentadas nas articulações artríticas (VAN DEN BOOM et al., 2004; VEIGA, 2008), são essenciais na avaliação da doença aguda, sendo liberadas pelos sinoviócitos e controladas pela ativação de interleucinas e TNF-alfa (BERTONE et al., 2001; FRISBIE et al., 2002; RASERA et al., 2008).

A inflamação articular resulta no acréscimo da quantidade de células nucleadas. O número de células nucleadas no líquido sinovial de equinos saudáveis varia de 80 a 200 células/mm³, e em casos de osteoartrites e sinovites podem alcançar 100.000 células/mm³ (POZZOBON et al., 2009). Mudanças qualitativas e quantitativas nos leucócitos indicam a magnitude da inflamação da membrana sinovial. Os neutrófilos são fiéis indicativos da inflamação articular, assim como a redução de células mononucleares no líquido sinovial (STEEL, 2008; POZZOBON et al., 2009). O influxo de proteínas e fibrinogênio para o líquido sinovial, assim como as alterações da celularidade são resultantes de mudanças na permeabilidade vascular e da membrana sinovial, decorrentes da liberação de fatores pró-inflamatórios, principalmente as interleucinas e prostaglandinas (STEEL, 2008). Quando há inflamação, ocorre diminuição da produção de ácido hialurônico e quebra dessa molécula por enzimas lisossomais, diminuindo a qualidade do líquido sinovial e perpetuando a doença articular (POZZOBON et al., 2009).

2.3. TRATAMENTOS

O tratamento primordial da osteoartrite objetiva o controle da perda progressiva de cartilagem articular. Dentre os tratamentos comumente utilizados estão o uso sistêmico ou local de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e esteroidais (AIEs), substâncias precursoras dos proteoglicanos e condroprotetoras, a administração intra-articular de associações de potentes AIEs ao ácido hialurônico e ao sulfato de condroitina, se baseando na supressão sintomática da inflamação. Essas terapias são paliativas, e não representam benefícios biológicos importantes (MCILWRAITH, 2005^a), podem ser úteis na melhora da viscosidade do líquido sinovial, redução da inflamação, consequente proteção do colágeno e da matriz extracelular, porém, ainda não conferem qualidade de reparação condral satisfatória, não resultando na regeneração da cartilagem, permitindo a progressão da doença (GOODRICH & NIXON, 2006; MCILWRAITH, 2005^a). Recentes terapias e intervenções cirúrgicas têm sido utilizadas, incluindo a microfratura, a mosaicoplastia, terapia celular e a bioengenharia, com CTM e PRP (MCILWRAITH 2005^a; BEDI et al., 2010, FORTIER et al., 2010). A terapia celular e a bioengenharia têm contribuído de forma significativa, não apenas para a redução da destruição articular e da dor, mas também como uma alternativa terapêutica de reparação e regeneração (BLACK et al., 2008; KOCH et al., 2009; VINATIER et al., 2009).

2.4. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As CTM são células adultas, multipotentes, que possuem a capacidade de diferenciar-se na mesma linhagem germinativa, ou seja, em tecidos mesodermiais. Essas células apresentam morfologia fibroblásticoide e devem ser aderente ao plástico, ter a habilidade de diferenciação osteogênica, adipogênica, condrogênica e expressar marcadores de superfície (cluster designation – CD = denominação de grupamento) (CARVALHO, 2009; VINATIER et al., 2009). As CTM representam uma importante fonte de células que podem ser destinadas à bioengenharia da cartilagem articular devido ao fácil acesso de coleta e alta capacidade de expansão *in vitro*. São isoladas

principalmente da medula óssea e de tecido adiposo, porém, já foram igualmente isoladas de diversos outros tecidos, como músculo, sangue, sinóvia, periósteo, bulbo olfatório e cordão umbilical. Em pesquisas recentes, as CTM foram descritas como importantes agentes imunomoduladores e quimiotáticos. Nos equinos, vários estudos mostram expressão semelhante entre os marcadores da superfície celular das CTM derivadas da medula óssea e das CTM derivadas do tecido adiposo. Ambas apresentam reação positiva à análise pelo aparelho de citometria de fluxo e pela imunocitoquímica aos seguintes marcadores: CD13, CD44 e CD90. Não podem expressar os marcadores da linhagem hematopoiética como o CD34, CD45, CD19 e CD79 (CARVALHO, 2009; VINATIER et al., 2009).

As CTM foram identificadas pela primeira vez a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos por Friedenstein et al. (1966). O primeiro isolamento de células do tecido adiposo foi descrito por Gimble & Guilak et al. (2003), e se caracterizam pela facilidade de crescimento em monocamadas, secreção de matriz extracelular que permite a adesão em superfície de crescimento, manutenção por várias passagens e possibilidade de marcação através de marcadores de superfície (cluster designation). As CTM do tecido adiposo são consideradas como uma população celular heterogênea, incluindo endotélio, epitélio, pré-adipócitos e outros progenitores celulares (GOODSHIP, 2004). Recentemente, a utilização destas células representa uma nova fonte de acesso prático e de grande potencial proliferativo (DE UGARTE et al., 2003). 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. O período ideal para o implante encontra-se após a fase inflamatória, antes da fase de formação de tecido cicatricial (BARREIRA, 2005; FRISBIE et al., 2006). As CTM vêm sendo utilizadas na reparação cartilaginosa para promover a diferenciação condrogênica, diminuir a degradação da cartilagem articular e reduzir a esclerose subcondral (HEGEWALD et al., 2004; TAYLOR et al., 2007).

Nöth et al (2008) relataram que a aplicação de CTM é indicada em várias doenças articulares, já que possuem potencial para diferenciação

condrogênica *in vitro* e *in vivo*, sendo vantajosa sobre o implante autólogo de condrócitos maduros que requerem uma articulação doadora e mais de uma intervenção cirúrgica. Para a regeneração da cartilagem articular, essas células devem ser implantadas em um microambiente que favoreça a condrogênese. Estudos *in vitro* demonstraram que CTM cultivadas com fatores de crescimento transformador beta e fibroblástico-2 apresentam acréscimo na diferenciação em condrócitos. Porém, segundo o mesmo autor, demais condições ainda são necessárias para que a aplicação terapêutica das CTM em lesões condrais seja plenamente satisfatória.

A manutenção íntegra do fenótipo das CTM, para que estas se diferenciem em condrócitos, é essencial para que não haja hipertrofia, ossificação ou fibrogênese da cartilagem articular. Alguns autores relatam que deveria ser realizado um direcionamento condrogênico *in vitro* das CTM antes da aplicação, para que houvesse diferenciação íntegra dessas células *in loco*. Como desvantagem, pode existir a produção excessiva de colágeno tipo X pelas CTM, assim como a tendência à apoptose, à hipertrofia e à formação de teratomas. Esses itens ainda devem ser corrigidos para a otimização desse implante celular (FORTIER, 2007).

Um requisito fundamental para a utilização das CTM na reparação de defeitos condrais é o método de aplicação e manutenção dessas células. Vários métodos têm sido estudados a fim de garantir o melhor desempenho das CTM no local da lesão (NÖTH et al., 2008). Diversos obstáculos estão associados com o método de implante. Marcações celulares fluorescentes demonstram que as CTM frequentemente não permanecem no local da lesão, se dissipam ou não recebem o devido microambiente, necessário para a diferenciação. Injeções intra-articulares são indicadas nas fases iniciais da doença articular, principalmente quando o defeito condral é limitado a uma pequena camada da cartilagem articular, já que após da aplicação intra-articular as CTM seriam distribuídas em todo espaço capsular, apresentando tropismo pelas lesões e superfícies receptivas. Porém, no tratamento intralesional, um método de aplicação eficiente deve ser utilizado. Aplicadores específicos,

adesivos de fibrina e anteparos mecânicos podem ser necessários para que não haja escoamento do implante para outros locais da articulação (NÖTH et al., 2008; HALEEN & CHU, 2010; RICHARDSON et al., 2010).

A administração direta de CTM intra-articular suspensas em ácido hialurônico provou auxiliar na regeneração de meniscos lesados, em lesões condrais, e é capaz de reduzir as consequências do ciclo inflamatório da osteoartrite (DRENGK et al., 2009; FRISBIE et al., 2009). A administração intra-articular ou intralesional em fases iniciais da osteoartrite ou em osteoartrites crônicas demonstrou reduzir o escore de claudicação (BLACK et al., 2008). Alguns autores afirmam que o ácido hialurônico aplicado junto às CTM auxiliam na adesão e na migração dessas células no interior da articulação. Os mecanismos exatos que norteiam a migração e ação das células tronco, quando liberadas no espaço intra-articular, ainda não são inteiramente esclarecidos. Sabe-se que essas células são capazes de secretar diversas moléculas bioativas que apresentam forte ação imunomoduladora e quimiotáxica. As CTM reduzem a ativação de linfócitos, reduzem reações inflamatórias mistas, igualmente reduzem o infiltrado de células inflamatórias, possuem ação anti-apoptótica, realizam recrutamento e anabolismo celular, quimiotaxias de células produtoras de matriz extracelular e de outras células produtoras de proteínas bioativas e finalmente também ativam citocinas e diversos fatores de crescimento (NÖTH et al., 2008; DRENGK et al., 2009; FRISBIE et al., 2009; HALEEN & CHU, 2010; RICHARDSON et al., 2010).

Quando há exposição de grandes áreas do osso subcondral, a aplicação ideal das CTM seria com o auxílio de um arcabouço ou um meio de sustentação, que pode ser constituído de biogel, fibrina, quitosana, alginato, polietilenoglicol, celulose, entre outros. Os meios de sustentação celular podem ser injetáveis, não injetáveis, simples ou complexos, e devem interagir integralmente com as células e com o tecido onde está sendo aplicado. O dano do osso subcondral faz com que fatores medulares sejam deslocados para a área da lesão condral, inclusive células tronco e fatores de crescimentos. Em consequência, nesses casos há favorecimento da reparação condral fibrocartilaginosa. Em estudos controlados, os arcabouços servem igualmente para evitar que o implante celular tenha contato com os fatores medulares

provenientes do osso subcondral, protegendo as células, impedindo interferências nos resultados e no tratamento proposto (FORTIER, 2007; VINATIER et al., 2009).

A maioria dos estudos realizados nos equinos aplica tratamentos combinados. As células tronco são aplicadas juntamente aos fatores de crescimento, PRP, arcabouços bioativos, sobrenadante do aspirado de medula óssea e ácido hialurônico (NÖTH et al., 2008; VINATIER et al., 2009). Culturas expandidas aplicadas dentro de articulações podem causar pequenas reações inflamatórias locais, como edema e dor local, até seis semanas após a aplicação. A maioria dos estudos controlados e com resultados foram demonstrado em tendões flexores, com diminuição do tempo de reparação e aumento da qualidade do tecido cicatricial neoformado. O implante de CTM é idade-dependente, o que significa que quanto mais velho o animal, menor a capacidade dessas células em desempenharem a reparação plena (FRISBIE et al., 2009; HALEEN & CHU, 2010; RICHARDSON et al., 2010).

A literatura demonstra que o implante de CTM associadas a arcabouços tridimensionais diminui a formação de tecido cicatricial fibrocartilaginoso e acresce a produção de matriz rica em colágeno tipo II. Sugere-se bloquear os efeitos catabólicos das interleucinas antes da aplicação de CTM, só assim essas células conseguiriam exercer a função desejada (NESIC et al., 2006). O tratamento de lesões condrais com CTM diminui a efusão sinovial e os índices de PGE_2 , que é um marcador inflamatório da osteoartrite no líquido sinovial (FRISBIE et al., 2009). As células tronco expandidas de aspirado medular são mais eficazes no tratamento de lesões condrais quando comparadas as células provenientes do tecido adiposo, com base na produção de matriz extracelular, concentração de glicosaminoglicanos e morfologia (KISIDAY et al., 2007; VIDAL et al., 2007; FRISBIE et al., 2009).

Culturas de CTM tratadas com IGF-1 apresentam-se promissoras para o tratamento de defeitos condrais articulares, porém, algumas dessas aplicações podem resultar em condrócitos hipertróficos e fibrocartilagem (FORTIER, 2007). Hegewald et al., (2004) relataram que utilizando CTM no tratamento de lesões articulares, a qualidade da cartilagem obtida ainda não alcançou

padrões elevados quando comparados à cartilagem hialina, porém os resultados são promissores. Mais estudos *in vitro* devem ser realizados para que não haja a formação de condrócitos hipertróficos após o tratamento com células tronco mesenquimais (FRISBIE et al., 2009; RICHARDSON et al., 2010). Apesar dos estudos e da tecnologia, o implante celular ainda enfrenta falhas na aplicação como suporte celular inadequado, suprimento sanguíneo inadequado, microambiente ineficaz, não sendo capaz de ativar e suportar a diferenciação e proliferação celular e por fim, complicações pós operatórias, mesmo quando minimamente invasivas. Porém, os benefícios gerados pela terapia celular como a quimiotaxia, tropismo por cartilagem lesada, imunomodulação e diferenciação celular estimulam a realização de mais pesquisas e predizem bons resultados (NÖTH et al., 2008; DRENGK et al., 2009; FRISBIE et al., 2009; HALEEN & CHU, 2010; RICHARDSON et al., 2010).

2.5. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

As plaquetas desempenham uma função fundamental no processo de homeostasia e participam ativamente no mecanismo de reparação tecidual (NISHIMOTO et al., 2007). São pequenos corpúsculos anucleados discóides, de aproximadamente 1 a 3 μm de diâmetro, com meia vida no sangue de aproximadamente sete dias. As plaquetas são formadas a partir de megacariócitos, células gigantes e multinucleadas da medula óssea. As plaquetas apresentam um anel de microtúbulos contrátil (citoesqueleto), contendo microfilamentos de actina e miosina, glicogênio, lisossomos e α -grânulos. O α -grânulos contêm fatores de coagulação, fatores de crescimento e outras proteínas, são organelas secretoras e possuem conteúdo protéico adquirido por biossíntese, endocitose e pinocitose (EVERTS, 2006; MAIA, 2008).

As plaquetas encontram-se naturalmente em estado inativo. A ativação pode ser feita por agentes fisiológicos (trombina, colágeno, fator ativador de plaquetas - PDGF, serotonina), que estão presentes em tecidos lesados e inflamados, ou através de agentes químicos, como o cloreto de cálcio a 10%.

Depois do reconhecimento desses agentes ativadores pelas membranas plaquetárias, estas se tornam ativas, emitem pseudópodos, responsáveis pela agregação e degranulam os α -grânulos, liberando os fatores de crescimento e recrutando outras plaquetas e tipos celulares (MAIA, 2008).

O PRP foi descrito pela primeira vez em 1997, por Whittman e colaboradores, para reparação de tecidos na cirurgia maxilo-facial (SUTTER, 2007). 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). Na definição correta, o PRP é o resultado obtido apenas da separação do plasma e plaquetas das hemácias e leucócitos através de uma única centrifugação. O concentrado de plaquetas é o termo utilizado para a centrifugação repetida do plasma, retirando o sobrenadante. Em uso comum na literatura, o termo PRP é utilizado para designar o plasma com maior concentração de plaquetas que no sangue normal, mesmo este sendo resultante de centrifugações repetidas (FOSTER et al., 2009).

O PRP é um biomaterial autólogo, rico em fatores de crescimento, que pode ser caracterizado como quimiotático, mitogênico, angiogênico, analgésico e anti-inflamatório. Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas exercem grande influência no processo de reparação e cicatrização, sendo uma ferramenta de grande utilidade no auxílio ao tratamento de enfermidades ortopédicas (MARX, 2004; MAIA, 2008). O PRP deve ser sempre autólogo e não homólogo. A utilização de um animal doador de plaquetas pode levar a reações imunes e a resultados insatisfatórios em relação à utilização e efeitos do PRP (MARX, 2004). Uma concentração superior a 250×10^6 plaquetas por mililitros, ou três vezes a concentração basal plaquetária do animal é a dose sugerida pela literatura (CARMONA et al., 2009; FOSTER et al., 2009). A concentração normal de plaquetas é variável, mas em média está entre 150.000 e 450.000 por microlitros em um animal hígido (ALBUQUERQUE et al., 2008). A contagem de plaquetas no PRP depende da contagem inicial de plaquetas no sangue total do animal, por isso, alterações na contagem inicial de plaquetas, como a trombocitopenia, interferem na qualidade do PRP (MAIA, 2008).

Outros fatores presentes no PRP podem também ser benéficos para a reparação tecidual, como proteínas do soro, fibronectina, fibrinogênio, fibrina e vitronectina (SUTTER, 2007; EL-SHARKAWY et al., 2007). 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; CARMONA et al., 2009).

Anteriormente à utilização do PRP pode ser necessária a utilização de um fator quelante do anticoagulante utilizado e de um ativador de fibrinogênio, como o gluconato de cálcio e a trombina autógena respectivamente. A função desses fatores é ativar as plaquetas e formar uma rede de fibrina possibilitando o implante no local da lesão (PLAGIOSA & ALVES, 2007, VINATIER et al., 2009). Alguns estudos relatam que as plaquetas ativam-se naturalmente, degranulando e liberando os fatores de crescimento através da exposição ao tecido lesado e a uma região previamente inflamada (MARX, 2004; SUTTER, 2007). A degranulação de plaquetas ocorre sempre após uma lesão tecidual, o PDGF e o FGF são produzidos por células lesadas, sendo assim, após o contato de um concentrado de plaquetas em uma região com lesão as plaquetas serão consequentemente ativadas (EVERTS, 2006). Estudos que utilizam o PRP no tratamento de enfermidades ortopédicas empregam o gluconato de cálcio, o cloreto de cálcio ou a trombina autóloga para ativação plaquetária e consequente formação do gel (CARTER et al., 2003; LEE et al., 2007; MAIA, 2008; CARMONA et al., 2009).

O PRP possui diversos fatores de crescimento para a aplicação terapêutica, capazes de acelerar e modular os processos de reparação, atuando na proliferação celular, diferenciação e formação de matriz extracelular. Para a correta utilização é necessário a comprovação de que o

PRP possua quantidades satisfatórias de fatores de crescimento, sendo necessária a ativação química das plaquetas se os fatores de crescimento não forem liberados em quantidades suficientes para a reparação tecidual (MARX, 2004; CARMONA et al., 2007; MAIA, 2008).

Os fatores de crescimento são peptídeos que exercem função através da interação com os receptores tirosina-quinase, presentes na superfície celular. Com esse receptor ativado ocorre a sinalização e ativação de processos para divisão celular e transcrição do RNAm. Assim, o processo de reparação e cicatrização estará iniciado. (EVERTS, 2006). Os fatores de crescimento podem ser liberados até 10 dias após a ativação (SUTTER, 2007). Os fatores de crescimento se difundem no meio extracelular ou são armazenados na matriz extracelular e na membrana basal, sendo recrutados de forma imediata ou tardia em caso de lesão tecidual. Atuam nas fases de inflamação, reparo e remodelamento durante a cicatrização, participando ativamente em cada uma dessas fases (PLAGIOSA & ALVES, 2007).

As plaquetas liberam diversos fatores de crescimento, dentre eles: o fator de crescimento ativador de plaquetas (PDGF); fator transformador (TGF); fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator semelhante à insulina (IGF-1), que atua sobre matriz óssea e cartilaginosa. Na fase de reparo são importantes o fator vascular endotelial (VEGF) e o fator epidermal (EGF). Os fatores de crescimento são importantes por atuarem na proliferação, diferenciação, modulação e coordenação celular (PLAGIOSA & ALVES, 2007). O PRP ainda auxilia no implante de enxertos ósseos e celulares, implante de condrócitos em defeitos condrais e de CTM em tendinites de equinos, assim, é capaz de acelerar e dar qualidade à reparação de lesões ortopédicas desses animais (CARTER et al., 2003; CARMONA et al, 2007; LEE et al., 2007; MAIA, 2008).

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 osteoartrite. Há redução da claudicação e da efusão sinovial, o principal fator relatado pela literatura é a redução significativa da dor articular. Acredita-se que o PRP seja capaz de bloquear a expressão de

fatores nucleares e a ação de moléculas pró-inflamatórias, atuando de forma anti-inflamatória e analgésica. A IL-1 e o TNF-alfa são inibidos pela presença de grande quantidade de fatores de crescimento e proteínas bioativas presentes no PRP (EL-SHARKAWY et al., 2007). A inibição da IL-1 tem como consequência a redução do ciclo inflamatório, inativação das prostaglandinas, diminuição da dor e da efusão sinovial (MCILWRAITH, 2005^a; STASHAK 2006; VEIGA 2008; CARMONA et al., 2009).

O PRP também possui uma concentração de proteínas osteocondutoras. Estimula a migração celular, a formação óssea e o incremento do tecido conjuntivo (CARTER et al., 2003). Tem alta capacidade de modulação inflamatória, torna a cicatrização mais rápida e eficiente por promover a diferenciação e migração celular. Observa-se uma influência positiva do PRP sobre a proliferação celular, apresentando um significativo efeito mitogênico. O coquetel de fatores de crescimento age em conjunto bloqueando o sangramento e iniciando a reparação. CTM expostas ao TGF e ao PDGF apresentam maior potencial proliferativo. Alguns estudos demonstram que CTM derivadas da medula óssea podem perder o potencial condrogênico e reduzir a expressão de RNAm de colágeno tipo II na presença de PRP, o que parece ser resultante da proliferação excessiva, principalmente em monocamadas (FORTIER, 2007; DRENGK et al., 2009). Porém, Drengk et al., (2009) demonstraram que culturas 3D e tratamentos *in vivo* realizados com CTM e PRP apresentaram aumento da taxa de proliferação, diferenciação condrogênica e expressão de RNAm do colágeno tipo II.

Anitua, et al., (2006) relataram que não houve efeitos colaterais graves decorrentes da aplicação intralesional de PRP, a não ser em pacientes que apresentavam disfunção plaquetária, trombocitopenia, hipofibrinogenemia e instabilidade hemodinâmica. Essas alterações hematológicas decrescem a qualidade do plasma rico em plaquetas. Carmona et al., (2009) relataram pequena efusão sinovial, sem alteração no grau de claudicação, logo após a aplicação intra-articular de PRP, essas alterações regrediram sem tratamentos depois de 48 horas. As condições básicas de assepsia durante a aplicação e preparação devem ser rigorosamente obedecidas (CARMONA et al., 2009).

Um número significativo de fatores de crescimento, proteínas adesivas, produtoras de matriz extracelular, quimiotáticos e fatores de diferenciação que regulam o desenvolvimento, homeostase e maturidade da cartilagem articular foram identificados no PRP (VINATIER et al., 2009). Diversos volumes de PRP, que variam de dois a 40 mL, são citados na terapêutica de lesões condrais, em aplicações intra-articulares ou intralesionais. Aplicações repetidas em avulsões ligamentares, pequenas fraturas e na osteoartrite demonstrou reduzir o tempo de repouso dos animais e acelerar a reparação (SANCHEZ et al., 2003). Segundo Carmona et al., (2007), o tratamento intra-articular com PRP é seguro e reduz significativamente os sinais clínicos da osteoartrite. O PRP também melhora a aparência morfológica da lesão, incrementando a transcrição de colágeno tipo II, sendo um tratamento promissor para equinos atletas com lesões articulares (FORTIER, 2007).

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Pesquisas recentes obtiveram progressos referentes à reparação cartilaginosa na osteoartrite, através de implantes autólogos ou alógenos de condrócitos, CTM, PRP, biomateriais associados a arcabouços e outros tecidos auxiliados pelo acesso artroscópico. A utilização de células autólogas diminui a possibilidade de rejeição e inflamação adicional. A obtenção de CTM derivadas do tecido adiposo e de PRP demonstra boa viabilidade em termos de coleta, processamento e aplicação, assim como o implante por artroscopia em lesões condrais articulares. Sabendo-se então do limitado mecanismo regenerativo do tecido condral e do processo inflamatório envolvido nas enfermidades articulares, as capacidades biológicas dos diferentes tipos celulares em questão representam uma possibilidade no restabelecimento estrutural e funcional da cartilagem articular lesada.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve por objetivos avaliar o efeito da aplicação das CTM, do PRP e da associação das CTM com o PRP sobre lesões condrais articulares produzidas experimentalmente na tróclea medial do fêmur, da articulação femoropatelar de eqüinos, através de exames clínicos, laboratoriais e artroscópicos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Avaliar pela artroscopia o aspecto macroscópico da cartilagem articular na tróclea medial do fêmur da articulação femoropatelar, antes e após a instituição dos tratamentos.
- b) Avaliar clinicamente os animais após a indução da lesão condral, e após a instituição dos tratamentos.
- c) Avaliar as características físicas, químicas e citológicas do líquido sinovial antes e após a indução da lesão na cartilagem, e após a instituição dos tratamentos.
- d) Avaliar o perfil sinovial de PGE_2 antes e após a indução da lesão na cartilagem, e após a instituição dos tratamentos.
- e) Avaliar a morfologia tecidual em T-150, por meio de exames histológicos e histoquímicos.

Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. EXPERIMENTAÇÃO

O experimento foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu (Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária), no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, Campus de Botucatu e no Instituto de Biociências (IB), UNESP, Campus de Botucatu (Departamento de Imunologia e Departamento de Histologia). A metodologia adotada durante o desenvolvimento do presente trabalho foi aprovada pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, em 17 de Dezembro de 2008, sob protocolo 256/2008.

5.2. ANIMAIS E FASE DE AMBIENTAÇÃO

Foram utilizados oito equinos adultos, clinicamente hígidos, mestiços da raça Quarto de Milha, com três a quatro anos de idade. Esses animais foram submetidos a um período de adaptação ao manejo alimentar de dois meses previamente ao início dos procedimentos cirúrgicos. A confirmação do estado de hígidez para a inclusão no grupo experimental foi realizada por meio dos exames físicos (mensuração de parâmetros vitais e exame do aparelho locomotor), laboratoriais (hematimetria, leucometria, perfil bioquímico das funções hepática e renal) e radiográficos (avaliação das articulações femoropatelares). Durante todo o experimento os cavalos foram alimentados com feno de capim “*coast-cross*”, com água “*ad libitum*” e suplementados com ração comercial para eqüinos¹ e composto vitamínico mineral². Receberam vermífugo com composto comercial a base de Ivermectina³ a cada três meses.

¹ Ração Triumph Passeio – Socil, Brasil

² Sal para equinos Manafós – Connan, Brasil

³ Ivermectina - Eqvalan, pasta - Merial, Brasil

Os animais permaneceram em baias na semana anterior e três semanas posteriores ao procedimento cirúrgico, sendo soltos em piquetes nos intervalos das cirurgias (Figura 01).

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos diferentes e um controle, ou seja, quatro grupos (G1, G2, G3 e G4). Cada grupo apresentou quatro repetições (quatro membros). Em todos os grupos as articulações femoropatelares de ambos os membros pélvicos foram abordadas pela cirurgia artroscópica para a realização de um defeito cartilaginoso e submetidas a tratamento conforme o grupo:

- G1 (Membro Pélvico Esquerdo - MPE e Membro Pélvico Direito - MPD dos animais 1 e 2): receberam implante autólogo de CTM de tecido adiposo.
- G2 (MPE e MPD dos animais 3 e 4): receberam implante autólogo de PRP autólogo
- G3 (MPE e MPD dos animais 5 e 6): receberam CTM de tecido adiposo associadas ao PRP autólogo.
- G4 (MPE e MPD dos animais 7 e 8): foi o grupo controle do experimento, tratados apenas com solução fisiológica.

A artroscopia para a indução das lesões cartilaginosas foi definida como tempo zero do experimento (T-0). Os parâmetros clínicos e laboratoriais de todos os grupos foram realizados em T-0, no 15º dia (T-15), no 30º (T-30), no 45º (T-45), no 60º dia (T-60), 75º (T-75), no 90º (T-90), 120º dia (T-120) e no 150º dia (T-150) após a realização do defeito na cartilagem. A análise macroscópica da articulação via artroscopia e, no mesmo procedimento, a coleta de cartilagem para análise histopatológica e histoquímica foi realizada no início e ao final do experimento (T-0 e T-150). O tratamento foi realizado para todos os animais em T-30, através de cirurgia artroscópica. Todos os

parâmetros clínicos e laboratoriais eram analisados e coletados imediatamente antes dos procedimentos cirúrgicos em T-0, T-30 e T-150 (Quadro 1).

Quadro 01: Esquema organizacional do delineamento experimental

Tratamentos					
G1	Tempo	0	30		150
		Lesão	Implante de CTM	Avaliação clínica e Laboratorial	Biópsia
G2	Tempo	0	30		150
		Lesão	Implante de PRP	Avaliação clínica e Laboratorial	Biópsia
G3	Tempo	0	30		150
		Lesão	Implante de CTM +PRP	Avaliação clínica e Laboratorial	Biópsia
G4 (Controle)	Tempo	0	30		150
		Lesão	Controle	Avaliação clínica e Laboratorial	Biópsia

*CTM = Células Tronco Mesenquimais

*PRP = Plasma rico em plaquetas;

*G = Grupo

5.4. EXAMES RADIOGRÁFICOS

Os animais foram submetidos a exames radiográficos das articulações femorotibiopatelares dos membros pélvicos, nas projeções caudo-cranial e latero-medial para a verificação de possíveis alterações ósseas ou articulares prévias ao experimento e inclusão dos animais nos grupos de pesquisa. Para

a realização dos exames, os animais foram sedados com cloridrato de xilazina⁴ a 10% (na dose de 0,5 mg/kg, IV) e a técnica radiográfica utilizada nas projeções caudo-craniais foi de 76 kVp e 11 mAs, e nas projeções latero-mediais foi de 65 kVp e 7 mAs.

5.5. REALIZAÇÃO DA LESÃO NA CARTILAGEM ARTICULAR

O primeiro procedimento artroscópico foi considerado como tempo zero (T-0) do experimento. Para a intervenção cirúrgica, os animais permaneceram em jejum alimentar de 8 horas e hídrico de 4 horas. O protocolo anestésico adotado foi composto de: acepromazina⁵ (0,05 mg/kg, IM) e xilazina (0,5 mg/kg, IV) como medicação pré-anestésica, diazepam⁶ (0,15 mg/kg, IV) e cetamina⁷ (2,2 mg/kg, IV) para a indução e manutenção em plano cirúrgico com anestesia inalatória com isofluorano⁸ vaporizado em 100% de oxigênio. Uma área de aproximadamente 20cm² na região de acesso da articulação femoropatelar foi submetida à tricotomia e posteriormente à antisepsia com digluconato de clorexidine degermante⁹ e digluconato de clorexidine em solução alcoólica a 0,5%¹⁰.

Os equipamentos e instrumentos artroscópicos foram os seguintes: artroscópio 4 mm de diâmetro, 18 cm de comprimento, lente em 30⁰, marca Karl Storz; camisa artroscópica com torneira rotativa marca Karl Storz; cabo de luz de fibra de vidro, 180 cm de comprimento, videocâmera Endocan, NTSC, marca Karl Storz; conjunto para lâminas motorizadas (“*Shaver*”) e descartáveis marca Razek; monitor a cores, Triniton PVM-14N1MDE Sony; gravador de DVD para captura das imagens Dual Layer RDR-DX 330 marca Sony; fonte de luz marca Karl Storz; bomba de irrigação Arthropump, marca Karl Storz e insuflador de dióxido de carbono 45 L marca Astustec (Figura 02).

⁴ Xilamax, Xylazine HCl Vetoquinol N-A. Inc. George Lavaltrie, Canadá.

⁵ Acepran 1%, Acepromazina UNIVET S.A Indústria Veterinária SP, Brasil.

⁶ Compaz Injetável, Diazepam Cristália Prod. Químicos e Farmacêuticos Ltda, SP, Brasil.

⁷ Dopalen Injetável, Cloridrato de Ketamina VETBRANDS, Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil

⁸ Isoforine, Isofluorano Cristália Prod. Químicos e Farmacêuticos Ltda, SP, Brasil

⁹ Riohex 2%, digluconato de clorexidine degermante Rioquímica SP, Brasil

¹⁰ Riohex 0,5%, digluconato de clorexidine alcoólico Rioquímica SP, Brasil

A lesão cartilaginosa da tróclea medial do fêmur foi realizada com o animal em decúbito dorsal e com articulação femorotibiopatelar em semiflexão. As cápsulas das articulações foram previamente distendidas com 120 mL de solução salina 0,9%¹¹, com o auxílio de uma seringa descartável de 60 mL¹² e agulha hipodérmica¹³ 40 x12, para facilitar o acesso dos instrumentos artroscópicos. Foram estabelecidos dois portais, de acordo com a técnica descrita por McIlwraith (2005^b). Com auxílio do bisturi e lâmina número 11, uma incisão de pele e fáscia puntiforme de dois centímetros foi realizada na face dorsolateral da articulação, entre o ligamento patelar lateral e o ligamento patelar intermédio, proximal à crista da tíbia para o portal artroscópico primário. O conjunto obturador e camisa foi inserido através desta incisão, e posicionado próximo a tróclea medial do fêmur (Figura 03). Neste momento, o obturador foi retirado e substituído pela óptica, iniciando-se a irrigação e insuflação da cápsula articular com solução salina para a realização da inspeção da articulação e da superfície condral da tróclea medial do fêmur (Figura 04).

Uma segunda incisão puntiforme de pele e fáscia foi realizada na face dorsomedial da articulação, entre os ligamentos patelares médio e medial, constituindo o portal instrumental, utilizado para realização da lesão cartilaginosa. A lesão condral foi realizada na tróclea medial do fêmur, o mais proximal possível e evitando o sulco intertroclear. Para criar a lesão foi utilizada lâmina abrasiva motorizada (*shaver*), com desgaste suficiente para obter a dimensão da lesão condral desejada. As lesões foram induzidas apenas retirando a cartilagem hialina, não havendo abrasão, perfuração ou sangramento do osso subcondral, e apresentavam um centímetro de diâmetro. O diâmetro lesão foi mensurado com o auxílio de pinça tipo “*Ferris-Smith*”.

A pinça tipo “*Ferris-Smith*” foi igualmente utilizada para dar acabamento à lesão e para recolher os fragmentos de cartilagem, coletados sempre do centro da lesão, retirados pelo portal instrumental e reservados para exame histopatológico e histoquímico. Todo o procedimento artroscópio foi documentado por meio de sistema de gravação em DVD. Ao final do

¹¹ Cloreto de Sódio 0,9% Halex Istar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás, Brasil

¹² Seringa Descartável BD - Brasil

¹³ Agulha descartável BD - Brasil

procedimento o fluido foi drenado pelo fluxo da camisa artroscópica e a pele foi suturada com fio de nylon agulhado¹⁴ número 3-0 em pontos separados em padrão “Wolff”. Após a cirurgia, os animais receberam a associação de penicilinas¹⁵, com dose calculada pela benzatina, de 30.000 UI/kg intramuscular, totalizando três aplicações a cada 72h; 10.000UI de soro antitetânico¹⁶ subcutâneo; 2,2 mg/kg de fenilbutazona¹⁷ intravenosa a cada 24h, totalizando duas aplicações e curativo local duas vezes ao dia com digluconato de clorexidine 0,5% em solução alcoólica até a retirada dos pontos, realizada 15 dias após a cirurgia.



Figura 01: Animal 2 do G1 ao final da fase de ambientação, com confirmação do estado de higidez para inclusão no grupo experimental.

¹⁴ Nylon 3-0 Brasuture Ind. Com. Imp. e Exp. Ltda, SP, Brasil

¹⁵ Multibiótico Reforçado Vitalfarma Indústria Farmacêutica Vitalfarma Ltda, Minas Gerais, Brasil.

¹⁶ Soro Antitetânico Vencofarma, Lab. Vencofarma do Brasil Ltda, Paraná, Brasil

¹⁷ Equipalazone Injetável, Fenilbutazona MARCOLAB, Indústria Farmacêutica Vitalfarma Ltda, Minas Gerais, Brasil.

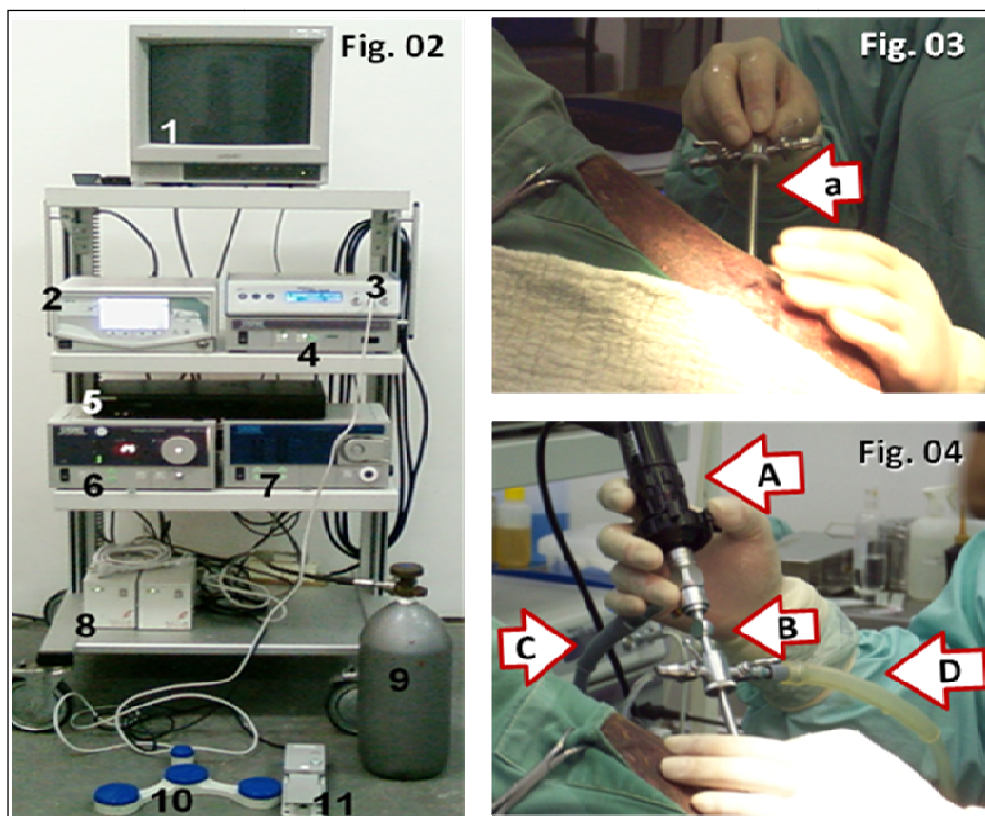


Figura 02: Equipamento artroscópico. Monitor a cores (1), Insuflador de CO₂ (2), Sistema de lâminas motorizadas – Shaver (3), Câmera (4), Gravador de DVD (5), Fonte de Luz (6), Bomba de fluido – Arthropump (7), estabilizadores de energia (8), cilindro de CO₂ (9), pedal do Shaver (10) e pedal do Arthropump (11) do membro pélvico direito.

Figura 03: Camisa artroscópica (a) sendo inserida pela incisão de pele e fáscia, na articulação femoropatelar.

Figura 04: Procedimento artroscópio da articulação femoropatelar direita. Câmera (A); Conjunto de óptica e camisa artroscópica (B); com cabo de luz (C); conector da bomba de fluido (D).

5.6. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

5.6.1. Coleta

O PRP foi processado conforme Vendramin et al. (2006). Foram coletados 80 mL de sangue dos dois equinos de G2 e G3 através da venopunção jugular, acondicionados em frascos com citrato de sódio a 3,8%. O sangue total foi centrifugado pela primeira vez à 300g por 10 minutos, promovendo a separação das células vermelhas. Do plasma sobrenadante foi

descartado os 50% superiores (plasma pobre em plaquetas - PPP) e a zona de névoa (*"Buffy Coat"*). Os 50% restantes foram submetidos à nova centrifugação à 660g por 10 minutos. Novamente, os 50% superiores foram descartados, os 50% restantes foram agitados resultando no PRP. O PRP deve possuir uma contagem igual ou maior que 300.000 plaquetas/ μ L para a viabilidade de utilização, verificado por contagem microscópica em câmara de Neubauer espelhada¹⁸. O PRP foi obtido momentos antes da utilização (tratamentos em T-30, T-45, T-60 e T-75).

5.6.2. Implante isolado do PRP

O G2 foi submetido à administração de PRP em T-30. Posteriormente, o PRP foi sequencialmente administrado isoladamente a cada 15 dias, em um total de três aplicações (T-45, T-60 e T-75). Em T-30, o implante isolado de 4 mL de PRP foi realizado de forma intralesional, via artroscópica (o acesso artroscópico foi semelhante ao utilizado para realização da lesão condral articular, citada anteriormente no item 5.5) sobre a lesão previamente provocada na tróclea medial do fêmur. No momento da aplicação do implante ao leito receptor, foi adicionado ao PRP 5% de cloreto de cálcio¹⁹ a 10% e 5% de trombina equina (purificada em laboratório) para formação do coágulo de fibrina (gel). A proporção estabelecida de cloreto de cálcio a 10% para o PRP foi de 100 μ L para 2 mL de PRP. A proporção estabelecida de trombina equina (2,3 mg/mL) para a formação do coágulo de fibrina foi de 100 μ L para 2 mL de PRP. Em T-30, os tratamentos foram realizados com o PRP em forma de gel. As outras aplicações de PRP (T-45, T-60 e T-75) foram realizadas através de injeções intra-articulares, na articulação femoropatelar, com prévia realização de tricotomia e antisepsia local, entre os ligamentos patelares médio e medial. A injeção intra-articular foi realizada com uma seringa descartável de 20 mL e agulha hipodérmica 40x8, portando 5 mL de plasma rico em plaquetas para cada articulação, em forma líquida, sem a adição de trombina.

¹⁸ Câmara de Neubauer

¹⁹ Calcium Chloride Solution, Sigma – Aldrich, Sigma Life Science, Brasil.

5.7. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

O processamento e cultivo das CTM foi realizado no Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu. As CTM utilizadas no experimento foram extraídas e cultivadas a partir de tecido adiposo.

5.7.1. Coleta de tecido adiposo

No local, situado aproximadamente cinco centímetros lateralmente da linha média da base cauda, foi realizada a tricotomia e antissepsia para a intervenção cirúrgica (Figura 05). Realizou-se a anestesia local infiltrativa com lidocaína sem vasoconstritor²⁰ a 2% e sedação dos animais com xilazina a 10%, 0,5 mg/kg. Uma incisão de aproximadamente 5 cm foi realizada, paralela à base da cauda, com lâmina bisturi número 24. O subcutâneo foi divulsionado permitindo a visualização do tecido adiposo sobre o tecido muscular. Foi realizada a coleta de tecido adiposo superior a um grama (Figura 06), pesado em balança de precisão, reservado e submerso em um frasco estéril contendo 50 mL de meio HEPES²¹, encaminhado imediatamente para processamento em laboratório. A sutura de pele foi realizada com pontos padrão “simples separado”, em fio nylon agulhado, número 3-0.

5.7.2. Extração da fração vascular estromal

A extração da fração vascular estromal foi realizada segundo técnica descrita para eqüinos por Vidal et al., (2007). As amostras de tecido adiposo foram submetidas a lavagens sucessivas em meio HEPES. Posteriormente, realizou-se a separação mecânica com uma lâmina de bisturi número 24 (Figura 06) e ação da collagenase tipo I. A solução foi homogenizada e levada à estufa a 37° C e 5% de CO₂ “overnight”. O material foi filtrado em filtro de

²⁰ Xylestesin 2%, Cloridrato de lidocaína Cristália Prod. Químicos e Farmacêuticos Ltda, SP - Brasil

²¹ HEPES Sodium Salt, Sigma – Aldrich, Sigma Life Science, Brasil.

70 μ m² e adicionado a um mesmo volume de meio DMEM-Knockout²² com 10% de soro fetal bovino. O resultante foi centrifugado a 1.500 *rpm* por cinco minutos, desprezando o sobrenadante e adicionado o meio HEPES. A centrifugação foi repetida, desprezando novamente o sobrenadante e adicionado meio DMEM-Knockout com 10% de soro fetal bovino.

5.7.3. Cultivo, expansão e caracterização das células-tronco mesenquimais

Foram extraídos 100 μ L do resultante e colocados em frascos de hemólise para a contagem celular em microscópio comum e Câmara de Neubauer. Foi avaliada a viabilidade celular por exclusão do azul de trypan. A contagem celular das células viáveis foi realizada através do cálculo matemático:

$$\text{Número de células/ mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células viáveis}}{4 (\text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes})} \times 2 (\text{Azul de Trypan}) \times \text{Diluição} (10^4)$$

As células foram contadas em quatro quadrantes na Câmara de Neubauer. Um volume igual de Azul de Trypan foi adicionado à amostra a ser contada (100 μ L da amostra : 100 μ L de Azul de Trypan). As células viáveis permaneciam incolores, e as células coradas em azul foram quantificadas como inviáveis, devido ao rompimento sua membrana celular e penetração do corante em seu interior.

O restante da amostra foi transferido para placas de cultura de 25cm², permanecendo a 37⁰ C em estufa a 5% de CO₂, em ambiente estéril, sendo manipulada apenas em capela de fluxo laminar, segundo Zuk et al (2001). O meio (DMEM- Knockout 10% de soro fetal bovino) foi substituído a cada 48 horas e, havendo confluência de 80% da placa realizou-se a tripsinização (passagens). A cada passagem foram realizadas contagens e avaliações da viabilidade celular como descrito anteriormente. O conteúdo então foi transferido novamente para placas de cultura de 25cm², permanecendo a 37⁰ C e em estufa a 5% de CO₂. O cultivo foi mantido até a terceira passagem ou até

²²Dulbecco's Modified Eagle's Medium Knockout, Sigma – Aldrich, Sigma Life Science, Brasil.

completar o dia do tratamento dos respectivos grupos (G1 e G3). Na última tripsinização, no momento da utilização das células tronco nos tratamentos propostos, foi realizada novamente a contagem, estabelecendo a caracterização das CTM. A dose mínima utilizada no tratamento foi de 10^7 células por lesão tratada.

A caracterização das células-tronco foi realizada pela reação antígeno-anticorpo conforme protocolo sugerido pelo fabricante dos anticorpos, com antígenos de superfície de eqüinos por citometria de fluxo e marcadores de superfície (Quadro 02). As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur BD®, no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu.

Para a realização das marcações foi utilizada uma amostra de 30×10^4 células para cada teste (marcadores mouse anti-rat CD90 isotiocianato de fluoresceína, mouse anti-horse CD13, mouse anti-horse CD44 e CD45). Os marcadores CD13 e CD44 são específicos da espécie equina, já os marcadores CD90 e CD45 são específicos para uma espécie distinta ao cavalo, por isso foi observado se haveria reação interespecie. Os marcadores específicos, necessitam de um marcador secundário para a sua análise, para isso foi utilizado o marcador “*goat anti-mouse IgG-FITC*”. Para o controle negativo dos marcadores utilizados nas amostras foram realizados testes para a calibração do aparelho de citometria de fluxo: leitura da fluorescência das células e leitura da fluorescência das células adicionadas ao anticorpo secundário (“*goat anti-mouse IgG-FITC*”), conforme técnica descrita por Carvalho, (2009).

Quadro 02: Resposta esperada para os marcadores CD utilizados na caracterização das CTM.

CD 13	Positivo
CD 90	Positivo
CD 44	Positivo
CD 45	Negativo

*CD = “*Cluster Designation*” ou denominação de grupamento;

*O conjunto de marcações “*positivas*” sugere que as células utilizadas no presente estudo são células tronco.

5.7.4. Implante isolado das células-tronco mesenquimais

O implante das CTM para o G1 foi realizado em T-30. Foi necessária a obtenção de 3 mL plasma pobre em plaquetas (PPP) para a suspensão do “*pellet*” de células tronco cultivadas. O implante foi realizado de forma intralesional, por artroscopia (o acesso artroscópico foi semelhante ao utilizado para realização da lesão condral articular, citada anteriormente no item 5.5) sobre a lesão previamente provocada na tróclea medial do fêmur. Foi adicionada trombina para formação do coágulo de fibrina (gel de fibrina) para a fixação do implante no local da lesão. A proporção estabelecida de trombina (2,3 mg/mL) para a formação do coágulo de fibrina foi de 100 µL para 2 mL de plasma.

5.7.5. Implante de células-tronco mesenquimais associadas ao PRP

O implante de CTM associadas ao PRP para o G3 foi realizado em T-30, depois, apenas o PRP foi administrado isoladamente a cada 15 dias, em um total de três aplicações (T-45, T-60 e T-75). Em T-30, o implante foi realizado de forma intralesional, por artroscopia. O “*pellet*” de células tronco foi ressuspenso em 4 mL de PRP previamente processado. No momento da aplicação do implante ao leito receptor, foi adicionado ao PRP 5% de cloreto de cálcio a 10% e 5% de trombina equina para formação do coágulo de fibrina (gel). Em T-30, os tratamentos foram realizados com o PRP em forma de gel. As outras aplicações de PRP (T-45, T-60 e T-75) foram realizadas através de injeções intra-articulares, na articulação femoropatelar. A injeção intra-articular foi realizada com 5 mL do plasma rico em plaquetas, para cada articulação, em forma líquida, sem a adição de trombina. O G4 foi submetido ao mesmo procedimento artroscópico em T-30 e injeções intra-articulares em T-45, T-60 e T-75, igualmente ao restante dos grupos. Porém, o G4 recebeu os mesmos volumes apenas de solução salina a 0,9%. Todos os tratamentos foram realizados com distensão articular por CO₂ em torno de 30 mmHg de pressão. Após o acesso articular com solução salina, todo o fluido era drenado e a

articulação era distendida com CO₂ permitindo assim, o implante dos tratamentos.

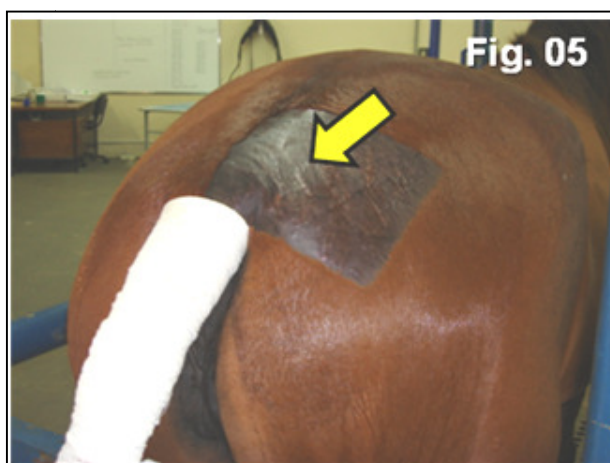


Figura 05: Vista caudal do equino contido em tronco para coleta de tecido adiposo (seta).

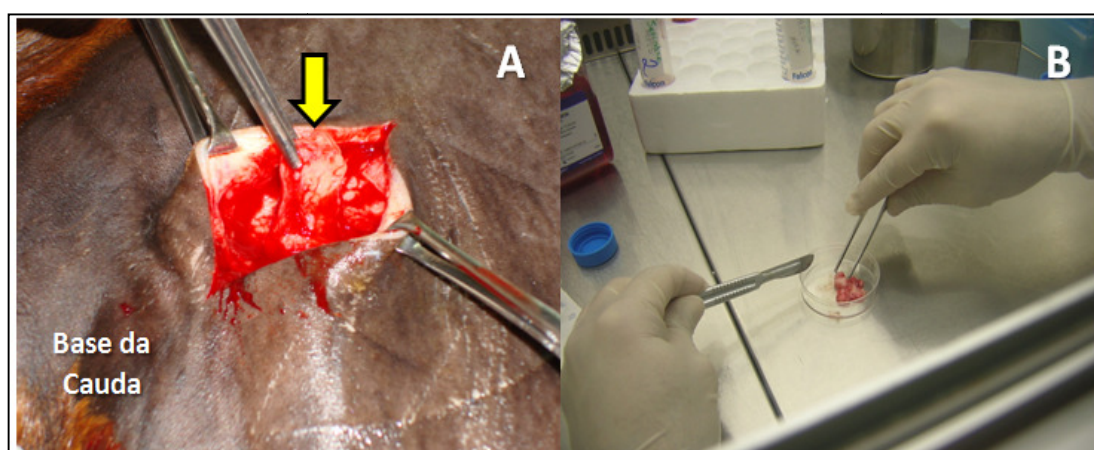


Figura 06: Incisão a cinco centímetros lateralmente da linha média da base cauda e coleta de tecido adiposo (seta) (A). Separação mecânica do tecido adiposo (B).

5.8. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

5.8.1. Exame Clínico

Todos os grupos foram avaliados clinicamente, imediatamente antes da realização do defeito de cartilagem por artroscopia (T-0) e em T-15, T-30, T-45, T-60, T-75, T-90, T-120 e T-150, quanto à claudicação, graduada em escores de 0 a 5 segundo Stashak (2006): 0 = ausência de claudicação, 1 = claudicação pouco visível ao passo e imperceptível ao trote, 2 = claudicação

visível ao passo e pouco visível ao trote, 3 = claudicação nítida ao passo e visível ao trote, 4 = claudicação nítida em qualquer circunstância, 5 = impotência funcional do membro. Foram realizados testes de flexão forçada na articulação femorotibiopatelar para todos os grupos (Figura 07). Havendo exacerbação da claudicação após a flexão, era realizada uma nova graduação do escore. As articulações foram diariamente inspecionadas quanto à presença de sinais inflamatórios, efusão ou sinais de infecção.

5.8.2. Exame físico, químico e citológico do líquido sinovial

A análise do líquido sinovial foi realizada pelo Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu. A análise do líquido sinovial foi dividida em três categorias: exame físico, exame químico e exame citológico. No exame físico, a cor, o aspecto e a coagulação do líquido sinovial foram avaliados no momento da coleta. A densidade foi obtida em laboratório por refratometria. Foram avaliadas no exame químico, por método semi-quantitativo, utilizando-se fitas reagentes de teste rápido²³, a quantidade de proteína e a glicose. Esses parâmetros foram classificados em escores de 0 a 3, de acordo com a coloração da fita.

Ainda no exame químico, o fibrinogênio foi dosado pelo método de JAIN (1993), e também classificado em escores de 0 a 3, onde 0 representa a ausência de fibrinogênio; 1 representa fibrinogênio menor que 100 mg/dL; 2 representa fibrinogênio entre 100 e 200 mg/dL e 3 fibrinogênio maior que 200 mg/dL. A qualidade da mucina foi analisada através do teste do coágulo em ácido acético glacial 7N e água destilada (PARRY, 1997). Esse parâmetro foi classificado em qualidades: *ótima*; *boa*; *baixa* ou *muito baixa*. A viscosidade relativa foi avaliada mediante a união e separação do líquido sinovial entre os dedos, sendo igualmente classificada como descrito para a qualidade da mucina.

No exame citológico foi efetuada a contagem global e diferencial de células nucleadas e a contagem aproximada do número de hemácias, utilizando a Câmara de Neubauer. Os leucócitos foram quantificados em

²³ Combur 10 Test M, Cobas, Roche, Brasil.

porcentagem. A coleta do líquido sinovial para as análises foi realizada em T-0, T-15, T-30, T-45, T-60, T-75, T-90, T-120 e T-150. O líquido sinovial foi coletado da articulação femoropatelar, entre os ligamentos patelares médio e medial, realizado com uma seringa descartável de 20 mL e agulha hipodérmica 40x12, com prévia tricotomia e antissepsia da região escolhida (Figura 08). O material, cerca de 10 mL, foi depositado em frascos com EDTA e sem EDTA para as análises descritas anteriormente. Foram utilizadas as mesmas amostras de líquido sinovial, coletadas nos diferentes momentos, para todas as análises envolvendo o material.

5.8.3. Análise de prostaglandina (PGE₂) no líquido sinovial

A determinação da concentração da prostaglandina E₂ (PGE₂) sinovial foi realizada para todos os grupos em T-0, T-15, T-30, T-45, T-60, T-75, T-90, T-120 e T-150, através de teste imunoenzimático utilizando um “kit” ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) comercial²⁴, de acordo com as instruções observadas na bula do produto. Parte do líquido sinovial coletado nos diferentes momentos foi congelada em tubos eppendorfs® a -80° C para a quantificação da prostaglandina. Foi utilizado o líquido sinovial diluído, 150 µL de líquido sinovial para 300 µL do “*Calibrator Diluent RD5-56*” fornecido pelo fabricante. A absorbância foi lida em comprimentos de 450 nm em leitor de microplaca ELISA, e sendo correlacionada a um padrão com variação de 18 a 2500 pg/mL. As amostras que se apresentaram fora dessa faixa de resultados foram re-analizadas após nova diluição. A curva de regressão da análise e a conversão das densidades ópticas obtidas na leitura foram realizadas com o auxílio de um software²⁵.

²⁴ *Kit* Parameter™ PGE₂, PGE₂ Assay. R&D Systems, Inc. Minneapolis, EUA. Distribuído por LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil.

²⁵ Instat Graph Pad Instat.

5.9. ANÁLISE MACROSCÓPICA DA CARTILAGEM ARTICULAR

No procedimento artroscópico de T-150 do experimento foram abordados todos os grupos para a avaliação macroscópica da cartilagem articular na região onde foi realizada a lesão condral e coleta de material para exame histopatológico e histoquímico. Foram avaliadas as superfícies articulares da tróclea medial do fêmur, quanto ao aspecto geral da superfície cartilaginosa, aspecto do tecido cicatricial, adesão do tecido cicatricial, erosões e fibrilações, além da palpação local indireta com um obturador rombo, verificando a consistência do tecido neoformado.

5.10. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA

As análises histopatológicas foram realizadas para todos os grupos em T-0 e T-150. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Histopatologia, Departamento de Morfologia do Instituto Biológico da UNESP – Botucatu. Para a realização das análises histopatológica e histoquímica, cortes de cinco micrômetros de espessura foram obtidos dos blocos de parafina, e distendidos em lâminas histológicas. Esses cortes foram processados pelas técnicas habituais de desparafinização e corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (H&E), Picrosírius Red e Azul de Toluidina. A análise das lâminas foi realizada por microscopia óptica e em microscópio de polarização para as lâminas coradas com Picrosirius, sem o prévio conhecimento dos grupos a que pertenciam cada lâmina. Para a avaliação das alterações histopatológicas e histoquímicas da reparação da cartilagem lesada foram considerados os seguintes aspectos: predominância de condrócitos (ou perda de celularidade), organização celular e tecidual da cartilagem, qualidade da matriz extracelular, presença de fibras colágenas e fibrose (WILKE et al., 2007).

5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas separadamente, comparando os grupos dentro de cada tempo e os tempos dentro de cada grupo. Para as aferições numéricas (densidade, contagem de células nucleadas, contagem relativa de mononucleares, linfócitos e neutrófilos) foi realizada, de forma separada, a análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two Way Repeated Measures ANOVA) e o Teste de Tukey para comparação de médias, sendo que as médias foram inseridas nas tabelas e os valores de p nas legendas das mesmas. Para as aferições em escores (proteína, fibrinogênio, claudicação e flexão forçada) foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis comparando individualmente os tratamentos em cada tempo e separadamente, comparando os tempos dentro de cada tratamento. Quando houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi realizado o Teste de Tukey para comparação das medianas, sendo que, neste caso, os valores de p estão inseridos nas tabelas.

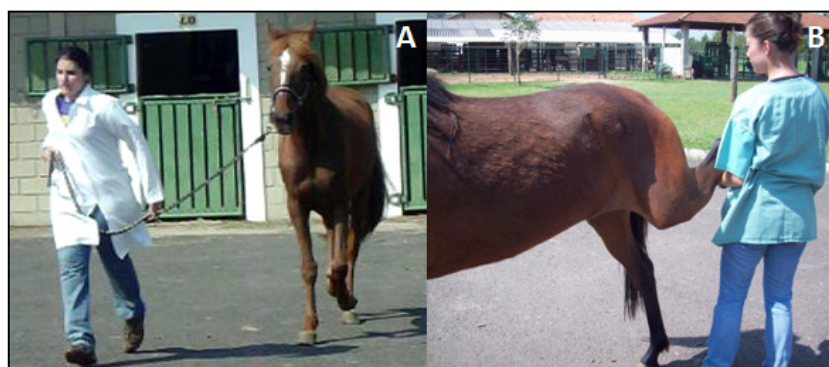


Figura 07: Exame de claudicação. Animal ao trote (A) e posição no teste de flexão forçada (B).



Figura 08: Coleta de líquido sinovial. Posição da agulha no local da punção (C) e aspiração do líquido sinovial (D).

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. EXAMES RADIOGRÁFICOS

A normalidade das articulações e, principalmente das superfícies trocleares através das posições caudo-cranial e latero-medial foi confirmada, em todos os grupos experimentais. Todas as articulações foram incluídas nos grupos de pesquisa sem alterações radiográficas iniciais.

6.2. LESÕES NA CARTILAGEM ARTICULAR

No exame macroscópico artroscópico inicial (T-0), das 16 articulações avaliadas, pertencentes aos quatro grupos, nenhuma apresentou anormalidades na superfície articular durante o exame macroscópico inicial, confirmando a inclusão experimental e permitindo a realização dos defeitos condrais sem intercorrências. Em T-0, a lesão foi mensurada de forma satisfatória, com o auxílio da pinça tipo “*Ferris-Smith*”. A pinça “*Ferris-Smith*” apresentava, totalmente aberta, um centímetro de amplitude (Figura 09).

6.3. IMPLANTES

Em todas as articulações as lesões condrais apresentaram aspecto semelhante no trigésimo dia pós-indução (Figura 10). Não houve alteração na dimensão das lesões em nenhum grupo. Em 11 articulações (68,7%) foram observadas a presença de fibrilações e rachaduras na cartilagem articular que se originavam dos bordos das lesões. Nas cinco articulações restantes (31,3%) apenas foi observado irregularidade da superfície da cartilagem ao redor das lesões. Pôde ser notado em 14 articulações (87,5%) algum grau de sinovite, espessamento da cápsula articular e hiperemia da membrana sinovial.

A pressão média para a distensão da articulação femoropatelar dos animais, com CO₂, foi de 26 mmHg. As lesões condrais, no momento do tratamento, apresentaram uma película flutuante e pouco aderida sobre a região do defeito, aparentemente composta de fibrina. A película foi levemente

curetada em todos os grupos imediatamente antes da aplicação dos tratamentos propostos. A aplicação intralesional dos tratamentos foi realizada com o auxílio de agulha modelo Komiyashiki 11G (Figura 11). Em T-30 houve, em todos os animais, maior dor local e discreto acréscimo da claudicação até quatro dias após a intervenção cirúrgica quando comparado ao T-0. Oito articulações (50%), de G1 e G3, apresentaram severo edema local, até sete dias após o tratamento.

6.4. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Nenhum dos oito animais apresentou alterações nos valores plaquetários do sangue total. A média de plaquetas quantificadas no PRP foi de 362.350 plaquetas/ μL , o que representou uma taxa de enriquecimento plaquetário médio de 106,5% ou um aumento de duas vezes a concentração de plaquetas do sangue total para o PRP. Nenhum animal apresentou o número de plaquetas abaixo de 300.000 plaquetas/ μL . As quantificações plaquetárias estão descritas no Quadro 03.

A utilização de 5% de cloreto de cálcio a 10% e a utilização de um ativador de fibrina igualmente a 5% na amostra previamente separada para o tratamento, foi suficiente para a formação do gel de fibrina (Figuras 11). O tempo de espera médio para a formação do gel foi de 15 minutos. O PRP aplicado isoladamente ou aplicado com as CTM (G2 e G3) recebeu uma pequena quantidade (0,5 mL) de plasma pobre em plaquetas (PPP) já que este é rico em fibrinogênio e auxiliou na formação do gel.

Quadro 03: Contagem plaquetária no sangue total, concentração plaquetária no PRP, fator de multiplicação da concentração plaquetária (Aumento) e a taxa de enriquecimento plaquetário em porcentagem (Enriquecimento) de cada animal de G2 e G3.

Grupo	Animal	CP ST	CP PRP	Aumento	Enriquecimento
G2	3	142.000	360.000	2,53 (x)	153,00%
G2	4	162.000	412.000	2,54 (x)	154,00%
G3	5	202.000	310.575	1,53 (x)	53,75%
G3	6	222.000	366.825	1,65 (x)	65,23%
Média	-	182.000	362.350	2,00x	106,50%
DP	-	±36,51	±41,51	±0,54	±54,48

*G2 = Grupo 2;

*G3 = Grupo 3;

*Unidade da contagem plaquetária = plaquetas/ μ L;

*CP ST = Contagem plaquetária no sangue total;

*CP PRP = Concentração plaquetária no PRP;

*Os valores estão seguidos de descrição da média e desvio padrão (DP).

6.5. CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Foram coletados em média 1,5 gramas de tecido adiposo para cada animal de G1 e G3. Após a cirurgia para coleta de tecido adiposo, dois animais (50%) apresentaram deiscência dos pontos seis dias após o procedimento, com discretos sinais de infecção. A ferida desses animais foi tratada por segunda intenção até a cicatrização completa.

A média de células mononucleares iniciais, obtidas logo após o processamento do tecido adiposo, foi de $30,7 \times 10^4$ células/mL. Essas células apresentaram em média uma viabilidade de 76,98%. Já as células implantadas após o cultivo, ou seja, as CTM apresentaram média de 73,9% de viabilidade celular imediatamente antes da aplicação do tratamento. Foram aplicadas em média $1,14 \times 10^7$ células tronco/mL por articulação nas lesões dos grupos 1 e 3 (Quadro 04).

As CTM de todos os animais apresentaram média de marcação para CD13 e CD45 de 1,94% e 2,56% respectivamente sendo consideradas negativas. Para CD90 e para CD44 a média de marcação das células foi de 94,35% e de 61,40% respectivamente, apresentando-se como marcações

positivas. Esses valores estão descritos no Quadro 05. Não se observou reações indesejáveis ou marcações inespecíficas na citometria das células tronco.

Quadro 04: Quantidade de tecido adiposo coletado por animal, número de células mononucleares inicialmente cultivadas, viabilidade celular inicial (%), número de células aplicadas em cada lesão, viabilidade celular no momento da aplicação (%) e o número de passagens realizadas para cada animal de G1 e G3.

Grupo	Animal	Peso	Nº céls. mononucleares (céls/mL)	Viabil. celular inicial	Nº céls. aplicadas (céls/mL)	Viabil. celular final	Passagens
G1	1	1,05 g	22×10^4	68,75%	$1,64 \times 10^7$	75%	3,0
G1	2	0,88 g	57×10^4	68,67%	$1,05 \times 10^7$	81%	4,0
G3	5	1,10 g	29×10^4	80,50%	$1,01 \times 10^7$	42%	4,0
G3	6	3,00 g	15×10^4	90,00%	$0,86 \times 10^7$	98%	3,0

*G1 = Grupo 1;

*G3 = Grupo 3;

*O peso está em gramas (g);

*Unidade do número de células = células/mL;

*Passagens = número de vezes que a placa de cultura atingiu confluência máxima

Quadro 05: Resultados observados após a caracterização das CTM em G1 e G3

Grupo	Animal	CD 13	CD 90	CD 44	CD 45
G1	1	3,16%	98,98%	43,47%	0,45%
G1	2	0	98,00%	93,00%	0
G3	5	1,86%	90,00%	84,66%	2,89%
G3	6	2,72%	90,40%	24,45%	6,90%
Média	-	1,94%	94,35%	61,40%	2,56%
DP	-	$\pm 0,012$	$\pm 0,048$	$\pm 0,280$	$\pm 0,030$

*G1 = Grupo 1;

*G3 = Grupo 3;

*CD = “*Cluster Designation*” ou denominação de grupamento.

*Valores acima de 30% são consideradas marcações positivas.

*Os valores estão seguidos de descrição da média e desvio padrão (DP).

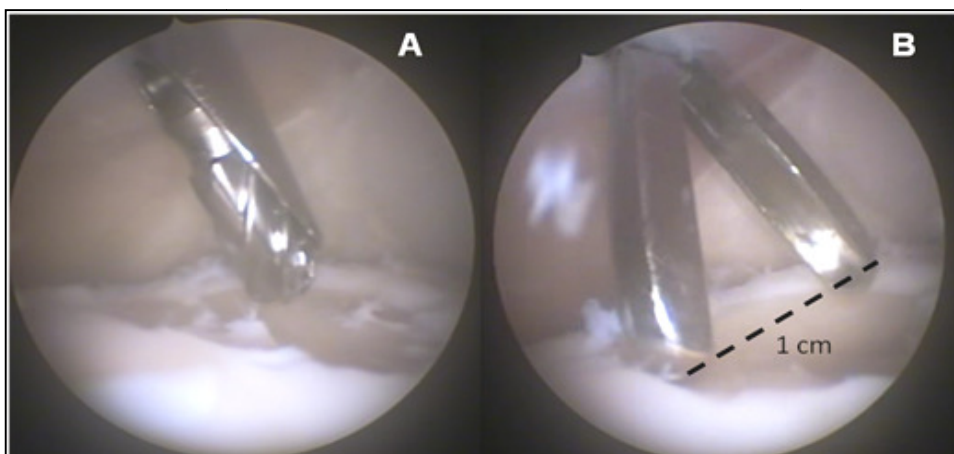


Figura: 09: Imagem artroscópica da indução da lesão em T-0. Utilização da broca na destruição da cartilagem articular (A). Medição do diâmetro da lesão em T-0. A pinça “Ferris-Smith” possui 1 cm de amplitude de abertura máxima (B)

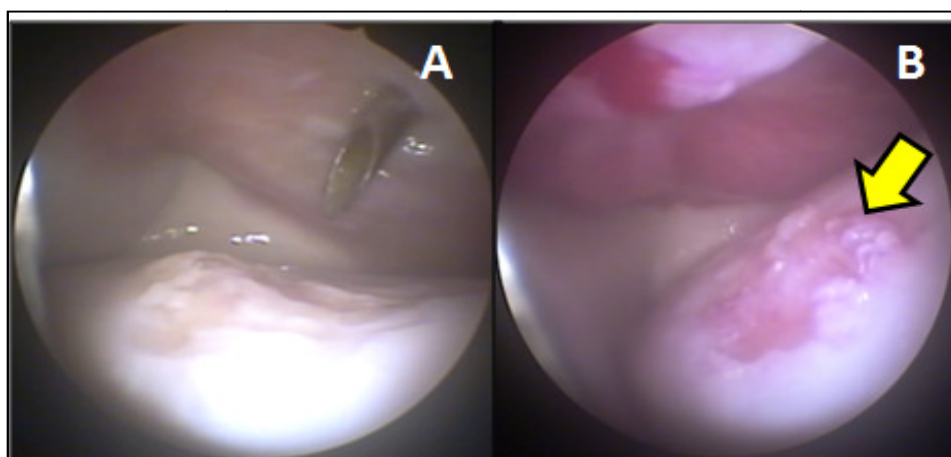


Figura: 10: Imagem artroscópica da lesão condral em T-30 antes da aplicação do tratamento (A). Observa-se a irregularidade da superfície da cartilagem ao redor da lesão (seta) e sinovite (B).

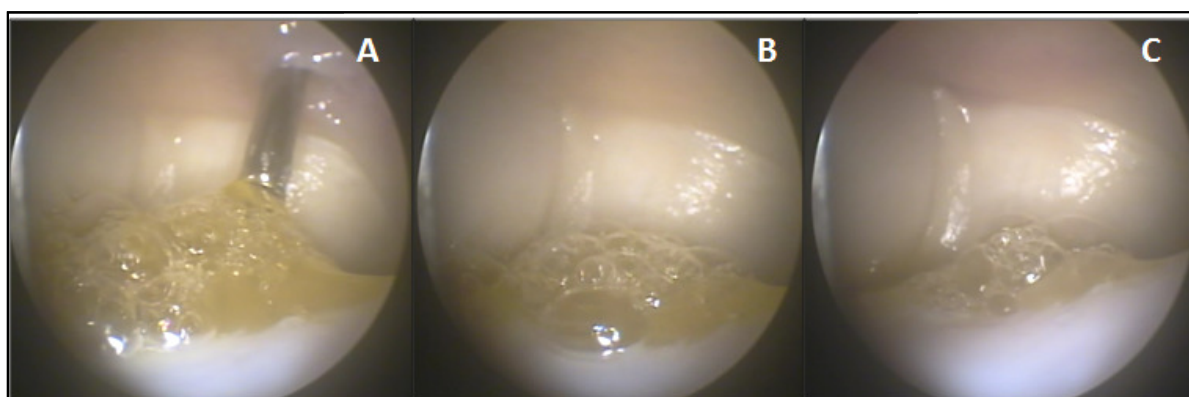


Figura 11: Imagem artroscópica da lesão condral em T-30. Aplicação do tratamento no local da lesão no G1 (A). Período de secagem do tratamento no G2 (B) e no G3 (C).

6.6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

6.6.1. Exame clínico

Os escores de claudicação seguem dispostos na Tabela 01. Os escores de claudicação após os testes de flexão forçada da articulação femorotibiopatelar seguem organizados na Tabela 02. Nos exames de claudicação, foi observado nos animais 1 e 2, do G1; no animal 4 do G2 e no animal 8, do G4 (50%) abdução dos membros pélvicos no decorrer dos exames de claudicação, principalmente da região da articulação femorotibiopatelar. Todos os grupos apresentaram aumento da claudicação após a flexão forçada. Após a flexão, o G2 apresentou menores escores de claudicação quando comparado aos outros grupos ($P < 0,05$) (Tabela 01 e 02).

Na inspeção das articulações foram observados, após a intervenção cirúrgica em T-0 e T-150, sinais inflamatórios leves, como discreto aumento de volume local e leve efusão sinovial para todos os grupos. Nesses momentos também foi notado leve dor a palpação e discreto aumento de temperatura local. Em T-30 pôde-se observar, em todos os grupos, sinais inflamatórios moderados, maior efusão sinovial, dor severa à palpação e significativo aumento de temperatura local quando comparadas as cirurgias realizadas em T-0 e T-150. Tais sinais inflamatórios apresentavam evolução remissiva até o quarto ou quinto dia após a cirurgia em T-30. Em nenhum dos animais foram observados sinais de infecção local.

Tabela 01: Mediana dos escores de claudicação e valores de p dos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									p
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	0,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,5	1,5	1,5	0,008
	± 0	$\pm 1,1$	± 0	± 0	± 0	± 0	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aab	Aa	Aa	
G2	0,0	0,5	0,5	2,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<0,001
	± 0	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Ab	Ab	Ab	Ab	
G3	0,0	0,5	0,5	2,0	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,003
	± 0	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	± 0	± 0	± 0	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	
	Ba	ABa	ABa	Aa	ABa	ABab	ABab	ABab	ABab	
G4	0,0	1,0	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	1,0	0,5	<0,001
	± 0	± 0	$\pm 0,5$	$\pm 0,9$	± 0	± 0	± 0	± 0	$\pm 0,5$	
	Ba	ABa	ABa	ABa	Aa	Aa	Aa	ABab	ABab	
p	1,000	0,565	0,019	0,094	0,002	0,002	0,006	0,007	0,023	

*Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

*Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Resumo descritivo das medianas seguidas pelo desvio padrão ($\pm$).

Tabela 02: Mediana dos escores de claudicação e valores de p dos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento, após a flexão forçada da articulação femoropatelar.

GRUPO	TEMPO									p
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	0,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,0	2,0	2,0	0,012
	± 0	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	± 0	± 0	± 0	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
G2	0,0	1,0	1,0	2,5	1,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,045
	± 0	$\pm 1,1$	$\pm 1,1$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	
	Ba	ABa	ABa	Aa	ABb	ABb	ABa	ABb	ABb	
G3	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,006
	± 0	± 0	± 0	± 0	$\pm 0,5$	$\pm 0,8$	$\pm 0,9$	$\pm 0,9$	$\pm 0,9$	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aab	Aab	Aa	Aab	Aab	
G4	0,0	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	<0,001
	± 0	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,8$	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	
	Ba	ABa	ABa	ABa	Aab	Aab	Aa	ABab	ABab	
p	1,000	0,046	0,071	0,392	0,010	0,010	0,012	0,021	0,021	

*Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

*Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Resumo descritivo das medianas seguidas pelo desvio padrão ($\pm$).

6.6.2. Exame físico, químico e citológico do líquido sinovial

No exame físico do líquido sinovial, nas 16 articulações avaliadas, os parâmetros avaliados como coloração e aspecto apresentaram-se dentro dos padrões normais para a espécie em todos os momentos analisados. O líquido sinovial coletado apresentou variações entre as colorações amarela, alaranjada e avermelhada. Nas coletas de líquido sinovial dos quatro grupos houve resultado improdutivo (sem obtenção de amostras) em 14 articulações (9,72%) e impossibilidade do exame do líquido devido a baixo volume em 17 amostras (11,8%) no decorrer de todo o período experimental.

O aspecto do líquido sinovial variou entre discretamente turvo e límpido. Observou-se a coagulação nas amostras de líquido sinovial em G1 e G3 em T-45, T-75 e T-90. As amostras de líquido sinovial que sofreram coagulação total não foram submetidas ao exame citológico, sendo uma nova amostra coletada permitindo o exame completo do líquido sinovial. Ambos os membros pélvicos dos animais 2 (50% de G1), 3 e 4 (100% de G2), 6 (50% de G3) e o membro pélvico direito do animal 5 (25 % de G3), ou seja 56,25% considerando o total dos grupos (n=16), apresentaram a formação de pequenos grumos esbranquiçados, que não interferiram no processamento laboratorial. Nenhuma punção sinovial do grupo controle (G4) apresentou coagulação ou grumos suspensos no líquido sinovial. Os resultados das densidades encontradas nas análises do líquido sinovial encontram-se dispostos na Tabela 03.

No exame químico não foi observada diferença significativa para a concentração de glicose entre todos os momentos analisados e na comparação dos grupos. A concentração de glicose apresentou-se em todos os momentos e para todos os grupos, dentro dos valores esperado para a espécie. A qualidade da mucina e a viscosidade relativa mantiveram-se como “*ótimas*” ou “*boas*”. Uma discreta perda da viscosidade relativa e da qualidade da mucina, classificadas então como “*boa*”, foi principalmente observada nos momentos entre T-15 e T-45.

Para a proteína, quando foram comparados os tratamentos em cada tempo, não se observou diferença estatística significativa ($P>0,05$), quando foram comparados os tempos em cada tratamento foi observada diferença estatística significativa entre esses tempos em todos os tratamentos, porém

não se detectou essa diferença pelo Teste de Tukey ($P>0,05$). A concentração de proteína no líquido sinovial foi visivelmente maior nos momentos T-15 e T-45 para todos os grupos (Tabela 04). Para o item fibrinogênio, quando comparado os tratamentos em cada tempo e os tempos em cada tratamento, não se observou diferença estatística significativa ($P>0,05$), porém, as concentrações foram igualmente elevadas em T-15 e T-45 (Tabela 05).

No exame citológico foram observadas as variações apresentadas nas Tabelas 06, 07, 08 e 09. As maiores médias da contagem global de células nucleadas foram observadas em todos os grupos nos momentos T-15 e T-45. O G1 apresentou menor contagem total de células nucleadas quando comparado aos outros grupos, porém não houve diferença estatística entre os grupos, apenas entre os tempos analisados, sendo as maiores contagens observadas em T-15 e T-45 (Tabela 10). Nas Tabelas 8, 9, 10 e 11 os espaços sem preenchimento numérico correspondem a não realização da contagem celular por baixo volume de líquido sinovial, formação de coágulo ou inviabilidade celular.

Os valores relativos encontrados na contagem diferencial de células do líquido sinovial estão dispostos nas Figuras 12, 13, 14 e 15 e nas Tabelas 11, 12 e 13. No G1, 100% das articulações em T-45 e T-60, 50% das articulações em T-75 e 25% das articulações em T-90 e T-150 apresentaram hemossiderina e outros tipos celulares, como eosinófilos e macrófagos. G2 apresentou eosinófilos, macrófagos e hemossiderina em 50% das articulações em T-15 e T-75, em 100% das articulações em T-45 e em 25% das articulações em T-120. Em G3 houve presença de outros tipos celulares e hemossiderina em 50% das articulações em T-15, T-60, T-75 e T-90, em 100% das articulações em T-45 e 25% das articulações em T-150. G4 apresentou hemossiderina nas articulações principalmente nos momentos após as intervenções cirúrgicas.

Na quantificação de células mononucleares houve diferença estatística entre os tratamentos realizados ($P=0,008$), e entre os tempos analisados ($P<0,001$). Antes do tratamento, em T-30, houve maior contagem de mononucleares quando comparado aos momentos após T-45 (Tabela 11). G1 apresentou diferença estatística da contagem de células mononucleares quando comparado ao G4, esse último apresentou uma contagem de mononucleares sempre abaixo do padrão esperado ($> 90\%$). Na comparação

entre os grupos, o G4 apresentou uma contagem mais alta de neutrófilos em todos os momentos analisados, quando comparado ao restante dos grupos. Os neutrófilos também foram estatisticamente menores em G2 ($P < 0,001$) (Tabela 13).

Tabela 03: Média da densidade do líquido sinovial no grupos 1, 2, 3 e 4 durante os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	1016,0	1019,0	1016,0	1018,0	1014,0	1018,0	1017,0	1017,0	1016,0	1016,8 _a
G2	1015,0	1017,0	1016,0	1017,0	1019,0	1018,0	1016,5	1017,5	1019,0	1017,2 _{ab}
G3	1017,0	1019,0	1017,0	1021,0	1015,0	1020,0	1019,5	1019,5	1017,5	1018,4 _b
G4	1012,5	1016,0	1015,5	1014,5	1015,0	1015,0	1018,0	1017,5	1019,0	1015,9 _a
Média	1015,1	1017,8	1016,1	1017,6	1015,8	1017,8	1017,8	1017,9	1017,9	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA).

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Resumo descritivo das médias.

*p tratamento = 0,001; p tempo = 0,08; p interação tratamento x tempo = 0,168.

Tabela 04: Mediana dos escores de proteína do líquido sinovial e valores de p nos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									p
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	1,5	3,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	<0,001
G2	2,0	3,0	2,0	3,0	3,0	2,5	3,0	3,0	3,0	0,002
G3	1,5	3,0	2,0	3,0	2,5	2,5	2,5	3,0	3,0	0,006
G4	1,0	3,0	1,0	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	<0,001
p	0,210	1,000	0,008	0,093	0,335	0,172	0,238	0,392	0,542	

*Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

*Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Resumo descritivo das medianas.

*Não houve diferença estatística.

Tabela 05: Mediana dos escores de fibrinogênio do líquido sinovial e valores de *p* nos grupos 1, 2, 3 e 4, durante os tempos do experimento

GRUPO	TEMPO									<i>p</i>
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,083
G2	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,5	0,0	0,5	0,430
G3	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	1,5	0,5	0,5	1,0	0,263
G4	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,5	0,052
<i>p</i>	1,000	0,432	1,000	0,820	1,000	0,412	0,210	0,893	0,252	

*Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

*Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Resumo descritivo das medianas

*Não houve diferença estatística

Tabela 06: Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial do grupo 1, animais 1 e 2, em todos os tempos do experimento.

em todos os tempos de experimento.

GRUPO 1	Céls Nucleadas		Céls. Nucleadas		MÉDIA	DP
	Animal 1		Animal 2			
	MPE	MPD	MPE	MPD		
T0	50	50	70	70	60,00	±11,54
T15	500	578	506	689	568,25	±87,95
T30	278	281	133	187	219,75	±72,44
T45	520	700	467	513	550,00	±102,70
T60	475	250	165	-	296,67	±160,20
T75	-	330	177	140	215,67	±108,19
T90	220	360	135	145	215,00	±103,80
T120	210	150	210	190	190,00	±28,28
T150	500	-	100	123	241,00	±224,60

*Valores em células/ μ L, realizados nas articulações de G1, seguidos da média e desvio padrão (DP), nos momentos de T-0 a T-150.

*MPE = Membro Pélvico Esquerdo. MPD = Membro Pélvico Direito.

Tabela 07: Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial do grupo 2, animais 3 e 4, em todos os tempos do experimento.

em todos os tempos do experimento.

GRUPO 2	Céls Nucleadas		Céls. Nucleadas		MÉDIA	DP
	Animal 3		Animal 4			
	MPE	MPD	MPE	MPD		
T0	220	220	150	150	185,00	±40,41
T15	800	835	700	740	768,75	±60,32
T30	100	170	230	316	204,00	±91,63
T45	220	940	635	705	625,00	±299,80
T60	770	300	650	330	512,50	±233,50
T75	-	45	-	410	227,50	±258,10
T90	90	245	625	1033	498,25	±421,40
T120	210	290	500	440	360,00	±133,40
T150	320	320	480	340	365,00	±77,24

*Valores em células/μL, realizados nas articulações de G2, seguidos da média e desvio padrão (DP), nos momentos de T-0 a T-150.

*MPE = Membro Pélvico Esquerdo. MPD = Membro Pélvico Direito.

Tabela 08: Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial do grupo 3, animais 5 e 6, em todos os tempos do experimento.

em todos os tempos de experimento.						
GRUPO 3	Céls Nucleadas		Céls. Nucleadas		MÉDIA	DP
	Animal 5		Animal 6			
	MPE	MPD	MPE	MPD		
T0	60	60	35	35	47,50	±14,43
T15	600	850	453	662	641,25	±164,40
T30	100	215	50	75	110,00	±72,91
T45	1035	-	360	310	568,33	±404,90
T60	262	257	510	390	354,75	±120,40
T75	-	275	335	-	305,00	±42,42
T90	-	350	540	600	496,67	±130,50
T120	410	230	500	500	410,00	±127,20
T150	510	500	270	540	455,00	±124,40

*Valores em células/μL, realizados nas articulações de G3, seguidos da média e desvio padrão (DP), nos momentos de T-0 a T-150.

*MPE = Membro Pélvico Esquerdo. MPD = Membro Pélvico Direito.

Tabela 09: Contagem total de células nucleadas no líquido sinovial do grupo 4, animais 7 e 8, em todos os tempos do experimento.

GRUPO 4	Céls Nucleadas Animal 7		Céls. Nucleadas Animal 8		MÉDIA	DP
	MPE	MPD	MPE	MPD		
T0	50	50	90	90	70,00	±23,09
T15	1250	1100	560	600	877,50	±349,30
T30	100	-	230	315	215,00	±108,28
T45	-	940	560	700	733,33	±192,18
T60	215	105	170	116	151,50	±50,98
T75	200	250	60	75	146,25	±93,39
T90	240	160	100	658	289,50	±252,20
T120	60	1500	-	180	580,00	±799,00
T150	-	260	440	-	350,00	±127,27

*Valores em células/μL, realizados nas articulações de G4, seguidos da média e desvio padrão (DP), nos momentos de T-0 a T-150.

*MPE = Membro Pélvico Esquerdo. MPD = Membro Pélvico Direito.

Tabela 10: Média da contagem total de células nucleadas no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4, em todos os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	60,0	568,2	219,8	550,0	222,5	161,8	215,0	190,0	180,8	263,1
G2	185,0	768,8	204,0	625,0	512,5	113,8	498,2	360,0	365,0	403,6
G3	47,5	641,2	110,0	426,2	354,8	152,5	372,5	410,0	455,0	330,0
G4	70,0	877,5	161,2	550,0	151,5	146,2	289,5	685,0	175,0	345,1
Média	90,6 D	713,9 A	173,8 CD	537,8 AB	310,3 BCD	143,6 CD	343,8 BCD	411,2 ABC	293,9 BCD	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA).

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Resumo descritivo das médias (células/μL).

*p tratamento = 0,208; p tempo <0,001; p interação tratamento x tempo = 0,873.

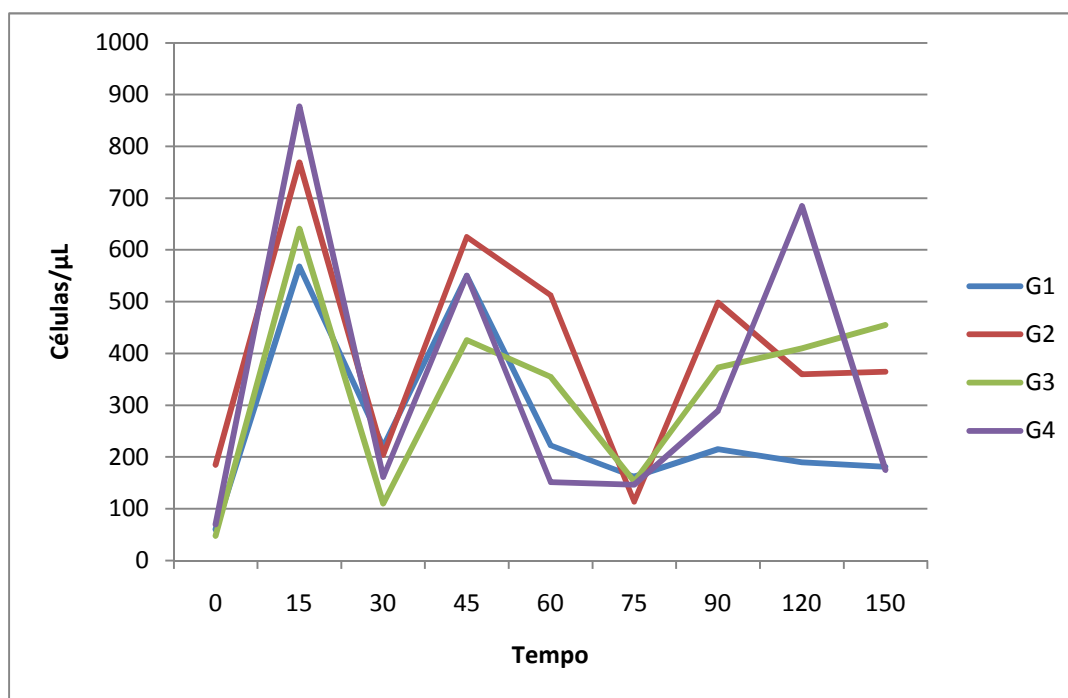


Figura 12: Valores médios da contagem global de células nucleadas realizada no líquido sinovial, durante os momentos analisados e nos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4).

Tabela 11: Média relativa de células mononucleares, em porcentagem, no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4, em todos os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	98,0 ±0	96,5 ±1,7	96,5 ±1,7	93,2 ±3,9	62,0 ±41,4	68,0 ±45,7	74,0 ±13,9	81,0 ±13,1	61,0 ±42,1	81,1 a
G2	91,2 ±6,2	91,2 ±4,7	93,5 ±1,7	53,8 ±35,4	83,5 ±3,3	46,8 ±53,9	76,2 ±21,3	84,0 ±12,1	45,5 ±52,1	73,9 ab
G3	84,2 ±14,7	75,5 ±4,1	90,0 ±0	62,8 ±42,6	87,5 ±6,4	35,0 ±43,0	24,8 ±21,0	71,5 ±8,5	86,8 ±11,4	68,7 ab
G4	78,0 ±8,0	66,5 ±7,5	59,2 ±39,8	64,0 ±43,0	81,0 ±15,0	58,8 ±29,8	54,5 ±44,2	46,8 ±37,4	21,8 ±31,1	58,9 b
Média	87,9 A	82,4 AB	84,8 A	68,4 AB	78,5 AB	52,1 B	57,4 AB	70,8 AB	53,8 B	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA).

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Valores em porcentagem

*Resumo descritivo das médias seguidas pelo desvio padrão ($\pm$).

*p tratamento = 0,008; p tempo <0,001; p interação tratamento x tempo = 0,163.

Tabela 12: Média relativa de linfócitos, em porcentagem, no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4, em todos os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	2,0	3,5	3,5	3,8	3,8	5,8	22,0	17,0	12,8	8,2
	±0	±1,7	±1,7	±4,1	±3,8	±6,5	±11,7	±14,2	±13,1	
	Aa	Aa	Aa	Ab	Aa	Aab	Aab	Aa	Aa	
G2	7,0	6,2	6,5	45,8	13,5	2,2	23,0	13,5	3,2	13,4
	±2,5	±2,5	±1,7	±35,7	±2,5	±2,8	±20,4	±14,5	±4,7	
	Ba	Ba	Ba	Aa	Ba	Bb	Aab	Ba	Ba	
G3	9,5	13,2	9,8	9,0	10,2	13,8	38,2	27,2	7,8	15,4
	±7,5	±4,3	±0,5	±7,0	±20,0	±28,8	±2,3	±9,4	±5,1	
	Aa	Aa	Aa	Ab	Aa	Aab	Aa	Aa	Aa	
G4	14,2	19,5	10,8	8,5	16,0	30,8	3,5	17,2	27,0	16,4
	±3,7	±6,4	±7,5	±5,6	±13,8	±31,4	±2,3	±16,2	±37,2	
	Aa	Aa	Aa	Ab	Aa	Aa	Ab	Aa	Aa	
Média	8,2	10,6	7,6	16,8	10,9	13,1	21,7	18,8	12,7	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA).

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Valores em porcentagem

*Resumo descritivo das médias seguidas pelo desvio padrão ($\pm$).

*p tratamento = 0,070; p tempo = 0,073; p interação tratamento x tempo = 0,003.

Tabela 13: Média relativa de neutrófilos, em porcentagem, no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4 em todos os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	0,0	0,0	0,0	3,0	9,2	0,8	3,0	2,0	1,2	2,1
	±0	±0	±0	±4,2	±8,4	±1,5	±2,5	±4,0	±1,5	
	Ab	Ac	Aa	Aa	Aa	Aa	Aab	Aa	Aa	
G2	1,8	2,5	0,0	0,5	3,0	0,0	0,5	1,5	1,2	1,2
	±3,5	±3,8	±0	±1,0	±0,8	±0	±1,0	±3,0	±1,5	
	Aab	Abc	Aa	Aa	Aa	Aa	Ab	Aa	Aa	
G3	6,2	11,2	0,2	3,2	2,2	4,0	10,5	1,2	5,0	4,9
	±7,3	±0,5	±0,5	±4,2	±0,9	±7,3	±9,5	±1,5	±5,3	
	Aab	Aab	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
G4	10,0	14,0	5,0	2,5	3,0	7,8	3,8	10,0	1,2	6,4
	±0,8	±13,8	±4,5	±5,0	±1,15	±2,2	±2,9	±16,8	±2,5	
	ABa	Aa	ABa	Ba	ABa	ABa	ABab	ABa	Ba	
Média	4,5	6,9	1,3	2,3	4,4	3,1	4,4	3,7	2,2	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA).

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Valores em porcentagem

*Resumo descritivo das médias seguidas pelo desvio padrão ($\pm$).

*p tratamento < 0,001; p tempo = 0,106; p interação tratamento x tempo = 0,049.

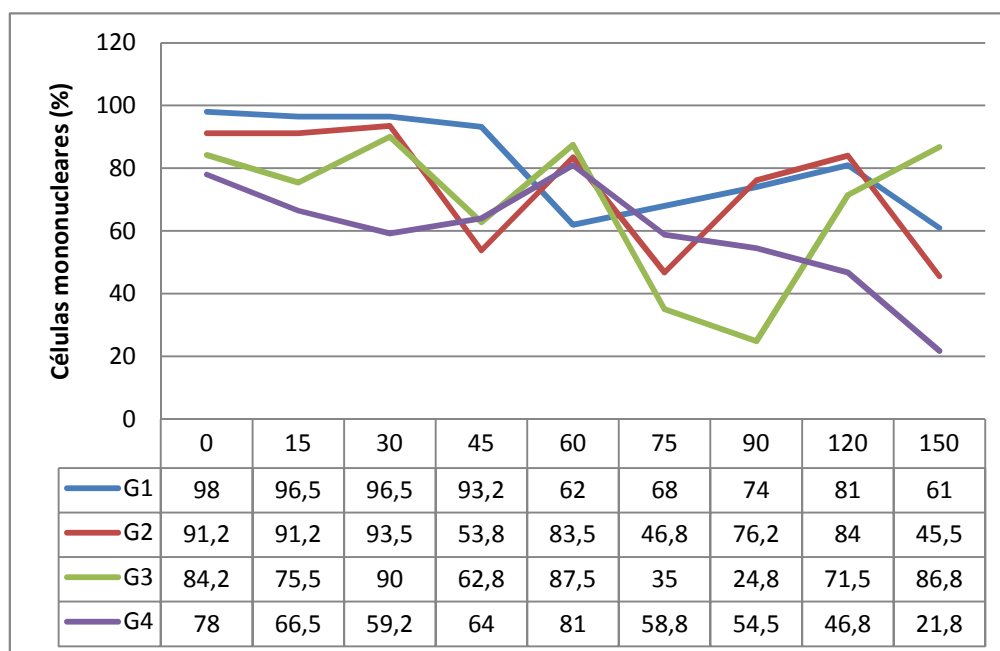


Figura 13: Valores percentuais médios na citologia diferencial das células mononucleares realizada no líquido sinovial durante os momentos analisados e nos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4)

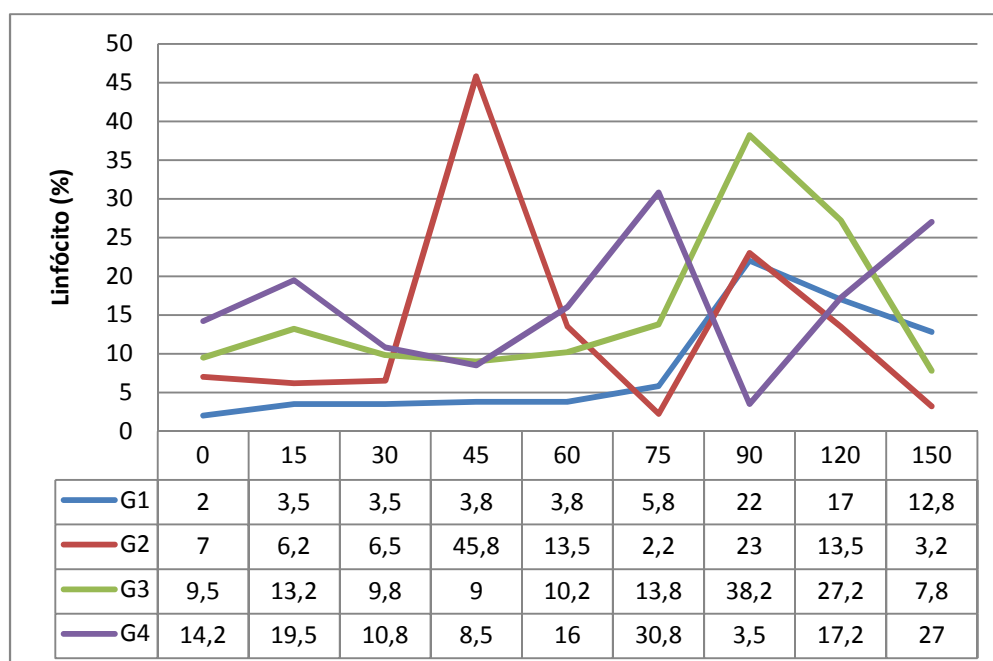


Figura 14: Valores percentuais médios na citologia diferencial dos linfócitos realizada no líquido sinovial durante os momentos analisados e nos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4).

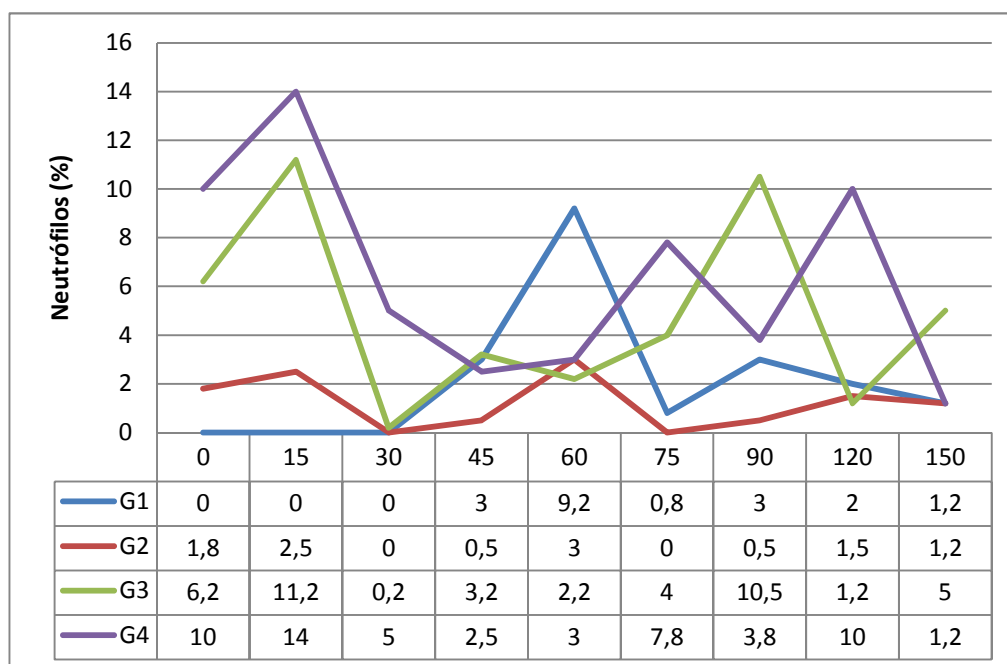


Figura 15: Valores percentuais médios na citologia diferencial dos neutrófilos realizada no líquido sinovial durante os momentos analisados e nos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4)

6.6.3. Análise da PGE₂ no líquido sinovial

Na quantificação de prostaglandina, houve diferença estatística entre os grupos e entre os tempos de análise durante o experimento ($P < 0,001$). O G1 e o G4 apresentaram os menores valores de PGE₂ e o G2 os maiores. Nos quatro grupos experimentais, houve um padrão de acréscimo da concentração de PGE₂ em T-15, T-45 e T-90, atingindo valores superiores a 1500 pg/mL ($P = 0,049$) (Tabela 14). Todos os grupos apresentaram valores mais baixos de PGE₂ no líquido sinovial em T-0, T-15 e T-30, nesses momentos a concentração de PGE₂ não ultrapassou em nenhum grupo 700 pg/mL (Figuras 16, 17, 18 e 19).

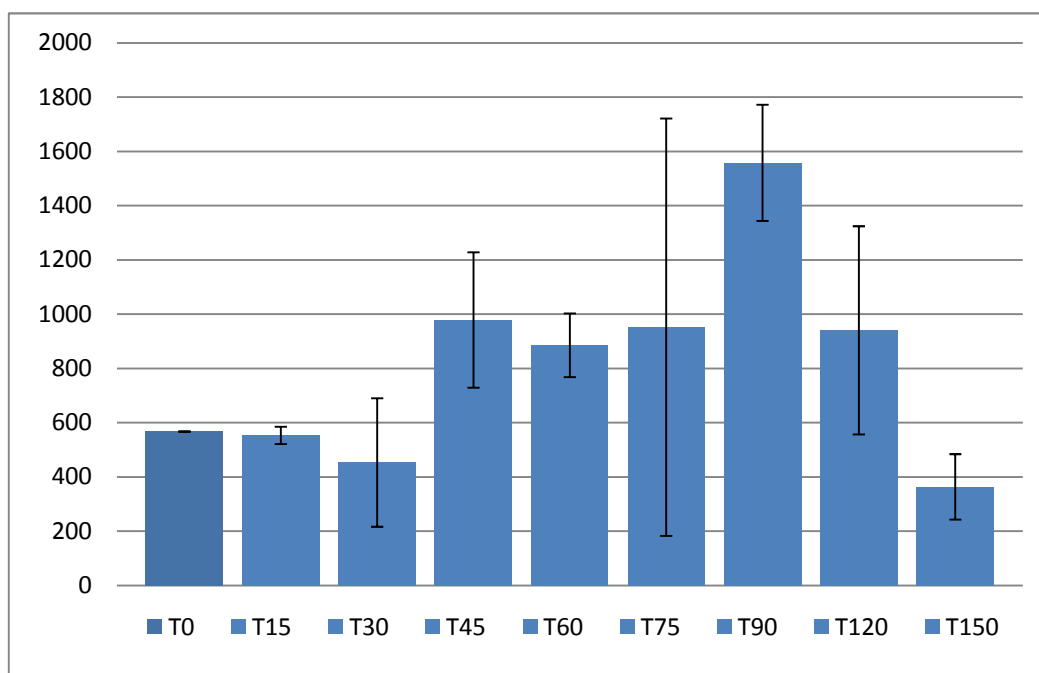


Figura 16: Concentração de PGE_2 de G1. Valores em picograma por mililitro (pg/mL). Momentos de T-0 a T-150. Resumo descritivo em média e desvio padrão de G1.

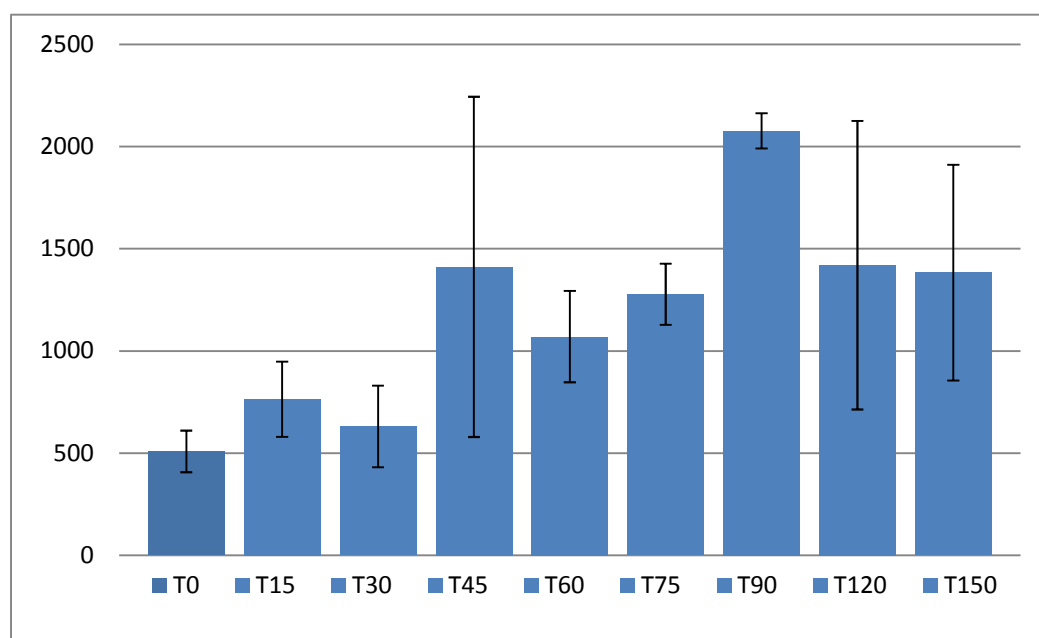


Figura 17: Concentração de PGE_2 de G2. Valores em picograma por mililitro (pg/mL). Momentos de T-0 a T-150. Resumo descritivo em média e desvio padrão de G2.

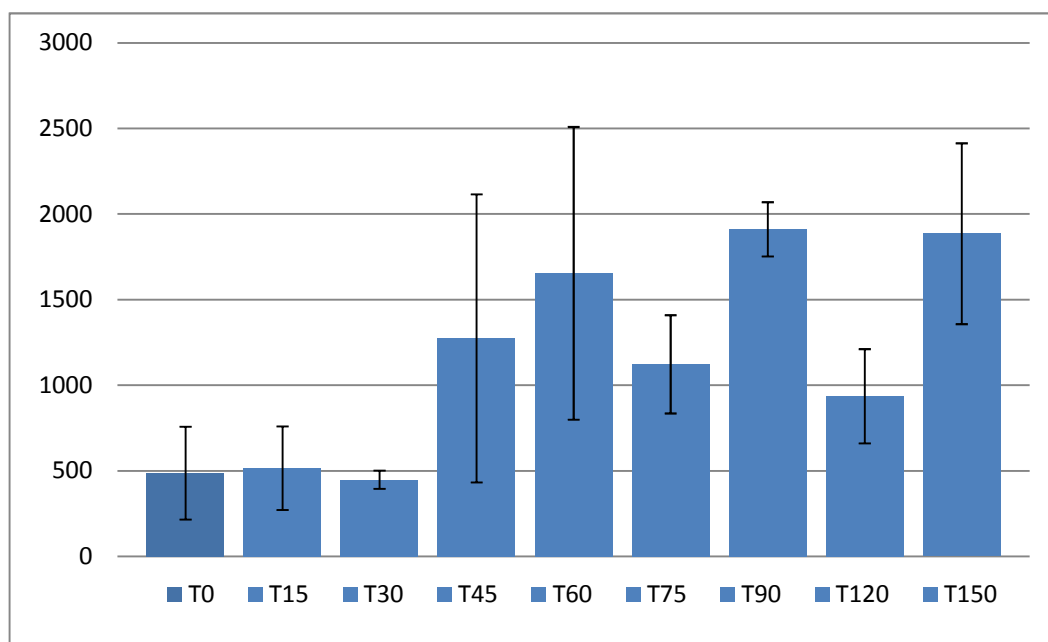


Figura 18: Concentração de PGE₂ de G3. Valores em picograma por mililitro (pg/mL). Momentos de T-0 a T-150. Resumo descritivo em média e desvio padrão de G3.

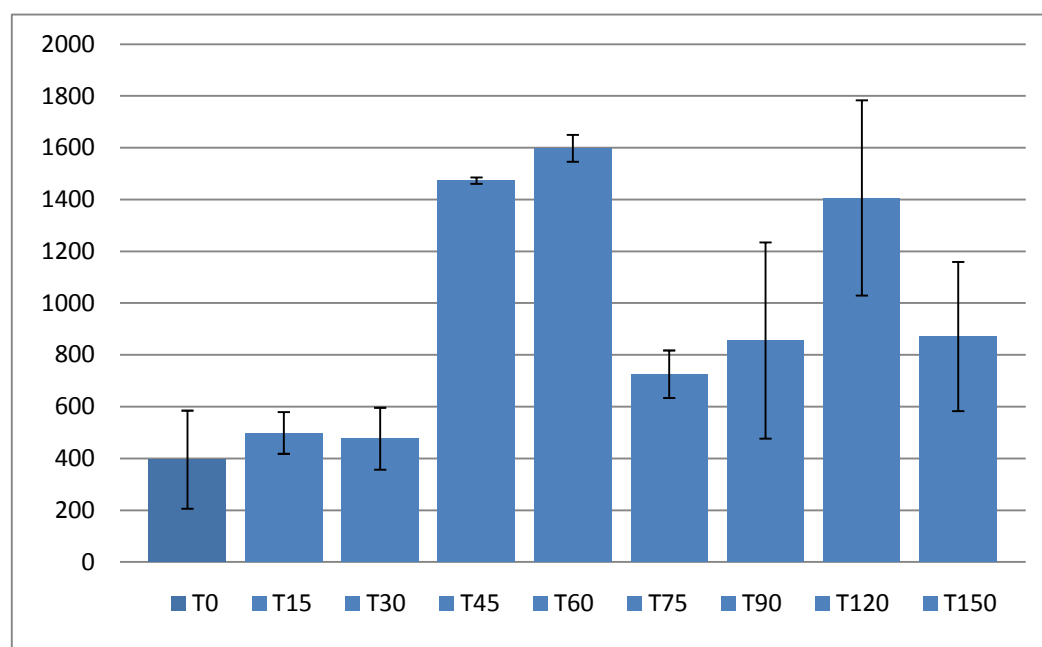


Figura 19: Concentração de PGE₂ de G4. Valores em picograma por mililitro (pg/mL). Momentos de T-0 a T-150. Resumo descritivo em média e desvio padrão de G4.

Tabela 14: Média da concentração de PGE₂ no líquido sinovial dos grupos 1, 2, 3 e 4 em todos os momentos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	568,0	553,8	453,9	979,0	558,9	952,6	1558,3	940,8	364,2	806,3_b
G2	508,3	764,0	630,2	1411,1	1070,2	1277,2	2076,5	1419,2	1382,7	1171,0_a
G3	487,9	516,4	448,9	1274,9	1654,5	1123,0	1911,9	936,3	1885,8	1137,7_a
G4	395,2	498,6	476,0	1472,7	1597,7	725,3	855,2	1405,9	870,9	921,9_{ab}
Média	489,9_C	583,2_{BC}	502,2_C	1284,4_A	1302,1_A	1019,5_{ABC}	1600,5_A	1175,6_{AB}	1125,9_{AB}	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA).

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p>0,05).

*Valores em picogramas por mililitro

*Resumo descritivo das médias

*p tratamento=0,013; p tempo<0,001; p interação tratamento x tempo = 0,127.

6.7. ANÁLISE MACROSCÓPICA DA CARTILAGEM ARTICULAR

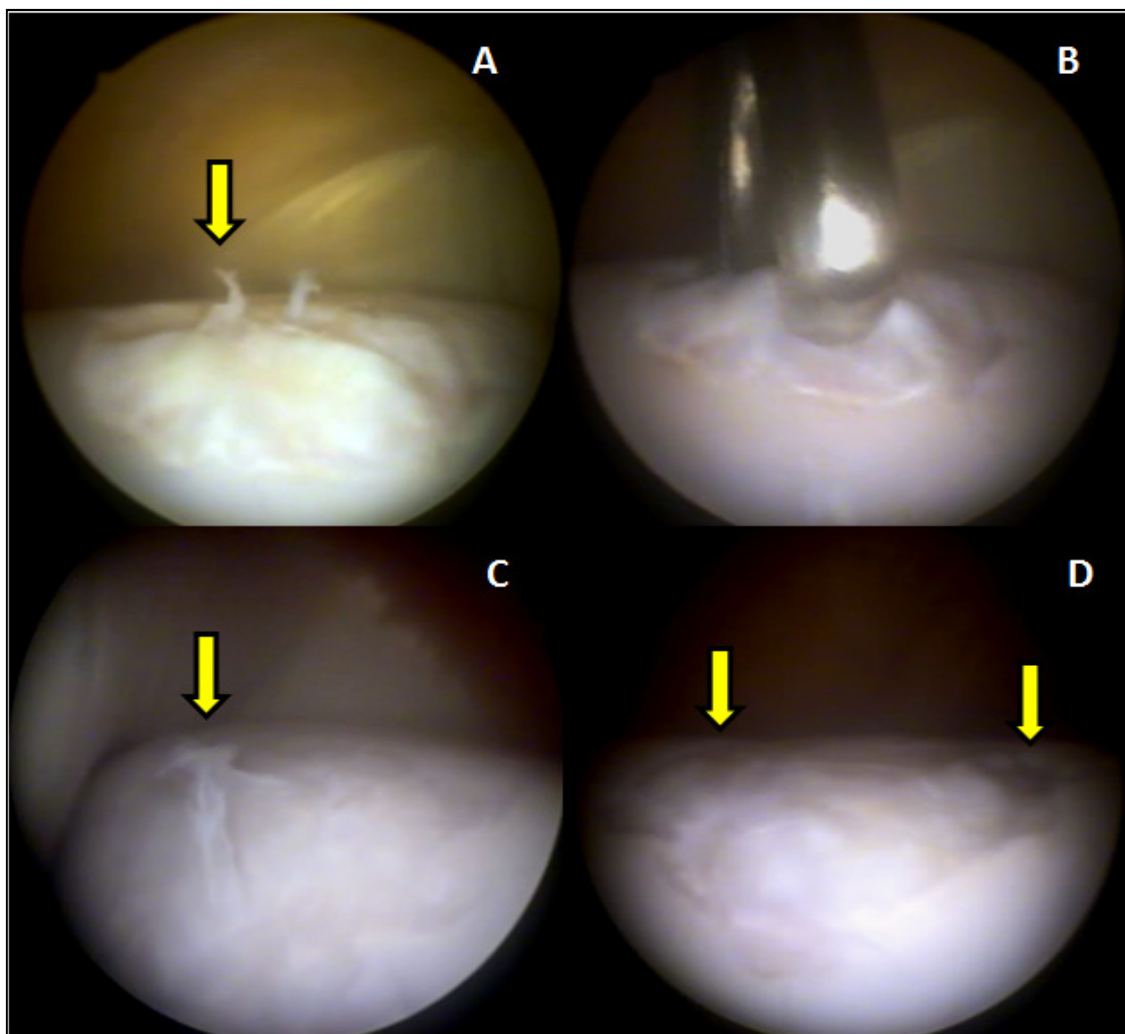
No 150º dia após a indução das lesões foi observada sinovite em 10 articulações (62,5%), irregularidades ao redor da lesão em 11 articulações (68,75%) e fibrilações também em 10 articulações (62,5%), dos quatro grupos experimentais. Erosões da superfície condral foram constatadas nas quatro articulações (25% do número total de articulações) de G4. As características observadas em cada articulação seguem organizadas nos Quadros 06 e 07. Algumas articulações, conforme demonstrados no Quadro 06 apresentaram proliferações do tecido cicatricial, que se direcionavam para a cavidade articular.

Quadro 06: Características observadas no exame macroscópico da cartilagem articular em T-150, para todos os grupos

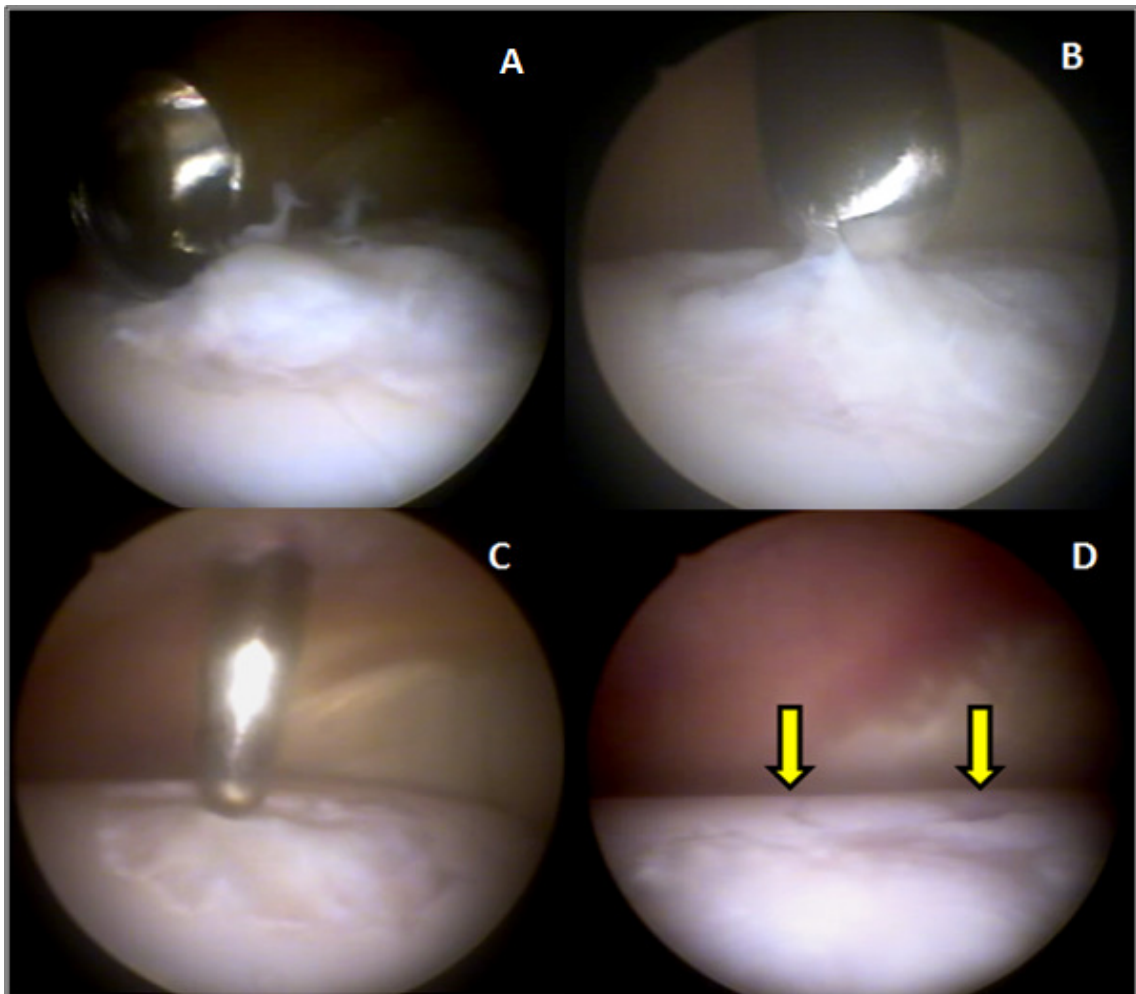
			Preenchimento da lesão	Proliferações	Aderência às bordas	Aderência ao osso subcondral
G1 (Figura 20 e 21)	Animal 1	MPE	ótimo, lesão completamente preenchida	presentes, porém poucas	bem aderido	bem aderido
		MPD	ótimo, lesão completamente preenchida	presentes, porém poucas	bem aderido	bem aderido
		MPE	ótimo, lesão completamente preenchida	não apresentava	bem aderido	bem aderido
	Animal 2	MPD	preenchimento satisfatório, menor quantidade de tecido cicatricial, porém sem falhas	não apresentava	bem aderido	bem aderido
G2 (Figura 20 e 21)	Animal 3	MPE	ótimo, lesão completamente preenchida	não apresentava	bem aderido	bem aderido
		MPD	ótimo, lesão completamente preenchida	não apresentava	bem aderido	bem aderido
		MPE	preenchimento satisfatório, menor quantidade de tecido cicatricial, porém sem falhas	não apresentava	bem aderido	bem aderido
	Animal 4	MPD	preenchimento satisfatório, menor quantidade de tecido cicatricial, porém sem falhas	não apresentava	bem aderido	bem aderido
G3 (Figura 20 e 21)		MPE	preenchimento satisfatório, menor quantidade de tecido cicatricial, porém sem falhas	presentes	bem aderido	bem aderido
	Animal 5	MPD	preenchimento satisfatório, menor quantidade de tecido cicatricial, porém sem falhas	presentes	bem aderido	bem aderido
		MPE	preenchimento satisfatório, menor quantidade de tecido cicatricial, porém sem falhas	não apresentava	bem aderido	bem aderido
	Animal 6	MPD	preenchimento satisfatório, menor quantidade de tecido cicatricial, porém sem falhas	não apresentava	bem aderido	bem aderido
G4 (Figura 20 e 21)		MPE	ruim, foi observado o aumento do diâmetro das lesões em cerca de 15%, mensurado com pinça tipo "Ferris-Smith"	não apresentava	pouco aderido	bem aderido
	Animal 7	MPD	ruim, foi observado o aumento do diâmetro das lesões em cerca de 15%, mensurado com pinça tipo "Ferris-Smith"	não apresentava	pouco aderido	bem aderido
		MPE	ruim, foi observado o aumento do diâmetro das lesões em cerca de 15%, mensurado com pinça tipo "Ferris-Smith"	não apresentava	pouco aderido	bem aderido, porém o tecido cicatricial era mais frível
	Animal 8	MPD	ruim, foi observado o aumento do diâmetro das lesões em cerca de 15%, mensurado com pinça tipo "Ferris-Smith"	não apresentava	pouco aderido	bem aderido, porém o tecido cicatricial era mais frível

G= Grupo, MPE = Membro Pélvico Esquerdo, MPD = Membro Pélvico Direito

Quadro 07: Características observadas no exame macroscópico da cartilagem articular em T-150, para todos os grupos					
		Irregularidades	Fibrilações	Erosões	Sinovite
G1 (Figura 20 e 21)	Animal 1	MPE	não apresentava	não apresentava	leve hiperemia
		MPD	discretas ao redor da lesão	não apresentava	leve hiperemia
	Animal 2	MPE	não apresentava	não apresentava	não apresentava
		MPD	não apresentava	não apresentava	não apresentava
G2 (Figura 20 e 21)	Animal 3	MPE	não apresentava	não apresentava	não apresentava
		MPD	não apresentava	não apresentava	não apresentava
	Animal 4	MPE	discretas ao redor da lesão	discretas	leve hiperemia
		MPD	discretas ao redor da lesão	discretas	leve hiperemia
G3 (Figura 20 e 21)	Animal 5	MPE	discretas ao redor da lesão	discretas	não apresentava
		MPD	discretas ao redor da lesão	discretas	não apresentava
	Animal 6	MPE	discretas ao redor da lesão	discretas	moderada (membrana sinovial com hiperemia acentuada)
		MPD	discretas ao redor da lesão	discretas	moderada (membrana sinovial com hiperemia acentuada)
G4 (Figura 20 e 21)	Animal 7	MPE	graves e evidentes ao redor da lesão	moderadas	moderada (membrana sinovial com hiperemia acentuada)
		MPD	graves e evidentes ao redor da lesão	moderadas	moderada (membrana sinovial com hiperemia acentuada)
	Animal 8	MPE	graves e evidentes ao redor da lesão	moderadas	grave (com hiperemia acentuada e proliferações sinoviais)
		MPD	graves e evidentes ao redor da lesão	moderadas	grave (com hiperemia acentuada e proliferações sinoviais)
G= Grupo, MPE = Membro Pélvico Esquerdo, MPD = Membro Pélvico Direito					



Figuras 20: Imagens artroscópica das articulações em T-150. Observam-se proliferações provenientes do tecido neoformado (seta) no G1 (A). A pinça tipo “*Ferris-Smith*” coleta do tecido neoformado no G2 (B). Proliferações (seta) e bom preenchimento no G3 (C) e falhas de preenchimento e irregularidades ao redor das lesões (setas) no G4 (D).



Figuras 21: Imagens artroscópica das articulações em T-150. Remoção do tecido neoformado para a biópsia com auxílio de cureta no G1 (A). Coleta de tecido neoformado bem aderido com a pinça tipo “Ferris-Smith” no G2 (B). Palpação e exame com a “probe” no G3 (C). Falhas de preenchimento, irregularidade e fibrilações (setas) no G4 (D).

6.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA

Nos cortes corados com H&E, todos os fragmentos coletados em T-0 apresentaram estrutura e aspecto normais para a cartilagem articular. Em T-150 todos os grupos apresentaram formação de fibrocartilagem, com diferentes intensidades de fibrose cicatricial e feixes de fibras colágenas desorganizadas no local onde foi induzida a lesão. Houve perda de celularidade (condrócitos) em todos os grupos. Em todos os grupos houve desorganização da matriz interterritorial e da disposição das células (Figura 22). O G4 apresentou muitas células fibroblastóides, com maior proporção de feixes fibrosos. Pôde ser

observada a formação de poucos grupos isógenos nos tecidos cicatriciais de G2 e G3. Ao redor do tecido cicatricial (da lesão condral), na área de transição do tecido neoformado para a cartilagem normal, se observou a presença de condrócitos mortos e lacunas vazias. Houve também a formação de uma camada externa de tecido conjuntivo denso, rico em fibroblasto, semelhante ao pericôndrio, em todos os grupos (Figura 23).

Nos cortes corados com Picrosírius Red foi confirmada a presença de grande quantidade de fibrose em todos os grupos. Nas imagens polarizadas pode-se observar a predominância de fibrose em fase inicial, com predominância de colágeno tipo III (verde). O G4 apresentou feixes de fibras mais espessas e predominância de colágeno tipo I (amarelo), quando comparado aos outros grupos (Figura 24).

Nos cortes corados com Azul de Toluidina houve pouca marcação de matriz interterritorial ou territorial em todos os grupos, porém, G2 e G3 apresentaram-se discretamente mais corados em áreas com maior predominância de condrócitos. Nesses mesmos grupos houve a marcação de matriz territorial e algumas áreas de matriz interterritorial em azul claro (Figura 25).

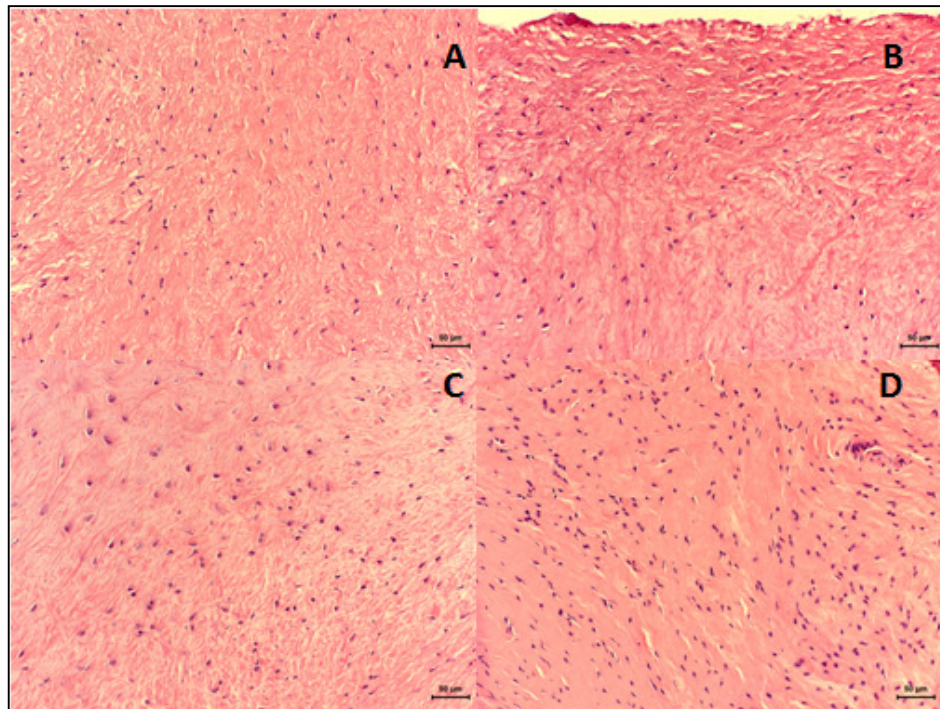


Figura 22: Fotomicroscopia de luz em T-150. G1 (A) e G4 (D) apresentam fibras desorganizadas e células fibroblastóides. G2 (B) e G3 (C) apresentam melhor aspecto histopatológico, áreas com maior organização celular, células arredondadas e lacunas (condrócitos). H&E. Objetiva: 20x.

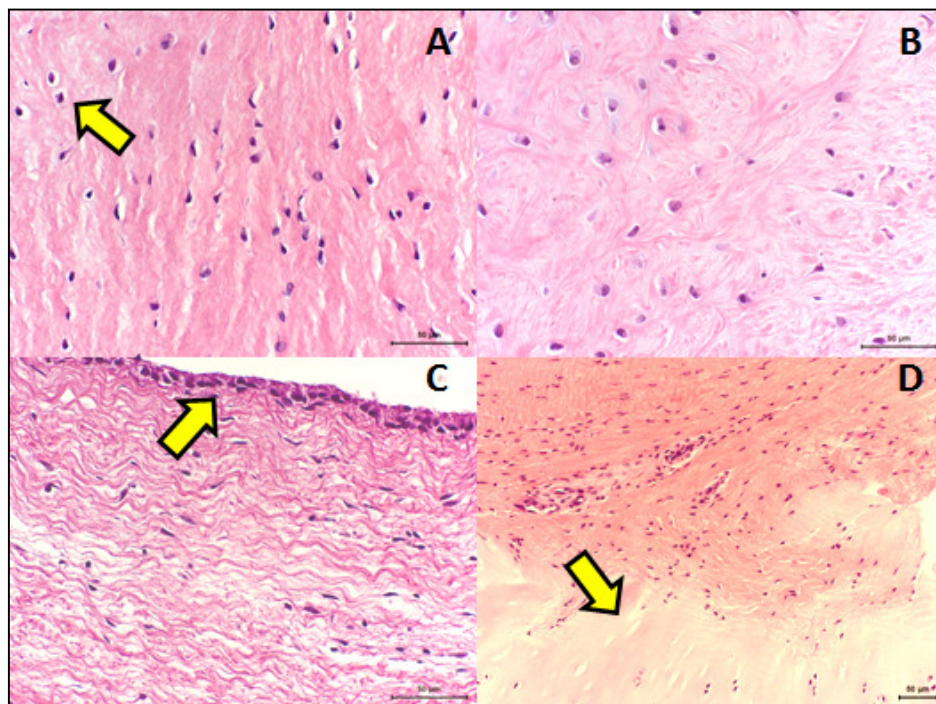


Figura 23: Fotomicroscopia de luz em T-150. Tecido de reparação com poucos condrócitos (seta) no G1 (A). Tecido com maior quantidade de condrócitos no G2 (B). Pericôndrio fibroso existente (seta) no G4 (C). Área de transição da cartilagem normal e fibrocartilagem, com condrócitos mortos e lacunas vazias (seta) no G4 (D). H&E. Objetiva: A, B e C 40x; D 20x.

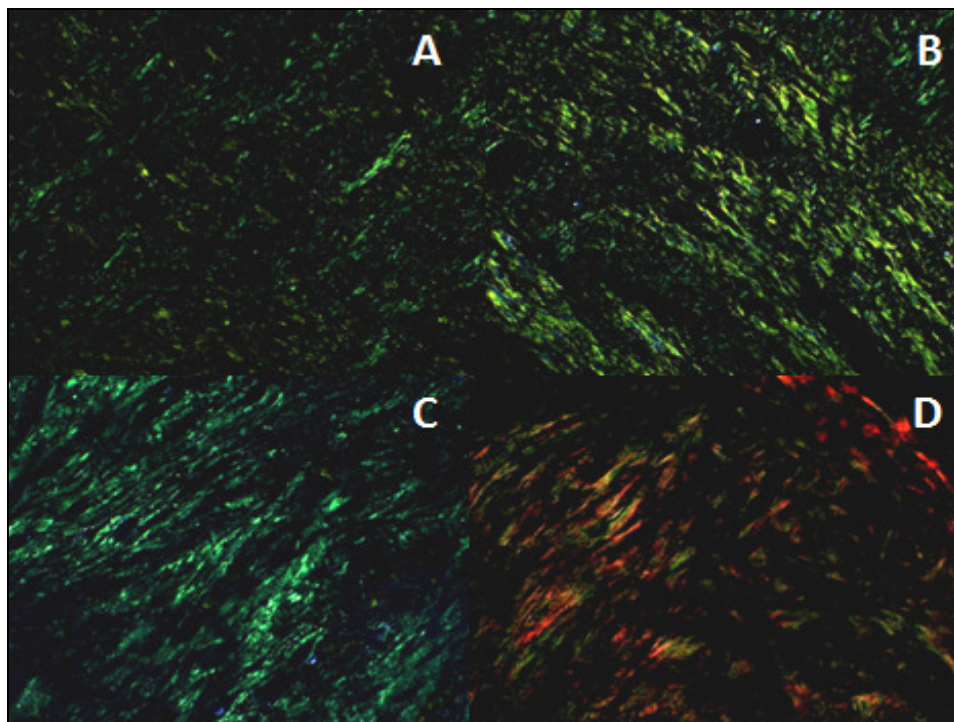


Figura 24: Fotomicroscopia de luz polarizada de G1 (A), G2(B), G3 (C) e G4(D) em T-150. O G4 apresenta fibras espessas e predominância da cor amarela ou vermelha (colágeno tipo I). Os grupos 1, 2 e 3 apresentam fibras mais finas e predominância da cor verde (colágeno tipo III) Picrosirius Red. Objetiva: 40x.

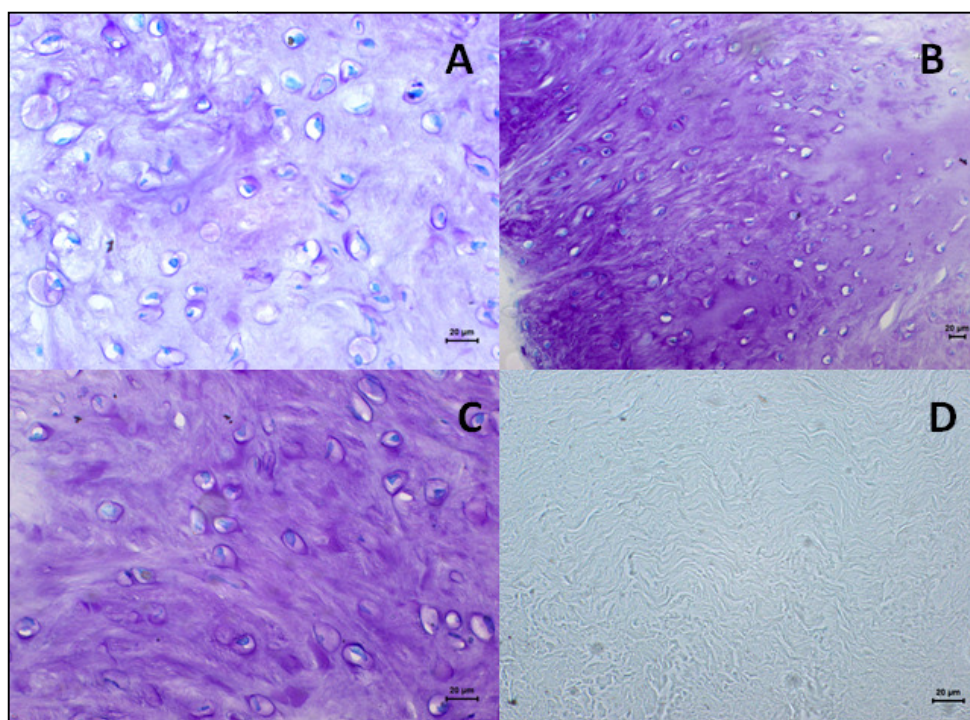


Figura 25: Fotomicroscopia de luz de G1 (A), G2(B), G3 (C) e G4(D) em T-150. O G1 apresentou fraca coloração. Os grupos 2 e 3 apresentam maior quantidade de condrócitos, matriz territorial e interterritorial corada em azul. O G4 apresentou fibras desorganizadas, poucas células e nenhuma coloração. Azul de Toluidina. Objetivas: A, C e D 40x; B 20x.

Discussão

7. DISCUSSÃO

Nesse estudo não foi adotada a lesão do osso subcondral, sendo apenas exposta a sua superfície. A indução da lesão e a remoção da cartilagem danificada foram realizadas com o auxílio de brocas motorizadas (“*shaver*”) e pinças, o que permitiu o controle da extensão da lesão. Sendo assim, o osso subcondral não foi perfurado ou desgastado, não havendo, em nenhuma articulação, sangramento proveniente do osso. A perfuração ou abrasão do osso subcondral induz a migração de células progenitoras do sangue medular para o local da lesão, além disso, facilita a adesão do coágulo de fibrina e dos fatores de crescimento provenientes da vasculatura subcondral e da medula óssea na lesão (FRISBIE et al., 1999; VINATIER et al., 2009; FORTIER et al., 2010). Sendo assim, a perfuração do osso subcondral nesse estudo iria, de forma significativa, interferir na avaliação dos efeitos dos tratamentos propostos, sendo, portanto invariavelmente evitada.

A espessura da cartilagem articular dos equinos pode variar de 1,5 a 3,2 mm, dependendo do local e da idade do animal. Sugerimos que, a profundidade da lesão condral nesse estudo não superou o padrão estabelecido pela literatura, já que não houve perfuração do osso subcondral (FORTIER et al., 2010; HURTIG et al., 2011). A técnica utilizada nesse experimento foi adequada para induzir a lesão condral e a artrite, já que foram observados sinais evidentes de inflamação articular, com degeneração da cartilagem e sinais clínicos da osteoartrite, tornando o leito receptor adequado para o implante dos tratamentos propostos (WILKE et al. 2007; FORTIER et al., 2010; HURTIG et al., 2011). A degeneração da cartilagem articular é decorrente da liberação de enzimas catabólicas, collagenases e metaloproteinases. Essa liberação é resultante do ciclo inflamatório articular, nesse estudo, provocado pelas intervenções cirúrgicas, artrocenteses e pela indução da lesão condral, expondo o osso subcondral. Esses itens participaram ativamente na manutenção da inflamação articular (SCHLUETER & ORTH, 2004; MCILWRAITH, 2005^a)

O número de plaquetas dos animais de G2 e G3 manteve-se dentro dos valores normais para a espécie, de 100.000 a 350.000 plaquetas/ μ L, segundo

Jain (1993) o que permitiu a inclusão desses animais no grupo de pesquisa. Durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa foi observada que a concentração média de plaquetas no PRP dificilmente ultrapassou 400.000 plaquetas/ μ L. Concentrações acima de 500.000 plaquetas/ μ L ou um enriquecimento três vezes superior aos valores plaquetários basais, como recomenda parte da literatura, não foram alcançadas (MARX et al., 1998; MAIA, 2008). A contagem de plaquetas no PRP desse estudo não apresentou relação com a contagem inicial de plaquetas no sangue total, como sugerem alguns autores (OKUDA, 2003; VAN DEN DOLDER et al., 2006; MCCARREL & FORTIER, 2009), concordando com estudo realizado por Mazzucco et al., (2009) onde o enriquecimento do concentrado de plaquetas não foi proporcional à contagem de plaquetas inicial do sangue total. Entretanto, estudos demonstraram que quanto maior a concentração plaquetária, maior a liberação dos fatores de crescimento (OKUDA, 2003; VAN DEN DOLDER et al., 2006; MCCARREL & FORTIER, 2009), podendo ocorrer variações entre indivíduos (VAN DEN DOLDER et al., 2006).

Os resultados referentes à contagem plaquetária e, consequente concentração de fatores de crescimento no PRP podem ser explicados por vários motivos, dentre eles: à variação individual do animal, ao protocolo de centrifugação escolhido e as propriedades plaquetárias (MAZZUCCO et al., 2009). Protocolos que ofereçam melhores concentrações plaquetárias proporcionalmente irão fornecer maiores concentrações de fatores de crescimento (LOPEZ-VIDRIERO et al., 2010). A utilização do PRP durante o experimento foi viabilizada já que concentrações maiores ou iguais a 300.000 plaquetas/ μ L tornam o PRP eficaz. (CARMONA et al., 2009; FOSTER et al., 2009). Valores plaquetários no PRP de 270.000 a 630.000 plaquetas/ μ L são adequados para equinos, expressando uma concentração suficiente de fatores de crescimento e sendo eficazes quando utilizado em diferentes terapias (MCCARREL & FORTIER, 2009; CARMONA et al., 2009).

A identificação precisa das CTM é possível utilizando-se marcadores de superfície que, em conjunto, refletem as características biológicas e funcionais dessas células. Um dos critérios para a caracterização da CTM é a capacidade de expressão dos marcadores de superfície CD 13, CD 90, CD 44 e CD 105, não podendo expressar os marcadores da linhagem hematopoiética como o

CD 14, CD 34, CD 45 e CD 19 (CARVALHO, 2009). Para o marcador CD13, o qual se esperava marcação positiva, foi observada expressão negativa. Esse resultado pode ser explicado pelos diferentes métodos de isolamento das células tronco após a coleta do tecido adiposo, o tempo de cultura celular antes da análise, o uso de anticorpos monoclonais detectando diferentes epítomos da mesma proteína de superfície e pelos diferentes graus de sensibilidade utilizados para a análise da citometria de fluxo (GIMBLE & GUILAK et al., 2003; CARVALHO, 2009). O “lote” do fabricante dos anticorpos também pode ser uma explicação, já que outros trabalhos que utilizaram a citometria de fluxo para caracterização das células tronco encontraram igualmente marcação negativa para o CD13, quando deveria ser positiva (RADCLIFFE et al., 2010). O CD13 é marcador de granulócitos e monócitos, apresentando expressão quando utilizado nas células da fração vascular fresca e nas CTM derivadas do tecido adiposo humano (SCHÄFFLER & BÜCHLER, 2007; TAPP et al., 2009). O CD13 não apresentou reação nessa experimentação, mostrando incompatibilidade com estudos realizados em humanos. Porém, os resultados apresentados confirmaram a caracterização imunofenotípica da superfície das células isoladas e cultivadas como células-tronco mesenquimais, sendo assim possível, sua aplicação para os tratamentos propostos das lesões condrais (CARVALHO, 2009).

As lesões condrais, no momento do tratamento, apresentaram uma película fina, friável e pouco aderida sobre a região do defeito, aparentemente composta de fibrina. Similarmente, Hurtig et al., (1999); Wilke et al., (2007) e Fortier et al., (2010) observaram a formação de um tecido cicatricial, de coloração branca, pouco aderido e fissuras ao redor da lesão no primeiro mês após a indução de lesões condrais. Antes da administração do tratamento, o leito receptor necessitou de uma leve curetagem dessa película para que o gel preenchesse e aderisse completamente toda a extensão da lesão. Inferimos que a retirada desse tecido inicial de preenchimento, realizado em todos os grupos para que pudesse ser administrado o tratamento, não interferiu nos resultados finais do trabalho.

Em T-30, a articulação foi primeiramente distendida com fluido estéril para a inspeção e palpação da lesão condral. Para realizar a fixação dos tratamentos, o líquido foi totalmente drenado e a articulação foi insuflada com

CO₂. A distensão da articulação com cerca de 26 mmHg de CO₂ foi adequada para secar a lesão, permitir o implante do tratamento e a secagem do gel no local, que perdurava cerca de 5 a 10 minutos. A aplicação dos tratamentos foi realizada com o auxílio de agulha modelo Komiyashiki 11G, o que permitiu a aplicação intralesional. Durante o desenvolvimento do projeto foi observado que a agulha modelo Komiyashiki 11G permitiu a adequada aplicação do composto, portanto as células e o PRP, em fase final de gelificação. Desse modo, não foram observadas obstruções da agulha pelo tratamento já gelificado ou aplicação exacerbada do implante fora do local da lesão, além disso, esse modelo de agulha possui, sem o trocater, a ponta romba e não ocasionou danos adicionais na cartilagem articular.

Foi observada a necessidade da adição de dois fatores ativadores do PRP para que o implante fosse fixado na lesão condral. Recomenda-se a adição de trombina ao PRP para que esse expresse uma quantidade satisfatória de fatores de crescimento e forme um gel de fibrina adequado para adesão do tratamento no leito receptor (VAN DEN DOLDER et al., 2006; ROUSSY et al., 2007). A adição de trombina no PRP resultou na polimerização do fibrinogênio em fibrina, que é uma proteína adesiva (VAN DEN DOLDER et al., 2006; ROUSSY et al., 2007). O cloreto de cálcio demonstrou ser um fraco ativador plaquetário. Sua principal função é antagonizar o anticoagulante utilizado (citrato de sódio) permitindo a formação do gel. Já a trombina é um potente ativador, degranulando a maior parte dos grânulos intraplaquetários, que liberam todo o seu conteúdo (EVERTS, 2006). A trombina utilizada foi purificada no Laboratório do Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu, sendo proveniente do plasma de um único animal, portanto homóloga.

O gel de PRP, formado a partir da adição de trombina, tem sido utilizado com arcabouço tridimensional em tratamentos de lesões da cartilagem articular. A facilidade de aplicação (na forma líquida), a polimerização e a elevada aderência no local da lesão foram vantagens apresentadas na utilização desse gel. Além disso, o gel reuniu uma variedade de fatores de crescimentos, que favoreceram a diferenciação condrogênica (WILKE et al., 2007). Segundo Berrevoet & Hemptinne (2007) e Kretlow et al., (2010) o gel de PRP estimula a atividade de reparação e possui efeito anti-inflamatório.

Arcabouços formados do gel de PRP apresentaram-se eficazes para suportar implantes celulares e orientar a proliferação celular. Além disso, os coágulos de fibrina interagem e estimulam a aderência de células na lesão (FOSTER et al., 2009; KRETLOW et al., 2010)

A fibrina é degradada por componentes da matriz extracelular, resultando em moléculas atóxicas para o processo de reparação, além de fornecer um ambiente mais perto de uma forma com três dimensões. O uso do gel de PRP é restrito devido à sua falta de estabilidade mecânica, fato também observado no presente estudo (VINATIER et al., 2009; KON et al., 2010^b). Em desvantagem, a durabilidade do gel de PRP no local da lesão é pequena, sendo de uma a três semanas, tempo fisiológico de absorção de um coágulo sanguíneo normal (BERREVOET & HEMPTINNE, 2007). A utilização da trombina para a degranulação plaquetária e para a obtenção do gel de fibrina nesse estudo explica-se pela necessidade de um fator de fixação do implante no local da lesão condral, que interferisse o mínimo possível na avaliação dos tratamentos propostos.

7.1. Avaliação dos Parâmetros clínicos e laboratoriais

7.1.1. Exame Clínico

Em T-15 era esperado o aumento dos escores do grau de claudicação, para todos os grupos, consequente do estresse cirúrgico, mesmo que minimamente invasivo, e da indução da lesão condral. Animais submetidos à artroscopia sofrem alterações neuroendócrinas, provenientes das lesões dos diversos tecidos articulares. Essas alterações são decorrentes do estímulo hipotalâmico, que se conecta com as vias da dor, (CHAPARRO, 2008) caracterizada neste estudo pelos graus de claudicação. Frisbie et al., (2009) relataram que após realização de um defeito condral experimental de 15 mm, na articulação cárpica, todos os equinos apresentaram acréscimo da claudicação do membro lesados, com escore médio de $2,33 \pm 0,06$, portanto, semelhante ao observado no presente trabalho. Hurtig et al., (1999), após provocarem lesões condrais e subcondrais, também observaram graus moderados de claudicação em articulações cárpicas e femoropatelares. A exposição do osso subcondral e a inflamação da membrana sinovial são os

principais responsáveis pela manutenção do ciclo inflamatório e consequente liberação de interleucinas, prostaglandinas e outras citocinas determinantes da claudicação (STASHAK, 2006; MCILWRAITH, 2005^a). Em T-15 também pôde ser observada a abdução dos membros posteriores de todos os animais durante o trote. Deduzimos que essa abdução é também resultante da dor articular causada pela intervenção cirúrgica.

Em T-15, o escore de claudicação provavelmente não foi influenciado apenas pelo defeito condral criado e sim também pelo estímulo doloroso da cápsula articular e inflamação da membrana sinovial, decorrentes da manipulação cirúrgica. A maioria das terminações nervosas localiza-se na cápsula articular e ligamentos associados, porém, agressões na membrana sinovial decorrentes de inflamação ou distensão exacerbada podem ser transmitidos para a cápsula, resultando em estímulos diretos nessas terminações nervosas. Inferimos que lesões mais profundas, com perfuração significativa do osso subcondral, provoquem mais dor, já que a cartilagem articular é desprovida de inervação (PALMER & BERTONE et al., 1994; STASHAK, 2006). Segundo Hurtig et al., (1988) a distensão da cápsula articular com fluido ou gás também pode provocar dor quando há extravasamento desse fluído ou gás para regiões periarticulares, evento que pode ter interferido no grau de claudicação nas semanas após as intervenções cirúrgicas.

A redução gradual do escore do grau de claudicação, em G2 e G3, foi principalmente observada após T-45. Carmona et al., (2009) observaram melhora no grau de claudicação em animais portadores de artropatias após a terceira aplicação intra-articular de PRP, com volume médio de 15 mL por articulação. Em acordo com o estudo citado anteriormente, esses mesmos grupos experimentais apresentaram melhora evidente de claudicação após a segunda ou terceira aplicação de PRP intra-articular, realizadas em T-45, T-60 e T-75. Injeções intra-articulares de plasma rico em plaquetas são comprovadamente benéficas e eficazes na redução da claudicação em equinos (CARMONA et al., 2005; CARMONA et al., 2009; KON et al., 2010^a; LOPEZ-VIDRIERO et al., 2010).

As intervenções cirúrgicas em T-30 resultaram em maior inflamação local e efusão sinovial, até sete dias após o tratamento, dados que corroboram

com estudo realizado por Lee et al., (2007) e Carmona et al. (2009). Inferimos que a pressão que o gás proporcionou foi maior que a de fluído, ocasionando dor proveniente da distensão da cápsula articular, não relacionando essas alterações imediatas com a administração do tratamento. Além disso, a literatura descreve que a distensão com dióxido de carbono pode causar irritação intra-articular já que, após o contato com a água, o gás se transforma em ácido carbônico (H_2CO_3) que além do caráter ácido e irritante, possui efeito vasodilatador (ROSSETTI, 2006). As aplicações intra-articulares isoladas de PRP não ocasionaram nenhum tipo de reação inflamatória, fato que discorda com trabalho de Carmona et al., (2007).

Os benefícios da aplicação intra-articular de PRP refletiram-se na redução dos sinais clínicos associados à osteoartrite. Houve diminuição dos escores de claudicação e da efusão sinovial. A principal vantagem relatada pela literatura é a redução significativa da dor articular, resultante do efeito anti-inflamatório do PRP, atuando de forma positiva sobre a membrana sinovial. Acredita-se que os fatores de crescimento presentes no PRP sejam capazes de bloquear a expressão de moléculas pró-inflamatórias, atuando de forma analgésica (MCILWRAITH, 2005^a; GAISSMAIER et al., 2008; VEIGA, 2008; CARMONA et al., 2009). Em trabalho realizado por El-Sharkawy et al., (2007) o PRP demonstrou suprimir de forma significativa a inflamação através da liberação da LXA₄, uma lipoxina liberada por monócitos, capaz de reduzir por exemplo, a liberação de superóxido.

Os animais de G2 e G3 apresentaram menores escores de claudicação quando comparados ao G1 e ao G4. De acordo com Kon et al., (2010^a) o PRP é capaz de restringir a reatividade da membrana sinovial e antagonizar os efeitos da IL-1 e do TNF-alfa por concentrar diversos fatores de crescimento e proteínas bioativas. A diminuição da concentração de IL-1 no líquido sinovial tem como consequência a redução do ciclo inflamatório articular, inativação de prostaglandinas e diminuição da claudicação (MCILWRAITH, 2005^a; CARMONA et al., 2009; MILANO et al., 2010). No atual experimento o PRP agiu de forma analgésica, porém, não atuou significativamente de forma anti-inflamatória, verificado pelas análises laboratoriais do líquido sinovial.

De forma semelhante ao observado para o G1, Frisbie et al., (2009) não observaram melhora da claudicação em animais com osteoartrite induzida após

a aplicação de CTM derivadas de gordura e de medula óssea na articulação do carpo de equinos, 70 dias após o tratamento. McIlwraith et al., (2010) e Carrade et al., (2011) também observaram que cavalos submetidos à lesões condrais induzidas e tratadas com células tronco mesenquimais apresentaram melhora clínica mínima e variável. A literatura relata que a melhora dos sinais clínicos de doenças articulares tratadas com a aplicação intra-articular ou intralesional de células tronco mesenquimais é tardia, sendo observada após oito meses do tratamento. Isso se deve as propriedades inatas das CTM, que em longo prazo, atuam de forma ativa na reparação tecidual através da proliferação, diferenciação e imunomodulação celular (KURODA et al., 2007; WILKE et al., 2007; NÖTH et al., 2008; KHAN et al., 2009). O G3 apresentou redução do grau de claudicação, de forma semelhante ao G2, provavelmente devido à administração associada do PRP.

As CTM são capazes de reduzir a progressão da osteoartrite, reduzir a esclerose do osso subcondral, promover incremento do tecido de reparação e apresentam tropismo pelo local lesado. Porém, a utilização de CTM no tratamento de enfermidade ortopédicas pode não reduzir de forma imediata as consequências clínicas, o que provavelmente ocorreu com o G1 (MURPHY et al., 2003; LEE et al., 2007, CARVALHO, 2009). Em estudos realizados por Kuroda et al., (2007) e Haleen et al., (2010) em humanos com lesões condrais, foi apenas observado melhora clínica significativa do paciente um ano após a instituição do tratamento com CTM. Deduzimos que o maior escore de claudicação no G1 foi decorrente da impotência imediata do tratamento utilizado em reduzir a claudicação, já que as CTM aplicadas isoladamente, apesar de auxiliar expressivamente na reparação, possuem pouco efeito analgésico.

A possibilidade de ter ocorrido reações adversas após a administração das CTM, do cloreto de cálcio ou da trombina não foi descartada. Porém, não associamos os maiores escores de claudicação do G1 com a maior inflamação articular, já que, nas análises laboratoriais do líquido sinovial o G1 não apresentou os maiores índices inflamatórios. O G2 e G3 apresentaram claudicação reduzida pelo amplo efeito anti-inflamatório do PRP. A administração de PRP foi adequada em reduzir a claudicação apesar de não ter sido eficaz na remissão significativa dos índices de inflamação mensurados

no líquido sinovial (EL-SHARKAWY et al., 2007; CARRADE et al., 2011). O G4 manteve escores de claudicação elevados por ter sido tratado apenas com solução fisiológica.

7.1.2. Exame físico, químico e citológico do líquido sinovial

No decorrer do experimento, as colorações alaranjadas e avermelhadas do líquido sinovial foram decorrentes de diferentes graus de contaminação por sangue, que em raras ocasiões ocorreu acidentalmente durante a coleta. A contaminação por sangue não apresentou correlação com o grupo experimental ou momento coletado, e sim, com intercorrências durante a coleta. A contaminação das amostras por sangue, coletas improdutivas ou a impossibilidade de realização dos exames devido a problemas com as amostras também foram observadas por Martins et al., (2007) e Steel et al., (2008). Esses mesmos autores observaram igualmente o decréscimo da viscosidade em até 30 dias após artroscopia, justificando que a inflamação articular provocada pela agressão cirúrgica quebra as moléculas de hialuronato resultando nessa alteração. A redução da viscosidade e da qualidade da mucina no líquido sinovial deve vir acompanhada do aumento da contagem celular global (acima de 500 células / μ L), fato encontrado durante o experimento, principalmente em T-15 e T-45 (MARTINS et al., 2007; STELL, 2008). Pequenos grumos brancos nas amostras do líquido sinovial encontrados durante o experimento foram interpretados macroscopicamente como prováveis fragmentos de cartilagem ou grumos de fibrina, e não interferiram na avaliação dos tratamentos ou comparação entre os grupos.

A sinovite resulta em efusão de líquido sinovial, influxo de proteínas, fibrinogênio e leucócitos (STASHAK, 2006). Não foi observada correlação entre as concentrações de proteína e fibrinogênio com os tratamentos propostos, apenas com os diferentes momentos analisados, principalmente em T-15 e após T-45. A proteína apresentou concentrações superiores nos períodos de maior inflamação articular, decorrente de alterações principalmente envolvendo a membrana sinovial e a cartilagem articular (MCILWRAITH, 2005^a; MARTINS et al., 2007). A manutenção de escores de proteína e fibrinogênio acima dos padrões esperados corrobora com estudos realizados por Frisbie et al., (2009),

onde o tratamento de lesões condrais induzidas com CTM não resultou em alterações significativas da concentração da proteína do líquido sinovial. Inferimos que os tratamentos impostos no experimento não minimizaram a inflamação da membrana sinovial de forma satisfatória para que o influxo de proteínas e fibrinogênio fosse inibido, sendo ainda esse influxo perpetuado pelas punções articulares repetidas na coleta do líquido sinovial e intervenções cirúrgicas. A manutenção dos elevados escores de proteína e fibrinogênio ainda podem ser explicados por discreta resposta aversiva aos tratamentos realizados, como observado por Carrade et al., (2011).

Frisbie et al., (2009) relataram que não houve alteração na contagem de células nucleadas após a instituição do tratamento com frações mononucleares de medula óssea e tecido adiposo, concordando com os achados do presente estudo, onde não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o controle na contagem de células nucleadas. Houve apenas diferença entre os momentos analisados. A contagem de células nucleadas foi maior nos momentos após as artroscopias, consequente da inflamação pós cirúrgica, apoiando trabalho realizado por Wilke et al., (2007), onde foi observado aumento na contagem de células nucleadas principalmente entre o quarto e sétimo dia após a intervenção cirúrgica. G2, G3 e G4 apresentaram aumento da contagem das células nucleadas após T-90. Sugerimos que essa alteração foi provocada pela finalização dos tratamentos e diminuição da ação dos mesmos G2 e G3 e ausência do tratamento no G4, que apresentou a maior contagem. A menor contagem apresentada por G1 foi provavelmente ocasionada pelo amplo efeito imunomodulador que as CTM possuem (NÖTH et al., 2008).

O líquido sinovial normal deve apresentar grande quantidade de células mononucleares (> 80%) derivadas de monócitos sanguíneos, sinoviócitos e macrófagos teciduais. O decréscimo da contagem de células mononucleares pode representar graus variados de sinovite e osteoartrite (STELL, 2008; POZZOBON et al., 2009), o que provavelmente ocorreu com o grupo controle durante o experimento. Foi observada significativa redução de células mononucleares no G4, principalmente quando comparado ao G1. A aplicação de CTM intra-articulares pode acrescer a contagem de células mononucleares no líquido sinovial, conforme alguns estudos realizados, devido às

propriedades quimiotáticas dessas células, o que não foi observado nesse estudo, já que todos os grupos apresentaram tendência em reduzir a contagem de células mononucleares, refletindo algum grau de artrite (WILKE et al., 2007; CARRADE et al., 2011).

A porcentagem de linfócitos deve ser reduzida no líquido sinovial, sendo aceitável uma variação até 16% na contagem relativa. O aumento da porcentagem de linfócitos não apresenta relação com alterações articulares significativas. Variações da quantidade relativa de linfócitos podem ser decorrentes de sinovite idiopática ou sinovite eosinofílica (resposta alérgica medicamentosa) (FRISBIE et al., 2007; STELL, 2008; POZZOBON et al., 2009). Essa informação pode justificar o aumento variável de linfócitos durante o experimento em G4, que manteve maior grau de inflamação articular quando comparado aos outros grupos. Em T-45, o G2 apresentou um aumento significativo da porcentagem de linfócitos, o que pode ter sido resultante de reação adversa à trombina, ao cloreto de cálcio ou menos provável, ao próprio PRP. Amostras de líquido sinovial em T-45 apresentaram eosinófilos nos grupos que receberam tratamentos. Em trabalho realizado por Del Bue et al., (2008) e Frisbie et al., (2009) houve redução da porcentagem de linfócitos e de células “*Natural Killer*” em animais portadores de osteoartrite experimental tratados com células tronco, evento igualmente observado no presente estudo para o G1, porém, sem diferença estatística entre os grupos.

Os neutrófilos devem representar menos que 10% do total de células no líquido sinovial, maiores porcentagens são indicativos fiéis de inflamação articular. A porcentagem de neutrófilos ainda pode predizer a magnitude da inflamação (CARMONA et al., 2007; STELL, 2008; POZZOBON et al., 2009). Nesse estudo o G4 apresentou porcentagens discretamente mais elevadas de neutrófilos quando comparado aos outros grupos, refletindo maior inflamação articular. O G1 apresentou resultados sutilmente melhores nas análises do líquido sinovial. As CTM são capazes de reduzir a ativação de linfócitos e reduzir o infiltrado inflamatório (NÖTH et al., 2008; VINATIER et al., 2009). O PRP, apesar de possuir efeito anti-inflamatório, também ativa citocinas, aumenta a permeabilidade vascular e realiza quimiotaxia sobre monócitos, podendo explicar os valores relativos variados encontrados na análise do

líquido sinovial em G2 e G3 (EL-SHARKAWY et al., 2007; VEIGA, 2008; NÖTH et al., 2008; VINATIER et al., 2009).

As repetidas artrocenteses para a coleta do líquido sinovial colaboraram na manutenção da inflamação articular, em parte suprimida pelos efeitos benéficos dos tratamentos impostos. O G4 manteve maior inflamação articular, comprovada pela redução de células mononucleares e pelo maior valor relativo de neutrófilos quando comparado aos outros grupos. Entendemos que os resultados apresentados nesse experimento, comparando os grupos tratados ao controle, são igualmente decorrentes dos efeitos benéficos das CTM e do PRP no tratamento de lesões articulares, porém, tais tratamentos não reduziram de forma contundente a inflamação articular observada pelas análises do líquido sinovial.

7.1.3. Análise da prostaglandina (PGE₂) no líquido sinovial

No decorrer do experimento, até T-150, foi observado aumento gradativo das concentrações de prostaglandina, apenas o G1 apresentou valores reduzidos da PGE₂ em T-150. Em média, o G2 apresentou os maiores valores de PGE₂ e G1 os menores valores, considerando todos os momentos. A PGE₂ é um excelente indicador do grau da inflamação articular por ser sensível, detectável por teste ELISA e não se correlacionar com a contagem de células nucleadas. A quantificação da PGE₂ é realizada de forma independente à contagem de leucócitos já que estudos comprovaram que a PGE₂ é liberada por células sinoviais, condrócitos e células subcondrais residentes, e não por neutrófilos ou células mononucleares (MAY et al., 1994; BERTONE et al., 2001). A prostaglandina é produzida em casos de vasodilatação, danos celulares ou estresse articular (VAN DEN BOOM et al., 2004). Rasera et al., (2008) encontraram valores até 521,75 pg/ mL $\pm$ 331 em equinos após exercício, esses valores estão acima do que a literatura considera normal para uma articulação saudável (5,7 pg/ mL) segundo Kirker-Head et al., (2000) ou para uma osteoartrite (63,5 pg/ mL) segundo Bertone et al., (2001). Os valores encontrados no presente estudo apresentaram-se significativamente superiores aos encontrados na literatura. Sugere-se que tal fato seja explicado pela intervenção cirúrgica inicial somada à manutenção da lesão condral e

artrocenteses repetidas para as coletas do líquido sinovial. Van Den Boom et al., (2004) encontraram igualmente valores mais altos de PGE_2 em articulações submetidas à artrocenteses repetidas.

A PGE_2 é um mediador inflamatório expressado em doenças articulares agudas, fraturas, traumas, doenças degenerativas, alterações condrais, subcondrais e infecções (KIRKER-HEAD et al., 2000; FRISBIE et al., 2009). É rapidamente liberada, apresentando pico em até nove horas após a agressão articular e manifesta-se em altas concentrações em osteoartrites induzidas (VAN DEN BOOM et al., 2004; FRISBIE et al., 2007). A concentração de PGE_2 no líquido sinovial vem sendo relacionada com o grau de claudicação, sendo que quanto maior essa concentração, maior o grau de claudicação (BERTONE et al., 2001; VAN DEN BOOM et al., 2004). No presente estudo houve diferença da concentração de PGE_2 sinovial principalmente entre o G1 e o G2 e G3, sendo que o G1 apresentou as menores concentrações de PGE_2 .

O resultado observado para a concentração de prostaglandina, realizando a comparação entre os grupos, se confronta com os achados dos exames clínicos, onde o G1 apresentou os maiores graus de claudicação, porém concorda com os resultados observados na análises laboratoriais do líquido sinovial, onde, o mesmo G1 apresentou a melhor imunomodulação e menor grau de inflamação do líquido sinovial. Esse fato pode ser explicado em conceitos descritos por Grauw et al., (2006). Esses autores observaram que articulações acometidas por diversas doenças articulares, apresentando concentrações elevadas de PGE_2 (cerca de 500 pg/mL), não apresentavam necessariamente, melhora do grau de claudicação após a anestesia intra-articular. Esses mesmo autores sugeriram que a PGE_2 não está intimamente relacionada com o grau de claudicação ou manifestações clínicas de dor e sim apenas com inflamação articular generalizada, sendo impossível determinar a causa primordial, apenas a alteração inflamatória interferindo na qualidade e composição do líquido sinovial. Confirmaram ainda, o fato da cartilagem articular não ser inervada, o que também não provocaria dor, mesmo em casos de lesões condrais graves (GRAUW et al., 2006). Isso justifica os menores graus de claudicação de G2 e G3, mesmo apresentando valores elevados de PGE_2 e inflamação articular moderada, observada no exame do líquido sinovial.

Sugerimos também que a manutenção de valores acima do esperado de PGE_2 ao final do experimento possa ser explicada pela incapacidade do tratamento de suprimir totalmente a inflamação articular, como já visto na análise do líquido sinovial. Foi observado acréscimo da concentração de prostaglandina após as intervenções cirúrgicas, sendo esse aumento propagado pelas repetidas artrocenteses. Apesar do efeito anti-inflamatório do PRP, plaquetas degranuladas em lesões tissulares também são capazes de ativar alguns tipos de citocinas, alterando a composição e homeostasia do líquido sinovial, o que também poderia explicar valores mais altos de PGE_2 no G2 e G3. A administração de CTM, que são capazes de inibir reações mistas inflamatórias e apresentam forte ação imunomoduladora, pode explicar o valor reduzido de PGE_2 no G1 (NÖTH et al., 2008; CARMONA et al., 2009; LOPEZ-VIDRIERO et al., 2010).

7.2. Análise macroscópica da cartilagem articular

As análises macroscópicas da cartilagem articular demonstraram uma semelhança de preenchimento e aderência entre todos os grupos. Os resultados apresentados na inspeção macroscópica das lesões tratadas corroboram com dados encontrados na literatura, onde pesquisas que utilizaram o PRP e as CTM no tratamento de lesões condrais induzidas ou de ocorrência natural observaram a formação de um tecido cicatricial branco, liso, aparentemente fibroso e bem aderido, preenchendo completamente as falhas de cartilagem. As lesões condrais que não foram submetidas a esses tratamentos apresentaram falha do preenchimento e manutenção da degradação da cartilagem articular (HURTIG et al., 1988; WILKE et al., 2007; DEL BUE et al., 2008; HALEEN et al., 2010; MCILWRAITH et al., 2010; RAHEJA et al., 2011).

As CTM representam uma apropriada fonte celular. Sendo assim, o implante intralesional de CTM é capaz de promover o preenchimento tecidual de lesões condrais, devido à capacidade de proliferação dessas células (WILKE et al., 2007; VINATIER et al., 2009). Raheja et al., (2011) relataram que um animal portador de lesão condral submetido a tratamentos intralesionais e intra-articulares com CTM apresentou a formação de um tecido

homogêneo e bem aderido, semelhante à superfície articular na análise macroscópica, quatro meses após a instituição do tratamento, voltando à atividade atlética após 15 meses. Implantes intralesionais de CTM comprovadamente favorecem a formação de tecido cicatricial, que macroscopicamente apresenta-se com as mesmas características observadas pela atual experimentação, se tornando bem integrado à cartilagem articular após cerca de 5 a 8 meses (KOGA et al., 2008^a; FRISBIE et al., 2009; FORTIER et al., 2010; RAHEJA et al., 2011).

McIlwraith et al., (2010) e Murphy et al., (2003) observaram que, lesões tratadas com células tronco apresentam melhor integração do tecido cicatricial à borda de lesão, menor ocorrência de erosões e fibrilações ao redor da lesão, menor índice de osteófitos, melhor aparência macroscópica e preenchimento da lesão condral. Esses dados explicam o preenchimento satisfatório e o tecido bem aderido às bordas e ao osso subcondral de G1 e G3 quando comparado ao G4. O implante de CTM em gel de PRP acresce a taxa de preenchimento da lesão e reduz a atividade de enzimas catabólicas articulares, reduzindo a degeneração articular (HALEEN et al., 2010).

Fortier et al., (2010) relataram bom preenchimento tecidual em lesões condrais induzidas experimentalmente e tratadas com aspirado de medula óssea, sugerindo que a eficácia do tratamento encontra-se na grande concentração de fatores de crescimentos presentes no sangue medular, induzindo o anabolismo celular. G2 e G3 apresentaram igualmente ao G1, um preenchimento satisfatório da lesão, e tecido neoformado bem aderido às bordas e ao osso subcondral. Esses resultados são explicados pelas propriedades do PRP terapêutico. O PRP é rico em fatores de crescimento capazes de estimular a proliferação celular. Os fatores de crescimento exercem grande efeito anabólico na proliferação tecidual, agindo principalmente nas fases de proliferação e remodelamento tecidual (AKEDA et al., 2006; FOSTER et al., 2009).

Os grupos tratados apresentaram menor manutenção, ou mínimo desenvolvimento de irregularidades e erosões ao redor da lesão quando comparado ao grupo controle. Sugerimos que as CTM foram responsáveis pela inibição da progressão da doença articular e inativação de enzimas ofensivas à cartilagem articular devido à forte atividade imunomoduladora e pelo tropismo

por regiões lesadas (VINATIER et al., 2009). O PRP é capaz de antagonizar interleucinas e metaloproteinases, as maiores responsáveis pela manutenção da degeneração da cartilagem articular (MCILWRAITH, 2005^a; EL-SHARKAWY et al., 2007). O G4 apresentou maior número de erosões, irregularidade e falha de preenchimento quando comparado aos outros grupos. Esse fato corrobora com dados da literatura, onde os animais com lesões condrais experimentais não tratadas demonstram falha de preenchimento, aumento da inflamação articular e aumento do diâmetro da lesão condral, somando irregularidades e erosões (WILKE et al., 2007; KOGA et al., 2008^a; FORTIER et al., 2010; GOBBI et al., 2011).

A apresentação de sinovite, erosões ao redor da lesão e fibrilações na cartilagem articular nas avaliações macroscópicas em T-30 e T-150 concordam com os achados em estudos realizados por Wilke et al., (2007) e Frisbie et al., (2009). Inferimos que a sinovite seja resultante da manutenção da inflamação articular causadas pelas intervenções cirúrgicas e repetidas artrocenteses, sendo mais grave no G4. Frisbie et al., (2009) igualmente observaram sinovite em animais com osteoartrite induzida por lesões condrais, tratados e não tratados com CTM. A cicatrização da cartilagem articular, devido à diferença topográficas, é favorecida distalmente. Defeitos condrais induzidos experimentalmente podem apresentar diferenças de preenchimento de acordo com a localização topográfica, fato não observado no presente estudo (FORTIER et al., 2010).

7.3. Análise histopatológica e histoquímica

As análises histopatológicas e histoquímicas da reparação da cartilagem devem, fundamentalmente, basear-se na quantificação da matriz extracelular e sua organização, na densidade e morfologia celular, organização global do tecido de reparação e respostas inflamatórias. Nessas análises, deve-se ainda verificar a reminiscência de material anteriormente implantado, a integração do tecido cicatricial com o osso subcondral e bordas da lesão, além da orientação das fibras colágenas (HOEMANN et al., 2011).

Nesse estudo, observamos pelas lâminas coradas com H&E formação de fibrocartilagem em todos os grupos. O G1, apesar do ótimo preenchimento

macroscópico, apresentou desorganização tecidual, grande quantidade de células fibroblastóides e reduzida quantidade de matriz extracelular. G2 e G3 apresentaram, nas lâminas coradas com H&E, uma maior quantidade aparente de condrócitos e discreta organização da matriz extracelular. Essa resposta ao tratamento pode ser decorrente da capacidade do PRP em reduzir a resposta inflamatória, apesar de não ter sido observado nas análises do líquido sinovial, e inibir enzimas catabólicas, favorecendo a organização do colágeno, a migração e a proliferação celular (CARTER et al., 2003). Os cortes corados com Picrosírius Red confirmaram a presença de fibrocartilagem em todos os grupos. Nas imagens polarizadas, foi observado um padrão semelhante de organização, distribuição e composição de colágeno (sendo o colágeno tipo III esverdeado e o colágeno tipo I amarelado) para todos os grupos tratados, sendo consideravelmente diferente apenas o grupo controle (G4), que apresentou maior quantidade de fibrose (colágeno tipo I amarelado), em feixes grossos e bem desorganizados.

A cicatrização de defeitos da cartilagem articular apresenta formação predominante de colágeno tipo I e II, sendo que o colágeno tipo II é observado apenas nas camadas mais profundas, e o colágeno tipo I distribuído por todo o tecido de reparação (WILKE et al, 2007; ELDER et al., 2009). Apesar de não ter sido realizada a análise imunoistoquímica para colágeno nesse trabalho, foi possível observar que, nas lâminas coradas com Picrosírius Red, existiam fibras polarizadas em verde que representam o colágeno tipo III, que é menos denso em G1, G2 e G3. O G4 apresentou fibras polarizadas em vermelho e amarelo, que representam fibrose madura, rica em colágeno tipo I. Nenhum grupo apresentou organização das fibras colágenas semelhante à cartilagem normal, fato que corrobora com trabalhos realizados por Wilke et al., (2007), porém, o G4 apresentou feixes fibrosos mais densos e em maior quantidade.

A partir das análises realizadas nas lâminas coradas com H&E e Picrosírius Red inferimos que todos os tratamentos propostos, com células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas, foram benéficos na reparação da cartilagem quando comparados ao grupo controle, proporcionando menor intensidade de fibrose e melhor organização tecidual quando comparados ao G4, porém, G2 e G3 morfologicamente aproximaram-se mais da cartilagem normal quando comparados ao G1 e G4. Os resultados

encontrados nesse estudo concordam com os dados da literatura. Milano et al., (2010) observaram que, defeitos condrais experimentais tratados com a técnica de microfraturas associada à aplicação de PRP, apresentam um aumento quantitativo de condrócitos e melhor organização cicatricial. Khan et al., (2009) observaram que os fatores de crescimento são capazes de melhorar o aspecto histológico do tecido de reparação, quando comparado à cartilagem normal, em casos de lesões da cartilagem articular. A melhora histopatológica é resultante do incremento no alinhamento celular e do estímulo que os fatores de crescimento exercem sobre as CTM locais. Os fatores de crescimento presentes no PRP acrescem a expressão fenotípica condrogênica celular, a deposição de matriz extracelular, apresentam atividade anabólica (KON et al., 2010^a), além de estimular a atividade autócrina dos condrócitos e realizar quimiotaxia (NESIC et al., 2006; GAISSMAIER et al., 2008).

O Azul de Toluidina é essencial no estudo da reparação de lesões condrais já que essa técnica de coloração é adequada para quantificar glicosaminoglicanos, demonstrando sua presença e localização no tecido. O Azul de Toluidina cora a matriz colágena em azul claro e os glicosaminoglicanos em roxo escuro (metacromasia) (HOEMANN et al., 2011). As lâminas coradas com azul de toluidina demonstraram diferença significativa entre os grupos. G2 e G3 apresentaram maior marcação em tons de azul na matriz territorial e interterritorial, ao redor da maior quantidade aparente de condrócitos. G1 e G4 apresentaram fraca marcação em tons de azul claro e rara coloração territorial. Nenhum grupo tratado apresentou metacromasia, a não ser em pequenas áreas ao redor dos condrócitos, indicando pouca produção de proteoglicanos. Esses resultados entram em desacordo com estudo realizado por Koga et al., (2008^a) e McIlwraith et al., (2010), onde defeitos condrais tratados com CTM apresentaram maior produção de agregan quando comparado a controles não tratados. Wilke et al., (2007) também observaram melhora no tecido cicatricial de defeitos condrais tratados com CTM, onde havia melhor alinhamento e maior densidade celular quando comparado a grupos não tratados, discordando com os resultados aqui apresentados.

Diversos estudos baseados no tratamento de lesões da cartilagem articular com CTM mostram-se vantajosos na produção de proteoglicanos, há

maior marcação com Azul de Toluidina em áreas próximas ao osso subcondral (profundas), provavelmente devido ao influxo de fatores de crescimento provenientes da medula óssea. Há manutenção da metacromasia, comprovando a presença glicosaminoglicanos na matriz extracelular (KOGA et al., 2008^a; KOGA et al., 2008^b; MCILWRAITH et al., 2010), o que não foi observado em G1. Entretanto, Frisbie et al., (2009) em acordo com o presente estudo, não encontraram diferença significativa no conteúdo de glicosaminoglicanos quando comparou grupos tratados e não tratados com células tronco mesenquimais. Além disso, Koga et al., (2008^b) observaram que células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo possuem pouca expressão de proteoglicanos, *in vitro*, quando comparadas a CTM derivadas de medula óssea e membrana sinovial.

A presença de fatores de crescimento em abundância no PRP estimula a produção de proteoglicanos pelos condrócitos e acelera a reparação tecidual (GAISSMAIER et al., 2008), o que esclarece a discreta melhora no aspecto histoquímico dos cortes corados com Azul de Toluidina no G2 e G3. O G2 e o G3 apresentaram melhor produção de proteoglicanos em todas as seções do cortes analisados. Esse aspecto é elucidado pela não abrasão do osso subcondral em T-0, o que não permitiu o influxo de moléculas provenientes da medula óssea que pudessem interferir no processo de reparação, sendo a melhora histoquímica resultante da aplicação terapêutica de PRP. Diversos estudos têm relatado que a presença de fatores de crescimento é essencial na proliferação e na eficácia do tratamento com CTM, fato observado no G3. Apenas com um microambiente favorável, rico em fatores de crescimento e na presença de um arcabouço biocompatível, as CTM conseguem sobreviver e expressar todo potencial necessário para crescer a qualidade de reparação. (WILKE et al., 2007; FRISBIE et al., 2009; FORTIER et al., 2010).

Entendemos que, a marcação pelo Azul de Toluidina no G1 pode ter sido decorrente da menor densidade celular e conseqüentemente, menor produção de matriz extracelular e proteoglicanos, quando comparados ao G2 e G3. O microambiente encontrado na articulação em T-30, rico em moléculas inflamatórias, como a PGE₂, e enzimas catabólicas; somado a não associação de PRP no G1 pode ter resultado na não expressão do total potencial e propriedades das CTM, atuando apenas como fonte celular e expressão

imunomoduladora. As CTM favoreceram o preenchimento da lesão e principalmente realizaram a imunomodulação do líquido sinovial e da inflamação local, impedindo a progressão da doença. Com a não expressão adequada das propriedades inatas das CTM não houve melhora significativa nas análises microscópicas, porém, o G1 ainda apresentou melhor aspecto histopatológico e histoquímico quando comparado ao G4.

Os maiores obstáculos para o sucesso da terapia celular em defeitos condrais estão relatados na literatura. As CTM podem se afastar do leito de implante devido ao escoamento e instabilidade do veículo de implante. Além disso, a inflamação local pode induzir apoptose devido à presença de óxido nítrico, metaloproteinases e citocinas. O microambiente desfavorável pode igualmente resultar em diferenciações das CTM em fibroblastos (VINATIER et al., 2009; KON et al., 2010^a). Todos esses aspectos podem se relacionar com os achados observados no G1 e no G3. Para solucionar esses problemas é recomendado que as CTM sejam implantadas já pré-diferenciadas, em arcabouços ideais, que permitam a adesão, forneçam microambiente adequado e sejam biocompatíveis. Aliado a isso, as CTM devem ser implantadas com uma fonte rica em fatores de crescimento, permitindo sua proliferação e diferenciação (VINATIER et al., 2009; FORTIER et al., 2010), como realizado para o G3. O PRP e as CTM apresentaram resultados favoráveis em todas as análises realizadas e, no aspecto geral, foram melhores quando comparados ao G4 para o tratamento de lesões condrais.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

- a) O tratamento das lesões experimentais com CTM e PRP melhorou o aspecto macroscópico do tecido de reparação em relação ao grupo controle.
- b) O PRP reduziu os escores de claudicação dos animais tratados, sendo clinicamente benéfico no tratamento das lesões experimentais.
- c) Os tratamentos não minimizaram de forma significativa o grau de inflamação articular, observada pelas análises do líquido sinovial e pela concentração de PGE₂ no líquido sinovial.
- d) Os animais tratados demonstraram melhor aspecto histopatológico e histoquímico, com a morfologia mais próxima à cartilagem normal, quando comparados ao grupo controle, principalmente em G2 e G3.
- e) As intervenções cirúrgicas, a indução da lesão condral e artrocenteses repetidas resultaram em inflamação articular significativa.
- f) Cada um dos tratamentos propostos apresentou particularidades e resultados diferentes em cada análise realizada, porém, as CTM, o PRP e a associação destes são, de forma geral, benéficos e eficazes no tratamento de lesões condrais induzidas.
- g) A correta utilização e objetivos definidos tornam essas terapias promissoras no tratamento de lesões articulares no equinos.

Referências

9. REFERÊNCIAS

- AKEDA, K.; AN, H. S.; OKUMA, M.; ATTAWIA, M.; MIYAMOTO, K.; THONAR, E. J-M. A.; LENZ, M. E.; SAH, R. L.; MASUDA, K. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. **OsteoArthritis and Cartilage**, v.14, p.1272-1280, 2006.
- ALBUQUERQUE, D. P.; OLIVEIRA, T. M. F. F.; ALBUQUERQUE, A. W.; FILHO, M.; GUSMÃO, J.A.; SANTOS, E. Aplicação clínico-cirúrgica do plasma rico em plaquetas – Estudo revisonal. **Clín. Científ.** v.7 ,n.2, p.119-122, 2008.
- ANITUA, E.; SÁNCHEZ, M.; NURDEN, A. T.; NURDEN, P.; ORIVE, G.; ANDÍA, I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **TRENDS in Biotechnology**, v.24, n.5, 2006.
- BARREIRA, A. P. B.; **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzidas em eqüinos: Avaliação clínica, ultrasonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.** 2005, 73f. Tese (Doutorado) - Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Unesp, Botucatu.
- BEDI, A.; FEELEY, B. T.; WILLIAMS, R. J. Management of articular cartilage defects of the knee. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v.92, p.994-1009, 2010.
- BERREVOET, F.; HEMPTINNE, B. Clinical application of topical sealants in liver surgery : does it work. **Acta chir. Belg.**, v.107, p.504-507, 2007.
- BERTONE, A. L.; PALMER, J. L; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horse. **Vet. Surg., Ohio**, v.30, n.6, p.528-38, 2001.
- 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 AutologousAdipose-DerivedMesenchymal Stem and Regenerative Cells on Clinical Signs of ChronicOsteoarthritis of the Elbow Joint in Dogs. **Veterinary Therapeutics**, v.9, n.3, 2008.
- BROMMER, H. Functional adaptation of articular cartilage from birth to maturity under the influence of loading: a biomechanical analysis. **Equine Vet J.**, v.37, p.148-154, 2005.
- CARMONA, J. U.; ARGÈLLES, D.; CLIMENT F.; PRADES, M.; SOLER, R.; VIDAL, F.; OROZCO, L. Autologous platelet-rich plasma injected intraarticularly diminished synovial effusion and degree of lameness in horses affected with severe joint disease. In: **14th Annual Scientific Meeting of the European College of Veterinary Surgeons.** 2005, Lyon. Proceedings... France, 2005.

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

CARMONA, J. U.; LOPEZ,C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos obtenidos mediante El método del tubo como tratamiento de artropatías em caballos. **Arch. Med. Vet.**, v.41, p.175-179, 2009.

CARRADE, D. D.; OWENS, D. S.; GALUPPO, L. D.; VIDAL, M. A.; FERRARO, G. L.; LIBRACH, F.; BUERCHLER, S.; FRIEDMAN, M. S.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. **Cytotherapy.**, v.13, n.4, p.419-430, 2011. Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14653249.2010.536213>. Acesso em: 15 mar. 2011.

CARTER, C. A.; JOLLY, D. G.; WORDEN, C. E.; HENDREN, D. G.; KANE, C. J. M. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology.** v.74, p.244–255, 2003.

CARVALHO, A. M. **Implante autólogo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no tratamento de tendinitis experimentais em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica, histopatológica e imunoistoquímica.** 2009. 135f. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CHAPARRO, M. B. **Avaliação da dor no pós-operatório de artroscopia em equinos.** 2008. 71f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2008.

DE GRAUW, J. C.; VAN DE LEST, C. H. A.; VAN WEEREN, R.; BROMMER, H.; BRAMA, P. A. J. Arthrogenic lameness of the fetlock: synovial fluid markers of inflammation and cartilage turnover in relation to clinical joint pain. **Equine vet. J.**, v.38, n.4, p.305-311, 2006.

DE UGARTE, D. A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P.A.; ZHU, M.; DRAGOO, J.L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM,P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M.H. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. **Cells Tissues Organs.** v.174, n.3, 2003.

DEL BUE, M. RICCÓ, S.; RAMONI, R.; CONTI, V.; GNUDI, G.; GROLLI, S. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. **Vet. Res. Commun.**, v.32, n.1, p.51-55, 2008.

DRENGK, A.; ZAPF, A.; STÜRMER, E. K.; a KLAUS MICHAEL STÜRMER, K. M.; FROSCH, K-H. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. **Cells Tissues Organs.**, v.189, p.317-326, 2009.

ELDER, S. H.; Cooley, Jr., A. J.; Borazjani, A.; Sowell, B. L.; To, H.; Tran, S. C. Production of hyaline-like cartilage by bone marrow mesenchymal stem cells in a self-assembly model. **TISSUE ENGINEERING: Part A.**, v.15, n.10, 2009.

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. **J Periodontol.**, v.78, n.4, p.661-669, 2007.

EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J. P. A. M.; HOFFMANN, J.; PVERDEVEST, E. P.; BOX, H. A. M.; VAN ZUNDERT, A. Platelet rich plasma and platelet gel, A review. **J Extra Corpor Techn.** v.38, n.2, p.174-187, 2006.

FORTIER, L. Clinical use of stem cells in cartilage repair. **Osteoarthritis and Cartilage.** In: Abstracts of ICRS. 15., Proceedings...2007, Marsaw, Poland. S.B. Extended Abstracts. Poland, 2007. v.15, p. 55-56.

FORTIER, L.; POTTER H. G.; RICKEY, E.J.; SCHNABEL, L. V.; FOO, L. F.; CHONG, L. R.; STOKOL, T.; CHEETHAM, J.; NIXON, A.J. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in equine model. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.92, p.1927-37, 2010.

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**, v.37, n.11, p.2259-2272, 2009.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY – SHAPIRO II; PETROKOVA, K. V. Osteogenesis in transplant of bone marrow cells. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 16p, p.381-90, 1966.

FRISBIE, D. D.; Ghivizzani S. C.; Robbins, P. D.; Evans, C. H.; McIlwraith, C. W. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. **Gene Ther.**, v.9, n.1, p.12-20, 2002.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; WERPY, N. M.; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of bone marrow derived stem cells and adipose derived stromal vascular fraction for treatment of osteoarthritis using an equine experimental model. In: **American Association of Equine Practitioners Annual Convention**, v.52, 2006, Texas. Proceedings... San Antonio – Texas, 2006.

- FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; WERP, N. M.; PARK, R. D.; MCILWRAITH, C. W. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. **Am J Vet Res.**, v.68, n.3, p.290-296, 2007.
- FRISBIE, D. D.; KISIDAY, J. D.; KAWCAK, C. E.; WERP, 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.**, p.1675-1680, 2009.
- FRISBIE, D. D.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E.; RODKEY, W. G.; STEADMAN, J. R.; HOWARD, R. D.; PARK, R. D.; MCILWRAITH, C. W. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. **Veterinary Surgery.**, v.28, p.242-255, 1999.
- GAISSMAIER, C.; KOH, J. L.; WEISE, K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. **Injury, Int. J. Care Injured.** v.39, n.1, p.88-96, 2008.
- GIMBLE, G. M.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, v.5, n.5, p.362-369, 2003.
- GOBBI, A.; KARNATZIKOS, G.; SCOTTI, C.; MAHAJAN, V.; MAZZUCCO, L.; GRIGOLO, B. One-step cartilage repair with bone marrow aspirate concentrated cells and collagen matrix in full-thickness knee cartilage lesions: results at 2 year follow up. **Cartilage.**, 2011.
- GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in horse – A review. **The Vet. Journal.** v. 171, p.51-69, 2006.
- GOODSHIP, A. An introduction to the state of stemcell therapy in clinical orthopaedics. In: **ESVOT Congress, Munique, Proceedings...**Munique. Setembro, 2004.
- HALEEM, A. M.; EL SINGERGY, A. A.; SABRY, D.; ATTA, H. M.; RASHED, L. A.; CHU, C. R.; EL SHEWY, M. T.; AZZAM, A.; AZIZ, M. T. A. 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.** v.1, n.4, p.253–261, 2010.
- HALEEN A. M.; CHU, C. R. Advances in tissue engineering techniques for articular cartilage repair. **Oper Tech Orthop** v. 20, p.76-89, 2010.
- HARDY J.; BERTONE, A. L.; WEISBRODE, S. E.; MUIR, W. W.; O'DORISIO T. M.; MASTY, J. Cell trafficking, mediator release, and articular metabolism in acute inflammation of innervated or denervated isolated equine joints. **Am. J. Vet. Res.** Ohio, v.59, n.1, p.88-100, jan, 1998.

- HAUPT, J. L.; FRISBIE, D. D.; MCILWRAITH, C. W. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. **Journal of Orthopaedic Research**. v.23, p.118-126, 2005.
- HEGEWALD, A. A.; RINGEA, J.; BARTEL, J.; KRÜGER, I.; NOTTER, M.; BARNEWITZ, D.; KAPS, C.; SITTINGER, M. Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. **Tissue and Cell**, Berlin, v.36, p.431–438, 2004.
- HOEMANN, C.; KANDEL, R.; ROBERTS, S.; SARIS, D. B. F.; CREEMERS, L.; MAINIL-VARLET, P.; MÉTHOT, S.; HOLLANDER, A. P.; BUSCHMANN, M. D. International cartilage repair society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. **Cartilage**, v.2, n.2, p.153-172, 2011.
- HURTIG, M. B.; FRETZ, P. B.; DOIGE, C. E.; SCHNURR, D. L. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. **Can J Vet Res.**, v.52, p.137-146, 1988.
- HURTIG, M.B.; BUSCHMANN, M.D.; FORTIER, L.A.; HOEMANN, C.D.; HUNZIKER, E.B.; JURVELIN, J.S.; VARLET, P.M.; MCILWRAITH, C.W.; SAH, R.L.; WHITESIDE, R.A. Preclinical studies for cartilage repair: recommendations from the international cartilage repair society. **Cartilage**, v.2, n.2, p.137 –152, 2011.
- HURTIG, M.B.; FRETZ, P.B.; DOIGE, C.E.; SCHNURR, D.L. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. **Can J Vet Res.** v.52, p.137-146, 1999.
- JAIN, N. J. **Essentials of Veterinary Hematology**. P.A. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993. 417p.
- JAMES D. KRETLOW, J. D.; SPICER, P. P.; JANSEN, J. A.; VACANTI, C. A.; KASPER, K.; MIKOS, A. G. Uncultured marrow mononuclear cells delivered within fibrin glue hydrogels to porous scaffolds enhance bone regeneration within critical-sized rat cranial defects. **Tissue engineering: Part A**, v.16, n.12, p.3555-3568, 2010.
- KHAN, W. S.; JOHNSON, D. S.; HARDINGHAM, T. E. The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. **The Knee**, p.1-6, 2009.
- KIRKER-HEAD C.A., CHANDNA V.K., AGARWAL R.K., et al. Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. **Am. J. Vet. Res**, v.61, n.6, p.714-718, 2000.

KISIDAY, J. D.; KOPESKY, P. W.; EVANS, C. H. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. **Journal of Orthopaedic Research**, 2008. Disponível em: in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jor.20508. Acesso em: Nov. 2007.

KOCH, T. G.; BERG, L. C.; BETTS, D. H. Current and future regenerative medicine — principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. **C. J. V.**, v.50, 2009.

KOGA, H.; MUNETA, T.; NAGASE, T.; NIMURA, A.; JU, Y-J.; MOCHIZUKI, T.; SEKIYA, I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. **Cell Tissue Res.**, p.207-215, 2008^a.

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**, v.10 n.4, p.1-10, 2008^b.

KON, E.; BUDA, R.; FILARDO, G.; Di Martino, A.; Timoncini, A.; Cenacchi, A.; Fornasari, P. M.; Giannini, S.; Marcacci, M. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. **Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.**, v.18, p.473-479, 2010^a.

KON, E.; MUTINI, A.; ARCANGELI, E.; DELCOGLIANO, M.; .; FILARDO, G.; ALDINI, N. N.; PRESSATO, D.; QUARTO, R.; ZAFFAGNINI. S.; MARCACCI, M. Novel nanostructured scaffold for osteochondral regeneration: pilot study in horses. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.**, v.4, p.300-308, 2010^b.

KRETLOW, J.D.; SPICER, P.P.; JANSEN, J.A.; VACANTI, C.A.;KASPER, F.K.; MIKOS, A.G. uncultured marrow mononuclear cells delivered within fibrin glue hydrogels to porous scaffolds enhance bone regeneration within critical-sized rat cranial defects. **Tissue engineering: Part A**, v. 16, n.12, p.3555-3568, 2010.

KURODA, R.; ISHIDA, K.; MATSUMOTO, T.; AKISUE, T.; FUJIOKA, H.; MIZUNO, K.; OHGUSHI, H.; WAKITANI, S.; KUROSAKA, M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. **OsteoArthritis and Cartilage.**, v.15, p.226-231, 2007.

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

LEY, C.; EKMAN, S.; ELME, A.; NILSSON, G.; ELORANTA, M. L. Interleukin-6 and Tumour Necrosis Factor in Synovial Fluid from Horses with Carpal Joint Pathology. **J. Vet. Med. A.** v.54, p.346–351, 2007.

LOPEZ-VIDRIERO, E.; GOULDING, K.A.; SIMON, D.A.; SANCHEZ, M.; JOHNSON, D.H. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. **The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**. v.26, n.2, p.269-278, 2010.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica**. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

HURTIG, M. B.; BUSCHMANN, M. D.; FORTIER, L. A.; HOEMANN, C. D.; HUNZIKER, E. B.; JURVELIN, J. S.; MAINIL-VARLET, P.; MCILWRAITH, C. W.; SAH, R. L.; WHITESIDE, R. A. Preclinical studies for cartilage repair : recommendations from the international cartilage repair society. **Cartilage**, v.2, n.2, p.137-152, 2011.

MARTINS, E. A. N.; SILVA, L. C. L. C.; BACCARIN, R. Y. A. Evaluation of the synovial fluid of the femuropatellar joint after experimental medial patellar desmotomy in horses. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.784-788, 2007.

MARX, R. E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v.62, p.489-496, 2004.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EISCHTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surgery, Oral Medicine, **Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.85, p.638-646, 1998.

MAY, S.A.; HOOKE, R.E.; PEREMANS, K.Y.; VERSCHOOTEN, F. Prostaglandin E2 in equine joint disease. **Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.** v.63, n.6, p.187-191, 1994.

MAZZUCCO, L.; BALBO, V.; CATTANA, E. GUASCHINO, R.; BORZINI, P. Not every PRP-gel is born equal Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet®, RegenPRP-Kit®, Plateltex® and one manual procedure. **Vox Sanguinis**.v.97, n.2, p110-118, 2009.

McCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal Growth Factor Release from Platelet-Rich Plasma, Trehalose Lyophilized Platelets, and Bone Marrow Aspirate and Their Effect of Tendon and Ligament Gene Expression. **Journal of Orthopaedic Research**. v.27, p.1033-1042, 2009.

McILWRAITH, C. W. **Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse**. 3a ed. Mosby-Elsevier, 2005^b. 479p.

McILWRAITH, C. W. From arthroscopy to gene therapy – 30 years of looking in joints. In: **American association of equine practitioners annual convention**, v.51, Colorado. Proceedings ... Colorado, 2005^a.

- McILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KISIDAY, J. D.; KAWCAK, C. E.; WERP, N. M.; RODKEY, W. G.; STEADMAN, R. S. Use of bone marrow-derived culture-expanded mesenchymal stem cells to augment healing of chondral defects treated with microfracture. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP** – Baltimore, MD, USA. v.56, p.27-28, 2010.
- MILANO, G.; SANNA PASSINO, E.; DERIU, L.; GAREDDU, G.; MANUNTA, A.; SACCOMANNO, M. F.; FABBRICIANI, C. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.971-980, 2010.
- MOROZ, A.; BITTENCOURT, R.A.C.; FELISBINO, S.L.; PEREIRA, H. R.; FERREIRA, R.R.; DEFFUNE, E. Gel de plaquetas, arcabouço 3D para cultura celular. **Acta Ortop Bras**. v. 17, n.2, p.43-45, 2008.
- MURPHY, J. M.; FINK, D. J.; HUNZIKER, E. B.; BARRY, F. P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**. v.48, n.12, p.3464–3474, 2003.
- NESIC, D.; WHITESIDE, R.; BRITTBERG, M.; WENDT, D.; MARTIN, I.; MAINIL-VARLET, P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V.58, p.300-322, 2006.
- NISHIMOTO, S.; OYAMA, T.; MATSUDA, K. Simultaneous concentration of platelets and marrow cells: A simple and useful technique to obtain source cells and growth factors for regenerative medicine. **Wound Rep.Reg**. v.15, p.156-162, 2007.
- NÖTH, F.; STEINERT, A. F.; TUAN, R. S. Technology Insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v.4, n.7, p.371-380, 2008.
- OKUDA, K.; KAWASE, T.; MOMOSE, M.; MURATA, M.; SAITO, Y.; SUZUKI, H.; WOLFF, L. F.; YOSHIE, H. Platelet-Rich Plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. **J. Periodontol**. v.74, p.849-857, 2003.
- PALMER, J. L.; BERTONE, A. L. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. **Equine Veterinary Journal**, v.26, n.4, p.263-277, 1994.
- PARRY, B.W. Miscellaneous laboratory techniques. In: PRATT, P.W. (ed.). **Laboratory procedures for veterinary technicians**. St. Louis: Mosby, 1997. Cap.12, p.561-626.
- PLAGIOSA, G. M.; ALVES, G. E. S. Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos, **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1202-1205, 2007.

POZZOBON, R.; BRASS, K. E.; FIGHERA, R. A.; DE LA CORTE, F. D. Características físico-químicas e citológicas do líquido sinovial de pôneis com modelo de sinovite induzida. **Ciência Animal Brasileira.**, v.10, n.4, p.1303-1309, 2009.

RADCLIFFE, C. H.; FLAMINIO, M. J. B. F.; FORTIER L. A.; Temporal Analysis of Equine Bone Marrow Aspirate During Establishment of Putative Mesenchymal Progenitor Cell Populations. **Stem Cells and Development.** v.19, n. 2, p.269-282, 2010.

RAHEJA, L. F.; GALUPPO, L. D.; BOWERS-LEPORE, J.; DOWD, J. P.; TABLIN, F.; YELOWLEY, C. E. Treatment of Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage Fissures in a Horse Using Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. **Journal of Equine Veterinary Science.**, v.31, n.3, p.147-154, 2011.

RASERA, L. **Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de pólo.** 2007, 158f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RASERA, L.; MASSOCO, C. O.; LANDGRAF, R. G.; BACCARIM, Y. A. Exercise induced apoptosis and necrosis in the synovial fluid cells of athletic horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.5, p.231-236, 2008.

RICHARDSON, S. M.; HOYLAND, J. A.; MOBASHERI, R.; CSAKI, C.; SHAKIBAEI, M.; MOBASHERI, A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering. *J. Cell. Physiol.*, v.222, p.23-32, 2010.

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

ROSSETTI, R. B. **Comparação da resposta inflamatória articular decorrente da distensão líquida ou gasosa em eqüinos submetidos a exame artroscópico.** 2006. 110f. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

ROUSSY, Y.; DUCHESNE, M. B.; GAGNON, G. Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. **Clin. Oral Impl. Res.** v.18, p.639-648, 2007.

SÁNCHEZ, M.; AZOFRA, J.; ANITUA, E.; ANDÍA, I.; PADILLA, S.; SANTISTEBAN, J.; MUJICA, I. Plasma Rich in Growth Factors to Treat an Articular Cartilage Avulsion: A Case Report. **Medicine & science in sports & exercise.**, p.1648-1652, 2003.

SCHÄFFLER A., BÜCHLER C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells**. v.25, p.818-827, 2007.

SCHLUETER, A. E.; ORTH, M. W. Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. **Equine and Comparative Exercise Physiology**. Michigan v.1, n.4, p.221–231, 2004.

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

STEEL, C. M. Equine synovial fluid analysis. **Vet Clin Equine** v. 24, n.1, p.437–454, 2008.

SUTTER, W. W. Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v.6, n.3, p.198-208, 2007.

SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P.; GENT, T.; FREEMAN, S.; FOSTER, N.; BARRET-JOLLEY, R.; MOBASHERI, A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. **The Veterinary Journal**., v.179, p.10-24, 2009.

TAPP H.; HANLEY E. N. J.; PATT J.C.; GRUBER, H. E. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. **Experimental Biology and Medicine**. v. 234, p.1-9, 2009.

TAYLOR, S. E.; SMITH, R. K. W.; CLEGG, P. D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction. **Equine. Vet. J.** v.32, n.2, p.172-180, 2007.

VAN DEN BOOM, R.; BRAMA, P.; KIERS, G.; DE GROOT, J.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, R. The influence of repeated arthrocentesis and exercise on matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor α activities in normal equine joints. **Equine Veterinary Journal**, v.36, p.155-159, 2004.

VAN DEN DOLDER, J.; MOOREN, R.; VLOON, A.P.G.; STOELINGA, P. J. W.; JANSEN, J. A. Platelet-Rich Plasma: Quantification of Growth Factor Levels and the Effect on Growth and Differentiation of Rat Bone Marrow Cells. **Tissue Engineering**. v.12, n.11, p.3067-3073, 2006.

VEIGA, A. C. R. **Estudo retrospectivo de casuística, abrangendo metodologia diagnóstica da osteoartrite em equinos**. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

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. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.33, n.1, 2006.

VIDAL, M. A. **Characterization and comparison of cell frequency, growth, and multipotential differentiation of adult mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and adipose tissue.** 2007. 193f. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

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.

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.** v. 55. n.11, p. 1294-1299, 1997.

WILKE, M. M.; NYDAM, D. V.; NIXON, A. J. Enhanced early Chondrogenesis in articular defect following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in a equine model. **Journal of Orthopaedic Research.**, v.25, n.7, p.914-925, 2007.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. D.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering.**, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

TRABALHO CIENTÍFICO

“AVALIAÇÃO ARTROSCÓPICA E ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL EM LESÕES CONDRAIS EXPERIMENTAIS TRATADAS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E PLASMA RICO EM PLAQUETAS”

Ana Lúcia Miluzzi Yamada, Armando de Mattos Carvalho, Patrícia Galvão Gomes de Oliveira, Sérgio Felisbino, Diana Leocata de Queiroz, Marcos Jun Watanabe, Carlos Alberto Hussni, Ana Liz Garcia Alves.

ARTIGO ESCRITO PARA:

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

POLÍTICA EDITORIAL

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Reprodução de artigos publicados: A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Tipos de artigos aceitos para publicação: *Artigo científico:* É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15. *Relato de caso:* Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10. *Comunicação:* É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

Preparação dos manuscritos para publicação: Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa. Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho: Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos. Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail. Resumo e Abstract. Devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial

às conclusões. Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco. Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho. Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança. Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados. Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto. Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada. Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final. Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg. Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados. Referências bibliográficas. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Citações bibliográficas Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- Autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88).
- Dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974).
- Mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979).

• Mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano. Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada. Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado. Referências bibliográficas São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos:

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa:

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14.1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos:

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-Related-Articles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de publicação: *Taxa de submissão:* A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente trabalhos com taxa paga de submissão serão avaliados. *Taxa de publicação:* A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

**“PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DE LESÕES
CONDRAIS ARTICULARES INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM
EQUINOS: AVALIAÇÃO CLÍNICA, MACROSCÓPICA, HISTOLÓGICA E
HISTOQUÍMICA.”**

**“Platelet-Rich Plasma in the treatment of articular chondral defects
experimentally induced in horses: Clinical, Macroscopic, histopathological and
histochemical evaluation.”**

Ana Lucia Miluzzi Yamada¹; Armando de Mattos Carvalho¹; Patrícia Galvão Gomes de
Oliveira¹; Sérgio Luis Felisbino²; Diana Leocata de Queiroz³; Marcos Jun Watanabe⁴;
Carlos Alberto Hussni⁴; Ana Liz Garcia Alves⁴.

¹ Doutorandos, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP- Botucatu,
SP – Brasil.

² Docente do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade
Estadual Paulista, UNESP- Botucatu, SP – Brasil.

³ Aluna de Graduação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade
Estadual Paulista, UNESP- Botucatu, SP – Brasil.

⁴ Docentes Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP- Botucatu,
SP – Brasil.

Autor para Correspondência: Ana Lúcia Miluzzi Yamada, Hospital Veterinário,
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Distrito de Rubião Júnior, sem
número, CEP 18618-000, Botucatu, SP –Brasil. Telefone: (55) (14) 3811-6118 Fax:
(55) (14) 3811-6072 e-mail: anamyamada@fmvz.unesp.br

RESUMO

O plasma rico em plaquetas (PRP) vem sendo utilizado na reparação condral articular
por disponibilizar grande concentração local de fatores de crescimento. Este composto
biológico proporciona rapidez e qualidade de reparação, através de suas propriedades

quimiotáticas, mitogênicas e anti-inflamatórias. Esse trabalho estudou a eficácia do PRP no tratamento de lesões condrais articulares, experimentalmente induzidas em equinos. Para isso, foi induzida uma lesão condral, na tróclea medial femoral dos dois membros pélvicos de quatro animais. Após 30 dias da indução, as oito articulações foram divididas em dois grupos: o Grupo 1 recebeu o tratamento intralesional e intra-articular com PRP e o Grupo 2 foi tratado apenas com solução fisiológica. As avaliações clínicas, constituídas de exames de claudicação e análises do líquido sinovial, foram realizadas antes da indução da lesão (tempo zero), quinzenalmente até 120 dias e aos 150 dias. Avaliações macroscópicas, histopatológicas e histoquímicas foram realizadas no tempo zero e aos 150 dias. No decorrer do experimento, o Grupo 1 apresentou melhora do grau de claudicação quando comparado ao Grupo 2. Os exames macroscópicos, histopatológicos e histoquímicos revelaram um melhor tecido de reparação igualmente no Grupo 1. Sendo assim, a administração de PRP apresentou efeitos benéficos no tratamento de lesões condrais experimentais de equinos.

Palavras-chave: Articulação; Artrosopia; Células Tronco; Equino; Plasma Rico em Plaquetas.

ABSTRACT

The platelet-rich plasma (PRP) has been used to repair articular chondral defects by providing high local concentration of growth factors. This biological compound enhances the tissue repair, through its chemotactic properties, mitogenic and anti-inflammatory effect. This work aims to study the use of PRP in the treatment of articular cartilage defects induced experimentally in horses. For this purpose, both patellofemoral joints of four animals were approached by arthroscopic surgery to perform a cartilage defect, on the medial femoral trochlea. After 30 days of induction the eight joints were divided into two groups: Group 1 received treatment intralesional and intra-articular with PRP and Group 2 was treated only with saline solution. The clinical assessments, constituted by lameness signs and synovial fluid analysis, were performed before induction of injury (time zero) and every 15 days in 120 days, with last analysis in day 150. The macroscopic and morphologic analyses were performed at 0 and 150 day. During the experiment, the Group 1 showed improvement in lameness when compared to Group 2. The macroscopic and morphological analyses showed a

better tissue repair in the treated Group. Thus, the implantation of autologous PRP showed beneficial effects in the treatment of chondral lesions, experimentally induced in horses.

Keywords: Arthroscopy; Horse; Joint; Platelet Rich Plasma; Stem Cells.

INTRODUÇÃO

A osteoartrite é definida como uma desordem das articulações, considerando um grupo de distúrbios que resultam em um final comum: deterioração progressiva da cartilagem articular, acompanhada de alterações ósseas e de tecidos moles. Em estágios mais avançados, a osteoartrite é caracterizada por grande perda da integridade condral, resultando em dor, deformações ósseas, esclerose subcondral, redução da mobilidade e da função articular. Em cavalos de esportes e na osteoartrite a cartilagem articular é intensamente danificada (Schlueter & Orth, 2004; Mcilwraith, 2005^a). Na osteoartrite são encontrados diversos mediadores pró-inflamatórios catabólicos. Tais mediadores são determinantes no desenvolvimento da doença e compõem um importante método de avaliação do grau de implicação articular (Bertone et al., 2001; Sutton et al., 2009). As interleucinas são responsáveis pelo aumento de prostaglandinas no líquido sinovial, estas causam a sensibilização de terminações sensoriais nervosas, aumento da dor e degradação da matriz extracelular do tecido condral (Schlueter & Orth, 2004).

A ausência de vasculatura, que resulta no não fornecimento para o tecido de células progenitoras provenientes do sangue, e o lento mecanismo de “turnover” da cartilagem articular implicam em mecanismos de reparação insatisfatórios, com formação exclusiva de tecido fibrocartilagenoso e manutenção da inflamação articular (Schlueter & Orth, 2004; Mcilwraith, 2005^a). Diversas técnicas cirúrgicas e terapias medicamentosas que recuperem a integridade estrutural e funcional da cartilagem hialina articular são pesquisadas, mas ainda sem o completo sucesso (Schlueter & Orth, 2004; Mcilwraith, 2005^a). O tratamento de lesões condrais com plasma rico em plaquetas (PRP) demonstra ser promissor, com resultados satisfatórios representa uma alternativa terapêutica (Vinatier et al., 2009; Carmona et al., 2011).

O PRP é um biomaterial autólogo, rico em fatores de crescimento, com ação quimiotática, mitogênica, angiogênica, analgésica e antiinflamatória. Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, concentradas no PRP, exercem grande influência

no processo de reparação e cicatrização, sendo uma ferramenta de grande utilidade no auxílio ao tratamento de enfermidades ortopédicas (Maia, 2008; Carmona et al., 2011). A obtenção do PRP é relativamente simples e não onerosa. Consiste, basicamente, em centrifugações do sangue total. Diversos fatores de crescimento são capazes de acelerar e modular os processos de reparação, atuando na proliferação celular, diferenciação e formação de matriz extracelular (Carmona et al, 2009; Fortier et al., 2010). Acredita-se que o PRP seja ainda capaz de bloquear a expressão de fatores nucleares e a ação de moléculas pró-inflamatórias, como as interleucinas, atuando de forma antiinflamatória e analgésica (El-Sharkawy et al., 2007). A aplicação intralesional ou intra-articular do PRP reduz os sinais clínicos da osteoartrite, acelera a reparação e não apresenta nenhum tipo de efeito indesejável (Carmona et al., 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu (Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária) e no Instituto de Biociências (IB), UNESP, Campus de Botucatu (Departamento de Imunologia e Departamento de Histologia). A metodologia adotada durante o desenvolvimento do presente trabalho foi aprovada pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, em 17 de Dezembro de 2008, sob protocolo 256/2008.

Foram utilizados quatro equinos adultos, clinicamente hígidos, com três a quatro anos de idade, divididos em dois grupos (Grupo 1 – G1 e Grupo 2 – G2). As articulações femoropatelares de ambos os membros pélvicos (direito e esquerdo) desses animais foram abordadas por cirurgia artroscópica para a realização de um defeito condral e submetidas a tratamento conforme o grupo: G1 receberam implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) de forma intralesional e injeções intra-articulares. O G2 foi o grupo controle do experimento, tratado apenas com solução fisiológica, seguindo os mesmos procedimentos realizados para o G1.

O procedimento artroscópico para a indução das lesões condrais foi considerado como tempo zero do experimento (T-0). Foram estabelecidos dois portais, de acordo com a técnica descrita por McIlwraith (2005^b). Pelo portal artroscópico primário foi

inserida a óptica para inspeção articular, e, pelo portal instrumental foi realizada a lesão condral, o implante dos tratamentos e a coleta das amostras para os exames histopatológicos e histoquímicos. A lesão condral foi realizada na tróclea medial do fêmur, o mais proximal possível e evitando o sulco intertroclear, criada com o auxílio de brocas motorizadas, com desgaste suficiente para obter a dimensão da lesão condral desejada. As lesões foram induzidas apenas retirando totalmente a cartilagem hialina, não havendo abrasão, perfuração ou sangramento do osso subcondral, e apresentavam um centímetro de diâmetro.

O PRP foi processado conforme Vendramin et al. (2006). Foram coletados 80 mL de sangue dos dois eqüinos de G1 através da venopunção jugular, acondicionados em tubos com citrato de sódio a 3,8% e submetidos a duas centrifugações seriadas com crescente velocidade de rotação. O PRP deve possuir uma contagem igual ou maior que 300.000 plaquetas/ μ L para a viabilidade de utilização, verificado por contagem microscópica em câmara de Neubauer espelhada. O procedimento artroscópico para o tratamento intralesional foi realizado 30 dias após (T-30) a indução das lesões em T-0. Em T-30, no G1 os tratamentos foram realizados com o PRP em forma de gel, permitindo a fixação do tratamento no leito receptor. Para isso, no momento da aplicação foi adicionado ao PRP 5% de cloreto de cálcio²⁶ a 10% e 5% de trombina bovina²⁷ para formação do gel de fibrina e ativação plaquetária. A articulação em T-30 foi insuflada com gás carbônico ao invés de fluido estéril, permitindo assim o implante do gel. As outras aplicações de PRP foram realizadas através de injeções intra-articulares, na articulação femoropatelar, entre o ligamento patelar médio e patelar medial, com uma seringa descartável portando 10 mL de plasma rico em plaquetas para cada articulação, em forma líquida, sem a adição de trombina. As aplicações intra-articulares foram realizadas a cada 15 dias após T-30, em um total de três aplicações (T-45, T-60 e T-75).

A coleta do líquido sinovial para as análises foi realizada em T-0, T-15, T-30, T-45, T-60, T-75, T-90, T-120 e T-150 para os dois grupos. O líquido sinovial foi coletado da articulação femoropatelar, entre o ligamento patelar médio e patelar medial, depositado em frascos com EDTA e sem EDTA para todas as análises realizadas. A

²⁶ Calcium Chloride Solution, Sigma – Aldrich, Sigma Life Science, Brasil.

²⁷ Thrombin from bovine plasma, lyophilized powder, 600-2,000 NIH units/mg protein (biuret) - Aldrich, Sigma Life Science, Brasil

análise do líquido sinovial foi dividida em quatro categorias: exame físico, exame químico, exame citológico e quantificação de prostaglandina E₂ (PGE₂). No exame físico, o aspecto e a viscosidade do líquido sinovial foram avaliados no momento da coleta. No exame químico, foram avaliadas, com fitas reagentes de teste rápido²⁸, a quantidade de proteína e a glicose. Ainda no exame químico, o fibrinogênio foi dosado pelo método de Jain (1993). No exame citológico foi efetuada a contagem global e diferencial de células nucleadas. Os leucócitos foram quantificados em porcentagens.

A determinação da concentração da prostaglandina E₂ (PGE₂) sinovial foi realizada através de teste imunoenzimático utilizando um “kit” ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) comercial²⁹, de acordo com as instruções observadas na bula do produto. A absorbância foi lida em comprimentos de 450 nm em leitor de microplaca ELISA, e sendo correlacionada a um padrão com variação de 18 a 2500 pg/mL. As amostras que se apresentaram fora dessa faixa de resultados foram re-analizadas após nova diluição. A curva de regressão da análise e a conversão das densidades ópticas obtidas na leitura foram realizadas com o auxílio de um software³⁰.

Os grupos foram avaliados clinicamente, imediatamente antes da realização do defeito de cartilagem por artroscopia (T-0) e em T-15, T-30, T-45, T-60, T-75, T-90, T-120 e T-150, quanto à claudicação, graduada em escores de 0 a 5 segundo Stashak (2006). Foram realizados testes de flexão forçada na articulação femorotibiopatelar nos dois grupos. Havendo exacerbação da claudicação após a flexão, era realizada uma nova graduação do escore. No procedimento artroscópico de T-0 e T-150 do experimento os dois grupos foram abordados para a avaliação macroscópica da cartilagem articular. Em T-150, na região onde foi realizada a lesão condral, foram avaliadas as superfícies articulares (cartilagem) da tróclea medial do fêmur, quanto ao aspecto geral da superfície cartilaginosa, aspecto do tecido cicatricial, além da palpação local indireta com um obturador rombo, verificando a consistência do tecido neoformado. Nesses mesmos momentos foram realizadas as coletas de amostras para as análises histopatológicas e histoquímicas.

²⁸ Combur 10 Test M, Cobas, Roche, Brasil.

²⁹ Kit Parameter™ PGE₂, PGE₂ Assay. R&D Systems, Inc. Minneapolis, EUA. Distribuído por LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil.

³⁰ Instat Graph Pad Instat.

Para a realização das análises histopatológica e histoquímica, os cortes foram processados pelas técnicas habituais de desparafinização e corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (H&E), Picrosírius Red e Azul de Toluidina. A análise das lâminas foi realizada por microscopia óptica e em microscópio de polarização para as lâminas coradas com Picrosirius, sem o prévio conhecimento dos grupos a que pertenciam cada lâmina. Para a avaliação das alterações histopatológicas e histoquímicas da reparação da cartilagem lesada foram considerados os seguintes aspectos: predominância de condrócitos, organização celular e tecidual da cartilagem, qualidade da matriz extracelular, presença de fibras colágenas e fibrose (Wilke et al., 2007).

As análises estatísticas foram realizadas separadamente, comparando os grupos dentro de cada tempo e os tempos dentro de cada grupo. Para as aferições numéricas (contagem de células nucleadas, contagem relativa de mononucleares, linfócitos e neutrófilos) foi realizada, de forma separada, a análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two Way Repeated Measures ANOVA) e o Teste de Tukey para comparação de médias, sendo que as médias foram inseridas nas tabelas e os valores de p nas legendas das mesmas. Para as aferições em escores (proteína, fibrinogênio e claudicação) foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis comparando individualmente os tratamentos em cada tempo e separadamente, comparando os tempos dentro de cada tratamento. Quando houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) foi realizado o Teste de Tukey para comparação das medianas, sendo que, neste caso, os valores de p estão inseridos nas tabelas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo não foi adotada a lesão do osso subcondral, sendo apenas exposta a sua superfície. A perfuração ou abrasão do osso subcondral induz a migração de células e dos fatores de crescimento provenientes da vasculatura subcondral e da medula óssea para o local da lesão, além disso, facilita a adesão do coágulo de fibrina (Vinatier et al., 2009; Fortier et al., 2010). Sendo assim, a perfuração do osso subcondral nesse estudo iria, de forma significativa, interferir na avaliação dos efeitos do tratamento proposto, sendo, portanto invariavelmente evitada.

A média de plaquetas quantificadas no PRP foi de 362.350 plaquetas/ μ L, o que representou uma taxa de enriquecimento plaquetário médio de 106,5% ou um aumento de duas vezes a concentração de plaquetas do sangue total para o PRP. Concentrações acima de 500.000 plaquetas/ μ L ou um enriquecimento três vezes superior aos valores plaquetários basais, como recomenda parte da literatura, não foram alcançadas (Marx et al., 1998; Maia, 2008). A utilização do PRP durante o experimento foi viabilizada já que concentrações maiores ou iguais a 300.000 plaquetas/ μ L são adequadas para equinos, expressando uma concentração suficiente de fatores de crescimento e sendo eficazes quando utilizado em diferentes terapias (Foster et al., 2009; Mccarrel & Fortier, 2009; Carmona et al., 2011).

A aplicação intralesional dos tratamentos em T-30 foi realizada com o auxílio de agulha modelo Komiyashiki 11G. Essa agulha permitiu a adequada aplicação do composto em fase final de gelificação. Desse modo, não foram observadas obstruções da agulha pelo tratamento já gelificado ou aplicação exacerbada do implante fora do local da lesão, além disso, esse modelo de agulha possui, sem o trocater, a ponta romba e não ocasionou danos adicionais na cartilagem articular. A distensão articular com gás carbônico permitiu, de forma satisfatória, a fixação do gel no leito receptor.

A utilização de 5% de cloreto de cálcio a 10% e a utilização de um ativador de fibrina igualmente a 5% na amostra previamente separada para o tratamento, foi suficiente para a formação e adesão do gel de fibrina. A adição de trombina ao PRP resultou na polimerização do fibrinogênio em fibrina, que é uma proteína adesiva (Roussy et al., 2007). O cloreto de cálcio demonstrou ser um fraco ativador plaquetário. Sua principal função é antagonizar o anticoagulante utilizado, permitindo a formação do gel. Já a trombina é um potente ativador, degranulando a maior parte dos grânulos intraplaquetários, que liberam todo o seu conteúdo (Everts, 2006). O gel de PRP, formado a partir da adição de trombina, tem sido utilizado com arcabouço tridimensional em tratamentos de lesões da cartilagem articular. A facilidade de aplicação, a polimerização e a elevada aderência no local da lesão são vantagens apresentadas na utilização desse gel. Além disso, o gel reúne uma variedade de fatores de crescimentos, que favoreceram a diferenciação condrogênica (Wilke et al., 2007).

Os benefícios da aplicação intralesional e intra-articular de PRP refletiram-se na redução dos sinais clínicos associados à osteoartrite. O G1 apresentou menores escores

de claudicação quando comparado ao G2 (Tab. 01), mesmo após a flexão forçada ($p < 0,05$). Ambos os grupos apresentaram aumento da claudicação após a flexão forçada. Carmona et al., (2009) observaram melhora no grau de claudicação em animais portadores de artropatias após a terceira aplicação intra-articular de PRP. Em acordo com o estudo citado anteriormente, G1 apresentou melhora evidente de claudicação após a segunda aplicação de PRP intra-articular, realizadas em T-45, T-60 e T-75. Injeções intraarticulares de plasma rico em plaquetas são comprovadamente benéficas e eficazes na redução da claudicação em equinos (Carmona et al., 2009; Lopez-Vidriero et al., 2010; Carmona et al., 2011). Não foram observadas reações clínicas indesejáveis no grupo tratado com PRP.

No exame do líquido sinovial, o aspecto e a concentração de glicose não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e momentos analisados, variando dentro dos padrões normais para a espécie. Houve um decréscimo da viscosidade apenas após os procedimentos artroscópicos, em T-15 e T-45. Para a proteína e fibrinogênio, quando foram comparados os tratamentos em cada tempo, não se observou diferença estatística significativa ($p > 0,05$). As concentrações de proteína e fibrinogênio foram elevadas apenas após as cirurgias, variando entre os momentos analisados. A sinovite decorrente das artroscopias resulta em efusão de líquido sinovial, influxo de proteínas, fibrinogênio e leucócitos (Stashak, 2006).

No exame citológico do líquido sinovial, as maiores médias da contagem global de células nucleadas foram observadas nos momentos T-15 e T-45. Na quantificação relativa de células mononucleares houve diferença estatística entre os tratamentos realizados ($p = 0,008$), e entre os tempos analisados ($p < 0,001$) (Tab. 02). O G2 apresentou menor contagem relativa de células mononucleares quando comparado ao G1 ($p < 0,001$). O líquido sinovial normal deve apresentar grande quantidade de células mononucleares ($> 80\%$) derivadas de monócitos sanguíneos, sinoviócitos e macrófagos teciduais. O decréscimo da contagem de células mononucleares pode representar graus variados de sinovite e osteoartrite (Stell, 2008; Pozzobon et al., 2009), o que provavelmente ocorreu com o grupo controle. Em T-45, o G2 apresentou um aumento significativo da porcentagem de linfócitos (Tab. 03), o que pode ter sido resultante de reação adversa à trombina, ao cloreto de cálcio ou menos provável, ao próprio PRP. A porcentagem de neutrófilos pode predizer a magnitude da inflamação (Stell, 2008;

Pozzobon et al., 2009). Nesse estudo, o G2 apresentou porcentagens discretamente mais elevadas de neutrófilos quando comparado ao G1 (Tab. 04), refletindo maior inflamação articular. O G1 apresentou resultados sutilmente melhores nas análises do líquido sinovial. O PRP, apesar de possuir efeito anti-inflamatório, também ativa citocinas, aumenta a permeabilidade vascular e realiza quimiotaxia sobre monócitos, podendo explicar os valores relativos variados encontrados na análise do líquido sinovial no G1 (El-Sharkawy et al., 2007; Vinatier et al., 2009). O G2 manteve maior inflamação articular, comprovada pela redução de células mononucleares e pelo maior valor relativo de neutrófilos.

Na quantificação de prostaglandina, houve diferença estatística entre os grupos e entre os tempos de análise durante o experimento ($p < 0,001$) (Tab. 05). G2 apresentou os menores valores de PGE_2 e o G1, os maiores. Houve um padrão de acréscimo da concentração de PGE_2 em T-15 e T-45. O resultado observado para a concentração de prostaglandina se confronta com os achados dos exames clínicos, onde o G1 apresentou os menores graus de claudicação. Esse fato pode ser explicado em conceitos descritos por Grauw et al., (2006). Esses autores observaram que articulações acometidas por diversas doenças articulares, apresentando concentrações elevadas de PGE_2 não apresentavam, necessariamente, melhora do grau de claudicação após a anestesia intra-articular, sugerindo que a PGE_2 poderia não estar relacionada com o grau de claudicação. Além disso, apesar do efeito antiinflamatório do PRP, plaquetas degranuladas em lesões tissulares também são capazes de ativar alguns tipos de citocinas, alterando a composição e homeostasia do líquido sinovial (El-Sharkawy et al., 2007; Vinatier et al., 2009), o que também poderia explicar valores mais altos de PGE_2 .

No 150º dia após a indução das lesões foram observadas sinovite e irregularidades ao redor da lesão, principalmente no G2. O G1 apresentou melhor tecido cicatricial macroscópico quando comparado ao G2 (Fig. 01). Os resultados apresentados na inspeção macroscópica das lesões tratadas corroboram com dados encontrados na literatura, onde pesquisas que utilizaram o PRP no tratamento de lesões condrais induzidas ou de ocorrência natural observaram a formação de um tecido cicatricial branco, liso, aparentemente fibroso e bem aderido, preenchendo completamente as falhas de cartilagem. As lesões condrais que não foram submetidas a esses tratamentos

apresentaram falha do preenchimento e manutenção da degradação da cartilagem articular (Wilke et al., 2007; Mcilwraith et al., 2010; Raheja et al., 2011).

Os dois grupos apresentaram formação de fibrocartilagem, com diferentes intensidades de fibrose cicatricial e feixes de fibras colágenas desorganizadas no local onde foi induzida a lesão (Fig. 02). Houve perda de celularidade, desorganização da matriz interterritorial e da disposição celular. O G2 apresentou predominantemente células fibroblastóides. Pôde ser observada melhor organização tecidual e maior número aparente de condrócitos nos tecidos cicatriciais de G1. Nos cortes corados com Picrosírius Red foi confirmada a presença de grande quantidade de fibrose nos dois grupos. Porém, nas imagens polarizadas de G1, pode-se observar a predominância de fibrose em fase inicial, com predominância de colágeno tipo III (verde). O G2 apresentou feixes de fibras mais espessas e predominância de colágeno tipo I (amarelo).

Nos cortes corados com Azul de Toluidina o G1 apresentou marcação moderada e irregular, enquanto os cortes de G2 não se coraram pelo Azul de Toluidina. Essa resposta ao tratamento pode ser decorrente da capacidade do PRP em reduzir a resposta inflamatória e inibir enzimas catabólicas, favorecendo a organização do colágeno, a migração e a proliferação celular (Carter et al., 2003). A presença de fatores de crescimento em abundância no PRP estimula a produção de proteoglicanos pelos condrócitos e acelera a reparação tecidual (Gaissmaier et al., 2008), o que esclarece a melhora no aspecto histoquímico dos cortes corados com Azul de Toluidina no G1. A melhora morfológica no G1 foi, sem dúvida, resultante dos efeitos mitogênicos, quimiotáticos e proliferativos do PRP (Fortier et al., 2010; Milano et al., 2010).

CONCLUSÃO

O tratamento das lesões experimentais com PRP melhorou o aspecto macroscópico do tecido de reparação em relação ao grupo controle. O PRP reduziu os escores de claudicação dos animais tratados, sendo clinicamente benéfico no tratamento das lesões experimentais. O tratamento não minimizou de forma significativa o grau de inflamação articular, observada pelas análises do líquido sinovial e pela concentração de PGE2 no líquido sinovial. Os animais tratados demonstraram melhor aspecto histopatológico e histoquímico, com a morfologia mais próxima à cartilagem normal, quando comparados ao grupo controle. O PRP foi benéfico e eficaz no tratamento de

lesões condrais induzidas. A correta utilização e objetivos definidos tornam essa terapia promissora no tratamento de lesões articulares no equinos.

REFERÊNCIAS

BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horse. **Vet. Surg., Ohio**, v.30, n.6, p.528-38, 2001.

CARMONA, J. U.; LOPEZ, C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos obtidos mediante El método del tubo como tratamiento de artropatías em caballos. **Arch. Med. Vet.**, v.41, p.175-179, 2009.

CARTER, C. A.; JOLLY, D. G.; WORDEN, C. E.; et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Experimental and Molecular Pathology**, v.74, p.244–255, 2003.

DE GRAUW, J. C.; VAN DE LEST, C. H. A.; VAN WEEREN, R.; et al. Arthrogenic lameness of the fetlock: synovial fluid markers of inflammation and cartilage turnover in relation to clinical joint pain. **Equine vet. J.**, v.38, n.4, p.305-311, 2006.

EL-SHARKAWY, H.; KANTARCI, A.; DEADY, J.; et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. **J Periodontol.**, v.78, n.4, p.661-669, 2007.

EVERTS, P. A. M.; KNAPE, J. T. A.; WEIBRICH, G. et al. Platelet rich plasma and platelet gel, A review. **J Extra Corpor Techn.** v.38, n.2, p.174-187, 2006.

FORTIER, L.; POTTER H. G.; RICKEY, E.J.; et al. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in equine model. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.92, p.1927-37, 2010.

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

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

JAIN, N. J. **Essentials of Veterinary Hematology**. P.A. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993. 417p.

LOPEZ-VIDRIERO, E.; GOULDING, K.A.; SIMON, D.A.; et al. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. **The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v.26, n.2, p.269-278, 2010.

MAIA, L. **Plasma rico em plaquetas no tratamento de tendinite em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e histopatológica**. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EISCHTAEDT, R. M.; et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.85, p.638-646, 1998.

- 386 McCARREL, T.; FORTIER, L. Temporal Growth Factor Release from Platelet-Rich
387 Plasma, Trehalose Lyophilized Platelets, and Bone Marrow Aspirate and Their Effect of
388 Tendon and Ligament Gene Expression. **Journal of Orthopaedic Research**. v.27,
389 p.1033-1042, 2009.
- 390 McILWRAITH, C. W. **Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse**. 3ª ed.
391 Mosby-Elsevier, 2005^b. 479p.
- 392 McILWRAITH, C. W. From arthroscopy to gene therapy – 30 years of looking in joints.
393 In: **American association of equine practitioners annual convention**, v.51, Colorado.
394 Proceedings ... Colorado, 2005^a.
- 395 McILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KISIDAY, J. D.; et al. Use of bone marrow–
396 derived culture-expanded mesenchymal stem cells to augment healing of chondral
397 defects treated with microfracture. **Proceedings of the Annual Convention of the**
398 **AAEP** – Baltimore, MD, USA. v.56, p.27-28, 2010.
- 399 MILANO, G.; SANNA PASSINO, E.; DERIU, L.; et al. The effect of platelet rich
400 plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an
401 experimental study in a sheep model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.971-980,
402 2010.
- 403 POZZOBON, R.; BRASS, K. E.; FIGHERA, R. A.; et al. Características físico-
404 químicas e citológicas do líquido sinovial de pôneis com modelo de sinovite induzida.
405 **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.4, p.1303-1309, 2009.
- 406 RAHEJA, L. F.; GALUPPO, L. D.; BOWERS-LEPORE, J.; et al. Treatment of
407 Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage Fissures in a Horse Using Bone
408 Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. **Journal of Equine**
409 **Veterinary Science**, v.31, n.3, p.147-154, 2011.
- 410 ROSSETTI, R. B. **Comparação da resposta inflamatória articular decorrente da**
411 **distensão líquida ou gasosa em eqüinos submetidos a exame artroscópico**. 2006.
412 110f. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
413 Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.
- 414 ROUSSY, Y.; DUCHESNE, M. B.; GAGNON, G. Activation of human platelet-rich
415 plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation.**Clin.**
416 **Oral Impl. Res**. v.18, p.639–648, 2007.
- 417 SCHLUETER, A. E.; ORTH, M. W. Equine osteoarthritis: a brief review of the disease
418 and its causes. **Equine and Comparative Exercise Physiology**. Michigan v.1, n.4,
419 p.221–231, 2004.
- 420 STASHAK, T. D. **Claudicação em equinos**. 5ª.ed. São Paulo: Roca, 2006. 1093p.
- 421 STEEL, C. M. Equine synovial fluid analysis. **Vet Clin Equine** v. 24, n.1, p.437–454,
422 2008.
- 423 SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P.; et al. The contribution of the
424 synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the
425 pathogenesis of osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, v.179, p.10-24, 2009.
- 426 VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; et al. Plasma rico em
427 plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica.
428 **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.33, n.1, 2006.

VINATIER, C.; MRUGALA, D.; JORGENSEN, C. et al. 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 defect following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in a equine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v.25, n.7, p.914-925, 2007.

AGRADECIMENTOS: Apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

Tabela 01: Mediana dos escores de claudicação e valores de *p* do grupo 1 e grupo 2 nos tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									<i>p</i>
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	0,0 ±0 Aa	0,5 ±0,5 Aa	0,5 ±05 Aa	2,0 ±0 Aa	1,0 ±0 Aa	0,0 ±0 Ab	0,0 ±0 Ab	0,0 ±0 Ab	0,0 ±0 Ab	<0,001
G2	0,0 ±0 Ba	1,0 ±0 ABa	1,0 ±0,5 ABa	1,5 ±0,9 ABa	2,0 ±0 Aa	2,0 ±0 Aa	2,0 ±0 Aa	1,0 ±0 ABab	0,5 ±0,5 ABab	<0,001
<i>p</i>	1,000	0,565	0,019	0,094	0,002	0,002	0,006	0,007	0,023	

*Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. *Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (*p*>0,05).

*Resumo descritivo das medianas seguidas pelo desvio padrão (±).

Tabela 02: Média relativa de células mononucleares, em porcentagem, no líquido sinovial do grupo 1 e grupo 2 em todos os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	91,2 ±6,2	91,2 ±4,7	93,5 ±1,7	53,8 ±35,4	83,5 ±3,3	46,8 ±53,9	76,2 ±21,3	84,0 ±12,1	45,5 ±52,1	73,9 ab
G2	78,0 ±8,0	66,5 ±7,5	59,2 ±39,8	64,0 ±43,0	81,0 ±15,0	58,8 ±29,8	54,5 ±44,2	46,8 ±37,4	21,8 ±31,1	58,9 b
Média	87,9 A	82,4 AB	84,8 A	68,4 AB	78,5 AB	52,1 B	57,4 AB	70,8 AB	53,8 B	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA). * Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (*p*>0,05). *Resumo descritivo das médias seguidas pelo desvio padrão (±).

**p* tratamento = 0,008; *p* tempo <0,001; *p* interação tratamento x tempo = 0,163.

Tabela 03: Média relativa de linfócitos, em porcentagem, no líquido sinovial do grupo 1 e grupo 2 em todos os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	7,0	6,2	6,5	45,8	13,5	2,2	23,0	13,5	3,2	13,4
	±2,5	±2,5	±1,7	±35,7	±2,5	±2,8	±20,4	±14,5	±4,7	
	Ba	Ba	Ba	Aa	Ba	Bb	Aab	Ba	Ba	
G2	14,2	19,5	10,8	8,5	16,0	30,8	3,5	17,2	27,0	16,4
	±3,7	±6,4	±7,5	±5,6	±13,8	±31,4	±2,3	±16,2	±37,2	
	Aa	Aa	Aa	Ab	Aa	Aa	Ab	Aa	Aa	
Média	8,2	10,6	7,6	16,8	10,9	13,1	21,7	18,8	12,7	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA). * Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$). *Resumo descritivo das médias seguidas pelo desvio padrão ($\pm$).

*p tratamento = 0,070; p tempo = 0,073; p interação tratamento x tempo = 0,003.

Tabela 04: Média relativa de neutrófilos, em porcentagem, no líquido sinovial do grupo 1 e grupo 2 em todos os tempos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G1	1,8	2,5	0,0	0,5	3,0	0,0	0,5	1,5	1,2	1,2
	±3,5	±3,8	±0	±1,0	±0,8	±0	±1,0	±3,0	±1,5	
	Aab	Abc	Aa	Aa	Aa	Aa	Ab	Aa	Aa	
G2	10,0	14,0	5,0	2,5	3,0	7,8	3,8	10,0	1,2	6,4
	±0,8	±13,8	±4,5	±5,0	±1,15	±2,2	±2,9	±16,8	±2,5	
	ABa	Aa	ABa	Ba	ABa	ABa	ABab	ABa	Ba	
Média	4,5	6,9	1,3	2,3	4,4	3,1	4,4	3,7	2,2	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA). * Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$). *Resumo descritivo das médias seguidas pelo desvio padrão ($\pm$).

*p tratamento < 0,001; p tempo = 0,106; p interação tratamento x tempo = 0,049.

Tabela 05: Média da concentração de PGE₂ no líquido sinovial do grupo 1 e grupo 2 em todos os momentos do experimento.

GRUPO	TEMPO									Média
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	
G2	508,3	764,0	630,2	1411,1	1070,2	1277,2	2076,5	1419,2	1382,7	1171,0 _a
G4	395,2	498,6	476,0	1472,7	1597,7	725,3	855,2	1405,9	870,9	921,9 _{ab}
Média	489,9_C	583,2_{BC}	502,2_C	1284,4_A	1302,1_A	1019,5_{ABC}	1600,5_A	1175,6_{AB}	1125,9_{AB}	

*Análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo (Two way repeated measures ANOVA). * Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$). *Valores em picogramas por mililitro. *Resumo descritivo das médias

*p tratamento = 0,013; p tempo < 0,001; p interação tratamento x tempo = 0,127.

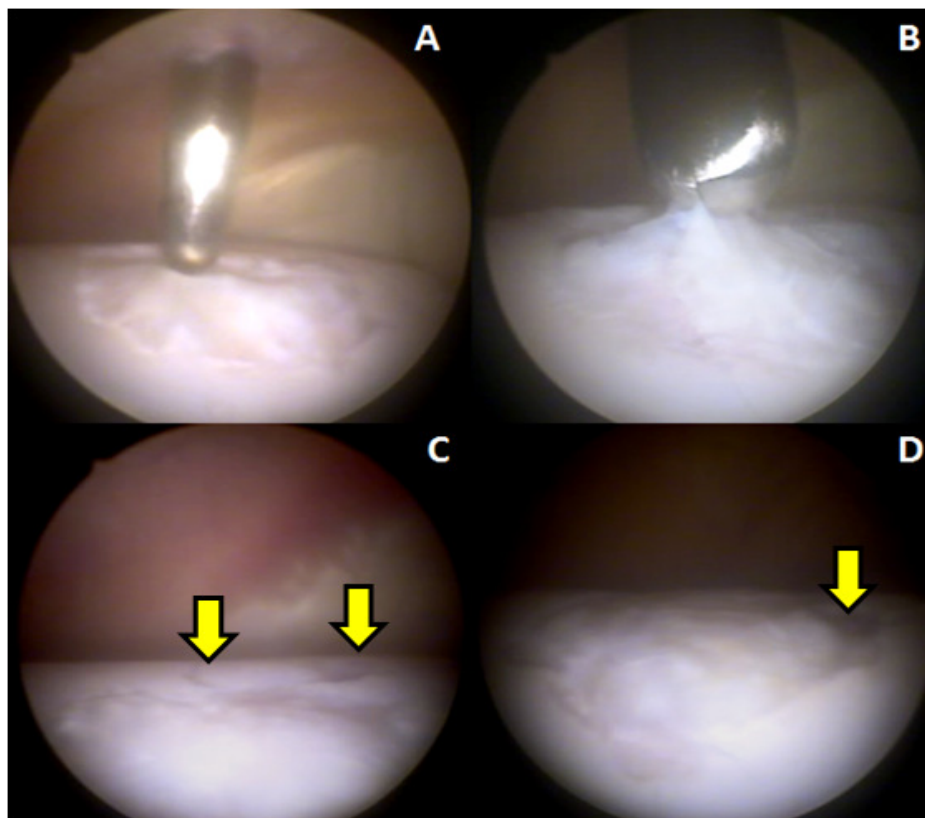


Figura 01: Imagens artroscópica das articulações em T-150. Palpação e exame com a “*probe*” do tecido cicatricial preenchendo completamente a lesão no G1 (A). Remoção do tecido neoformado para a biópsia com auxílio de pinça tipo “*Ferris-Smith*”. O tecido cicatricial está bem aderido às bordas da lesão no G1 (B). Falhas de preenchimento (setas), irregularidade (setas), fibrilações, pouca formação de tecido cicatricial e manutenção da degradação articular no G2 (C e D).

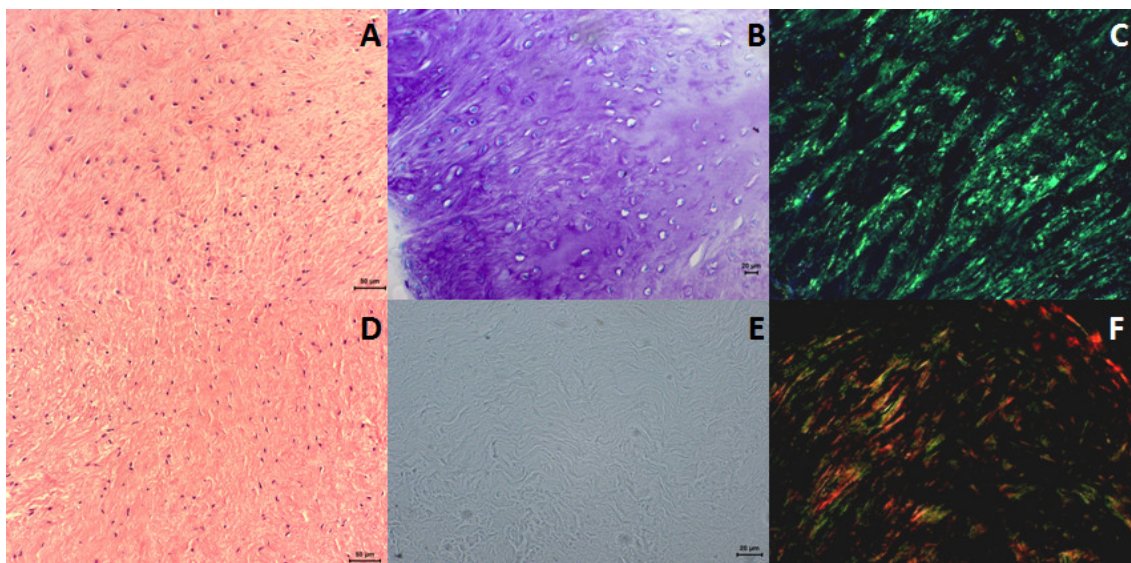


Figura 02: Fotomicroscopia de luz de G1 (A) e G2(D); H&E. Formação de tecido fibrocartilagenoso, porém com maior predominância de condrócitos no G1. Fotomicroscopia de luz de G1 (B) e G2(E); Azul de Toluidina. Marcação irregular em G1 e nenhuma marcação em G2. Fotomicroscopia de luz polarizada de G1 (C) e G2(F); Picrosírius Red. O G2 apresenta fibras espessas e predominância da cor amarela ou vermelha (colágeno tipo I). O G1 apresenta fibras mais finas e predominância da cor verde (colágeno tipo III). Objetivas 20x.