

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ENXERTO OSTEOCONDRAI ALÓGENO,
ASSOCIADO À INOCULAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DA MEDULA
ÓSSEA NO REPARO DO SULCO TROCLEAR DE
COELHOS**

**Luiz Augusto de Souza
Médico Veterinário**

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ENXERTO OSTEOCONDRAI ALÓGENO, ASSOCIADO À
INOCULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES
AUTÓLOGAS DA MEDULA ÓSSEA NO REPARO
DO SULCO TROCLEAR DE COELHOS**

Luiz Augusto de Souza

Orientador: Prof. Dr. Duvaldo Eurides

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

**UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL
Março de 2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S729e Souza, Luiz Augusto de, 1980-
Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de
células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo
do sulco troclear
de coelhos / Luiz Augusto de Souza. - 2009.

67 f. : il.

Orientador: Duvaldo Eurides.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Cirurgia veterinária - Teses. I. Eurides, Duvaldo. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU:

619:617

EPÍGRAFE

*"Podemos escolher o que semear, mas somos
obrigados a colher aquilo que plantamos"
(Provérbio chinês).*

DEDICATÓRIA

*A minha mãe **Marlene** pelo amor e apoio nos momentos mais difíceis dessa caminhada.*

*Ao meu pai **Wilson** (in memoriam), que mesmo com sua breve passagem em minha vida me ensinou a ser um homem digno e feliz.*

*Aos meus irmãos **Wilson, Maycon e Francielle** pela torcida e incentivo.*

*Aos meus tios **José Carlos e Rosa**, pela orientação e ensinamentos.*

*A minha namorada **Taís**, pelo amor, companheirismo e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ter me dado forças para conseguir vencer essa batalha e realizar mais um sonho.

A **minha família** pela confiança, torcida e incentivo. Sem vocês tudo seria mais difícil.

A minha nova família “Francana”, agradeço de coração ao **Acácio** e a **Beth**, pelos pensamentos positivos e por me acolherem de forma tão especial.

No início orientador e hoje um grande amigo Prof. Dr. **Duvaldo Eurides**. Obrigado pelo apoio, incentivo e pela confiança depositada na execução desse projeto. Saiba que aprendi muito com nossa convivência e que mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para aventura. Não é aquele que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas o que questiona e desperta para a realidade. Obrigado!!!!

Ao amigo **Benito** vulgo “Gambá”, grande companheiro e um dos responsáveis pela realização desse projeto. Apesar das grandes dificuldades tenho certeza que valeu a pena. Obrigado pela vontade e garra na concretização desse sonho e tenha certeza que aqui o filho chora e a mãe não vê.

Aos companheiros **Ana Flávia, Matheus, Lorena, Roberta e Evelyn**, pela ajuda e sacrifício de seus afazeres, não medindo esforços para que esse trabalho fosse realizado da melhor maneira possível.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Emílio Beletti** pelo auxílio e presença fundamental no desenvolvimento deste experimento. A professora Dr^a. **Deise Aparecida de Oliveira Silva** e a **Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba**, pela paciência e sabedoria. E ao prof. Dr. **Ernesto Akio Taketomi** por ceder o laboratório de imunologia.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias e Hospital Veterinário. **Amado, João de Assis (Jones), Antônio, Rondino, Zé Maria, Beth e Marquinho**, muito obrigado.

Aos professores Dr. **André Luiz Quagliatto Santos**, Dr. **Antônio Vicente Mundim** e Dr. **Carlos Gomes Ferreira** pela ajuda e apoio.

Agradeço a todos os amigos, colegas e professores que por mim torceram. A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais** pela concessão da bolsa e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** pelo financiamento do projeto.

Aos **animais**, que de forma involuntária cederam seus corpos em prol da ciência.

Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	Página vii
------------------------	----------------------

LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DE LITERATURA	02
II.a. Terapia celular	02
II.b. Células da medula óssea	03
II.c. Fontes de células mesenquimais	04
II.d. Conceitos e fisiologia das células-tronco	04
II.e. Patogênese das lesões osteocondrais.....	08
II.f. Enxertos	10
II.g. Conservação dos enxertos osteocartilaginosos	13
III. MATERIAL E MÉTODOS	15
III.a. Coleta das articulações e preservação	15
III.b. Animais	15
III.c. Pré-operatório	16
III.d. Coleta da medula óssea, isolamento, contagem e viabilidade das células mononucleares	16
III.e. Diluição do sedimento celular inoculado	19
III.f. Técnica cirúrgica	20
III.g. Pós-operatório	22
III.h. Avaliação clínica	22
III.i. Avaliação macroscópica	22
III.j. Avaliação histológica	23
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
V. CONCLUSÕES	43
VI. REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da propriedade das células-tronco de se dividirem e permanecem indiferenciadas ou se diferenciam e amadurecem. Fonte: Zago, 2006a. 06
- Figura 2.** Agulha de Rosenthal 16G (A) introduzida no tubérculo maior do úmero (B). Seringa de 10mL com 0,1mL de heparina acoplada a agulha de Rosenthal (C) e medula óssea aspirada (D). 17
- Figura 3.** Em “A” seta vermelha indica a solução composta por 2,0mL de medula óssea íntegra e 2,0mL da solução salina tamponada. Seta preta evidencia 2,0mL de solução Ficoll-Hypaque. Na figura “B”, o mesmo tubo após centrifugação á 495G durante 30 minutos a 15°C. Notar o plasma e sedimentos (1), Ficoll-Hypaque (2) e células vermelhas (3). A seta azul exibe a nuvem de células mononucleares mesenquimais da medula óssea de coelho. 18
- Figura 4.** Mensuração com paquímetro do local do sulco troclear a ser removido (A) e demarcação da área com lâmina de bisturi N^o10 (B). Notar a superfície articular demarcada (C) e o disco posicionado sobre o local demarcado (D). Posição angulada do disco para remoção do implante em forma de cunha (E) e remoção do enxerto com dissecação das faces do enxerto (F). 21
- Figura 5.** Microfotografia de células mononucleares da medula óssea coletadas no tubérculo umeral de coelhos. Células viáveis (setas verdes) e células inviáveis com citoplasma corado com azul de Tripán (seta amarela). Microscopia de luz (aumento 100x). 26
- Figura 6.** Aspecto látero-medial da articulação do joelho esquerdo do coelho C3 do grupo controle decorridos 45 dias de PO. Notar em “A” espessamento e aderência da cápsula aos tecidos adjacentes (seta amarela) e em “B” a presença de líquido sinovial com coloração avermelhada. 29

- Figura 7.** Aspecto do sulco troclear de coelho do grupo controle (C3) após 45 dias de PO. Observar o local de reabsorção do enxerto (seta azul) e crescimento de tecido conjuntivo denso sobre as faces medial e lateral das trócleas (setas pretas). 30
- Figura 8.** Sulco troclear femoral do CT2 e CT3 tratados com células mononucleares, após 45 dias de PO. Notar em “A”, crescimento de tecido conjuntivo denso nas faces medial e lateral da tróclea (contorno em vermelho) e integração do enxerto no leito receptor (seta azul). Em “B”, desenvolvimento de tecido conjuntivo denso na face medial (seta preta), crescimento de cartilagem na superfície lateral do enxerto (seta amarela). 31
- Figura 9.** Sulco troclear femoral de animais do grupo tratado com células mononucleares, após 45 dias de PO. Em “A”, animal CT5 o enxerto aderido com ausência de falhas na transição entre o leito receptor e a face do implante (setas pretas) e área de crescimento de cartilagem na superfície medial e central do enxerto (seta verde). Em “B”, animal CT2 com enxerto aderido a sítio receptor com ausência de falhas linhas de transição e crescimento de cartilagem na superfície medial do implante (seta azul)..... 32
- Figura 10.** Em “A” e “B”, sulco troclear femoral do coelho grupo tratado com células mononucleares CT11, após 90 dias de PO. Notar o enxerto aderido com ausência das linhas de transição entre o leito receptor e a face do implante e crescimento de tecido semelhante à fibrocartilagem, liso, brilhante e em continuidade a cartilagem adjacente (seta amarela). Na face lateral do côndilo femoral, crescimento de tecido denso (seta vermelha). Na figura “B” observar na posição látero-medial, tecido semelhante à fibrocartilagem recobrando a superfície do enxerto (seta azul) e na face lateral o crescimento de tecido atípico (circulo vermelho). 32

Figura 11. Fotomicrografias do sulco troclear femoral do coelho C11, após reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, com 90 dias de PO. Observar em “A” (Barra = 300µm) e “B” (Barra = 200µm) o enxerto (EN) envolvido por fibrocartilagem (FC) e as faces isoladas do osso trabecular. Coloração HE. 34

Figura 12. Fotomicrografias do sulco troclear femoral do coelho após reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%. Em “A”, animal C2, observar a descamação da superfície articular (seta azul), caracterizada por morte progressiva de condrócitos. Em “B”, animal C9, descamação das camadas superficial, média e profunda da cartilagem (CA) seguida de exposição, necrose e reabsorção do osso subcondral (quadrado preto), Barra = 300µm. Coloração HE. 35

Figura 13. Fotomicrografias do sulco troclear femoral de coelho após reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%. Em “A” coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B). Notar falha na união entre o osso do leito receptor e a face do enxerto osteocondral (EN). Ausência de cartilagem sobre a superfície (seta azul), necrose no osso subcondral (seta preta), tecido conjuntivo (asterisco) e trabéculas ósseas espaçadas caracterizando descontinuidade e fragilidade óssea (TO). Barra = 300µm. 36

Figura 14. Fotomicrografias com coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B) do sulco troclear femoral do coelho C12 após o reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98% decorridos 90 dias de PO. Em “A” e em “B” observar degeneração e fragmentação da cartilagem (setas vermelhas), face esquerda do enxerto constituída por cartilagem hialina (CH) e face direita por tecido conjuntivo denso (TCF). Barra = 300µm. 36

Figura 15. Fotomicrografias com coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B) do sulco troclear femoral do coelho CT9 após o

reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, associado às células mononucleares decorridos 90 dias de PO. Observar em “A”, cartilagem articular preservada com presença de cartilagem hialina (CH), pouca descamação (setas pretas) e união entre a face do enxerto e o osso adjacente, marcada pela neoformação óssea (NO) e predominante de tecido conjuntivo (seta amarela), fibrocartilagem, áreas de neoformação óssea, intensa vascularização (circulo azul). Em “B”, início da formação óssea (círculo vermelho). Barra = 300µm. 38

Figura 16. Fotomicrografias com coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B) do sulco troclear femoral do coelho CT11 após reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, associado às células mononucleares com 90 dias de PO. Notar a camada superficial constituída por fibrocartilagem (asteriscos) e a área de contato entre o enxerto e o osso adjacente com tecido conjuntivo (TC) substituído por cartilagem. Em alguns pontos início da ossificação endocondral (setas vermelhas). Barra = 300µm. 39

Figura 17. Fotomicrografias do sulco troclear femoral do coelho CT12 após o reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, associado às células mononucleares com 90 dias de PO. Em “A”, notar na área de transição entre o osso do leito receptor e o enxerto a fase final de reparação, caracterizada pela substituição da cartilagem hialina por tecido ósseo (circulo vermelho). Em “B”, processo de ossificação endocondral (OE) e padrão trabecular normal. Presença de condrócitos (setas azuis) e neoformação óssea (seta amarela). Coloração Hematoxilina-Eosina. Barra = 300µm. 39

Figura 18. Fotomicrografias com coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B) do sulco troclear do coelho CT11, após o reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, associado às células mononucleares com 90 dias de PO. Em “A”, observar o

processo de ossificação endocondral, caracterizada por hipertrofia dos condrócitos (setas), na camada profunda da cartilagem. Em “B”, presença de fibrocartilagem (FC), cartilagem hialina (CH) e neoformação óssea (setas). Barra = 300µm. 41

Figura 19. Fotomicrografias do sulco troclear femoral do coelho após o reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98% , associado às células mononucleares com 90 dias de PO. Verificar a união entre o enxerto (EN) e o tecido ósseo adjacente (TOA). Superfície cartilaginosa com pequena descamação e integridade da cartilagem preservada (setas). Osso denso, ausência de trabéculas ósseas espaçadas, padrão trabecular próximo à normalidade. (HE). Barra = 300µm. 41

LISTA DE TABELA

	Página
Tabela 1. Valores individuais da contagem e viabilidade das células mononucleares isoladas da medula óssea de coelhos, referentes à coleta de 2,0mL de medula óssea	27

ENXERTO OSTEOCONDRAIS ALÓGENO, ASSOCIADO À INOCULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DA MEDULA ÓSSEA NO REPARO DO SULCO TROCLEAR DE COELHOS

RESUMO

Vinte e quatro coelhos foram separados em grupo controle (GC) e tratados com células-tronco (GCT). Sob efeito anestésico, uma agulha de Rosenthal 16G foi inserida no tubérculo umeral para coleta de 2,0mL de medula óssea. Procedeu-se o isolamento, a contagem e a viabilidade das células mononucleares autólogas. Praticou-se no joelho esquerdo uma incisão parapatelar lateral de pele e da cápsula articular. A patela foi deslocada medialmente e no sulco troclear foi removido um segmento de 0,4cm x 1,0cm. No GC e GCT o local foi preenchido por enxerto osteocartilaginoso alógeno conservado em glicerina. No GCT foi administrado intra-articular de 2×10^6 células mononucleares. Aos 45 e 90 dias de pós-operatório, 75% dos animais do GC apresentavam cápsula articular espessa e em 41,66% aderida aos tecidos adjacentes. O enxerto se encontrava osteointegrado em 33,33% e 58,33% com alterações ósseas. Nos do GCT aderiu-se ao leito receptor, sendo que em 91,66% não foi observado processo de degeneração, e em 58,33% notou-se ossificação endocondral, junto ao osso subcondral com consolidação óssea. Enxertos osteocartilaginosos alógenos conservados em glicerina a 98%, no reparo do sulco troclear de coelhos, associado à administração intra-articular de células mononucleares autólogas, estimulam a formação de fibrocartilagem e cartilagem hialina com integração do implante no leito receptor.

Palavras-chave: cartilagem articular, fêmur, medula óssea, osso, terapia celular

OSTEOCHONDRAL ALLOGRAFT ASSOCIATED WITH BONE MARROW AUTOLOGOUS MONONUCLEAR CELLS INOCULATION IN THE REPAIR OF TROCHLEAR GROOVE IN RABBITS

ABSTRACT

Twenty four rabbits were separate in control group (GC) and treated with stem cell group (GCT). Under general anesthesia a Rosenthal 16G needle was inserted into umeral tubercle to collect 2,0mL of bone-marrow. It was proceeded the isolation, the counting and the viability of the mesenchymal autologous cells. A lateral parapatelar incision was made over the left knee in skin and articular capsule. The patella was medially dislocated and a segment about 0,4cm x 1,0cm was removed in the throcLEAR groove. In GC and GCT that local was filled by alogenic osteochondral graft conserved in glycerin. In GCT it was inject 2×10^6 mononuclear stem cells. On 45 and 90 days of postoperative, in 75% of GC animals the articular capsule presented thick and in 41,66% adhered to adjacent tissues. The graft was osteointegrated in 33,33% and 58,33% with bone alterations. In GCT the graft adhered into the receptor bed, in 91,66% degeneration process was not observed, and in 58,33% it was noted endochondral ossification of the subchondral bone with bone consolidation. Alogenic osteochondral grafts conserved in 98% glycerin in rabbits throcLEAR groove repair, associated with intra-articular injection of autologous mononuclear cells, stimulate fibrocartilage and hyaline cartilage formation with integration of the graft into the receptor bed.

Key words: articular cartilage, femur, bone-marrow, bone, cellular therapy.

I. INTRODUÇÃO

O tratamento cirúrgico das lesões condrais e osteocondrais que acometem articulações principalmente fêmoro-tíbio-fíbulo-patelar, ainda representa um desafio para o ortopedista. É uma articulação submetida à compressão e grande amplitude de movimentos de flexão-extensão (KAPANDJI, 2000; HEBERT, et al., 2003). Frequentemente é acometida por traumatismos de alta energia, deformidades congênitas, tumores e infecções. Nas lesões da cartilagem articular o prognóstico é reservado, devido à capacidade limitada de regeneração. Geralmente estas lesões evoluem para doença articular degenerativa, caracterizada por dor, rigidez e perda da mobilidade, resultando em hipofunção articular e comprometimento do bem estar animal (OLSSON, 1993).

A correção dos defeitos decorrentes de perdas osteocartilaginosas desperta o interesse de pesquisadores, de forma que métodos auxiliares são propostos com o intuito de melhorar a reparação óssea. A utilização de células-tronco na reconstituição de tecidos tem direcionado as pesquisas para o seu isolamento, purificação e concentração, com o objetivo de reparar e substituir tecidos lesados ou degenerados (CONNOLLY, 1995).

A existência de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea foi inicialmente sugerida por Cohnheim (1867), (citado por PROCKOP, 1997; FEHRER; LEPPERDINGER, 2006). No entanto, foi com os achados de Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina, (1970) que essa teoria foi comprovada com a descoberta das células-tronco mesenquimais (CTM's). As CTM's da medula óssea têm a capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido como o conjuntivo, ósseo, cartilaginoso, adiposo, tendão, músculo e estroma medular (CAMPAGNOLLI et al., 2001).

Neste estudo objetivou-se avaliar o potencial reparador das células mesenquimais mononucleares autólogas, após reparo do sulco troclear femoral de coelhos com enxerto osteocondral alógeno, conservado em glicerina a 98%.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.a. Terapia celular

O termo terapia celular é um conjunto de métodos e abordagens que visam à utilização de células para tratamento de inúmeras doenças (ZAGO, 2006a). Assim a medicina regenerativa desponta como uma ferramenta terapêutica no tratamento de várias doenças degenerativas, para as quais não há tratamento específico ou efetivo (KASSEM, KRISTIANSEN, ABDALLAH, 2004).

As células-tronco são encontradas nos indivíduos em populações extremamente pequenas, variando de uma a sete células-tronco em cada 100.000 células. Elas são mantidas quiescentes até receberem estímulo do ambiente para iniciarem sua diferenciação. Este estímulo pode ocorrer durante o processo de cicatrização (PERIN et al., 2003).

Devido à capacidade de auto-renovação, plasticidade e habilidade de circular na corrente sanguínea, as células mesenquimais aparecem como uma ferramenta no contexto da terapia celular. São descritas técnicas de isolamento, cultura, expansão e manipulação sendo utilizadas nos tratamentos de doenças hematopoiéticas e osteogêneses imperfeitas (BAKSH, SONG, TUAN, 2004).

O efeito terapêutico promissor das CTM's está relacionado com sua capacidade de interagir e sobreviver em tecidos-alvos distintos por um longo período (MINGUELL, ERICES, 2006). Proliferam rapidamente e originam células-filhas capazes de substituir as células doentes (BANFI et al., 2000). Além disso, podem ser transplantadas por infusão local no órgão lesado ou por meio da infusão sistêmica. No primeiro caso, espera-se que aumentem o reparo local e no segundo, que migrem para os tecidos lesados (MINGUELL, CONGET, ERICES, 2000).

A habilidade de purificar, cultivar e manipular células-tronco multipotentes fornece condições que possibilitam corrigir lesões provocadas por doenças congênitas ou degenerativas. Assim tecidos e órgãos lesados podem ser recuperados pelo organismo saudável. A ocorrência deste processo exige a interrupção ou abrandamento da agressão, seguida de remodelação do tecido utilizando reservas de células-tronco específicas do organismo (COLOMÉ, 2007).

O transplante de células-tronco hematopoéticas (transplante de medula óssea) é atualmente a única forma de tratamento com células-tronco humanas. Os tratamentos derivados dessa metodologia encontram-se em fase experimental e, portanto, seus benefícios precisam ser demonstrados ou consolidados, principalmente nos casos onde existam evidências de suas vantagens (ZAGO, 2006a).

II.b. Células da medula óssea

A medula óssea (MO) apresenta dois sistemas troncos distintos o hematopoético e o não hematopoético (SHORT, et al., 2003). Produzem tipos celulares com suas funções específicas. Dentre eles as células hematopoiéticas, as estromais ou mesenquimais e células progenitoras endoteliais. As células-tronco hematopoiéticas originam células sanguíneas e às do sistema imune, são utilizadas para restaurar componentes do sangue e do sistema imunológico. As mesenquimais são primordiais indiferenciadas, caracterizadas pela auto-renovação e potencial de diferenciarem-se em vários tecidos. Quando estimuladas adequadamente, origina músculos, ossos, cartilagens e células de gorduras (CAMPAGNOLLI et al., 2001). As células progenitoras se diferenciam em endoteliais, que integram os vasos sanguíneos e capilares. A capacidade proliferativa, combinada a habilidade de se tornar especializada, a faz única (KIRSCHSTEIN, 2001).

As células-tronco mesenquimais são utilizadas no campo da reparação e regeneração celular. Isso se deve ao potencial de diferenciação em vários tipos de células, em resposta à transdução de sinais mediados por citocinas (FRIEDENSTEIN, PETRAKOVA, KUROLESOVA, 2002). São facilmente coletas e como são provenientes da MO do próprio paciente, elimina possibilidade de rejeição. Além disso, a coleta do material do próprio paciente não provoca controvérsias no que diz respeito aos aspectos éticos e legais (WANG et al., 2004). O transplante dessas células não possui o risco de formação de tumor, pois não há diferenciação em tecidos indesejados no organismo hospedeiro (ROMANO, 2004).

Apesar do número limitado na medular óssea, a proliferação e a expansão sob condições adequadas, podem ser obtidas *in vitro* (KRAUSK, KIRKEY-HEAD,

2006). A caracterização morfológica e funcional das células estromais foram estabelecidas em roedores e humanos. Entretanto, em outras espécies são necessárias novas pesquisas para estimular a terapia celular na Medicina Veterinária (MARTIN et al., 2002).

II.c. Fontes de células mesenquimais

No ser humano a medula óssea é a principal fonte das células mesenquimais, porém são isoladas de outros órgãos e tecidos, como do músculo esquelético e da derme (YOUNG et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), endotélio e subendotélio da veia umbilical (COVAS et al., 2003) e veia safena (COVAS et al., 2005). Assim como do rim (ALMEIDA-PORADA et al., 2002), sangue de cordão umbilical e placentário (YU et al., 2004), medula óssea vertebral (AHRENS et al., 2004), cartilagem articular (ALSALAMEH et al., 2004), vilosidade coriônica da placenta (IGURA et al., 2004), ligamento periodontal (SEO et al., 2004) e pulmão (SABATINI et al., 2005).

Fernandes et al. (1997), foram os primeiros a reportarem a presença de células estromais no sangue periférico mobilizado. Já Zvaifler et al. (2000) e Kuznetsov et al. (2001), demonstraram em cultivo que as CTM's circulam no sangue periférico do adulto, mas são raras. Entretanto, em condições semelhantes, Ojeda-Uribe et al. (1993), Lazarus et al. (1997) e Wexler et al. (2003), não isolaram estas células no sangue periférico.

II.d. Conceitos e fisiologia das células-tronco

A presença de células precursoras não-hematopoéticas na MO foi sugerida por Julius Cohnheim em 1867 (citado por PROCKOP, 1997, FEHRER, LEPPERDINGER, 2006). Contudo, foram identificadas a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos, denominadas células

formadoras de colônias fibroblásticas (FRIEDENSTEIN, PIATETZKY-SHAPIRO, PETRAKOVA, 1966).

As CTM's correspondem a 0,001 a 0,01% de todas as células nucleadas medulares. São isoladas a partir de aspirados de medula óssea, separando-se a fração mononuclear por gradiente de densidade. Expressam um amplo espectro de citocinas, receptores de citocinas e fatores de crescimento. Também produzem moléculas de matriz extracelular, incluindo fibronectina, laminina, colágenos e proteoglicanos (COVAS, 2006).

As células-tronco são definidas com base no potencial de auto-renovação, na capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares e na habilidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado. Inicialmente estas características foram demonstradas nas células-tronco hematopoéticas (CTH's) e nas células tronco embrionárias (CTE). Com o avanço da ciência, outras células foram isoladas e conceituadas como células-tronco, denominadas de células-tronco mesenquimais (VERFAILLIE, 2002).

As CTH's foram as primeiras a serem descritas, sendo também melhor compreendidas e as mais aplicadas em protocolos clínicos (NARDI, AFONSO, 2006). No entanto, as células-tronco não hematopoiéticas apresentam ampla capacidade de diferenciação, bem como dar origem e regenerar diversos tecidos (POUNTOS, GIANNOUDIS, 2005). No processo de reparação óssea, desempenham a osteogênese ou a fagocitose, dependendo das condições do meio (BURWELL, 1985). Precursoras da linhagem osteogênica e encontradas na medula, estão mais concentradas próximo à superfície endosteal, apresentando altos índices osteogênicos (ASHTON, ALLEN, HOWLETT, 1984).

As células-tronco são caracterizadas por serem indiferenciadas e não apresentar função específica nos tecidos. São capazes de proliferarem, mantendo-se indiferenciadas por longos períodos de tempo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta última propriedade, denominada de auto-regeneração, permite que o compartilhamento de células-tronco seja mantido constante ao longo do tempo (SANTOS, SOARES, CARVALHO, 2004; NARDI, ALFONSO, 2006).

Quando uma célula-tronco se divide, uma das células filhas fica para substituir a progenitora. Enquanto que outra se divide e diferencia em células maduras, com o

aspecto do tecido específico (Figura 1) (DUA, 1995; SANTOS, SOARES, CARVALHO, 2004). São capazes de realizar as chamadas “divisões assimétricas”, ou seja, podem originar células que permanecem indiferenciadas, repondo a reserva de células-tronco ou podem se diferenciar em especializadas (ZAGO, 2006b).

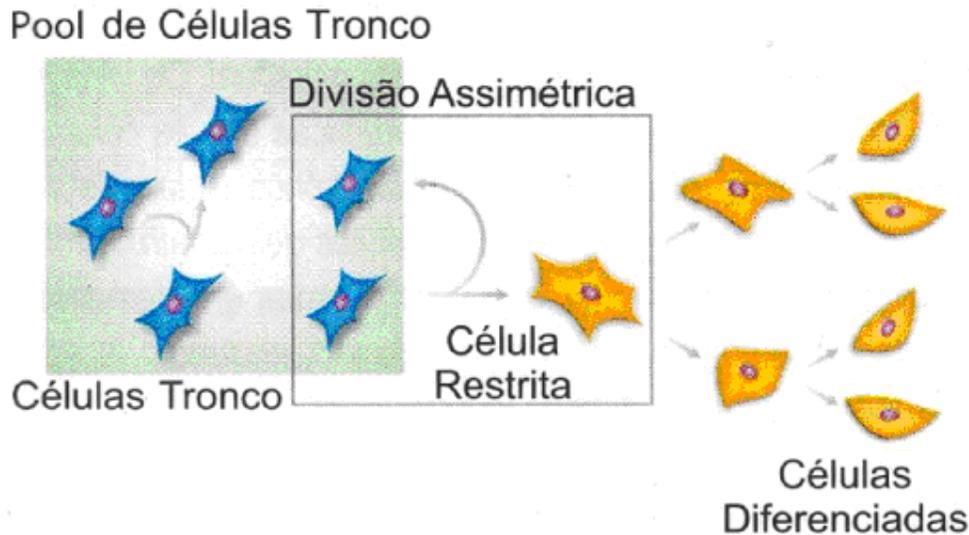


Figura 1. Representação esquemática da propriedade das células-tronco de se dividirem e permanecem indiferenciadas ou se diferenciam e amadurecem. Fonte: Zago, 2006a.

O processo de auto-renovação é importante, uma vez que, se todas as células filhas se tornassem células progenitoras, a população diminuiria progressivamente a partir de cada evento de ativação. Isto resultaria em uma depleção rápida de células de todos os tecidos normais, resultando em um número insuficiente para suportar os processos de remodelação e reparação do organismo (LIN, 1998).

As células-tronco e as progenitoras estão presentes na maioria dos tecidos e são fundamentais para saúde, manutenção e resposta a lesões ou doenças durante a vida. São as fontes de todos os tecidos formados pelos sistemas de reparo e remodelação (BIANCO et al., 2001). São conhecidas as da pele, mucosa intestinal, epitélio olfativo, cérebro, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária, pulmões e músculos esquelético e cardíaco. Denominados de células-tronco somáticas, que podem dar origem a um único ou alguns tipos de células diferenciadas, como unipotentes, oligopotentes ou multipotentes (ZAGO, 2006b). São moduladas por

sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência (BIANCO et al., 2001).

De acordo o grau de diferenciação que as células-tronco podem-se submeter, são classificadas em diferentes categorias. As totipotentes ou embrionárias que são capazes de diferenciar em todos os tecidos do corpo humano, inclusive a placenta e anexos embrionários. Encontram-se nos embriões nas primeiras fases da divisão, com 16 a 32 células, até três ou quatro dias de vida. Este tipo celular se localiza no ápice da hierarquia das células-tronco. Células-tronco pluripotentes conseguem se diferenciar em quase todos os tipos de tecidos de um indivíduo adulto com exceção da placenta e anexos embrionários. As multipotentes são isoladas de vários órgãos adultos auto-renováveis e diferenciadas em múltiplos tipos celulares específicos. Finalmente, com nenhum ou limitado poder de renovação e diferenciação em apenas um único e definido tipo celular são chamadas precursoras ou células progenitoras (DEL CARLO, 2005; LAKSHMIPATHY, VERFAILLIE, 2005; ZAGO, 2006a).

Existem evidências de que células-tronco da MO circulem no sangue periférico e se dirija para tecidos lesados, tanto no contexto de doenças hematológicas (XU, et al., 2005) quanto não hematológicas (ABE, et al., 2004). Voltam para a medula óssea, em um processo fisiológico regulado por uma complexa interação de citocinas (WRIGHT, et al., 2001; PETIT, et al., 2005). Observações recentes de quimerismo cardíaco após transplante de medula podem ser explicadas por este fenômeno fisiológico (QUAINI, et al., 2002; DEB, et al., 2003).

Sugere-se que as células-tronco somáticas de um tecido podem atravessar as barreiras das linhagens celulares e adotar um perfil de expressão gênica, função e fenótipo de células de outros tecidos (HERZOG, CHAI, KRAUSE, 2003). Isto ocorre por um mecanismo conhecido como plasticidade, mas que ainda não foi esclarecido (VERFAILLIE, 2005). Há pelo menos quatro explicações para esta plasticidade. A transdeterminação das células-tronco programadas para gerar linhagens de células, a transdiferenciação processo pelo qual a célula se diferencia e ganha fenótipo de outra diferenciada. Além da dediferenciação onde as progenitoras ou precursoras se diferenciam em outras células adultas e por fim o processo de fusão em adulta

(WATT, 2003). Enquanto se observa relativa facilidade de avaliar o potencial de diferenciação celular *in vitro*, o mesmo não acontece para a situação *in vivo*, pois o significado fisiológico e a correspondência destes processos são questionáveis (NARDI, ALFONSO, 2006).

Diante do exposto, a resposta final depende da avaliação do quanto um determinado tipo de células-tronco, após administração *in vivo*, pode originar células de diferentes tecidos. Geralmente a metodologia dos estudos científicos envolve a sua administração com marcador para avaliação da presença do mesmo. Além da expressão deste marcador, considera-se necessária a determinação da identidade celular por análise morfológica, imunofenotípica e/ou funcional (COLOMÉ, 2007).

II.e. Patogênese das lesões osteocondrais

As articulações são unidades morfofuncionais que suportam cargas mecânicas durante atividades diárias normais ou especializadas. Os componentes estruturais como a cartilagem articular, ossos, músculos, ligamentos, tendões e nervos participam na transmissão das energias aplicadas. Qualquer falha nestes componentes pode produzir mau funcionamento no complexo como um todo. Lesões estruturais acontecem quando a articulação recebe uma carga de impacto, que leva à lesão da cartilagem articular. O avanço progressivo do dano tissular depende das forças de compressão na área lesionada (AROKOSKI et al, 2000).

A etiologia do processo degenerativo das cartilagens articulares é complexa e inicia-se com o envelhecimento. Podem ocorrer fatos que provoquem o início do processo natural, como as doenças inflamatórias ou infecciosas que destroem a estrutura cartilaginosa. A evolução da doença degenerativa articular pode ter origem idiopática ou secundária a trauma. Este processo ocasiona desestruturação osteoligamentar da articulação entre fêmur, tíbia e patela (CAMANHO, 2001). A cartilagem é exigida extensivamente durante os movimentos das articulações. Pode propiciar falhas devido à fadiga, que levam à fragmentação e fibrilação da superfície. Na etapa tardia, torna-se desgastada, expondo o osso subcondral e permitindo a formação de cistos subcondrais. Logo, o osso sofre uma hipertrofia através da

proliferação de osteócitos periféricos, enquanto a membrana sinovial sofre hiperemia e achatamento devido à inflamação (GLASSON et al, 2005).

A degeneração da cartilagem é caracterizada por fibrilação da superfície articular, fissuras e perda parcial ou completa do tecido. Além do aumento na hidratação, estreitamento do espaço articular e alterações na atividade celular do osso subcondral (SETTON, ELLIOTT, MOW, 1999). Os fragmentos da cartilagem articular produzem sinovite e as enzimas liberadas durante o processo inflamatório aumentam a destruição do tecido condróide. Superfícies articulares dos ossos envolvidos se tornam incongruentes, ou seja, mecanicamente incompatíveis devido ao desalinhamento das estruturas articulares. Dessa forma, a articulação sofre sobrecarga, aumentando o dano articular (BELY, 1987). O enfraquecimento por redução de massa e a perda de elasticidade produzem deformação. Desse modo, as principais alterações afetam o amortecimento, estabilidade e lubrificação da cartilagem (SETTON, ELLIOTT, MOW, 1999).

Sabe-se, que a capacidade de reparação da cartilagem articular é limitada, devido à ausência dos vasos sanguíneos e linfáticos. Isolada da circulação sistêmica, o mecanismo de reparo das lesões é realizado através do infiltrado inflamatório ou por meio da migração celular, não ocorrendo quando a cartilagem é danificada (BUCKWALTER, 2002). Injúrias que não penetram no osso subcondral possuem difícil reparação e progridem para a degeneração articular, apresentando uma resposta tecidual branda (WAKITANI et al., 1994). Dessa forma, torna-se evidente que a cartilagem possui capacidade limitada de auto-regeneração após lesão (OCHI et al, 2004).

Em defeitos osteocondrais, raramente é observado um reparo espontâneo pela invasão de células-tronco mesenquimais condroprogenitoras. Essas células se diferenciam em condrócitos e regeneram a cartilagem articular. Contudo, a restauração não reproduz a arquitetura da cartilagem hialina original, diferem bioquímica e biomecanicamente. O tecido de cicatrização resultante possui natureza fibrosa, tornando-o vulnerável aos radicais livres, metaloproteinases e citocinas catabólicas do processo inflamatório (MARTIN et al, 2004). As lesões apresentam tecido de granulação ativo e exuberante com desenvolvimento rápido, e dificultando a proliferação de tecido osteocartilaginoso (INOUYE et al., 2002).

Foram realizadas tentativas de desenvolver procedimentos eficazes para reparação da cartilagem lesionada (WAKITANI et al., 1994). As lesões focais requerem tratamento cirúrgico através de estimulação da medula óssea como desbridamento, perfurações múltiplas, abrasões e microfraturas (KIM, MORAN, SALTER, 1991). Assim como transplantes periosteais e pericondrais, implante de condrócitos autólogos cultivados e enxertos autólogos osteocondrais (AMIEL, et al., 1985; HANGODY et al., 1997; PETERSON et al., 2000). A adição de culturas de CTM's provenientes da medula óssea pode acelerar a regeneração da cartilagem no defeito, quando comparado ao uso isolado dos procedimentos cirúrgicos de estimulação (NISHIMORI et al., 2006). Quando transferidas em suspensão através de injeção intra-articular do joelho, após lesões traumáticas, são capazes de reparar cartilagens e meniscos lesados (MURPHY et al., 2003). As vantagens apresentadas pelas CTM's, quando comparadas com os condrócitos diferenciados, demonstram que possuem maior capacidade proliferativa, dependendo das características do meio em que se encontram (LEE et al, 2004).

As células isoladas da medula óssea podem ser expandidas em cultura, mantendo a capacidade de diferenciação, quando submetidas a estímulos adequados. Assim, segundo Ochi, et al. (2004), as células-tronco mesenquimais são células promissoras para tratamento terapêutico das lesões osteocondrais. São utilizadas in vivo para reparar a cartilagem articular de animais. Caplan et al. (1997), demonstraram em coelhos, a regeneração de uma lesão na cartilagem articular do côndilo femoral, decorridos quatro semanas após transplante. Entretanto, o tecido regenerado se encontrava composto por uma matriz de colágeno tipo I, altamente hidratado, que não reproduzia a função mecânica original da articulação.

II.f. Enxertos

As estratégias terapêuticas para complementar ou substituir a necessidade de enxerto ósseo autólogo procuram atuar diretamente sobre as lesões. Compreende implantação de suportes teciduais, administração local de fatores de crescimento e transplantes de CTM's (WEIGEL, 1993). Foi relatado por Burkus (2002) que vários

tipos de enxertos ósseos podem apresentar propriedades distintas, cada qual com uma função específica na consolidação óssea. Uma delas é a osteogenicidade, que ocorre somente na presença de osteoblastos, pela deposição direta de osso. Apenas o enxerto ósseo autólogo e os aspirados de MO possuem esta propriedade. A outra é a osteocondutividade, que é a habilidade de um material agir como uma ponte, suportando a formação do osso novo e o seu crescimento. Os aloenxertos são exemplos de materiais inertes com osteocondutividade. Por fim, a osteoindução, que revela a presença de fatores de crescimento facilitando o recrutamento e a diferenciação das CTM's, induzindo especificamente a formação de osteoblastos que produzem osso novo.

Os enxertos são utilizados como adjuvantes no processo de reparação e regeneração de estruturas osteocartilaginosas (WEIGEL, 1993). Devem-se evitar traumas aos tecidos e uso de serras oscilatórias, que induzem aumento de temperatura no osso adjacente, resultando em morte celular e retardo na osteogênese (STEVENSON, 1990). Podem ser divididos em esponjoso formado por osso trabecular, poroso e altamente celular; cortical constituído de osso compacto, denso e relativamente acelular e corticoesponjoso composto de ambos os tipos, tais como costelas e asa do ílio (WEIGEL, 1993). Quanto à origem podem ser autólogos, alógenos e xenólogos (PIERMATTEI, FLO, 1997; MARTINEZ, WALKER, 1999). Esses últimos devem ter a antigenicidade diminuída por irradiação, congelamento, preservação química ou autoclavagem, para posterior enxertia (JOHNSON, 1995).

Implantação de ossos descalcificados na musculatura de coelhos e ratos resultou em formação de nova cartilagem e tecido ósseo. Deveu-se ao fato de substâncias originárias do tecido ósseo transplantado em forma de enxerto ter a capacidade de induzir células mesenquimais do hospedeiro a se transformarem em osteoblastos (URIST, 1965). Essas substâncias são conhecidas como Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMP's), (HOBAR, BYRD, 1990). As BMP's são fatores de crescimento multifuncionais pertencentes à superfamília dos fatores de crescimento de transformação β (TGF- β), (CHEN et al., 2004). Encontram-se na matriz óssea em pequenas quantidades e provavelmente agem em sinergismo (BOSTROM et al., 1996).

A formação de tecido ósseo se deve ao recrutamento de CTM's da medula óssea, induzidas por propriedades quimiotáticas da proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (rhBMP-2), que promovem a proliferação e diferenciação de osteócitos (ALDEN et al., 1999). Durante a formação óssea, a BMP motiva um ambiente rudimentar, que é conduzida ao desenvolvimento da medula óssea funcional (CHEN et al., 2004). Entretanto, Burwell et al. (1964), verificaram que as células osteogênicas primitivas da medula óssea respondiam pela maior parte da eficácia biológica dos enxertos de osso esponjoso autólogo. O osso autólogo é o melhor material da osteogênese e possui a vantagem de não transmitir doenças infecto-contagiosas. No entanto, pode apresentar limitações devido à quantidade insuficiente de enxerto. Além disso, a obtenção do auto-enxerto representa um trauma cirúrgico adicional complexo, aumentando a morbidade (KAWANO, SEVERINO, 2005).

O processo de incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor é representado por uma seqüência de eventos. Enquanto o receptor contribui com a formação dos vasos sanguíneos e células necessárias para reparar o processo, o enxerto serve como suporte na qual a resposta vai ocorrer (MUSCOLO, AYERZA, 1998; BURG, 2000). A zona profunda da cartilagem articular apresenta aspecto esponjiforme, com propriedades químicas similares à do tecido ósseo subcondral, possibilitando uma conexão firme entre o osso e a cartilagem (BELY, 1987).

As funções do enxerto ósseo esponjoso incluem a osteogênese, osteoindução e osteocondução (MARTINEZ, WALKER, 1999). A osteogênese consiste na formação de osso pelas células que sobreviveram à transferência (ALEXANDER, 1987) e inicia-se aproximadamente em cinco dias após a enxertia (MARTINEZ, WALKER, 1999). Estima-se que 10% das células deste tipo de enxerto sobrevivam à transferência (PIERMATTEI, FLO, 1997). O recrutamento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos são conhecidos como osteoindução (JOHNSON, 1991). A osteocondução é um processo tridimensional de crescimento de capilares, tecido perivascular e células mesenquimais do leito recipiente para dentro da estrutura do enxerto (MARTINEZ, WALKER, 1999).

Existem vários estágios de incorporação do enxerto autólogo esponjoso no foco de fratura. Inicialmente forma-se um hematoma que gradualmente se organiza,

sendo reabsorvido entre uma e duas semanas. A resposta inflamatória ocorre em minutos ou horas. Com a revascularização e osteoindução, surgem alças capilares decorridos de cinco dias. O tecido necrótico é reabsorvido e o enxerto é revascularizado em 20 dias. A remodelação prossegue, com corticalização e medulização (MILLIS, MARTINEZ, 2003).

Complicações no local doador são de baixa frequência, representadas por formação de seroma, hemorragia, deiscência da ferida, fraturas e contaminação por bactérias. Já no local receptor, a ausência de estímulo para formação óssea e não incorporação ao local da fratura (DENNY, BUTTERWORTH, 2000).

II.g. Conservação dos enxertos osteocartilaginosos

Vários são os métodos de conservação de ossos, como congelamento (DUELAND et al., 1989), tintura de iodo (PINTO JÚNIOR, 1995), liofilização (SCHENA, MITTEN, HOEFLE, 1984), glicerina a 98% (COSTA, 1996), óxido nitroso (JOHNSON, SHOKRY, STEIN, 1985) e mel (AMENDOLA, 2001). Ossos conservados apresentam vantagens em relação ao material fresco xenólogo e alógenos, pois diminuem a possibilidade de rejeição (WEIGEL, 1993). Ossos armazenados, congelados de -5° a -20°C , as enzimas teciduais ainda se encontram ativas e eventualmente diminuem as propriedades biomecânicas e terminam por destruir o tecido. No entanto, temperaturas entre -70° e -80°C resultam em mínima destruição tecidual (PARKER, 1996). O que retarda a autólise causada pela liberação de enzimas proteolíticas, influenciando nas condições do meio ambiente celular (MATTER, et al., 2001). A taxa de congelamento é um dos principais fatores que influenciam a viabilidade celular durante o processo de congelamento e descongelamento. Congelamento de espécies diferentes de células, incluindo microrganismos e células da medula óssea, mostrou que em congelamento lento, a saída de água da célula ocorreu de forma lenta, não afetando a estrutura celular. Já em congelamentos rápidos, a viabilidade celular foi muito reduzida (DUMONT, MARECHAL, GERVAIS, 2004).

O custo do equipamento de liofilização limita o emprego desta técnica. Os tecidos são inicialmente congelados a -76°C , sendo guardados em um liofilizador, em seguida são submetidos ao vácuo e a temperatura é gradualmente elevada até 20°C , com umidade aproximando-se a valores inferiores a 5% (PARKER, 1996). Os aloimplantes liofilizados, embora melhor sucedido que os a fresco, apresentaram resultados não expressivos, em comparação com os auto-enxertos (STEVENSON, 1998).

A conservação em glicerina é um método acessível não sendo necessário o emprego da autoclavagem e congelamento, técnicas que causam danos teciduais e prejudicam a formação de calo ósseo. Ossos com medula óssea íntegra foram conservados em glicerina 98% por nove anos, sendo notado preenchimento do canal medular. A coloração era rósea pálida e não houve ressecamento, sendo possível aspirar seu conteúdo com uma seringa. Durante sua utilização não foi constatada rejeição do organismo ao meio conservante na evolução pós-operatória (GIOSO, BENITES, KAMPF, 2002).

Pinto jr. (1990) e Costa (1996) utilizaram a glicerina a 98% como meio de preservação de ossos para uso em enxertos. Relataram que a glicerina desidrata o tecido ósseo substituindo a maior parte da água intracelular, sem alterar a concentração iônica das células. Atuando como protetor da integridade celular (PIGOSSI, 1964). Além disso, tem ação anti-séptica, bactericida e fungicida, exceto contra formas esporuladas (PIGOSSI, 1967).

Dentre os métodos de conservação de ossos avaliados, o congelamento e a glicerina a 98% foram os que proporcionaram melhores resultados em cães (DEL CARLO et al., 1999; ZILLOTTO et al., 2003). A glicerina além de ser um bom meio de conservação de fragmentos ossos para uso em enxertos, preserva a função osteoindutora e um adequado grau de osteocondução, não apresenta sinais de infecção e de rejeição no receptor (ZILLOTTO et al., 2003). Para isso, osso precisa permanecer por pelo menos 30 dias submerso em glicerina antes de ser utilizado, e deve ser hidratado com solução fisiológica antes de sua utilização (DEL CARLO, 1999). Um fato importante é que o enxerto não deve ser imerso em soluções isotônicas ou tratados com antibióticos por serem tóxicos para as células (FOX, 1984; JOHNSON, 1995; PIERMATTEI, FLO, 1997).

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.a. Coleta das articulações e preservação

Foram coletadas 24 articulações fêmoro-tíbio-fíbulo-patelares de 12 coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia, com peso entre 2,5kg a 4,0kg. As peças foram obtidas após o abate no abatedouro da Escola Agrícola Federal de Uberlândia, MG, fiscalizado pelo serviço de inspeção municipal. Os doadores selecionados não apresentavam alterações ortopédicas e neoplasias ósseas.

Com um paquímetro graduado¹ mensurou-se uma área de $\pm 0,4\text{cm}$ largura x $1,0\text{cm}$ comprimento sobre o sulco troclear femoral de cada articulação. Com auxílio de uma lâmina de bisturi n^o10 esta região foi demarcada para retirada do enxerto. Em seguida, a remoção do segmento osteocartilaginoso em forma de cunha foi realizada por meio de um disco diamantado acoplado á uma micro-retifica Dremel^{®2}. Esta foi mantida sob baixa rotação e refrigeração por gotejamento contínuo de solução fisiológica a 0,9%³. Os enxertos foram higienizados repetidas vezes com solução fisiológica e armazenados em frascos identificados, contendo solução de glicerina a 98%⁴, à temperatura ambiente durante um período mínimo de 30 dias.

III.b. Animais

Para realização deste experimento, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 041/08, parecer 060/08.

Empregaram-se no estudo 24 coelhos adultos, machos da raça Nova Zelândia, com peso entre 3,0kg a 4,5kg, provenientes do Laboratório Vallée de Uberlândia, MG. Todos foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e ração à vontade. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas e hematológicas e exames radiográficos da articulação fêmoro-tíbio-fíbulo-patelar esquerda nas posições látero-medial e dorso-ventral e respeitou-se um período de

15 dias para adaptação ao ambiente e socialização dos animais com os pesquisadores.

Em seguida os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de igual número, controle (GC) e tratado com células-tronco (GCT). Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos com avaliações histológicas em 45 e 90 dias de pós-operatório (PO). Os animais do grupo controle foram identificados de C1 a C12 e os do grupo tratados CT1 a CT12. Para os dois subgrupos os seis primeiros animais de cada grupo referiam-se a 45 dias de PO e os seis últimos ao período de 90 dias de PO. Foram avaliadas as funções clínicas, os aspectos macroscópicos e histológicos das articulações.

III.c. Pré-operatório

Os coelhos permaneceram em jejum hídrico e sólido por um período de 2 e 4 horas, respectivamente. Submetidos à medicação anestésica com cloridrato de cetamina⁵ (30,0mg/kg, IM) e cloridrato de xilazina⁶ (5,0mg/kg, IM). Para analgesia pré-operatória foi realizada a administração de tramadol⁷ (2,0mg/kg, SC), além do antiinflamatório flunixinina meglumina⁸ (1,0mg/Kg, IM). A antibioticoterapia profilática com cefazolina sódica⁹ (30,0mg/Kg, IM), foi feita 30 minutos antes do procedimento cirúrgico.

A região da pele da articulação do joelho esquerdo e da região da articulação escápulo-umeral foram submetidas à tricotomia e anti-sepsia com iodo degermante¹⁰, álcool¹¹ e polivinil-pirrolidona¹².

III.d. Coleta da medula óssea, isolamento, contagem e viabilidade das células mononucleares

Com os animais sob efeito anestésico, uma agulha metálica de Rosenthal¹³ de 16G heparinizada, (Figura 2 - A) foi inserida na região do tubérculo umeral por meio de movimentos rotacionais (Figura 2 - B e 2 - C) para coleta de 2,0mL de

medula óssea íntegra (Figura 2 - D). Após a agulha penetrar no espaço medular do úmero, a medula óssea foi aspirada com uma seringa de 10mL contendo 0,1mL de solução estéril heparinizada¹⁴ (5000U/mL). Durante a punção foram realizados breves movimentos com a seringa para homogeneização das amostras com a solução de heparina, evitando a formação de coágulos. Em seguida, sob temperatura ambiente foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, para isolamento, determinação do rendimento e viabilidade das células mononucleares.

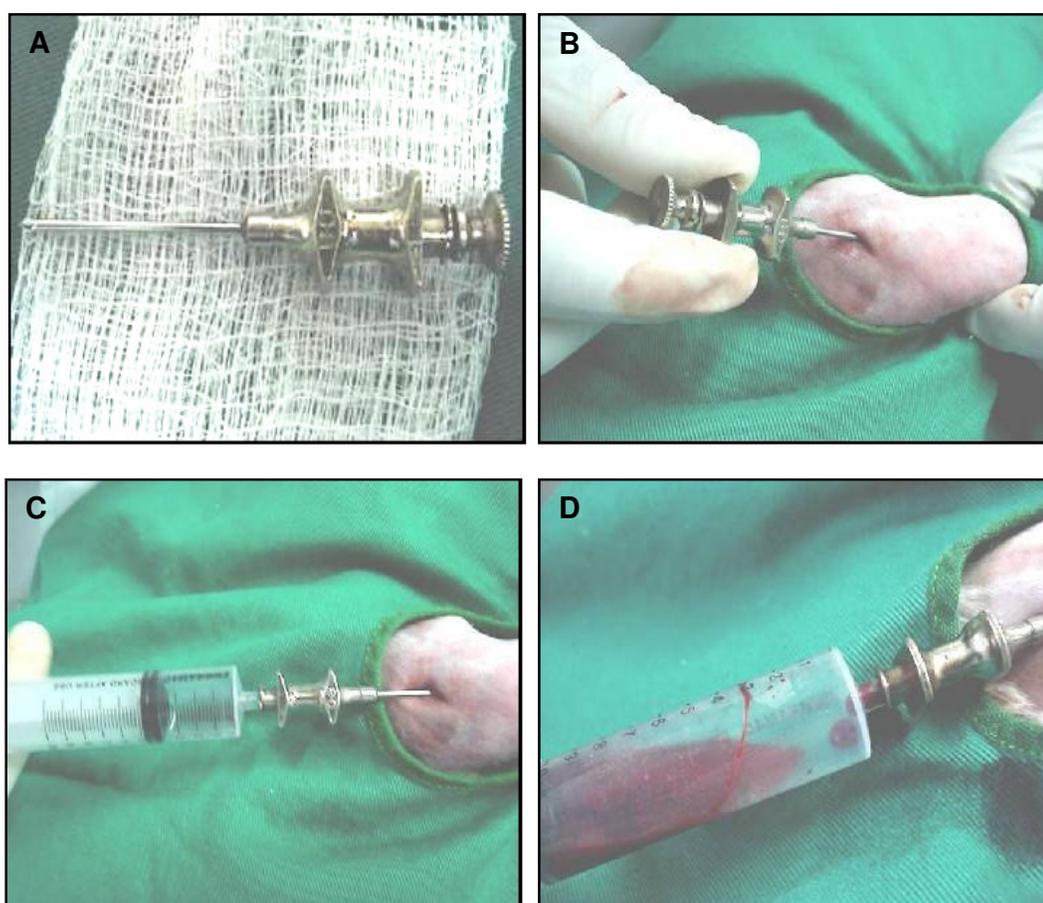


Figura 2. Agulha de Rosenthal 16G (A) introduzida no tubérculo maior do úmero (B). Seringa de 10mL com 0,1mL de heparina acoplada a agulha de Rosenthal (C) e medula óssea aspirada (D).

Em capela de fluxo laminar¹⁵ desinfetada com álcool e luz germicida os aspirados de medula óssea foram colocados individualmente em tubos estéreis de

15mL tipo Falcon¹⁶. Formou-se uma solução “A” diluiu-se volume a volume (v/v) 2,0mL da amostra em 2,0mL de solução salina tamponada de Dulbecco's¹⁷ (DPBS). A solução foi adicionada lentamente com pipeta de Pasteur sobre 2,0mL de solução Ficoll-Hypaque Plus¹⁸ na densidade 1,077g/mL em um outro tubo Falcon, para separação das células mononucleares, formando a solução B (Figura 3 - A).

Após centrifugação da solução B á 495G (força centrípeta) durante 30 minutos a 15°C, cada amostra foi separada em quatro porções distintas. Na superfície o plasma, logo abaixo a nuvem celular composta pelas células mononucleares em seguida o Ficoll-Hypaque e por fim na porção inferior do tubo as células que compõe a parte vermelha do sangue (Figura 3 - B). O sobrenadante composto pelo plasma foi removido e a nuvem celular formada sobre a solução de Ficoll-Hypaque foi cuidadosamente coletada com o auxílio de pipeta Pasteur, e transferida para um novo tubo estéril de 15mL. O sedimento celular foi lavado duas vezes com 10,0mL de DPBS a 385G durante 10 minutos a 4°C, para remoção de restos de plasma, Ficoll- Hypaque e células vermelhas.

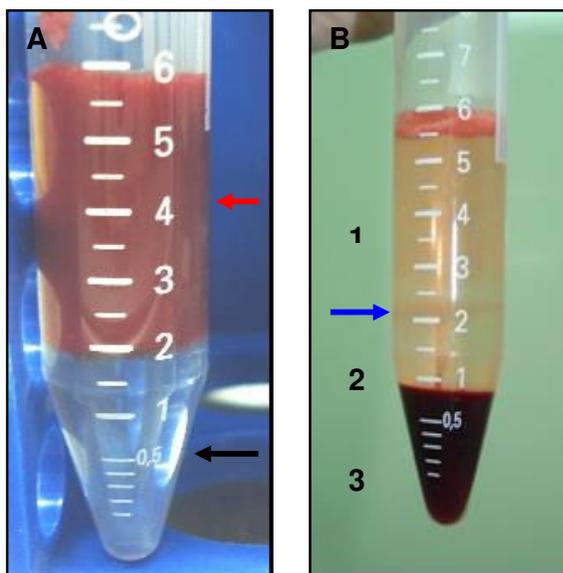


Figura 3. Em “A” seta vermelha indica a solução composta por 2,0mL de medula óssea íntegra e 2,0mL da solução salina tamponada. Seta preta evidencia 2,0mL de solução Ficoll-Hypaque. Na figura “B”, o mesmo tubo após centrifugação á 495G durante 30 minutos a 15°C. Notar o plasma e sedimentos (1), Ficoll-Hypaque (2) e células vermelhas (3). A seta azul exibe a nuvem de células mononucleares mesenquimais da medula óssea de coelho.

Após desprezar o sobrenadante, adicionou-se a amostra 1,0mL de tampão de lise de eritrócitos contendo cloreto de amônio 0,16M e Tris 0,17M, com pH 7,6

durante cinco minutos à temperatura ambiente. Uma terceira lavagem foi realizada com a adição de 10mL de DMEM¹⁹ (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente desprezado, permanecendo aderido no fundo do tubo apenas o aglomerado celular. Adicionou-se ao sedimento celular a quantidade necessária do meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, até que a amostra atingisse o volume total de 500µl. Mantida em gelo até a contagem das células e análise da viabilidade celular.

Deste volume, uma alíquota de 10µl da suspensão foi adicionada a 10µl do corante azul de Tripán²⁰ em um tubo de Eppendorf²¹ para contagem das células em câmara hemocitométrica de Neubauer²². A contagem de células viáveis e não viáveis foi realizada sob microscopia de luz, e o cálculo do número de células por mililitro foi determinado pela seguinte fórmula: $V \times FN \times FT / \#Q$, onde V = número de células viáveis contadas; FN = fator da câmara de Neubauer (10^4); FT = fator de diluição do Azul de Tripán (2) e $\#Q$ = número de quadrantes da câmara utilizados para a contagem.

A viabilidade foi determinada por técnica de exclusão vital, ou seja, das células não coradas por azul de trypan, como anteriormente descrito por Freshney (2001) e Bittencourt et al., (2006). A viabilidade celular foi determinada em porcentagem, aplicou-se a equação matemática: $V \times 100 / NT$, onde NT = número total de células (viáveis e não viáveis) contadas na câmara hemocitométrica.

II.e. Diluição do sedimento celular inoculado

Com intuito de padronizar a quantidade de células inoculadas no espaço articular dos coelhos, foi obtido o cálculo do fator de diluição de cada amostra, obtendo-se os volumes finais para inoculação. O número de células viáveis transplantadas para cada articulação dos coelhos foi de 2×10^6 células. A determinação do fator de diluição foi obtida pela seguinte equação matemática: $FD = QT / CT$, onde QT = quantidade de células viáveis presente em 500µl do sedimento celular; e CT = quantidade de células a serem transplantadas (2×10^6). O volume final foi calculado pela seguinte fórmula: $VF = VI / FD$, onde VI = volume inicial do

inoculado (500 μ l); e FD = fator de diluição. Os volumes finais da fração de células mononucleares foram ajustados e armazenados em tubos de Eppendorff. A fração celular foi aspirada dos tubos de Eppendorff para seringas estéreis de 1,0mL para aplicação intra-articular no momento dos procedimentos cirúrgicos.

III.f. Técnica cirúrgica

Aproximadamente 20 minutos antes do término do isolamento das células-tronco mononucleares, iniciaram-se os preparativos para a intervenção cirúrgica de enxertia e transplante celular autógeno. Os mesmos coelhos utilizados na coleta de medula óssea foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. Com o animal em decúbito dorsal foi realizada uma incisão na pele de aproximadamente 4,0cm na região parapatelar lateral da articulação do membro posterior esquerdo e incisão de \pm 3cm na cápsula articular. A patela foi deslocada medialmente para exposição do sulco troclear femoral esquerdo. Com um paquímetro graduado, mensurou uma área de 0,4cm de largura x 1,0cm. A área foi delimitada por incisões na cartilagem articular com lâmina de bisturi nº10. O segmento do sulco troclear foi removido por meio de um disco diamantado acoplado á uma micro-retifica (Dremel®) em baixa rotação e sob refrigeração com gotejamento de solução fisiológica. O disco foi angulado em torno de 30º no intuito de remover o segmento em forma de cunha, preservando as trócleas medial e lateral (Figura 4).

Posteriormente, efetuou-se cuidadosa dessecção do osso subcondral utilizando lâmina de bisturi, evitando-se danificar as bordas trocleares, bem como á cartilagem articular adjacente. O local removido foi preenchido com enxerto osteocartilaginoso alógeno conservado em glicerina a 98%, previamente hidratado por 30 minutos com solução fisiológica a 0,9%. A adequação das bordas dos enxertos se fez necessária, com o objetivo de promover melhor acomodação e evitar depressões entre as superfícies cartilaginosas do implante e do leito receptor.

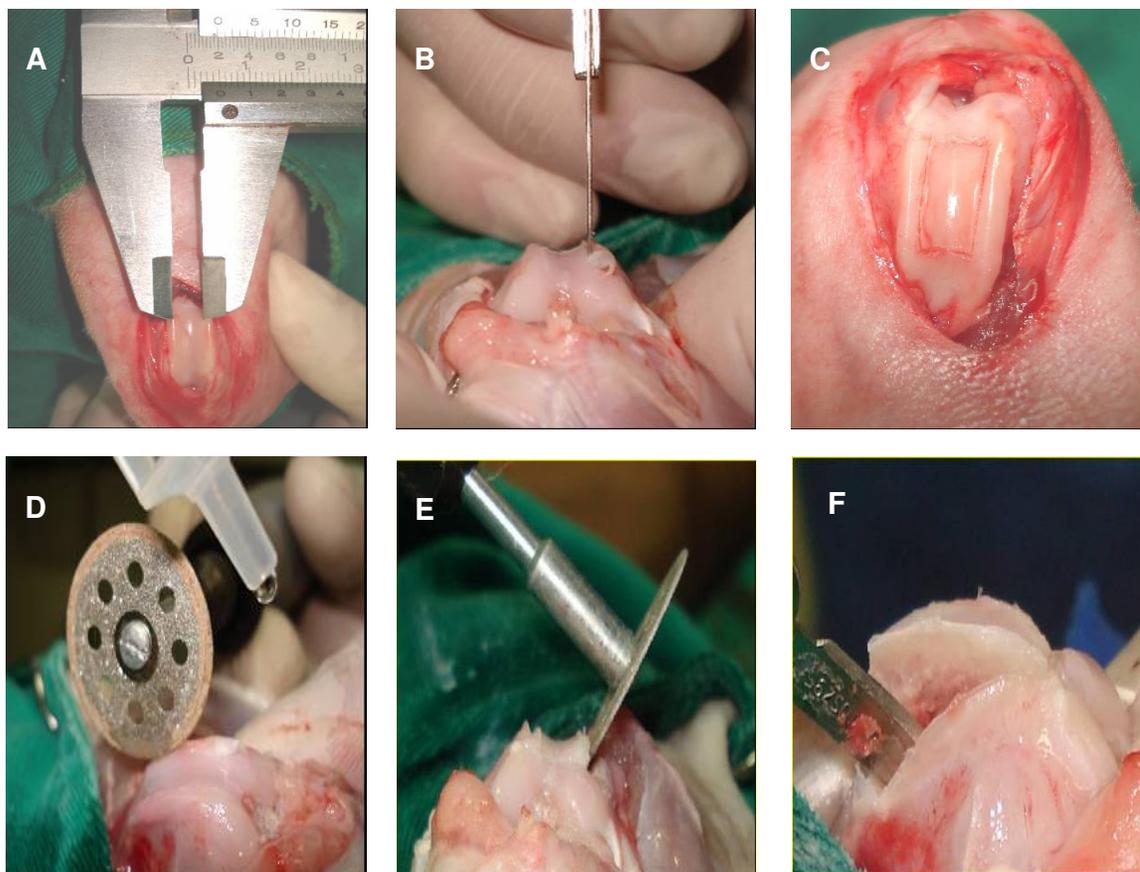


Figura 4. Mensuração com paquímetro do local do sulco troclear a ser removido (A) e demarcação da área com lâmina de bisturi N^o10 (B). Notar a superfície articular demarcada (C) e o disco posicionado sobre o local demarcado (D). Posição angulada do disco para remoção do implante em forma de cunha (E) e remoção do enxerto com dissecação das faces do enxerto (F).

No sítio receptor dos animais do grupo controle foi transplantado apenas o enxerto osteocartilaginoso alógeno conservado em glicerina a 98%. Em seguida a patela foi reposicionada, procedendo-se a sutura da cápsula articular e redução do espaço subcutâneo com fio poliglactina 910²³, n^o 4-0 com pontos simples isolados e zigue-zague, respectivamente. A reaproximação da pele foi realizada com sutura simples isolada utilizando fio mononáilon²⁴ n^o 3-0 agulhado. Nos coelhos do grupo tratado foram efetivados os mesmos procedimentos, porém associados à administração intra-articular de 0,5mL células mesenquimais mononucleares isoladas e quantificadas. A fração celular total inoculada foi de 2×10^6 células mononucleares da medula óssea do próprio animal, diluídas em DMEM.

III.g. Pós-operatório

No pós-operatório, foi realizada antibióticoterapia com cefazolina sódica (30,0mg/kg, IM); de 12/12 horas durante sete dias, além de anti-inflamatório flunixinina meglumina (1,0mg/Kg, IM); a cada 24 horas por três dias. Para analgesia utilizou-se o cloridrato de tramadol (2,0mg/kg/SC) de 8 em 8 horas, durante três dias. As feridas cirúrgicas foram higienizadas duas vezes ao dia, com gazes umedecidas em solução fisiológica a 0,9%, e posterior aplicação tópica de solução polivinil-pirrolidona 10% e rifamicina spray²⁵ por 10 dias, data prevista para remoção dos pontos. Os coelhos foram mantidos com colar elisabetano confeccionados com filmes radiográficos, a fim de evitar sua interferência na área da intervenção cirúrgica.

III.h. Avaliação clínica

Durante todo o período de PO os animais foram submetidos a exames clínicos do membro operado. Com avaliação dos movimentos de flexão e extensão, palpação articular e o tipo de deambulação apresentada.

III.i. Avaliação macroscópica

Decorridos os períodos pré-estabelecidos de 45 e 90 dias os animais foram submetidos à eutanásia para coleta das articulações fêmoro-tíbio-fíbulo-patelares com sobredose de tiopental sódico 2,5%²⁶ e cloreto de potássio 10%²⁷, conforme recomendado pelo código de ética para o uso de animais em pesquisas científicas (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2001).

Durante a biópsia das articulações, foram realizadas avaliações da cicatrização, presença de transudato e/ou exsudato e reações teciduais anormais. Na inspeção macroscópica intra-articular foram observadas as alterações como coloração, volume e consistência do líquido sinovial. Além de aderências entre tecidos adjacentes, a espessura da cápsula articular, posicionamento da patela e os

aspectos das bordas trocleares. Assim como a coloração, consistência, irregularidades na superfície do enxerto, área de contato com as bordas trocleares, bem como a adesão do enxerto ao sítio receptor. Os enxertos osteocondrais alógenos foram examinados quanto à integração ao leito receptor, crescimento de tecidos periarticulares e a presença de áreas com reabsorção óssea.

III.j. Avaliação histológica

Nos períodos de 45 e 90 dias de PO as articulações fêmoro-tíbio-fíbulo-patelares foram coletadas e armazenadas em frascos individuais e fixadas por formol 10%²⁸ por um período mínimo de 24 horas, à temperatura ambiente. Procedeu-se a descalcificação em ácido nítrico a 5% durante dois dias, sendo realizada a troca do fluido descalcificador de duas em duas horas. As amostras foram lavadas em água corrente durante 12 horas. No processo de desidratação foi utilizado o álcool absoluto, sendo este trocado a cada hora, no total de quatro trocas. Para a diafanização dos materiais utilizou-se o xilol²⁹, e previamente a inclusão em blocos, as amostras permaneceram imersas em parafina líquida no interior da estufa a 70°C, durante duas horas. Foram realizados cortes transversais de 0,5mm na região entre o implante e o leito receptor, com intuito de analisar a área de transição. Os cortes foram em seguida corados com Hematoxilina-Eosina³⁰ (HE) e tricrômio Mallory³¹. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Polyvar (Reichert-Jung)³².

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Decidiu-se pela utilização de coelhos da raça Nova Zelândia como modelo experimental em consideração a pouca exigência de espaço físico para alojamento. Além da facilidade de manipulação, manutenção e de estabelecer um protocolo anestésico. O número de animais envolvidos baseou-se em princípios bioéticos, utilizando o mínimo de coelhos para validação dos dados (LEOPIZZI et al., 1998).

O período de jejum utilizado neste experimento foi devido ao piloro do coelho ser estreito e não apresentar a capacidade de vomitar. É recomendado um período máximo de três a quatro horas, sendo que intervalos maiores tornam-se prejudiciais à saúde e recuperação do animal (QUINTON, 2005).

O protocolo anestésico utilizado foi de fácil administração, seguro e eficiente por manter os animais anestesiados e com respiração espontânea. A associação de cetamina e xilazina promoveu relaxamento muscular adequado para realização dos procedimentos cirúrgicos (LIPMAN, MARINI, ERDMAN, 1990).

Em relação aos locais da aspiração da medula óssea foi citado por Grindem, Neel, e Juopperi (2002) a crista ilíaca, o trocanter maior do fêmur e o tubérculo maior do úmero. Neste experimento, optou-se pela coleta no tubérculo umeral devido à facilidade na obtenção de grande volume do aspirado e na padronização do traumatismo gerado pela punção. Procurou-se não realizar a coleta da medula nos membros pélvicos, para evitar sinais de claudicação causada pela dor, interferindo na avaliação clínica das articulações fêmoro-tíbio-fíbulo-patelares. A coleta da medula foi simples, porém dependente do protocolo anestésico. Seringas e agulhas foram heparinizadas para prevenir entupimento e coagulação das amostras. A agulha de Rosenthal 16G utilizada na punção medular permitiu com facilidade a coleta da medula óssea. Entretanto, no plano piloto foram utilizadas agulhas hipodérmicas 40,0 X 12,0mm, e na perfuração do tubérculo umeral os biseis se danificavam dificultando a aspiração. Por outro lado, o diâmetro da agulha favoreceu a aspiração de fragmentos ósseos interferindo, no tubo falcon próximo do anel celular, a coleta das células mononucleares.

Existe a possibilidade de coagulação da amostra quando não for utilizado a heparina e o anticoagulante lesar as células medulares, entretanto, não foi

determinado à necessidade e o volume adequado (CONNOLLY et al., 1989; HEALEY et al., 1990; MUSCHLER, BOEHM, EASLEY, 1997). Yanai, et al. (2005), utilizaram 0,3mL de heparina (1000U/mL) para cada 2,0mL da amostra de medula e obtiveram bons resultados no reparo de defeitos da cartilagem articular de coelhos. Já Bruder et al. (1998), em cães utilizaram 9,0mL de medula para cada 1,0mL de solução salina heparinizada (1000U/mL) e não encontraram morte celular significativa. Neste experimento, utilizou-se 0,1mL de heparina sódica (5000U/mL) para cada 2,0mL da medula óssea, sendo que a viabilidade celular e o potencial reparador não foram comprometidos, confirmado com a boa integração do enxerto nos animais do grupo tratado. Denota-se que o volume e a concentração do anticoagulante utilizado, impediram a coagulação das amostras e mantiveram a média de células-tronco viáveis em 91,79%. Resultado próximo dos alcançados por Olsson et al. (2009), que obtiveram viabilidade superior a 90% trabalhando com aspirado medular de cães.

A utilização de concentrado células-tronco mesenquimais pode acelerar o processo de cicatrização osteocartilaginosa, porém deve-se considerar que nem sempre um maior volume coletado significa maior número de células com capacidade reparadora (CONNOLLY et al., 1989). Porém Muschler, Boehm, Easley, (1997), afirmaram que essa diferença do número e da concentração das células-tronco de um animal para outro são influenciadas pelo volume aspirado e pela diluição com o sangue periférico. Resultados semelhantes ao de Connolly foram encontrados neste trabalho, pois em cada volume coletado o número de células viáveis variou entre os animais. Assim como, nem sempre uma amostra com maior número de células apresentava maior quantidade de células viáveis e melhor potencial reparador. Isto se deve a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos como micro ambiente, fatores de crescimento, tipo de material implantado e técnica de manipulação das células.

Existe uma relação proporcional entre as células-tronco e as células nucleadas de medula (1:100.000). Devido a isso é necessário isolar, purificar e concentrar a população celular, para que haja resposta eficaz no tratamento (CONNOLLY, 1995). Neste experimento, empregou-se o isolamento e a quantificação das células da medula óssea, otimizando a terapia celular no reparo osteocondral. Com

metodologia semelhante à de Budenz e Bernard (1980), realizada em coelhos, foi possível isolar e quantificar as células da medula óssea pelo gradiente de densidade Ficoll-Hypaque.

No reparo de defeitos da cartilagem articular de coelhos, com células-tronco mesenquimais, Yanai et al. (2005), coletaram 2,0mL de medula óssea do fêmur e encontraram em média de 5×10^6 células/mL. Já Connolly et al. (1989), retiraram de 7,0 a 10,0mL e obtiveram 8×10^6 células/mL isoladas por gradiente Ficoll-Hypaque. Neste experimento, foram coletados 2,0mL, e o número médio de células quantificadas foi de $6,76 \times 10^6$ células/mL, variando entre $2,64 \times 10^6$ e $15,28 \times 10^6$. O resultado encontrado foi inferior aos encontrados por Connolly et al. (1989), possivelmente por terem coletado um maior volume de aspirado e superior aos de Yanai et al. (2005) que também coletou 2mL de MO. Logo a metodologia aplicada com o uso de gradiente Ficoll-Hypaque demonstrou eficácia no isolamento das células mononucleares da medula óssea de coelhos. Além disso, a quantidade suficiente de células para terapia celular pode ser obtida a partir de menores volumes de aspirado, evitando perfurações na pele e tornando o PO mais doloroso e dispendioso.

A viabilidade celular da amostra foi analisada pelo método de exclusão de células não viáveis, pela utilização prévia do tampão de lise de eritrócitos, favorecendo a identificação das células. Seguindo as recomendações de Freshney (2001) as células foram contadas excluindo-se aquelas em que o citoplasma era corado pelo azul de tripan, sendo consideradas inviáveis (Figura 5).



Figura 5. Microfotografia de células mononucleares da medula óssea coletadas no tubérculo umeral de coelhos. Células viáveis (setas verdes) e células inviáveis com citoplasma corado com azul de Tripan (seta amarela). Microscopia de luz (aumento 100x).

A viabilidade variou entre 81,97% e 97,09%, em média de 91,79%. Bittencourt et al. (2006), obtiveram viabilidades superiores a 95% e Tognoli et al. (2007) de 90%, utilizando o mesmo método de exclusão. A média celular relatada pelos autores foi semelhante à verificada neste experimento, o que confirma a eficácia do protocolo de isolamento adotado. Os resultados individuais de rendimento e viabilidade se encontram expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores individuais da contagem e viabilidade das células mononucleares isoladas da medula óssea de coelhos, referentes à coleta de 2,0mL de medula óssea.

Animais	Contagem	Viabilidade	Células viáveis/inviáveis
CT 1	3,06 x 10 ⁶	84,53%	153/28
CT 2	15,28 x 10 ⁶	95,90%	764/32
CT 3	9,22 x 10 ⁶	95,05%	461/24
CT 4	4,68 x 10 ⁶	97,09%	234/07
CT 5	6,38 x 10 ⁶	95,22%	319/16
CT 6	3,78 x 10 ⁶	96,92%	189/06
CT 7	10,68 x 10 ⁶	87,50%	267/38
CT 8	5,10 x 10 ⁶	93,40%	255/18
CT 9	3,82 x 10 ⁶	81,97%	191/42
CT 10	2,69 x 10 ⁶	90,70%	539/55
CT 11	11,64 x 10 ⁶	94,00%	582/36
CT 12	4,90 x 10 ⁶	89,26%	981/118
MÉDIA	6,76 x 10⁶	91,79%	

Com possibilidades de reparar defeitos que evoluem desde alterações degenerativas até a perda completa da superfície articular, várias técnicas cirúrgicas são recomendadas para animais e humanos (VAN SUSANTE et al, 1999). São utilizadas perfurações ósseas múltiplas, abrasões e microfraturas (KIM, 1991), implantes de condrócitos cultivados e utilização de enxertos autólogos osteocondrais (AMIEL, et al., 1985; HANGODY et al., 1997; PETERSON et al., 2000). Observa-se que o padrão de reparo dos defeitos articulares ainda não foi descrito. Assim como realizado por Melendez (2006), o delineamento deste trabalho baseou-se na

reparação osteocartilaginosa com emprego de enxertos alógenos na articulação fêmoro-tíbio-fíbulo-patelar de coelhos associados a células mononucleares mesenquimais autólogas, porém os enxertos foram preservados em glicerina a 98%.

A esterilização e conservação do enxerto são os maiores problemas na enxertia, sendo freqüentemente observado contaminação bacteriana, fúngica e viral. (PINTO JR., 1995). Neste trabalho, foi utilizada a glicerina a 98% como meio de preservação dos enxertos, que não deve ter alterado a integridade celular, preservando a morfologia osteocartilaginosa do implante (COSTA, 1996). Os enxertos não foram previamente tratados com antibióticos por serem tóxicos (PIERMATTEI, FLO, 1997) e interferir nos resultados. Além disso, a ação anti-séptica, bactericida e fungicida da glicerina (PIGOSSI, 1967), preveniu a resposta imune do hospedeiro e a transmissão de doenças (BARRY, MURPHY, 2004).

Nos achados macroscópicos do grupo controle aos 45 e 90 dias PO, nove animais (75%), apresentaram a cápsula articular espessa e em cinco (41,66%), aderida aos tecidos adjacentes (Figura 6-A), sendo que em quatro (33,33%) observou-se as duas anormalidades. De acordo com Lipowitz, (1993) o aumento da espessura da cápsula articular ocorreu devido ao processo inflamatório instalado. Esta alteração inicia-se com a degradação da matriz por enzimas e mediadores da inflamação, seguida de quebra dos proteoglicanos e da rede de colágeno. Resultando no aumento da espessura da cartilagem, incremento da quantidade de água no espaço entre as fibrilas de colágeno, além de necrose dos condrócitos superficiais e redução de sua densidade.

No animal C3 (8,33%) foi observado reabsorção do enxerto. Possivelmente, pela presença de enzimas lisossomais que degradaram a cartilagem articular por destruírem os proteoglicanos, os glicosaminoglicanos e o colágeno (STASHAK, 1994). Além disso, nas injúrias da membrana sinovial as enzimas são liberadas pelas células inflamatórias, com isso, prostaglandinas, radicais livres e citocinas são secretadas junto com o fluído sinovial (LESCHONSKI, 1999). Estes fatores associados podem ter ocasionado lesões erosivas na cartilagem articular com diferentes intensidades. Além disso, o líquido sinovial encontrava-se viscoso avermelhado característico de hemorragia (Figura 6-B).

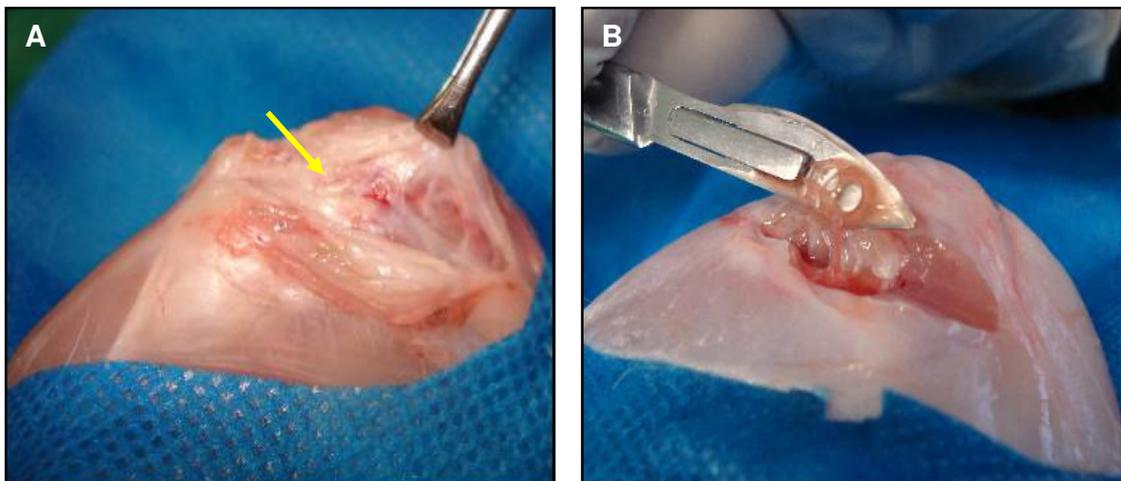


Figura 6. Aspecto látero-medial da articulação do joelho esquerdo do coelho C3 do grupo controle decorridos 45 dias de PO. Notar em “A” espessamento e aderência da cápsula aos tecidos adjacentes (seta amarela) e em “B” a presença de líquido sinovial com coloração avermelhada.

Em cinco coelhos (41,66%) do grupo controle o líquido sinovial apresentava-se de coloração amarelada (C1, C4, C5, C6, e C12). Apesar dos animais terem sido submetidos a antibiótico e antiinflamatório no pré-operatório e pós-operatório, as alterações observadas deveu-se ao processo inflamatório provocado pelo processo degenerativo do enxerto. No animal C7 (8,33%), observou-se no espaço articular, grânulos de pus, possivelmente por contaminação ou falha na ação anti-séptica da glicerina como meio de preservação. Nos coelhos C8, C9, C10, C11 (33,33%) a coloração apresentava-se próxima do normal e o volume do líquido era intenso e menos viscoso e em um (C2), 8,33% estava ausente. A diminuição da viscosidade pode ser devida à liberação da enzima hialuronidase que atua na degradação do ácido hialurônico durante o processo inflamatório. A membrana sinovial inflamada produziu em excesso um fluido aquoso, tornando-o relativamente ineficiente na proteção das cartilagens articulares (BENNET, 2004). Além disso, no C2 a patela encontrava-se luxada medialmente, devido ao arrasamento do sulco troclear femoral e perda das bordas trocleares em conseqüência do crescimento exacerbado de tecido fibroso. Alteração que não foi verificada nos animais tratados com células mononucleares.

Foi observado no grupo controle crescimento desordenado de osteófitos pericondrais (Figura 7), mecanismo pelo qual a cartilagem reage na tentativa de

impedir a progressão ou reparar o processo degenerativo (SCHIAVINATO et al., 1989; JOHNSTON, 1997).

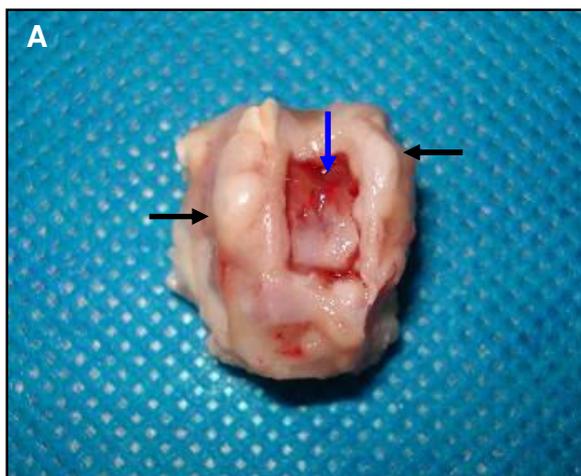


Figura 7. Aspecto do sulco troclear de coelho do grupo controle (C3) após 45 dias de PO. Observar o local de reabsorção do enxerto (seta azul) e crescimento de tecido conjuntivo denso sobre as faces medial e lateral das trócleas (setas pretas).

Nos animais do grupo tratado com células-tronco (GCT) aos 45 dias de pós-operatório não havia sinais de infecção e/ou de rejeição imunológica e o enxerto alógeno apresentava-se aderido no leito receptor da articulação. A cápsula articular se encontrava espessa devido ao aumento da síntese e da secreção dos componentes da matriz pelos condrócitos (SCHIAVINATO et al. 1989). Em cinco coelhos (83,33%) o líquido sinovial mostrava-se de coloração e viscosidade normais. Apenas um (16,66%) dos animais o fluído destacava-se com coloração amarelada sugerindo processo infeccioso. O animal CT2 (8,33%) apresentou crescimento de tecido conjuntivo denso, localizado nas tróclea medial e lateral e em outro CT3 (8,33%) apenas na face medial da tróclea (Figuras 8 - A e 8 - B).

Não foram observados deslocamentos medial ou lateral das patelas, nos animais do grupo tratado. Os enxertos osteocondrais não foram fixados no leito receptor, permanecendo no local sobre a força compressiva da patela e limitada pelas bordas trocleares. Nos outros animais tratados, não houveram diferenças expressivas em relação à ausência das linhas de transição entre o enxerto e o leito receptor, espessura da cápsula articular e volume e coloração de líquido sinovial.

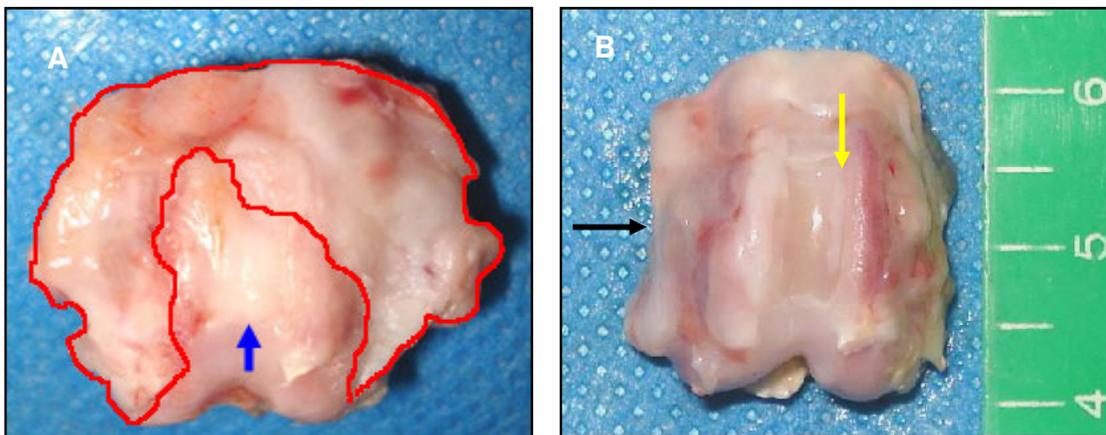


Figura 8. Sulco troclear femoral do CT2 e CT3 tratados com células mononucleares, após 45 dias de PO. Notar em “A”, crescimento de tecido conjuntivo denso nas faces medial e lateral da tróclea (contorno em vermelho) e integração do enxerto no leito receptor (seta azul). Em “B”, desenvolvimento de tecido conjuntivo denso na face medial (seta preta), crescimento de cartilagem na superfície lateral do enxerto (seta amarela).

Nos coelhos do GCT aos 90 dias de PO, observou-se evolução cicatricial com integração do enxerto no leito receptor e tecido de reparação preenchendo a lesão (Figura 9 - A). A cápsula articular encontrava-se espessa em todos os animais. O líquido sinovial apresentava volume, coloração e densidade aparentemente normais. Com exceção do animal CT7 (8,33%), que exibiu aspecto sanguinolento. A hemorragia intra-articular originou-se devido à ação das células inflamatórias que secretam citocinas e enzimas lisossomais que degradaram a cartilagem articular, com exposição do osso subcondral (STASHAK, 1994). Nos animais tratados com células-tronco as áreas de integração entre o enxerto e o leito receptor eram distinguíveis após a enxertia, porém não apresentavam falhas. As superfícies apresentavam cobertas com tecido esbranquiçado com bordas trocleares bem definidas. Ao contrário do grupo controle que as bordas dos defeitos eram visíveis e as interfaces do enxerto com leito receptor mostravam-se afastadas.

O enxerto apresentou-se aderido ao sulco troclear nos animais CT7, CT8, CT9, CT11 e CT12 (83,33%). Provavelmente deveu-se a administração intra-articular de células tronco mesenquimais autólogas. As células estimularam o processo de vascularização no interior do osso subcondral assim como acelerou a ossificação nas áreas de transição. O implante do CT2 (8,33%) se encontrava integrado no leito receptor e foi observado na superfície do enxerto tecido conjuntivo com aspecto fibroelástico (Figura 9 - B). Dois animais do GCT CT9 e o CT11

(16,66%) apresentaram crescimento de tecido fibrocartilaginoso ao redor das faces das trócleas lateral e medial, respectivamente. O que pode ser atribuído ao extravasamento da injeção de células-tronco para fora do sulco troclear diferenciando em um tipo de tecido indesejável (Figura 10).

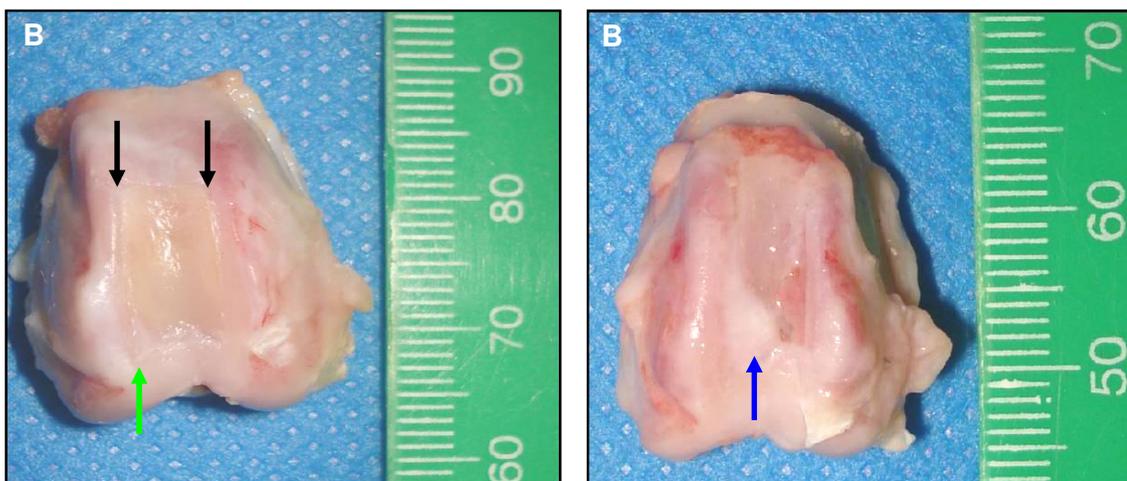


Figura 9. Sulco troclear femoral de coelhos do grupo tratado com células mononucleares, após 45 dias de PO. Observar em “A”, animal CT5, o enxerto aderido com ausência de falhas na transição entre o leito receptor e a face do implante (setas pretas) e área de crescimento de cartilagem na superfície medial e central do enxerto (seta verde). Em “B”, animal CT2, enxerto aderido a sítio receptor com ausência de falhas de transição e crescimento de cartilagem na superfície medial do implante (seta azul).

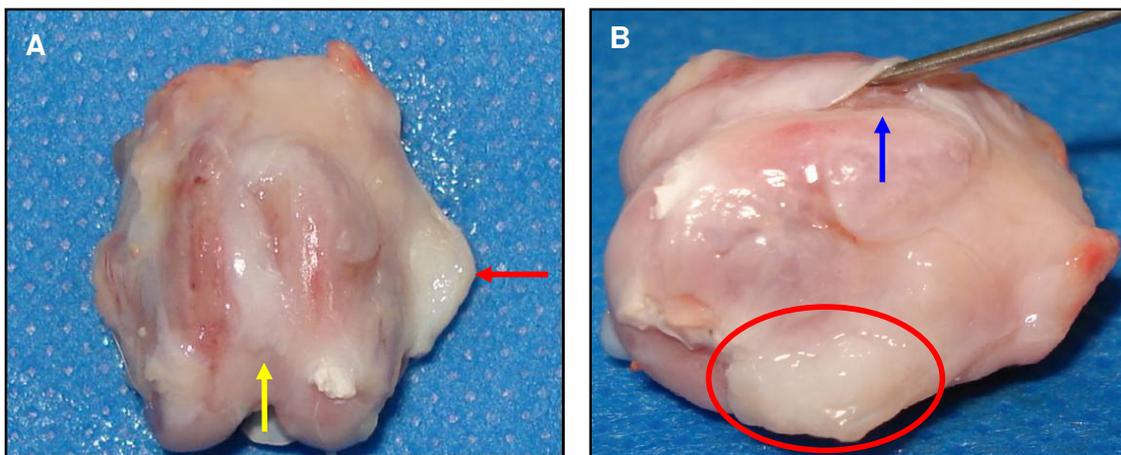


Figura 10. Em “A” e “B”, sulco troclear femoral do coelho grupo tratado com células mononucleares CT11, após 90 dias de PO. Notar o enxerto aderido com ausência das linhas de transição entre o leito receptor e a face do implante e crescimento de tecido semelhante à fibrocartilagem, liso, brilhante e em continuidade a cartilagem adjacente (seta amarela). Na face lateral do côndilo femoral, crescimento de tecido fibroso (seta vermelha). Na figura “B” observar na posição látero-medial, tecido semelhante à fibrocartilagem recobrendo a superfície do enxerto (seta azul) e na face lateral o crescimento de tecido atípico (circulo vermelho).

A avaliação histológica em microscopia de luz das lâminas coradas em HE e TM para o grupo controle aos 45 e 90 dias de PO, evidenciaram processos degenerativos. As principais funções do enxerto ósseo são a osteoindução e a osteocondução, alterações como falha no alinhamento, cargas excessivas e deficiência na vascularização podem levar a fragmentação, não união, absorção e infecção do enxerto (BAUER, 2000). Além disso, com a membrana sinovial inflamada a formação de edema e fibrose interfere no fornecimento de oxigênio para cartilagem (SVALASTOGA, 1988). O processo degenerativo encontrado pode estar relacionado com a má irrigação sanguínea do implante, uma vez que, a incorporação do enxerto sem a associação de células-tronco não promoveu uma revascularização adequada da área enxertada. O enxerto e leito receptor se encontravam osteointegrados em apenas 33,33% (C5, C8, C9 e C12). Os coelhos C1, C6 e C10 (25%) a cartilagem articular apresentava áreas de transição preenchidas por tecido conjuntivo e ossificação endocondral. Nos animais C2, C3, C4 e C7 (33,33%) não houve integração e a região apresentava áreas hemorrágicas, infiltrado de polimorfonucleares e tecido de granulação. Essas falhas ósseas causam o rompimento do tecido de reparação por forças biomecânicas normais, resultando em exposição do osso subcondral (RADIN, ROSE, 1986). Como acontece em doenças articulares degenerativas, as estruturas osteoligamentares tornam-se frágeis e vulneráveis a qualquer tipo de esforço adicional, resultando em hipofunção articular e comprometimento da função do membro.

Notou-se que aos 90 dias de PO, o enxerto do C11 (8,33%), mostrava sua porção implantada envolvida por fibrocartilagem (Figura 11). Segundo Bolander e Balian (1986), falhas ósseas são preenchidas por tecido conjuntivo fibroso. Neste caso, o enxerto não deve ter sido acondicionado de maneira eficaz ao leito receptor, comprometendo a instabilidade articular e a neoformação óssea na área de transição.

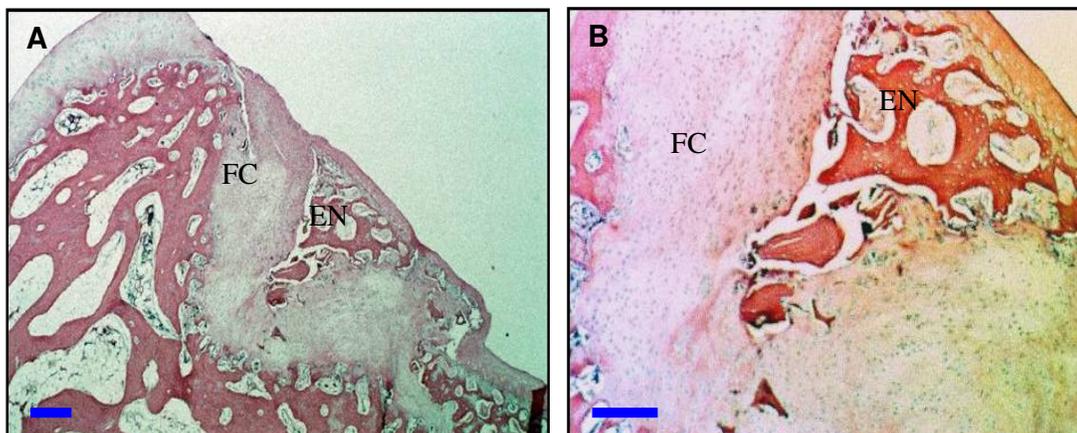


Figura 11. Fotomicrografias do sulco troclear femoral do coelho C11, após reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, com 90 dias de PO. Observar em “A” (Barra = 300µm) e “B” (Barra = 200µm) o enxerto (EN) envolvido por fibrocartilagem (FC) e as faces isoladas do osso trabecular. Coloração HE.

Áreas de degeneração da cartilagem do enxerto foram observadas em sete animais (58,33%), dois (16,66%) aos 45 dias e cinco (41,66%) aos 90 dias de PO. Também foi constatado infiltrado inflamatório nos coelhos C3, C6, C7 e C10 (33,33%), assim como piócitos no C6 (8,33%). Em 25% (C2, C4 e C6) dos espécimes foram encontrados focos de necrose sobre a superfície articular (Figura 12 - A) e em dois animais 16,66% (C8 e C9) ocorreram descamação severa da cartilagem do enxerto seguida de necrose e reabsorção do osso subcondral (Figura 12 - B).

Esta alteração é caracterizada por degeneração da cartilagem como origem na instabilidade articular, que promove o desequilíbrio na distribuição das forças sobre a superfície. Conseqüentemente, ocasionou ruptura dos arranjos de proteoglicanos e aumento da hidratação da cartilagem com exposição das fibrilas de colágeno. Junto ao processo de descamação, pode ocorrer esclerose do osso subcondral e, às vezes lesões císticas, invasão de vasos sanguíneos, osteonecrose focal e formação de osteófitos periarticulares (MCILWRAITH, TROTTER, 1996). Características observadas nos animais que apresentavam processo degenerativo intenso, principalmente esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos.

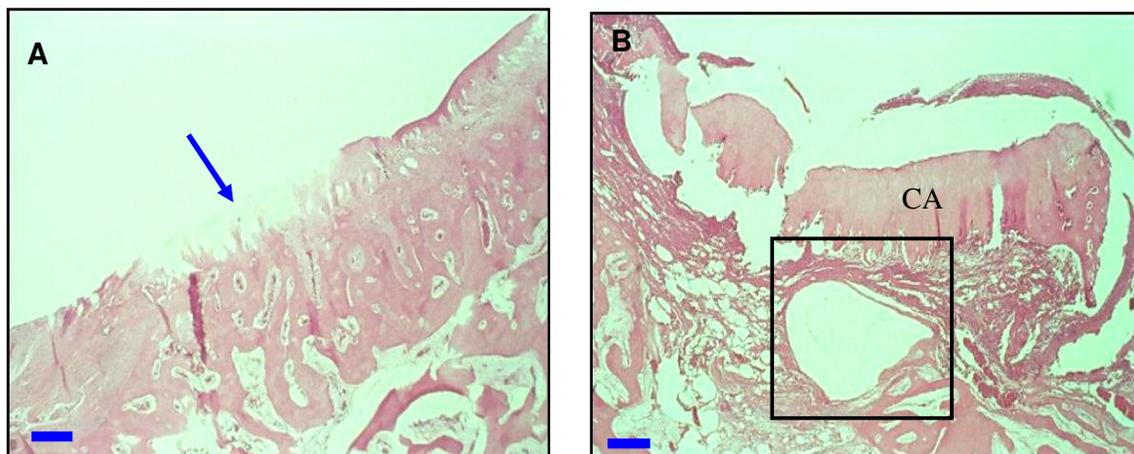


Figura 12. Fotomicrografias do sulco troclear femoral do coelho após reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%. Em “A”, animal C2, observar a descamação da superfície articular (seta azul), caracterizada por morte progressiva de condrócitos. Em “B”, animal C9, descamação das camadas superficial, média e profunda da cartilagem (CA) seguida de exposição, necrose e reabsorção do osso subcondral (quadrado preto), Barra = 300µm. Coloração HE.

Áreas hemorrágicas e osso em processo de necrose foram identificados no animal C2. Tais achados estão relacionados à ausência de vasos sanguíneos no local da necrose, pois segundo Piermattei e Flo (1999) a necrose corresponde à porção do osso esponjoso que normalmente morre por deficiência nutricional e para Schenk (1996) a carência de suprimento sanguíneo e de oxigênio para as células pode alterar o código genético celular induzindo a formação de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso. Em 58,33% (C2, C3, C7, C8, C9, C10 e C11) apresentavam alterações ósseas, sendo que 71,42% (C2, C7, C8, C9 e C10) com rarefação e 28,58% (C3 e C11) reabsorção intensa, caracterizando fragilidade e descontinuidade do tecido (Figuras 13 - A e 13 - B). A necrose deveu-se a perda da cartilagem pelo processo degenerativo articular, com exposição do osso subcondral que possivelmente, o alojamento de bactérias ocasionou a osteomielite. Apesar de 58,33% dos animais do grupo controle ter apresentado perda da cartilagem e exposição do osso subcondral (Figura 14 - A e 14 - B) em apenas um (8,33%) foi encontrado sinais de osteomielite, caracterizado por um vasto infiltrado de polimorfonucleares e piócitos.

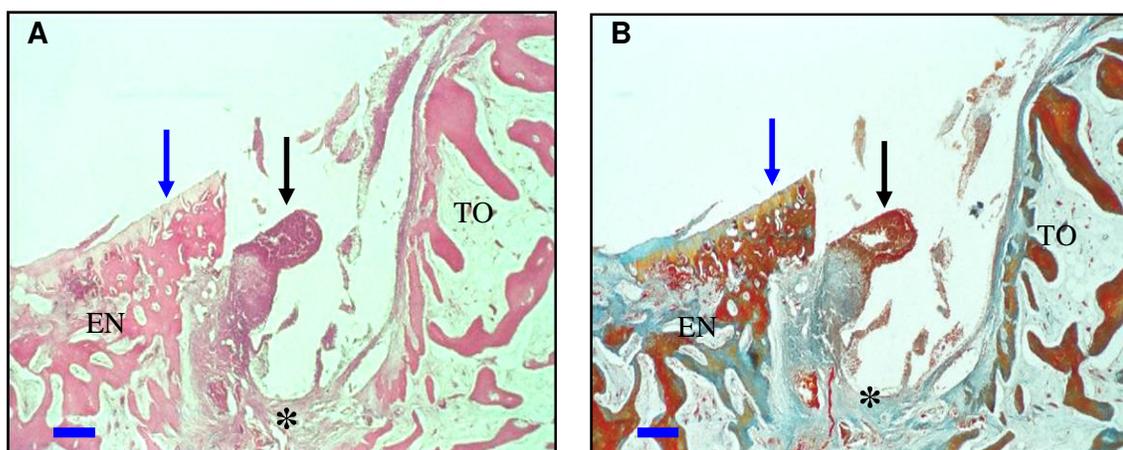


Figura 13. Fotomicrografias do sulco troclear femoral de coelho após reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%. Em “A” coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B). Notar falha na união entre o osso do leito receptor e a face do enxerto osteocondral (EN). Ausência de cartilagem sobre a superfície (seta azul), necrose no osso subcondral (seta preta), tecido conjuntivo (asterisco) e trabéculas ósseas espaçadas caracterizando descontinuidade e fragilidade óssea (TO). Barra = 300µm.

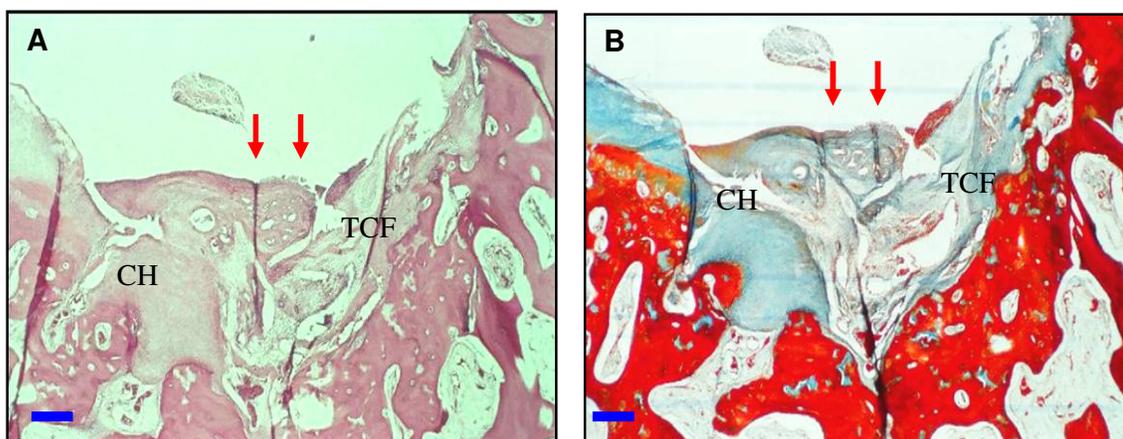


Figura 14. Fotomicrografias com coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B) do sulco troclear femoral do coelho C12 após o reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98% decorridos 90 dias de PO. Em “A” e em “B” observar degeneração e fragmentação da cartilagem (setas vermelhas), face esquerda do enxerto constituída por cartilagem hialina (CH) e face direita por tecido conjuntivo fibroso (TCF). Barra = 300µm.

Na área do enxerto do coelho C6, foram encontrados macrófagos indicativos de lesão crônica. Derivados dos monócitos e produzidos na medula óssea tem a função de fagocitar, eliminar ou degradar parcialmente o material fagocitado. Quando os antígenos são degradados rapidamente os macrófagos desaparecem na mesma velocidade, caso contrário residem por mais tempo na lesão (THOMPSON,

1983). O que justifica a presença dos macrófagos em 45 e 90 dias de PO no grupo controle, já que o reparo não foi eficaz quando comparado com o grupo tratado. Reações histológicas do grupo controle foram idênticas às obtidas por Smith et al. (1999), que empregaram a ruptura do ligamento cruzado cranial para reproduzir experimentalmente a doença articular degenerativa e estudar seu tratamento. Essas alterações também foram evidenciadas por Schiavinato et al. (1989); Myers, Brant, Albrecht (1990) e Smith et al. (1999).

As amostras com 45 e 90 dias de PO, dos animais tratados com células-tronco mesenquimais apresentavam integração do enxerto alógeno com o leito receptor. Os membros operados não foram imobilizados, possibilitando condições favoráveis para o desenvolvimento cicatricial. Existe a hipótese que o movimento contínuo da articulação aumenta a atividade metabólica e nutricional da cartilagem articular, estimulando as células mesenquimais a se diferenciarem em tecido osteocartilaginoso (SALTER, et al., 1984). A proliferação de condrócitos auxiliou na reparação da superfície articular, assim como a neovascularização do osso subcondral forneceu nutrientes para área implantada.

Em sete animais CT1, CT2, CT3, CT6, CT7, CT8 e CT9 (58,33%), houve união entre o implante e o osso, caracterizada pela consolidação óssea com osso denso. No entanto, o animal CT9 apresentou uma face do enxerto constituída por osso denso com integração adequada e o lado oposto preenchido por tecido conjuntivo (Figuras 15 - A e 15 - B).

Várias associações são realizadas na tentativa de acelerar o processo de reparação óssea por meio de osso alógeno ou materiais aloplásticos (OLIVEIRA et al., 2000). Neste aspecto, as células osteoprogenitoras do estroma medular aplicadas induziram a osteogênese (BARROS, 2000). Para diferenciação das células-tronco em tecido ósseo e reparação do defeito osteocondral, foi necessária à presença de uma matriz osteocondutiva de suporte (BRUDER, et al., 1998). Assim, o implante permitiu o preenchimento uniforme da área receptora, assegurando a retenção das células no local para diferenciação em osteoblastos e formação de matriz óssea madura. Este processo foi observado nas interfaces do enxerto com o osso subcondral, devido a abundante vascularização e a intensificação dos processos de ossificação endocondral e de remodelagem óssea.

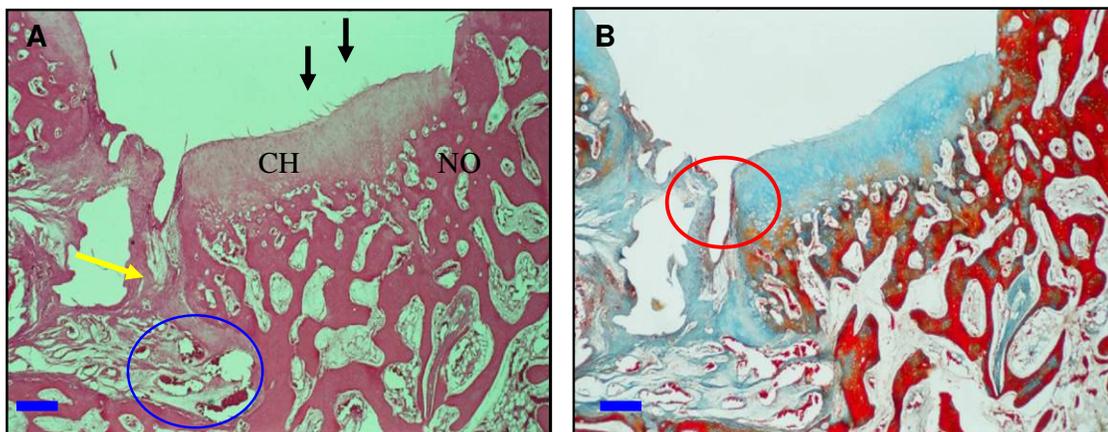


Figura 15. Fotomicrografias com coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B) do sulco troclear femoral do coelho CT9 após o reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, associado às células mononucleares decorridos 90 dias de PO. Observar em “A”, cartilagem articular preservada com presença de cartilagem hialina (CH), pouca descamação (setas pretas) e união entre a face do enxerto e o osso adjacente, marcada pela neoformação óssea (NO) e predominante de tecido conjuntivo (seta amarela), fibrocartilagem, áreas de neoformação óssea, intensa vascularização (círculo azul). Em “B”, início da formação óssea (círculo vermelho). Barra = 300µm.

Nos animais CT4, CT10 e CT11 (25%) as linhas de transição eram compostas por tecido conjuntivo. No entanto, foi observada pequena quantidade no animal CT11 (8,33%) (Figura 16) e no CT4 (8,33%) predominava a proliferação de cartilagem substituindo o tecido conjuntivo. Falhas ósseas deixadas sem preenchimento desenvolvem lamelas ósseas desorganizadas, com predominância de tecido conjuntivo fibroso (BOLANDER, BALIAN, 1986). Acredita-se que o enxerto no animal CT10 apresentou mobilidade, por não preencher o leito receptor de maneira adequada. A instabilidade prejudicou a revascularização e a neoformação óssea, promovendo a deposição de tecido conjuntivo na linha de transição.

Nos coelhos CT5 e CT12 (16,66%), o enxerto estava aderido ao osso por uma camada de cartilagem (Figuras 17 - A e 17 - B). Souza, et al. (2001), trabalhando com eletroterapia na reparação de lesões cartilaginosas também encontraram falhas preenchidas predominantemente por cartilagem hialina. Segundo Croci (1997), ilhotas de cartilagem podem ser encontradas no tecido celular que cresce dentro e fora do osso, formando uma ponte entre os fragmentos. A cartilagem aparece em quantidade variável sendo às vezes abundante, e em outras, pode estar ausente. Evidentemente, é um elemento essencial no processo de consolidação, precedendo o processo de ossificação endocondral.

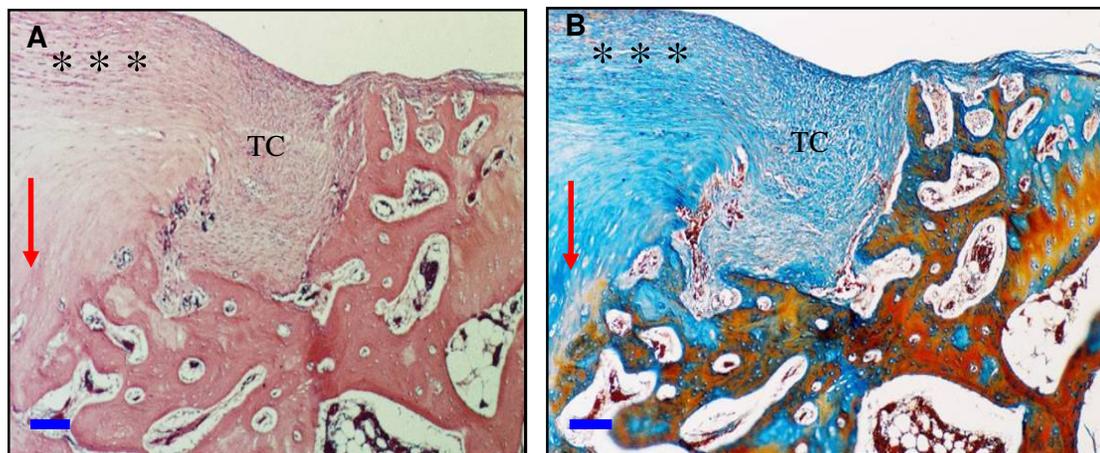


Figura 16. Fotomicrografias com coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B) do sulco troclear femoral do coelho CT11 após reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, associado às células mononucleares com 90 dias de PO. Notar a camada superficial constituída por fibrocartilagem (asteriscos) e a área de contato entre o enxerto e o osso adjacente com tecido conjuntivo (TC) substituído por cartilagem. Em alguns pontos início da ossificação endocondral (setas vermelhas). Barra = 300 μ m.

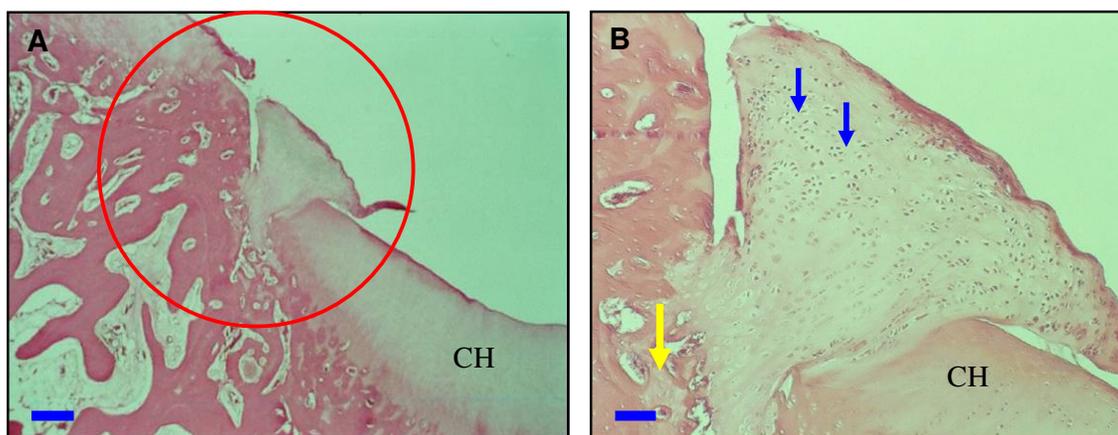


Figura 17. Fotomicrografias do sulco troclear femoral do coelho CT12 após o reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, associado às células mononucleares com 90 dias de PO. Em "A", notar na área de transição entre o osso do leito receptor e o enxerto a fase final de reparação, caracterizada pela substituição da cartilagem hialina por tecido ósseo (circulo vermelho). Em "B", processo de ossificação endocondral (OE) e padrão trabecular normal. Presença de condrócitos (setas azuis) e neoformação óssea (seta amarela). Coloração Hematoxilina-Eosina. Barra = 300 μ m.

Em 91,66% não foi observado processo de degeneração da cartilagem articular, porém no animal CT10 (8,33%), foi constatada uma área de degeneração sobre a superfície do sulco troclear com infiltrado inflamatório. Como relatado anteriormente este animal não apresentou vascularização adequada do enxerto.

Com isso, a carência de suprimento sanguíneo e a falta de oxigênio para a cartilagem promoveram um processo de morte celular caracterizada por degeneração do tecido (SCHENK, 1996). O processo degenerativo encontrado pode estar relacionado com a falha da incorporação entre o leito receptor e o enxerto.

Grande quantidade de cartilagem foi encontrada no centro do enxerto, que se proliferava em direção as bordas do leito receptor do animal CT1 (8,33%). Ao contrário do CT8, em que a cartilagem do osso adjacente crescia em direção ao enxerto, formando uma espessa camada. Nos animais CT9 e CT12 (16,66%) foram observadas pequenas áreas de descamação cartilaginosa, caracterizada por possível instabilidade articular que promoveu a ruptura dos arranjos de proteoglicanos (MCILWRAITH, TROTTER, 1996). No entanto, a descamação não interferiu no processo de reparação osteocondral, uma vez que os enxertos apresentavam-se integrados ao leito receptor.

No espécime CT11 (8,33%), algumas áreas da superfície do enxerto foram recobertas por fibrocartilagem e tecido conjuntivo denso, porém a cartilagem hialina permaneceu em perfeitas condições. Também foi observada grande quantidade de condrócitos hipertrofiados, caracterizando umas das fases da ossificação osteocondral (Figura 18 - A). Esta ossificação foi intensa na área de transição entre o enxerto e a área receptora, assim como a superfície do osso subcondral e a camada profunda do enxerto (Figura 18 - B).

Em relação à conformação óssea dos animais tratados com células mononucleares autólogas, apenas o CT4 (8,33%), exibiam trabéculas espaçadas e pouca continuidade óssea, constatada pela rarefação do osso subcondral. A maioria dos coelhos (91,66%) apresentava osso compacto, áreas de vascularização e tecido ósseo com padrão trabecular próximo a normalidade. O fundo da falha encontrava-se preenchido por osso esponjoso até a linha da junção osteocondral preexistente. Houve integração completa (Figura19), com reposição óssea principalmente por ossificação endocondral. Admite-se que a administração das células mesenquimais autólogas acelerou e intensificou o processo de osteogênese nos animais do grupo tratado.

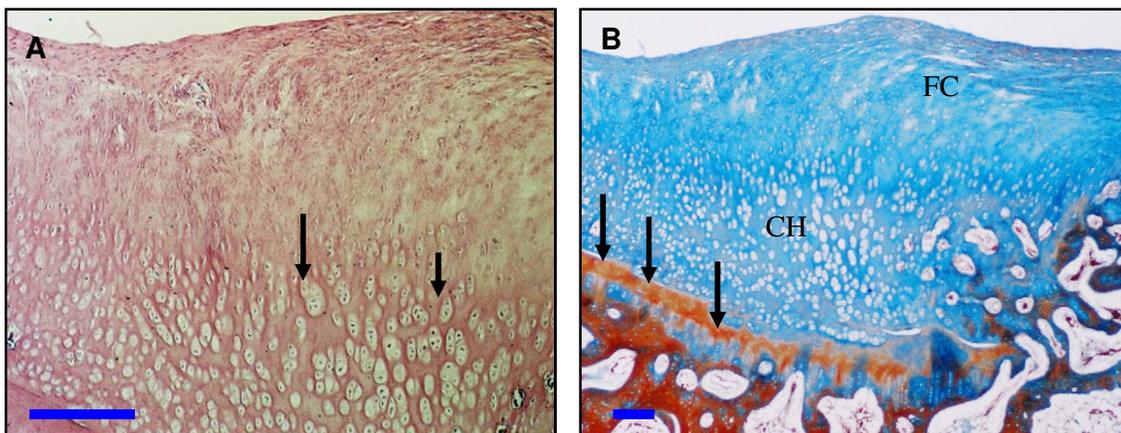


Figura 18. Fotomicrografias com coloração Hematoxilina-Eosina (A) e tricrômio Mallory (B) do sulco troclear do coelho CT11, após o reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%, associado às células mononucleares com 90 dias de PO. Em “A”, observar o processo de ossificação endocondral, caracterizada por hipertrofia dos condrócitos (setas), na camada profunda da cartilagem. Em “B”, presença de fibrocartilagem (FC), cartilagem hialina (CH) e neoformação óssea (setas). Barra = 300 μ m.

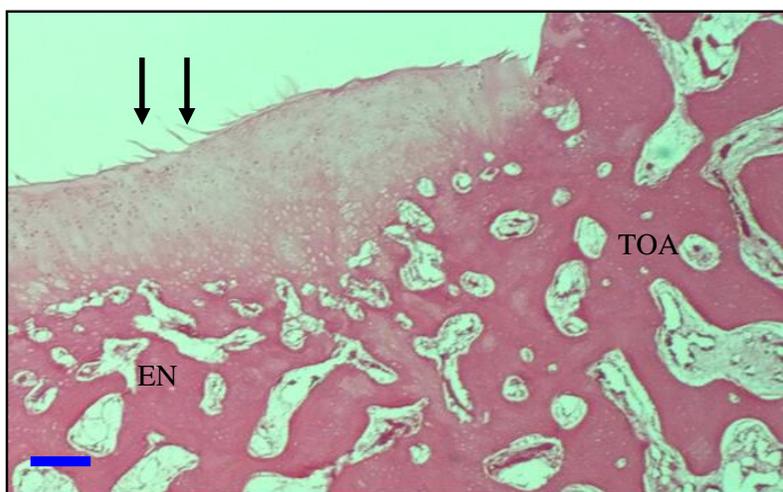


Figura 19. Fotomicrografias do sulco troclear femoral do coelho após o reparo por enxerto alógeno preservado em glicerina a 98% , associado às células mononucleares com 90 dias de PO. Verificar a união entre o enxerto (EN) e o tecido ósseo adjacente (TOA). Superfície cartilaginosa com pequena descamação e integridade da cartilagem preservada (setas). Osso denso, ausência de trabéculas ósseas espaçadas, padrão trabecular próximo à normalidade. (HE). Barra = 300 μ m.

Os resultados da pesquisa confirmam que lesões nas superfícies articulares, penetrando no osso subcondral, são reparadas a partir de células mononucleares provenientes da medula óssea. Há formação de fibrocartilagem e cartilagem semelhante à hialina, com ou sem a arquitetura típica da cartilagem articular normal.

Pesquisadores consideraram que a restauração da arquitetura tecidual característica da superfície articular é rara, ocorrendo em número reduzido de falhas osteocondrais (MITCHELL, SHEPARD, 1976; FRENCH et al., 1989, KIM et al., 1991; HANIE et al., 1992; SHAPIRO, KOIDE, GLIMCHER, 1993).

CONCLUSÕES

A técnica utilizada para coleta da medula óssea do tubérculo umeral foi de fácil execução. O protocolo de Ficoll-Hypaque para o isolamento celular foi eficaz apresentando viabilidade média de 91,79% e concentração média de $6,76 \times 10^6$ células mononucleares viáveis.

A administração intra-articular de células mononucleares autólogas, estimulam a formação de fibrocartilagem e cartilagem hialina com integração do implante ao leito receptor do sulco troclear de coelhos quando associadas aos enxertos osteocondrais alógenos preservados em glicerina a 98%.

REFERÊNCIAS

ABE, S.; BOYER, C.; LIU, X.; WEN, F.Q.; KOBAYASHI, T.; FANG, Q.; WANG, X.; HASHIMOTO, M.; SHARP, J.G.; RENNARD, S.I. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, Washington, v.170, p.1158-1163, 2004.

ALDEN, T.D.; PITTMAN, D.D.; HANKINS, G.R.; BERES, E.J.; ENGH, J.A.; DAS, S.; HUDSON, S.B.; KERNS, K.M.; KALLMES, D.F.; HERM, G.A. In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. **Human Gene Therapy**, Nova York, v.10, p.2245–2253. 1999.

AHRENS, N.; TORMIN, A.; PAULUS, M.; ROOSTERMAN, D.; SALAMA, A.; KRENN, V.; NEUMANN, U.; SCHEDING, S. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. **Transplantation**, Baltimore, v.78, n.6, p.925-929, 2004.

ALEXANDER, J.W. Bone grafting. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, St. Louis, v.17, n.4, p.811- 819, 1987.

ALMEIDA-PORADA, G.; EL SHABRAWY, D.; PORADA, C.; ZANJANI, E.D. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. **Experimental Hematology**, Washington, v.30, n.12, p.1454-1462, 2002.

ALSALAMEH, S.; AMIN, R.; GEMBA, T.; LOTZ, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Arthritis Rheumatism**, New Jersey, v.50, n.5, p.1522-1532, 2004.

AMENDOLA, G.F. **Correção de defeito ósseo femural em cães utilizando implante ósseo cortical homólogo conservado em mel**. Santa Maria, RS. 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Washington, v. 218, n.5, p.669, 2001.

AMIEL, D.; COUTTS, R.D.; ABEL, M.; STEWART, W.; HARWOOD, F.; AKESON, W.H. Rib perichondrial grafts for the repair of full-thickness articular cartilage defects. A morphological and biochemical study in rabbits. **Journal Bone Joint Surgery**, Massachusetts, v.67A, p.911-920, 1985.

AROKOSKI, J.P.A.; JURVELIN, J.S.; VÄÄTÄINEN, U.; HELMINEN, H.J. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, Copenhagen, v.10, p.186-198, 2000.

ASHTON, B.A.; ALLEN, T.D.; HOWLETT, C.R. Distribution of fibroblastic colony-forming cells in rabbit bone marrow and assay of their osteogenic potential by in vivo diffusion chamber method. **Calcified Tissue International**, New York, v.36, p.83-86, 1984.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v.8, p.301-316, 2004.

BANFI, A.; MURAGLIA, A.; DOZIN, B.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, Washington, v.28, n.6, p.707-715, 2000.

BARROS, S.V.G. **Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos**. Viçosa, MG, 2000. 54p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2000.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v.36, n.4, p.568-84, 2004.

BAUER, T. W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials an overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, v.371, p.10-27, 2000.

BELY, M. Arthrosis, The Arthritis Trust of America. 1987. Disponível em: <<http://www.arthritistrust.org>>. Acesso em: dez. 2008.

BENNET, D.G. Terapia das articulações. Revista EQUUS/USA. Colorado, p.31-35, agosto 2004.

BIANCO, P.; PRIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G. Bone marrow stem cells. Nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, Durham, v.19, p.180-92, 2001.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A.P.E; DEFFUNE, E. Isolamento das células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.1, p.22-24, 2006.

BOLANDER, M.E.; BALIAN, G. The use of demineralized matrix in the repair of segmental defects. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.68A, n.6, p.1264-1274, 1986.

BOSTROM, M.; LANE, J.H.; TOMIN, E.; BRWNE, M.; BERBERIAN, W.; TUREK, T.; SMITH, J.; WOZNEY, J.; SCILDHAUER, T. Use of morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n.327, p.272-282, 1996.

BRUDER, S.P.; KRAUS, K.H.; GOLDBERG, V.M.; KADIYALA, S.O. O efeito de implantes preenchidos com células-tronco mesenquimais autólogas na cura de

defeitos ósseos segmentares caninos. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.80A, n.7, p.985-996, 1998.

BUCKWALTER, J.A. Articular Cartilage Injuries. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.402, p.21-37, 2002.

BUDENZ, R.W.; BERNARD, G.W. Osteogenesis and Leukopoiesis within Diffusion-Chamber Method as a Quantitative Assay for Osteogenesis. **Calcified Tissue International**, New York, v.159, n.4, p.455-474, 1980.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. **Biomaterials**, Guilford, v.21, p.2347-2359 2000.

BURKUS, J.K. New bone graft techniques and applications in the spine. **Medscape Orthopaedics**, 2002. Disponível em <<http://www.medscape.com/viewprogram/2073>> Acesso em: nov. 2008.

BURWELL, R.G. Studies in the transplantation of bone: The composite homograft-autograft of cancellous bone: An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and marrow containing bone graft. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v. 46B, p.110-140, 1964.

BURWELL, R. G. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, n.200, p.125-141, 1985.

CAMANHO, G. L. Tratamento da osteoartrose do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.36, n.5, p.135-140, 2001.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, A.G.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; ELLANTUONO, I.; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, Washington, v.98, p.2396-2402, 2001.

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

CHEN, L.B.; JIANG, X.B.; YANG, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. **World Journal of Gastroenterology**, China, v.10, p.3016-3020, 2004.

COLOMÉ, L.M. **Avaliação do envolvimento de células tronco autólogas de medula óssea em associação com técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração do nervo tibial de coelhos**. Santa Maria, RS, 2007. 77p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em cirurgia veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

CONNOLLY, J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, n.313, p.8-18, 1995.

CONNOLLY, J.F.; GUSE, R.; LIPPIELLO, L.; DEHNE, R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. **Journal Bone Joint Surgery**, Massachusetts, v.71A, n.5, p.684-691, 1989.

COSTA, J.L.O. **Reconstrução de grande falha óssea com enxerto cortical alógeno conservado em glicerina, fixado com placa e parafusos de aço inoxidável da série 304. Estudo experimental em cães (Canis familiaris)**. Jaboticabal, 1996. 100p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 1996.

COVAS, D.T.; PICCINATO, C.E.; ORELLANA, M.D.; SIUFI, J.L.; SILVA, W.A. JR.; PROTO-SIQUEIRA, R.; RIZZATTI, E.G.; NEDER, L.; SILVA, A.R.L.; ROCHA, V.;

ZAGO, M.A. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Experimental Cell Research**, Stockholm, v.309, n.2, p.340-344, 2005.

COVAS, D.T. Células-tronco mesenquimais. In:_____. **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 35-48.

COVAS, D.T.; SIUFI, J.L.; SILVA, A.R.; ORELLANA, M.D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.36, n.9, p.1179-1183, 2003.

CROCI. A.T. Retarde de consolidação e pseudoartrose. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.5, p.26-34, 1997.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheumatism**, New Jersey, v.44, n.8, p.1928-1942, 2001.

DEB, A.; WANG, S.; SKELDING, K.A.; MILLER, D.; SIMPER, D.; CAPLICE, N.M. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart - a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. **Circulation**, Boston, v.107, p.1247-1249, 2003.

DEL CARLO, R.J. Células tronco: células da esperança. **Revista CFMV**, Brasília, n.35, p.60-68, 2005.

DEL CARLO, R.J.; GALVÃO, S.R.; VILORIA, M.I.; SOUZA, T.D.; FILHO, A.M. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.6, p.121-126, 1999.

DENNY, H.R.; BUTTERWORT, S.J. Bone grafts In: **A guide to canine and feline orthopaedic surgery**, 4.ed., London: Blackwell, 2000. cap.2, p.18-23.

DUA, H.S. Stem cells of the ocular surface: scientific principles and clinical applications. **British Journal of Ophthalmology**, London, v.79, p.968-969, 1995.

DUELAND, R.T.; TROTTER, E.J.; ARON, D.N.; ENGEN, M.H. Cryopreserved intercalary bone allografts: early experience (1975-1980) in eight canine cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Denver, v.25, n.3, p.5-16, 1989.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.F.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.1, p.268-272, 2004.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Experimental Gerontology**, Österreichischen, v.40, p.926-930. 2006.

FERNANDEZ, M.; SIMON, V.; HERRERA, G.; CAO, C.; DEL, F.H.; MINGUELL, J.J. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. **Bone Marrow Transplantation**, Reino Unido, v.20, n.4, p.265-271, 1997.

FOX, S.M. Cancellous bone grafting in the dog: Na overview. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Golden, v.20, p.840-848, 1984.

FRENCH, D.A.; BARBER, S.M.; LEACH, D.H.; DOIGE, C.E. The effect of exercise on the healing of articular cartilage defects in the equine carpus. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v.18, n.4, p.312-321, 1989.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 2001.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinetics**, New Jersey, v.3, p.393-403. 1970.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.; KUROLESOVA, A. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, Baltimore, v.6, p.230-47, 2002.

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

GIOSO, M.A.; BENITES, N.R.; KAMPF, G. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a extertia óssea. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.17, n.4, p.242-246, 2002.

GLASSON, S.S.; ASKEW, R.; SHEPPARD, B.; CARITO, B.; BLANCHET, T.; M.A, H.L.; FLANNERY, C.R.; PELUSO, D.; KANKI, K.; YANG, Z.; MAJUMDAR, M.K.; MORRIS, E.A. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. **Nature**, New York, v.434, n.7033, p.644-648, 2005.

GRIDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, n.32, p.1313-1374, 2002.

HANGODY, L.; KISH, G.; KARPATI, Z.; SZERB, I.; UDVARHELYI, I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. **Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy**, Heidelberg, v.5, p.262–267, 1997.

HANIE, E.A.; SULLINS, K.E.; POWERS, B.E.; NELSON, P.R. Healing of full-thickness cartilage compared with full-thickness cartilage and subchondral bone defects in the equine third carpal bone. **Equine Veterinary Journal**, Cambs, v.24, n.5, p.382-386, 1992.

HEALEY, J.H.; ZIMMERMAN, P.A.; McDONNELL, J.M.; LANE, J.M. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, n.256, p.280-285, 1990.

HEBERT, S; XAVIER, L.R.; PARDINI, A.G.; BARROS FILHO, T.E.P. **Ortopedia e Traumatologia: Princípios e Prática**. 3.ed., Porto Alegre: Artmed, 2003. p.444-451.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, Washington, v.102, n.10, p.3483-3493, 2003.

HOBAR, P.C.; BYRD, H.S. Implantation: bone, cartilage and alloplasts (overview). **Selected Reading Plastic Surgery**, Dallas, v.6, p.1-28, 1990.

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUCHI, S.; TAKASHI, T.A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, Simpsonville, v.6, n.6, p.543-553, 2004.

INOUE, C.M.; FAGUNDES, D.J.; FALOPPA, F.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; FIGUEIREDO, A.S.; TAHA, M.O. Estudo morfológico da articulação do joelho de coelhos após a reparação de um defeito osteocondral. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.17, n.6, p.403-409, 2002.

JOHNSON, A.L. Bone grafting. In:_____. OLMSTEAD, M. L. **Small Animal Orthopedics**. St. louis: Mosby, p.146-151, 1995.

JOHNSON, A.L. Principles of bone grafting. **Seminars in Veterinary Medicine & Surgery**, Philadelphia, v.6, p.90-99, 1991.

JOHNSON, A.L.; SHOKRY, M.M.; STEIN, L.E. Preliminary study of ethylene oxide sterilization of full-thickness cortical allografts used in segmental femoral fracture repair. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.6, n.5, p.1050-56, 1985.

JOHNSTON, S.A. Osteoarthritis: Articular anatomy, physiology and pathology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.27, p.699-723, 1997.

KAPANDJI, A.I. **Fisiologia Articular**. 5.ed., v.2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B.M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v.95, n.5, p.209-214, 2004.

KAWANO, C. T.; SEVERINO, N.R. Autologous bone graft for tibial defects on knee total arthroplasty. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.13, n.3, p.120-123, 2005.

KIM, H.K.W.; MORAN, M.E.; SALTER, R.B. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.73A, n.9, p.1301-1315, 1991.

KIRSCHSTEIN, R. Stem cells: scientific progress and future research. Bethesda: The National Institute of Health. Department of Health and Human Services. 2001. Disponível em <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>>. Acessado em out. 2008.

KRAUS, K.H.; KIRKEY-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v.35, n.3, p.232-42, 2006.

KUZNETSOV, S.A.; MANKANI, M.H.; GRONTHOS, S.; SATOMURA, K.; BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Circulating skeletal stem cells. **Journal of Cell Biology**, New York, v.153, n.5, p.1133-1140, 2001.

LAKSHMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Reviews**, Cambridge, n.19, p.29-38, 2005.

LAZARUS, H.M.; HAYNESWORTH, S.E.; GERSON, S.L.; CAPLAN, A.I. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. **Journal Hematother**, New York, v.6, n.5, p 447-455, 1997.

LEE, M.W.; CHOI, J.; YANG, M.S.; MOON, Y.J.; PARK, J.S.; KIM, H.C.; KIM, Y.J. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Florida, v.320, n.1, p.273-278, Jul. 2004.

LEOPIZZI, N.; BOLLINGER NETO, R.; BARROS FILHO, T.E.P.; AZZE, R.J. Modelos experimentais em ortopedia e ISSO 10993: "Biological evaluation os medical devices-part 2: Animal welfare requirements" interpretação e extensão da norma. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.6, p.139-142, 1998.

LESCHONSKI, C. Locomotores. Revista Horse Business. 49.ed., São Paulo, 1999. 33p.

LIN, H. The self-renewing mechanism of stem cells in the germline. **Current Opinion in Cell Biology**, Danvers, v.10, p.687-93, 1998.

LIPMAN, N.S.; MARINI, P.R.; ERDMAN, S.E. A comparison of ketamine/xylazine and ketamine/ xylazine/ acepromazine anesthesia in the rabbit. **Laboratory Animal Science**, Utrecht, v.40, p.395-398, 1990.

LIPOWITZ, A.J. Degenerative joints diseases. In:_____. SLATTER, D. (Ed). **Textbook of Small Animal. Surgery**, 2.ed., Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. p.1921-1927.

MARTIN, D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L., NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**, Washington, v.30, n.8, p.879-86, 2002.

MARTIN, J.A.; BROWN, T.D.; HEINER, A.D.; BUCKWALTER, J.A. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, suppl.427, p.96-103, 2004.

MARTINEZ, S.A.; WALKER, T. Bone grafts. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.29, n.5, p.1207-1219, 1999.

MATTER, H.P.; GARREL, T.V.; BILDERBEEK, U.; MITTELMEIER, W. Biomechanical examinations of cancellous bone concerning the influence of duration and temperature of cryopreservation. **Journal of Biomedical Materials Research**, Georgetown, v.55, p.40-44, 2001.

MCILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. **Joint Disease in the horse**. 1.ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. p.1-28.

MELENDEZ, M.E. **Terapia celular autóloga para lesões osteo-condrais: estudo em um modelo animal em coelhos**. Porto Alegre, RS, 2006 65p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molécula). Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

MILLIS, D.L.; MARTINEZ, S.A. Bone grafts. In:_____. SLATTER, D. **Small animal surgery**. 3ed. Philadelphia: Saunders, 2003. cap.133, p.1875-1891.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Philadelphia, v.33, n.8, p.881-887, 2000.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. **Experimental Biology and Medicine**, New Jersey, v.231, n.1, p.39-49, 2006.

MITCHELL, N.; SHEPARD, N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.58A, n.2, p.230-233, 1976.

MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B.; BARRY, F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis Rheumatism**, New Jersey, v.48, p.3464-3474, 2003.

MUSCHLER, G.V.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **Journal Bone Joint Surgery**, Massachusetts, v.79A, n.11, p.1699 -1709, 1997.

MUSCOLO, D.L.; AYERZA, M.A. Allografts. In:_____. CALLAGHAN, J.J.; ROSENBERG, A.G.; RUBASH, H.E. **Adult Hip**, New York: Lippincott-Raven, 1998. p.297-312.

MYERS, S.L.; BRANT, K.D.; ALBRECHT, M.E. Synovitis and osteoarthritic changes in canine articular cartilage after anterior cruciate ligament transection. **Arthritis & Rheumatism**, New Jersey, v.33, p.1406-1415, 1990.

NARDI, N.B.; ALFONSO, Z.C. Células Tronco Hematopoiéticas. In:_____. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células Tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p.49-65.

NISHIMORI, M.; DEIE, M.; KANAYA, A.; EXHAM, H.; ADACHI, N.; OCHI, M. Reparo de defeitos osteocondrais crônicos em ratos: procedimento que estimula a medula óssea expandida por cultura de células estromais mesenquimais alogênicas da medula óssea. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, Massachusetts, v.88B, n.9, p.1236-1244, 2006.

OCHI, M.; ADACHI, N.; NOBUTO, H.; YANADA, S.; ITO, Y.; AGUNG, M. Articular cartilage repair using tissue engineering technique--novel approach with minimally invasive procedure. **Artificial Organs**, Milão, v.28, n.1, p.28-32, 2004.

OJEDA-URIBE, M.; BRUNOT, A.; LENAT, A.; LEGROS, M. Failure to detect spindle-shaped fibroblastoid cell progenitors in PBPC collections. **Acta Haematologica**, Switzerland, v.90, n.3, p.139-143, 1993.

OLIVEIRA, D.R.; DEL CARLO, R.J.; GALVÃO, S.; MAIA FILHO, A.; FILGUEIRAS, R. Matriz óssea homóloga desmineralizada associada a medula óssea autógena no preenchimento de falhas segmentares em rádio de coelhos. **Revista Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.1, suplemento, p.89, 2000.

OLSSON, S. Pathophysiology, morphology, and clinical signs of osteochondrosis in the dog. IN:_____. BOJRAB, M. J. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2.ed., Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. Cap.111, p.777-796.

OLSSON, D.C.; PIPPI, N.L.; MARTINS, D.B.; TOGNOLI, G.K.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; MULLER, D.C.; LOPES, S.T.A.; MARCONATO, F.; MÖRCHBÄCHER, P.D.; TEIXEIRA, L.V. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, 2009

PARKER, R.B. Estabelecimento de Banco de Ossos. In:_____. BORJAB, M. J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia de Pequenos Animais**. 2.ed., São Paulo: Manole, 1996, p.791–798.

PERIN, E.C.; DOHMANN, H.F.R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SOUSA, A.L.S.; MESQUITA, C.T.; ROSSI, M.I.D.; CARVALHO, A.C.; DUTRA, H.S.; DOHMANN, H.J.F.; SILVA, G.V.; BELÉM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F.O.D.; ESPORCATTE, R.; GENG, Y.J.; VAUGHN, W.K.; ASSAD, J.A.R.; MESQUITA, E.T.; WILLERSON, J.T. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, Boston, v.107, p.2294-2302, 2003.

PETERSON, L.; MINAS, T.; BRITTEBERG, M.; NILSSON, A.; SJOGREN-JANSSON, E.; LINDAHAL, A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, v.374, p.212-234, 2000.

PETIT, I.; GOICHBURG, P.; SPIEGEL, A.; PELED, A.; BRODIE, C.; SEGER, R.; NAGLER, A.; ALON, R.; LAPIDOT, T. Atypical PKC- regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.115, p.168-76, 2005.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais. 3.ed., São Paulo: Manole, 1999. 694p.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Bone grafting. In:_____. **Small animal orthopedics and fracture repair**. 3.ed., Philadelphia: Saunders, 1997. cap.3, pag.147-153,

PIGOSSI, N. **Implantação de dura-máter homóloga conservada em glicerina. Estudo experimental em cães**. São Paulo, 1964. 92p. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1964.

PIGOSSI, N. **Glicerina na conservação de dura-máter. Estudo experimental**. São Paulo, 1967. 83p. Tese (Livre docência em Cirurgia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 1967.

PINTO JR., H.S. **Utilização de enxertos ósseos homólogos preservados na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos em cães.** São Paulo, 1990. 37p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1990.

PINTO JR., H.S. **Utilização de enxerto ósseo cortical homólogo preservado em tintura de iodo a 2% na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães** [Tese - Doutorado]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. FMVZ-USP, 1995.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury**, New York, v.36 Suppl 3, p.8-12, 2005.

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, Pennsylvania, v.276, n.5309, p.71-74, 1997.

QUAINI, F.; URBANEK, K.; BELTRAMI, A.P.; FINATO, N.; BELTRAMI, C.; NADAL, B.; KAJSTURA, J.; LENI, A.; ANVERSE, P. Quimerism of the transplanted heart. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.346, p.5-15, 2002.

QUINTON, J.F. **Novos animais de estimação: pequenos mamíferos.** São Paulo: Roca, 2005.

RADIN, E.L.; ROSE, R.M. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.213, p.34-40, 1986.

ROMANO, G. Stem cells transplantation therapy: controversy over ethical issues and clinical relevance. **Drug News & Perspectives**, v.17, n.10, p.637-45, 2004.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; JODON DE VILLEROUCHE, V.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYE, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem

cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**, Gainesville, v.85, n.8, p.962-971, 2005.

SALTER, R.B.; HAMILTON, H.W.; WEDGE, J.H.; TILE, M.; IAN, P.; TORODE, O'DRISCOLL, S.W.; MURNAGHAN, J.J.; SARINGER, J.H. Clinical application of basic research on continuous passive motion for disorders and injuries of sinovial joints: a preliminary report of a feasibility study. The effects of continuous passive motion on the healing of articular cartilage defects. An experimental investigation in rabbits. **Journal of Orthopaedic Research**, Canada, v.1, p.325-342, 1984.

SANCHEZ, R.J.; SORIANO, S.E.; GIRONA, B.R.; PÉREZ, M.P.; VIÑETS, G.C. Why do alkaline phosphatases increase? **Aten Primaria**, Spanish, v.29, n.4, p.241-245. 2002.

SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.37, n.6, p.490-495, 2004.

SCHENA, C.J.; MITTEN, R.W.; HOEFLE, W. D. Segmental freeze-dried and fresh cortical allografts in the canine femur. II, a sequential histological comparison over a one-year time interval. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Denver, v.21, p.193-205, 1984.

SCHENK, R.K. Regeneração óssea: bases biológicas. In:_____. BUSER, D., DAHLIN, C., SCHENK, R.K. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Quintessence, 1996. p.49-100.

SCHIAVINATO, A.; LINI, E.; GUIDOLIN, D.; PEZZOLI, G.; BOTTI, P.; MARTELLI, M.; CORTIVO, R.; DE GALATEO, A.; ABATANGELO, G. Intra-articular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs: Ilmorphological findings. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.241, p.286-299, 1989.

SEO, B.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P.M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J.; YOUNG, M.; ROBEY, P.G.; WANG, C.; SHI, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, Reino Unido, v.364, n.9429, p.149-155, 2004.

SETTON, L.A.; ELLIOTT, D.M.; MOW, V.C.; Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. **Osteoarthritis and Cartilage**, California, v.7, p.2-14, 1999.

SHAPIRO, F.; KOIDE, S.; GLIMCHER, M.J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.75A, n.4, p.532-553, 1993.

SHORT, B.; BROUARD, N.; OCCHIODORO-SCOTT, T.; RAMAKRISHNAN, A.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal Stem Cells. **Archives of Medical Research**, New York, v.34, p.567-571, 2003.

SMITH JR., G.N.; MYERS, S.L.; BRANDT, K.D. MICKLER, E.A.; ALBRECHT, M.E. Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, New Jersey, v.42, p.545-554, 1999.

SOUZA, T.D.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V. Efeitos da eletroterapia no processo da reparação da superfície articular de coelhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, p.819- 824, 2001.

STASHAK, T.S. **Claudicação em Eqüinos Segundo Adams**. São Paulo: Roca, 1994. p.351-454.

STEVENSON, S. Bone grafting. In:_____. BOJRAB, M.J.; BIRCHARD, S.J.; TOMLINNSON, J.L. **Current techniques in small animal surgery**. Philadelphia: Lea & Febiger, 3.ed., 1990, cap.3, p.836-844.

STEVENSON, S. Enxertos Ósseos. In:_____. SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, 1998, 2.ed., v.2, p. 2006–2016.

SVALASTOGA, E. **Local Tissue Hypoxia in the Pathogenesis of Osteoarthritis**. 92F, 1988. The Royal Veterinary and Agricultural University Department of Small Animal Disease and Clinical Practice, Copenhagen, 1988.

THOMPSON, E.G. Inflamação e reparação In:_____. THOMPSON, R.G. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1983. cap.4, p.144-250.

TOGNOLI, G.K.; PIPPI, N.L.; OLSSON, D.C.; GRAÇA, D.L.; TRAEZEL, C.K.; LOPES, S.T.A.; MARTINS, D.B.; RAISER, A.G.; MAZZANTI, A. Isolamento, quantificação e viabilidade da fração total de células mononucleares da medula óssea em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.35, n.2, p.368-369, 2007.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, Washington, v.150, n.698, p.893-899, 1965.

VAN SUSANTE, J.L.C.; BUMA, P.; SCHUMAN, L.; HOMMINGA, G.N.; VAN DEN BERG, W.B.; VETH, R.P.H. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. **Biomaterials**, New York, v.20, p.1167–1175, 1999.

VERFAILLIE, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biology**, London, v.12, n.11, p.502-508, Nov.2002.

VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Hematology**, Amsterdam, v.10 Suppl.1, p.293-296, Sep.2005.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.J.; YOUNG, R.;G.; MANSOUR, J.M.; CAPLAN, A.I .; GOLDBERG, V.M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.76A, p.579-592, 1994.

WANG, J.; LI, C.; FAN, H.E.H.; SUN, Y. Allograft bone-marrow derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate infarcted heart. **Journal of Zhejiang University Science**, China, v.5, n.10, p.1279-85, 2004.

WATT, S.M. Stem cell plasticity. **British Journal of Haematology**, v.122, p.877-891, 2003.

WEIGEL, P.J. Bone grafting: In: BOJRAB, J.M. **Disease mechanisms in small animal surgery**, 2.ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.678-685.

WEXLER, S.A.; DONALDSON, C.; NING-KENDALL, P.; RICE, C.; BRADLEY, B.; HOWS, J.M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. **British Journal of Haematology**, London, v.121, n.2, p.368-374, 2003.

WRIGHT, D.E.; WAGERS, A.J.; GULATI, A.P.; JOHNSON, F.L.; WEISSMAN, I.L. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. **Science**, Pennsylvania, v.294, p.1933-1936, 2001.

XU, M.; BRUNO, E.; CHAO, J.; NI, H.; LINDGREN, V.; NUNEZ, R.; MAHMUD, N.; FINAZZI, G.; FRUCHTMAN, S.M.; POPAT, U.; LIU, E.; PRCHAL, J.T.; RONDELLI, D.; BAROSI, G.; HOFFMAN, R. The constitutive mobilization of bone marrow-repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. **Blood**, Washington, v.105, p.1699-1705, 2005.

YANAI, T.; ISHII, T.; CHANG, F.; OCHIAI, N. Reparo de amplos defeitos de espessura completa da cartilagem articular em coelhos: os efeitos da distração do

joelho e transplante autólogo de células mesenquimais derivadas da medula óssea. **Journal Bone Joint Surgery**, Massachusetts, v.87B, n.5, p.721-729, 2005.

YOUNG, H.E.; STEELE, T.A.; BRAY, R.A.; HUDSON, J.; FLOYD, J.A.; HAWKINS, K.; THOMAS, K.; AUSTIN, T.; EDWARDS, C.; CUZZOURT, J.; DUENZL, M.; LUCAS, P.A.; BLACK JR., A.C. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anatomical Record**, v.264, New York, n.1, p.51-62, 2001.

YU, M.; XIAO, Z.; SHEN, L.; LI, L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. **British Journal of Haematology**, London, v.124, n.5, p.666-675, 2004.

ZAGO, M.A. Células tronco: terapia celular, transplante de células de tecidos ou de órgãos. In:_____. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006a, p.3-20.

ZAGO, M.A. Células tronco origens e propriedades In:_____. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006b, p.109-113.

ZILIOOTTO, L.; DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; SOUZA, A.P.; FANTINATTI, A.P.; DINIZ, P.P.V.P. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. **Acta Cirurgia Brasileira**, São Paulo, v.18, n.2, p.107-115, 2003.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human

adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, New York, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

ZVAIFLER, N.J.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; ADAMS, G.; EDWARDS, C. J.; MOSS, J.; BURGER, J. A.; MAINI, R.N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis Research**, London, v.2, n.6, p.477-488, 2000.

APÊNDICE

Fontes de aquisição dos materiais da pesquisa

- ¹ Paquímetro graduado. Produzido por Worker distribuído por FNCL, Brasil.
- ² Dremel[®] (EUA). Importado por Robert Bosch Limitada. Campinas, SP. Brasil.
- ³ Cloreto de Sódio 0,9%. Sanobiol. Pouso Alegre, MG. Brasil.
- ⁴ Glicerina 98%. Indústria Rioquímica, São José do Rio Preto, SP. Brasil.
- ⁵ Cetamin[®]. Syntec. Patrocínio Paulista, SP. Brasil.
- ⁶ Kensol[®]. Kong. Santana de Parnaíba, SP. Brasil.
- ⁷ Tramal. União Química Farmacêutica Nacional. Pouso Alegre, MG. Brasil.
- ⁸ Banamine[®] Injetável. Schering-Plough Saúde Animal Indústria e Comércio Ltda. Cotia, SP. Brasil.
- ⁹ Cezolin[®]. BioChimico. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ¹⁰ Biotrat Iodopovidona solução degermante. LMFarma Ind. e Comércio Ltda. São José dos Campos, São Paulo, SP. Brasil.
- ¹¹ Álcool 54^oGL. Minasúcar S/A. Santa Rosa de Viterbo. São Paulo, SP. Brasil.
- ¹² Riodine. Rioquímica Indústria Farmacêutica. São Jose do Rio Preto, SP. Brasil.
- ¹³ Agulha metálica de Rosenthal. Ecomed Comércio de Produtos Médicos Ltda. Catete, Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ¹⁴ Liquemine[®]. Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ¹⁵ Capela de fluxo laminar. Lupe Indústria e Comércio. São Paulo, SP. Brasil.
- ¹⁶ Tubo Falcon. CRAL artigos para Laboratórios Ltda. Cotia, SP. Brasil.

- ¹⁷ Dulbecco's. Invitrogen Brasil Ltda. São Paulo, SP. Brasil.
- ¹⁸ Ficoll-Hypaque Plus. Amersham Biosciences do Brasil Ltda. R. São Paulo, SP. Brasil.
- ¹⁹ DMEM. Invitrogen Brasil Ltda. São Paulo, SP. Brasil.
- ²⁰ Gibco BRL life technologies, Inc., Grand Island, Nova York.
- ²¹ Eppendorf. CRAL artigos para laboratórios Ltda. Cotia, SP. Brasil.
- ²² Câmara para contagem de células. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ²³ Vicryl 4-0. Ethicon. Sao Paulo, SP. Brasil.
- ²⁴ Nylon 3-0. Polysuture Indústria e Comércio. São Sebastião do Paraíso, MG. Brasil.
- ²⁵ Rifocina spray. Hoechst Marion Roussel S/A. Suzano, SP. Brasil.
- ²⁶ Tiopental sódico 2,5%. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Campinas, SP. Brasil.
- ²⁷ Cloreto de potássio 10%. Darrow Laboratórios S.A. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ²⁸ Formol 10%. Start Química. Uberlândia, MG. Brasil
- ²⁹ Xilol. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ³⁰ Hematoxilina-Eosina. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ³¹ Tricrômio Mallory. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ³² Microscópio de luz Polyvar. Reichert Microscope Services. New York, USA. Estados Unidos.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)