

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós Graduação Mestrado Profissional
Tecnologia em Química e Bioquímica

LUIZ ANTONIO RIBEIRO

***USO DE GEL TRI COMPOSTO, "TRIGEL" (TITÂNIO +
PVA + AC. HIALURÔNICO) ASSOCIADO OU NÃO COM
CÉLULAS-TRONCO, NO REPARO DA LESÃO OSTEO
CARTILAGINOSA: MODELO ANIMAL.***

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo
22 fevereiro de 2018

FOLHA DE APROVAÇÃO:

Aprovado em

-----/-----/-----

DEDICATÓRIA:

*... À minha mãe Yolanda Lugoboni Ribeiro e ao meu pai
Jacintho Antonio Ribeiro (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Ao quarteto fantástico, “mulheres de minha vida”:

Margareth Guimarães Máximo Ribeiro, minha esposa.

Yolanda Lugoboni Ribeiro, minha mãe.

Mari Cleide Sogayar, Professora, Orientadora e Amiga.

Denise Freitas de Siqueira, Coordenadora e Incentivadora.

E também:

Equipe do Laboratório NUCEL-FM-USP-... Em especial ao amigo

Fernando H. Lojudice.

Agências Financiadoras (BNDES, CAPES, CNPq, FAPESP, FINEP, MS-DECIT).

Ao Programa de Mestrado Profissional do IQ-USP

LUIZ ANTONIO RIBEIRO

USO DE GEL TRI COMPOSTO, "TRIGEL" (TITÂNIO + PVA + AC. HIALURONICO) ASSOCIADO OU NÃO COM CÉLULAS-TRONCO, NO REPARO DA LESÃO OSTEO CARTILAGINOSA: MODELO ANIMAL.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Tecnologia em Química e Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

Supervisor: Dr. Fernando Henrique Lojudice

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA No.</u>	<u>Página</u>
1 Representação Ilustrativa da Cartilagem humana	16
2 Representação esquemática das vias bioquímicas da OA	16
3 Rxs de joelho	18
4 Morfologia do Ti em pó	22
5 Ilustração das fórmulas do PVA e sua obtenção	22
6 A indústria e o PVA	23
7 Fórmula Molecular e Fórmula Estrutural do Ac. Hialurônico	24
8 Produtos comercializados feitos a partir de Ac. Hialurônico	24
9 Lesão Padrão	31
10 Joelho da pata posterior e a lesão padrão	31
11 Superfície Cartilaginosa de Joelho e Ratos Wistar	34
12 Atlas de Histologia de Joelho de Ratos Wistar	34
13 Trigel após três meses da aplicação	35
14 Trigel após três meses, visão intra-articular	35
15 Grupo Sham	39
16 Lâminas de corte do Joelho Direito de Ratos Wistar	40
17 Lâminas com coloração Tricômio de Masson	41
18 Utilização de dinamômetro	42
19 Modelos Comerciais	42
20 Análise da força de tração (em KgF)-HA	43
21 Análise da força de tração (em KgF)-PVA	44
22 Análise da Força de tração (em KgF)-Ti	45
23 Análise da Força de tração (em KgF)-TRG	46
24 Análise da Força de tração (em KgF)-TRG+MSC	47
25 Análise da Força de tração (em KgF)-HA+PVA	48
26 Análise da Força de tração (em KgF)-HA+Ti	49
27 Análise da Força de tração (em KgF)-PVA+Ti	50

28 Análise da Força de tração (em KgF)-MSC	51
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AO	Osteoartrose
MSC	Células-tronco mesenquimais
TRG	Trigel
PVA	Poli Vinil Álcool
TI	Titânio
SBR	Sociedade Brasileira de Reumatologia
OMS	Organização Mundial da Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL	Interleucina
PAI	Inibidor do Ativador do Plasminogênio
UPA	Ativador de Uroquinase
tPA	Ativador Tecidual do Plasminogênio
Cbfa1	Core Binding Factor Alpha One
EUA	Estados Unidos das Américas
GAG	Glucosaminoglicanos
LB	Luria Bertani
ZC	Zona de Crescimento
CC	Condrócitos
CB	Condroblastos
CH	Cartilagem Hialina
KgF	Kilograma Força

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.2 Patogenia	13
1.3 Diagnóstico	17
1.4 Classificação das Osteoartroses	17
1.5 Objetivo Geral	18
1.6 Objetivos específicos	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 Titânio	20
2.2 Poli Vinil Álcool	22
2.3 Ácido Hialurônico	23
2.4 Trigél	25
2.5 Análise Estatística	25
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	27
3.1 Modelo Animal	27
3.2 Teste de Contaminação e Citotoxicidade	28
3.3 Características Físico- químicas do Trigél	29
3.4 Formação dos Grupos para escolha da Lesão Padrão	30
3.5 A Lesão Padrão	31
3.6 Formação dos Grupos de Animais para Tratamento	32
3.7 Preparação das lâminas para análise histológica	33
4. RESULTADOS	37
4.1 Análise Histológica	37
4.2 Análise da Força de Tração na pata lesionada	42
5. DISCUSSÃO	52

6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS	55
8. SÚMULA CURRICULAR	59

RESUMO GERAL

RIBEIRO, L.A. Uso De Gel Tri Composto, “TRIGEL” (Titânio + PVA + Ac. Hialurônico) Associado Ou Não Com Células-Tronco, No Reparo Da Lesão Osteo Cartilaginosa: Modelo Animal. 2018. 56 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Biotecnologia em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A artrose, também chamada de osteoartrose ou osteoartrite (OA), é a terceira doença de maior incidência no Mundo. Nesse trabalho, buscou-se criar uma lesão osteocartilaginosa em joelhos de ratos Wistar machos com seis meses de vida, objetivando constituir um modelo animal para estudo da OA humana e, a partir desse modelo, avaliar biomateriais de forma isolada ou associados entre si e avaliados quanto à sua segurança biológica e potencial de reparação tecidual. Além disto, foi analisado o efeito reparador de células-tronco mesenquimais da polpa do dente de leite humano (MSC) isoladamente e em associação com o biomaterial formado por: Titânio + Poli Vinil Álcool + Ac. Hialurônico, nesse estudo denominado de TRIGEL (TRG). O Ac. Hialurônico (HA), por suas propriedades visco elásticas, o pó de Titânio (Ti), devido às suas propriedades biológicas únicas de osteointegração e o polímero Poli Vinil Álcool (PVA), com suas propriedades hidrofílicas, promovendo a formação do Hidrogel, os quais associados entre si formam um compósito, o TRG, que foi aplicado sobre uma lesão padrão no joelho da pata pélvica direita de ratos Wistar machos de seis meses de idade. Para a obtenção da lesão padrão, os animais foram divididos em três grupos de cinco

animais e cada grupo foi submetido a uma intervenção cirúrgica em seus joelhos direitos, utilizando três técnicas cirúrgicas diferentes, a saber: Grupo (I): Remoção cirúrgica dos meniscos medial e lateral mais perfuração do platô tibial seguido da aspiração da medula óssea através dessa perfuração por meio de seringa e agulha. Grupo (II): Remoção dos meniscos mais perfuração, sem aspiração, Grupo (III): Apenas a perfuração. Todos os animais foram autopsiados após 30 dias. Os joelhos dos quinze animais que constituíam os três grupos foram devidamente catalogados e enviados para a empresa Histotech, para a confecção das lâminas, tendo sido eleito, por análise histológica, o Grupo (I), por demonstrar menor reparo tecidual espontâneo. Em tese, o TRG teria as seguintes propriedades: Uma fonte de reparação tecidual (visco terapia) dada pelo HA e a capacidade amortecedora e carreadora de células-tronco do polímero PVA, que se hidrata, formando o hidrogel. O Ti, pela sua propriedade de osteointegração formaria um tampão sobre as áreas de matriz óssea exposta o que possibilitaria o afluxo de novos condrócitos, que também pode ocorrer pela ação das células-tronco. Livrar a superfície articular das áreas com exposição da matriz óssea é fundamental para o bloqueio das proteases que perpetuam a fisiopatologia da OA. Após tratamento estatístico dos diversos ensaios, utilizando-se os diversos biomateriais no tratamento da lesão, o TRG foi o biomaterial que apresentou o melhor resultado de força entre os grupos. No estudo histológico, foi evidenciada a presença de tecido cartilaginoso supra-lesional, o que só ocorreu nos animais dos grupos que receberam: apenas TRG, TRG associado com células-tronco e aquele que recebeu apenas MSCs. No entanto, mais estudos, com animais de maior porte e mais velhos, devem ser realizados para melhor analisar a segurança e o potencial terapêutico do composto Trigel.

Palavras chaves:

Osteoartrose **OA**

Ácido Hialurônico **HA**;

Poli vinil Álcool **PVA**;

Titânio **Ti**;

Células-tronco Mesenquimais da polpa de dente de leite **MSC**;

Trigel **TRG**;

ABSTRACT

RIBEIRO, L.A. Use of Tri-Compound Gel, "TRIGEL" (Titanium + PVA + Hyaluronic Acid) Associated Or Not With Stem Cells, In Lesion Repair Cartilaginous Osteo: Animal Model. 2018. 56 p. Dissertation (Professional Master's Degree in Biotechnology in Biochemistry) - Post-Graduate Program Professional Master's Degree in Technology in Chemistry and Biochemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Osteoarthritis, or osteoarthritis (OA) is the third most debilitating disease in the world. In this study, we attempted to create an osteocartilaginous lesion in the knees of six months old male Wistar rats, aiming to constitute an animal model for the study of human OA and to use this model to evaluate the therapeutic potential of biomaterials, which are already well known for their biocompatibility properties in the clinical practice. The biomaterials were used in isolation or associated with each other and then evaluated for their biological safety and tissue repair capacity. Mesenchymal stem cells, obtained from human dental pulp from deciduous teeth (MSC) were evaluated alone and in association with the biomaterial formed by: Titanium + Poly Vinyl Alcohol + Ac. Hyaluronic, here called TRIGEL (TRG). Due to its visco-elastic properties, the Ti powder, due to its unique biological properties of ostointegration and the polymer PVA, with its hydrophilic properties, forming a hydrogel, were associated to form the composite named TRIGEL, (TRG), which was applied to a standard knee injury of the right hind leg of male Wistar rats. In order to elect the standard lesion, the animals were divided into three groups with five animals each and each group underwent a surgical intervention in their right knees, with three different surgical techniques being applied, namely: Group (1): Surgical removal of

medial and lateral meniscus plus perforation of the tibial plateau, followed by aspiration of the bone marrow through this perforation using syringe and needle. Group (2): Removal of the meniscus plus perforation, without aspiration, Group (3): Drilling only. All groups were autopsied 30 days after the procedure and all groups were autopsied at 30 days post-procedure. The knees of the 15 animals that constituted the three groups were analyzed histologically and Group (1) (meniscus removed, perforated and aspirated), was elected as the standard lesion since it demonstrated less spontaneous tissue repair. TRG has the following properties: HA is used as a source of tissue repair (visco therapy) and hydration of the polymer; PVA, forms a hydrogel", with damping action and as a stem cells carrier, whereas Ti was used due to its ósseo-integration, which would allow coating of the exposed bone matrix and this intra-osseous osteo-integration response would form an intercalating buffer. The healthy cartilage surfaces around this structural buffer would allow the reception of new chondrocytes or the action of the cells on TRG properties. Freeing the articular surface of the areas with bone matrix exposure is critical for blocking the proteases that perpetuate the pathophysiology of OA. In the various biomaterial tests in the treatment of the standard lesions, TRG was statistically shown to be the one that better mimicked the non-injured group. The histological study demonstrated the presence of a supra-lesional cartilagenous tissue, which only occurred in the groups which received: only TRG, mesenchymal stem cells associated with TRG and that which received only MSCs. However, further studies with larger and older animals should be pursued to better assess the safety and therapeutic potential of the Trigel composite.

Keywords:

Osteoarthritis **AO**

Ac. Hyaluronic **HA**;

Polyvinyl Alcohol **PVA**;

Titanium **Ti**;

Mesenchymal stem cells **MSC**;

Trigel **TRG**.

1. INTRODUÇÃO

Com a extensão da longevidade humana graças, em parte, aos investimentos robustos das indústrias farmacêuticas e políticas públicas governamentais, podemos assistir ao maior número de humanos centenários, porém, muito antes desse crepúsculo de senioridade, as doenças degenerativas já se manifestam - em média, a partir dos 41 anos - entre as quais a artrose, também chamada de osteoartrose ou osteoartrite (OA), com 10 milhões de casos registrados no Brasil. Na artrose, o desgaste do tecido cartilaginoso ocorre gradualmente e se agrava com o passar do tempo, não atingindo apenas a terceira idade. Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia, (SBR / 2017) (1), 20% dos adultos brasileiros, na faixa dos 30 anos de idade, já sofrem com a doença, estimando-se que o excesso de exercícios físicos será a causa de 45% dos casos de artrose no futuro, assim como o sobrepeso, que atinge quase 60% dos brasileiros, segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE/2013) (1), (2). A doença é considerada, pelo Ministério da Saúde e da Previdência Social, a terceira causa de afastamento do trabalho no Brasil. A doença é tão comum que representa de 30% a 40% de todas as consultas em ambulatórios de reumatologia, afastando 7,5% dos trabalhadores, cerca de 70% a 80% da população com mais de 65 anos possui artrose e embora outros fatores, como: hereditariedade, alterações hormonais, inflamações, doenças metabólicas, possam causar o problema, sendo os primeiros sinais: dor, a falta de sustentação, estalos nas articulações, rigidez e limitação dos movimentos (1), (2) são os dados estatísticos do IBGE, 2013 (3). Na população acima dos 70 anos a prevalência é de 80%, aumentando em grande escala os custos previdenciários em todos os países desenvolvidos, provocando aposentadoria precoce por invalidez, *WATTERSON & ESDAILE; 2000*, (4). Diversas terapias para o tratamento da OA estão no mercado, porém suas eficácias são limitadas ao grau de comprometimento evolutivo das mesmas e à idade dos pacientes. Entre as terapêuticas mais utilizadas, estão os anti-inflamatórios hormonais e não hormonais e aos pacientes com maior grau de comprometimento, são submetidos aos procedimentos minimamente invasivos, que são as infiltrações por meio de injeções intra-articulares de corticosteroides ou de ácido hialurônico e na sequência evolutiva, os métodos extremamente invasivos, como as cirurgias para colocação de próteses, sendo, as mais comuns, as de joelhos e quadril (coxo- femoral). Essas últimas atingem principalmente a

população de idade mais avançada, nas quais os riscos cirúrgicos são mais significativos. Desde os sintomas iniciais, são encontradas alterações radiológicas em 30% dos casos, porém, apenas 1/3 tem sintomas significativos, contribuindo para a progressão silenciosa da patologia *BEDSON et. al; 2003, (5)*. A etiologia da OA ainda não tem unanimidade em relação às causas primárias e como causas secundárias, são listados: micro lesões progressivas a partir de lesões desportivas repetitivas, condições laborais, genéticas, doenças autoimunes e doenças metabólicas, ou traduzindo numa única definição: “Uma carga anormal sobre uma cartilagem normal ou uma carga normal sobre uma cartilagem anormal”, *PELLETIER et. al; 1991 (6)*.

1.2 PATOGENIA:

A patogenia da OA tem, como principais protagonistas bioquímicos, as metaloproteases, enzimas envolvidas na cascata de reações que levam à degradação do tecido cartilaginoso. Após o “start” decorrente das microfraturas ou microfissuras no tecido cartilaginoso intrarticular, ocorre a liberação de citocinas, que sinalizam a ativação de metaloproteases e consequente degradação da matriz cartilaginosa, com a quebra da estrutura molecular de um dos principais componentes da matriz cartilaginosa, o Ácido Hialurônico, com liberação de seus fragmentos, os quais estimulam a ativação de mais citocinas (Interleucinas) a liberarem mais metaloproteases o que acentua a profundidade das lesões denominadas microfissuras, atingindo as camadas mais profundas do tecido cartilaginoso, com exposição da matriz óssea, tornando o processo degenerativo cíclico, doloroso e perene. Embora as lesões mecânicas sejam muito comuns na base da artrose, estão envolvidas: as alterações bioquímicas e imunológicas e as células que revestem a articulação, como: condrócitos, sinviócitos tipo B (semelhantes aos fibroblastos), além de inúmeras enzimas e citocinas, apesar de não se constatar o infiltrado inflamatório típico (7). Entre as citocinas que estimulam os condrócitos a secretarem proteases estão: A interleucina tipo 1 (IL-1) que é a principal mediadora na fase inicial do processo artrósico, concomitantemente com o “fator de necrose tumoral alfa” (TNF- α). Outras citocinas estão envolvidas mais no papel regulatório, tais como: as interleucinas IL-6, IL-8, ou inibidor, como as interleucinas: IL-3, IL-4, IL-10 e o “fator de necrose tumoral

beta” (TNF- β) (8), (9). Sem a proteção da matriz, os condrócitos multiplicam-se no local da lesão, tentando formar uma barreira protetora vertical (colunar), com grande aumento da síntese de proteínas reparadoras (10), sendo essa tentativa anabólica tênue, quando comparada com a ação das proteases, as quais são mais efetivas na degradação progressiva da cartilagem. Quando moléculas de proteoglicanos e colágeno, provenientes da degradação da matriz cartilaginosa, caem no líquido sinovial, estimulam sinoviócitos a secretarem citocinas catabólicas (IL-1, IL-6 e TNF α), que acabam interagindo com os condrócitos, estimulando ainda mais a produção de proteases, as quais, por sua vez, voltam a estimular os sinoviócitos a secretarem mais citocinas e produzirem colágenos defeituosos e degradados, fechando um ciclo de perpetuação da patogênese da artrose (11). Alguns receptores da membrana, como CD44 e as β -integrinas, parecem estar envolvidos neste ciclo dos fragmentos e mediadores químicos (12). As proteases mais comumente encontradas nessa fisiopatologia são quatro: metaloproteases, serinoproteases, tiolprotease e agrecanases.

1.2.1 Metaloproteases: Atuam na degradação do colágeno tipo II: a colagenase-1, colagenase-3 e neutrófilos. As colagenases-1 e colagenase-3 são encontradas nas cartilagens com artrose em estados iniciais e avançados, sem níveis proporcionais à severidade das doenças, sendo sintetizadas pelos condrócitos após estímulo pela IL-1. A colagenase-3, provavelmente atua na mesma região onde age a colagenase-1, ou seja, na trípla hélice do colágeno, com ação mais rápida numa segunda clivagem (11), (12) e (Fig.1 e Fig.2).

A colagenase de neutrófilo é secretada pelos poucos neutrófilos presentes no líquido sinovial, sendo, sua quantidade, proporcional ao número de neutrófilos.

1.2.2 Estromelisin participam da degradação do colágeno IX, que é um estabilizador da função do colágeno tipo II (13), atuando na clivagem do colágeno IX na estrutura “não colagênica, “participando, portanto, da cascata enzimática de atuação das pro-metaloproteases”.

1.2.3 Gelatinases: são proteases neutras que também participam da cascata de ativação das outras enzimas, além da clivagem de fibronectina, elastina e dos colágenos tipo IV, V, VII e X.

1.2.4 Serinoproteases: apresentam no seu interior um complexo formado por zinco e cisteína, sendo que para o cátion zinco ficar disponível e catalisar as reações enzimáticas, há necessidade da clivagem da cisteína e exposição do zinco, havendo

participação da plasmina e de outras proteases envolvidas no processo de OA (14). Cada enzima ativada ganha a capacidade de ativar outras pró-enzimas. A demonstração de que a estromelina ativada vai ativar as collagenases, sugere o mecanismo de cascata do qual fazem parte, além das estromelinas, as gelatinases ativadas e os níveis de UPA e tPA, que se elevam, enquanto decrescem os níveis de seus bloqueadores naturais (PAI- “Inibidor de ativador de Plasminogênio”). Esse desequilíbrio marca o início da cascata que vai ativar as metaloproteases latentes (pró-enzimas) (15).

As citatinas, que pertencem ao grupo das catepsinas B, L e D, tem seu papel na degradação das proteoglicanas, sendo discutível se seria mediada por IL-1.

1.2.5 Agrecanases 1 e 2 são as primeiras enzimas envolvidas na degradação dos agregados proteínicos.

1.2.6 Tiolprotease são cistino-proteases, que tem, como seus inibidores, as psinas, sendo, a principal, as serinoproteases, cujas ações podem ser inibidas por ligação com o inibidor tecidual de plasminogênio (PAI), (16), (17) e (18).

O ativador de uroquinase (UPA) e o ativador tecidual de plasminogênio (tPA) ativam o plasminogênio em plasmina a qual é o principal elemento ativador de collagenases e estromelinas na OA, atuando sobre a "Core binding factor alpha one", (Cbfa1) que promovendo a hidrólise da Cbfa1, o que expõe a matriz osteocondral à ação das agrecanases sobre os complexos proteoglicanos, criando uma sequência que permite ação de outras proteases (18). Mais recentemente, foi observada a formação do óxido nítrico (NO) a partir de oxigênio molecular e L-arginina, sendo que sua ocorrência na OA se caracteriza pela presença de nitritos e nitratos na cartilagem e na cápsula articular, porém não no líquido sinovial, de pacientes portadores de OA (19).

O neuropeptídeo-P, também encontrado na sinóvia, tem sua origem nos neurônios não mielinizados e seria liberado por ação da IL-1, sendo encontrado no líquido sinovial dos pacientes com OA (20).

A Figura 1 abaixo ilustra o tecido cartilaginoso e a articulação do joelho.

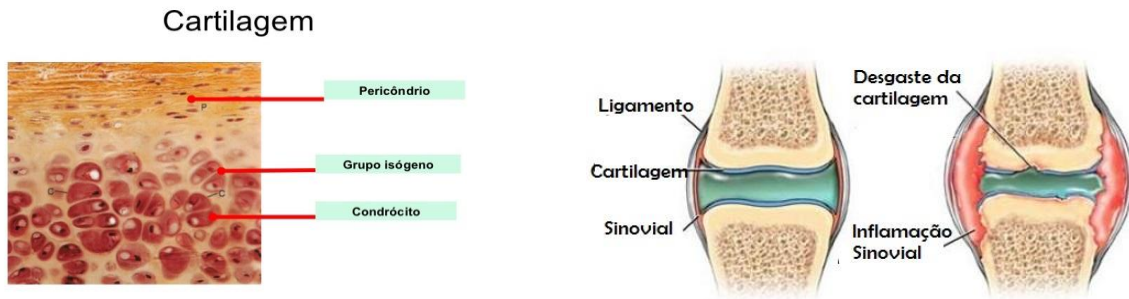


FIG.1: Representação ilustrativa da cartilagem humana. À esquerda: aspecto da histologia do tecido e à direita: representação da articulação de joelho normal e com osteoartrose. (fonte: Imagens do Google).

O esquema apresentado na Fig.2 mostra os diversos elementos envolvidos na patogenia da Osteoartrose (OA).

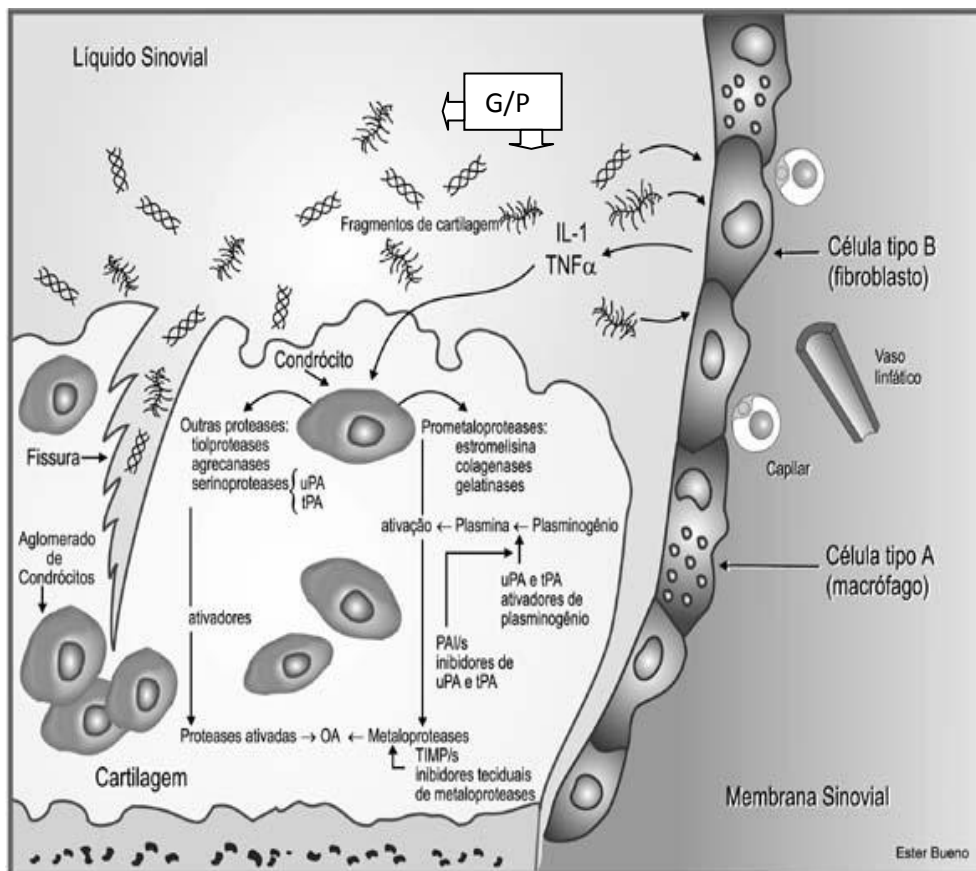


FIG. 2: Representação esquemática das vias bioquímicas da OA: Na figura acima pode-se observar a maquinaria biológica da patogenia provocada por uma “cascata de eventos” degradatórios, que levam à liberação e ativação das metaloproteases. As setas G/P são referentes às ilustrações: “G” de glucosaminaoglicanos e a “P” referente às proteínas. (Fonte: Imagens do Google)

1.3 DIAGNÓSTICO:

O diagnóstico da OA é essencialmente clínico e depois radiológico, nos casos iniciais, sendo sucedido por ressonância nuclear magnética, na progressão dos casos, porém esta é uma metodologia cara e não acessível a todos da população. Escalas psicométricas também são frequentemente aplicadas em estudos clínicos sendo a "Womac" a mais utilizada nos EUA e Canadá. Há também outra escala denominada "Lesquene", para joelhos e quadril. Atualmente já se aplica metodologia de questionários via "web", utilizando a escala de "Womac" e "Lesquene" para propostas de tratamentos validados (21). Ainda como alternativa para evolução do diagnóstico do estado inflamatório no pré e pós-operatório para pacientes submetidos à colocação de próteses, o peptídeo "presepsin", normalmente aplicado como indicativo de sepsis, vem sendo utilizado em comparação com outros grupos de não colocação de próteses tanto de quadril como joelhos, gerando assim um algoritmo controle do estado inflamatório, (22).

1.4. CLASSIFICAÇÃO DAS OSTEOARTROSES

Atualmente, existem três classificações embasadas no grau de degeneração articular da OA (Kellgreen & Lawrence (1957); Ahlbäck (1968) modificado por Keys et al (1992); Dejour et al (1991), sendo que todas se utilizam do Rx como parâmetro classificatório. A imagem radiográfica não detecta os estágios iniciais da degeneração da cartilagem, conseqüentemente, temos as alterações que são detectadas após grandes avanços da patogenia entre um estágio e outro das classificações.

No presente estudo, adotaremos a escala de KELLGREEN & LAWRENCE (1957), a qual, apesar de ser a mais antiga, não será utilizada neste trabalho como critério para acompanhamento do tratamento, mas, apenas, para a classificação da OA.

Classificação de KELLGREEN & LAWRENCE

Grau 0: Joelho normal (sem alterações radiológicas);

Grau I: Estreitamento do espaço articular duvidoso e possíveis osteófitos marginais

Grau II: Estreitamento do espaço articular e osteófitos marginais definidos;

Grau III: Possível estreitamento do espaço articular definido, múltiplos osteófitos marginais, moderada esclerose subcondral e possível deformidade provocada pela OA sobre o contorno ósseo.

Grau IV: Notável estreitamento do espaço articular, severa esclerose subcondral, presença de deformidade do contorno ósseo e presença maciça de osteófitos marginais. Com aspectos erosivos evidentes nas regiões subcondrais e severo desvio do eixo articular, conforme ilustrado na Figura 3, abaixo.

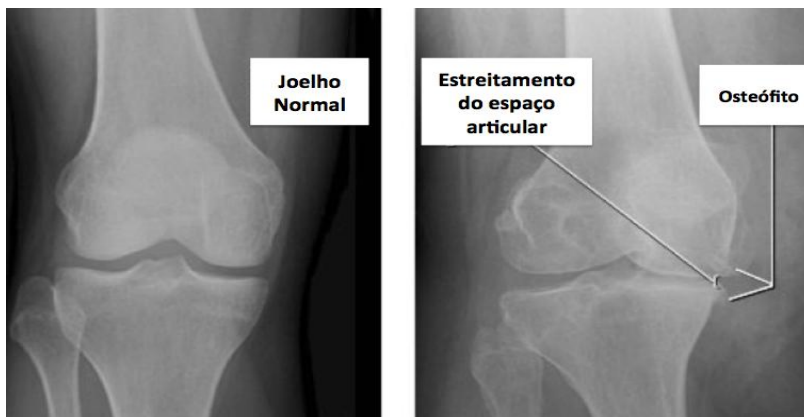


FIG. 3: Raios "X" de joelho: Normal à esquerda, e joelho com OA Grau IV, à direita

1.5 OBJETIVO GERAL:

Gerar e padronizar um modelo animal de OA para testar diferentes materiais isoladamente ou associados entre si quanto à sua eficácia na regeneração de uma lesão articular padrão em ratos Wistar machos com seis meses de idade.

Utilizando este modelo animal, desenvolver uma metodologia de tratamento minimamente invasivo da osteoartrose OA de joelho, utilizando a terapia celular e o biomaterial em estudo: o TRIGEL.

1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estabelecer um modelo animal de lesão semelhante ao padrão encontrado na osteoartrose (ao) em joelhos de membros posteriores de ratos Wistar no Biotério de Experimentação do NUCEL.
- Analisar o efeito de diferentes materiais, como: HA, PVA, e Ti, isoladamente ou em diferentes combinações, sobre a capacidade de regeneração da lesão padrão e a força de tração do membro afetado pela lesão.
- Analisar o efeito da associação de células-tronco mesenquimais ao compósito gerado e denominado Trigel no reparo da lesão.
- Submeter os dados obtidos a tratamento estatístico para a redação de artigo e/ou patente a serem submetidos à publicação.
- Propor medidas de aprimoramento da técnica padronizada e sua utilização na terapia celular associada aos biomateriais como tratamento alternativo às próteses de joelhos.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1 Titânio

O Titânio é um metal estrutural que apresenta uma combinação inédita de propriedades. A aparência visual é semelhante àquela do alumínio e do aço inoxidável. Sua superior relação resistência/peso e resistência à corrosão originaram uma variedade de aplicações, permitindo uma tecnologia anteriormente impraticável com outros materiais. A indústria do metal titânio, iniciada em 1945/1950, tem hoje meio século de existência. O rápido crescimento nos primeiros anos foi resultado do incentivo de programas aeronáuticos promovidos pelos governos dos Estados Unidos e da ex-União Soviética, com estes dois países investindo grandes somas de recursos no aperfeiçoamento do processo "Kroll". William Justin Kroll foi quem criou o processo metalúrgico de extração do Ti metálico a partir do mineral rutilo e desenvolveu ligas de alta resistência . O Japão seguiu utilizando a tecnologia existente e contribuiu no desenvolvimento de aplicações das propriedades anti-corrosivas do titânio. O setor da indústria de titânio que mais têm crescido nos últimos anos é o dos produtos de titânio comercialmente puro, sem elementos de liga, utilizados nas indústrias de processamento químico, em virtude da grande versatilidade proporcionada. Ainda hoje, os três países produtores de titânio estão utilizando o processo original "Kroll". A fonte de minério para o mundo livre tem sido, primariamente, o rutilo australiano. A próxima geração de usinas de titânio utilizará, sem dúvida, outros depósitos minerais como a iemenita, o anastásio ou a bruquita. O processo "Kroll" provavelmente será substituído por processos de redução eletrolítica ou outras técnicas mais recentes, tais como o arco plasma. Pode-se delinear, sumariamente, o mercado de aplicação do titânio em: indústria farmacêutica, alimentícia, galvanoplastia, química e derivados, papel e celulose, indústrias de alcalinização, siderúrgicas, aeronáuticas, espaciais, bio-medicinal, mineração, petróleo e petroquímicas, dentre muitas outras. A cada dia que passa, novas aplicações se desenvolvem. O Titânio, o Cromo, o Cobalto e o Molibdênio são biomateriais amplamente aplicados em implantes ortopédicos e odontológicos devido à sua excelente biocompatibilidade, baixo módulo de elasticidade e alta resistência ao desgaste e à corrosão, sendo as propriedades de osteointegração extensamente estudadas por, *BRANEMARK et al; 1981,1983, (23)*; Este autor participou de muitos

outros estudos sobre o comportamento da superfície do Ti e sua influência na ação antibacteriana dos implantes desses materiais (24), sendo essa sua última publicação antes de seu falecimento em 2015. Os fatores que influenciam decisivamente na funcionalidade de um biomaterial contendo Ti são suas características de pureza do metal, pois ocorre liberação de óxido de Ti na superfície do implante, o que não só facilita a osteointegração com a porção mineral do osso, mas, também, facilita a ocorrência de infecção. Atualmente, soluções de Nanotecnologia, construindo nanotubos na superfície do implante, possibilitou maior e mais rápida adesão dos osteócitos aos implantes, bem como carregamento de coberturas anti-bacterianas nesses nanotubos, contribuindo para alta eficácia da integração dos implantes de Ti. (25), (26), (27). Instrumentais cirúrgicos também são fabricados em larga escala em titânio, pois a leveza do metal é um fator positivo na redução da fadiga do cirurgião. O titânio não é magnético, não havendo, conseqüentemente, qualquer ameaça de danos aos pequenos dispositivos eletrônicos implantados. ASTM F-67 é a Norma que regulamenta a produção do Titânio Puro, para implantes cirúrgicos. Estas especificações abrangem os requisitos químicos, mecânicos e metalúrgicos para produção do Titânio destinado à fabricação de implantes cirúrgicos em quatro classes ou graus.

CARACTERÍSTICAS:

- Densidade 4,5 g/cm³
- Biocompatibilidade
- Resistência à corrosão
- Leveza
- Flexibilidade
- Fácil conformação

APLICAÇÕES:

- Implantes ortopédicos
- Implantes odontológicos
- Implantes maxilo-facial
- Implantes craniofaciais
- Dispositivos cardiovasculares

Abaixo na Fig. 4 a forma em pó do Titânio, utilizada neste trabalho

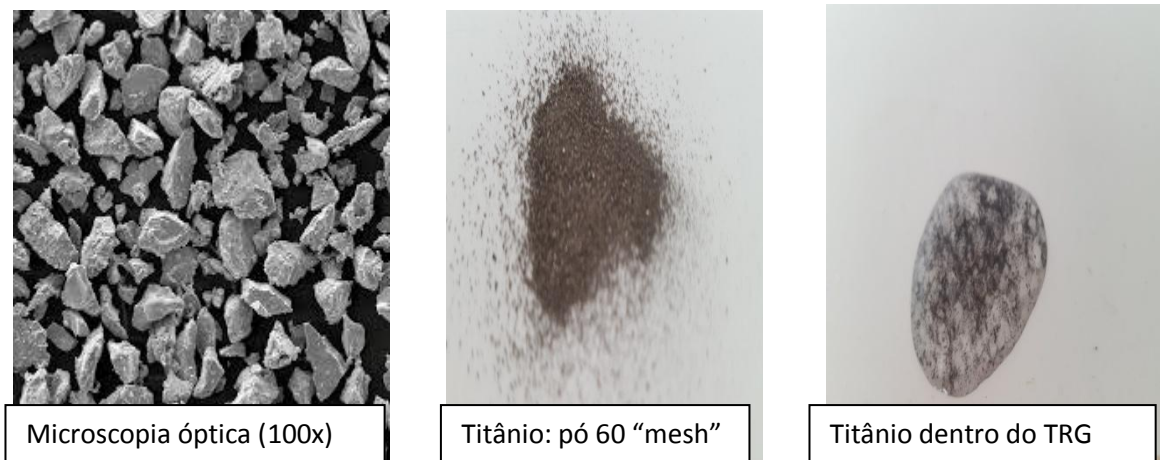


FIG. 4: Morfologia do Ti em pó: Na foto de microscopia (100X) observa-se o aspecto rugoso da superfície das partículas, o que é muito importante para a osteo-integração. Na foto do meio o Ti em pó utilizado para a composição do TRG (foto à direita)

2.2 Poli Vinil Álcool

Polímero muito utilizado pela indústria de manufaturados em todo o mundo, devido às suas propriedades físicas químicas, tem uma ampla gama de utilização por ser hidrofílico e aderente, sendo utilizado como cola hidrossolúvel nas atividades escolares e até gomas de mascar. Na Medicina, já se utiliza o PVA com microcarreadores de moléculas anti cancerígenas (28), também como carreador de micropartículas de prata no tratamento anti bacteriano de úlceras crônica (29). Como composto principal de algumas próteses de joelhos após passar por processo de “cristalização” utilizando com catalisadores os aldeídos ou com processo de ciclos de congelamento e descongelamento, sendo a cristalização por ciclos de congelamento e descongelamento mais bem mais bem tolerado pelos organismos biológicos, (30), (31) e (32).

Na Figura 5 abaixo a fórmula molecular e estrutural do PVA

A: Fórmula Molecular: $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$

B: Fórmula Estrutural

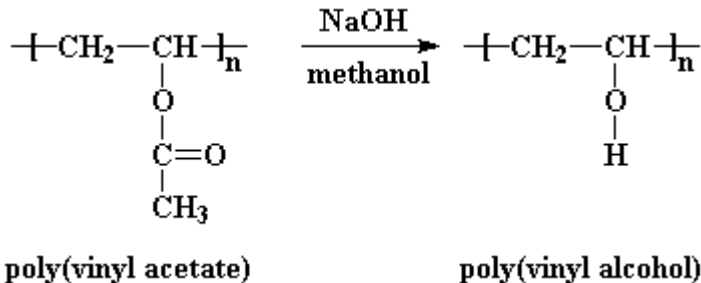


FIG. 5: Ilustração com Fórmulas do PVA e sua obtenção: Representação das fórmulas molecular (A) e estrutural(B). Na figura se observa a reação química para a obtenção de PVA na presença de Hidróxido de sódio e methanol.

Na Figura 6 abaixo produtos contendo PVA e PVAc



Fig.6: A indústria: PVA e PVAc:

PVA:Hidrossolúveis: Colas, microcarreadores de drogas e gomas de mascar, entre outros
PVAc: produtos industrializados de plásticos e tintas.

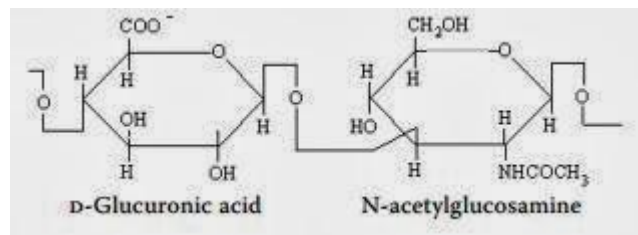
2.3 Ácido Hialurônico

Classificado com um biopolímero formado por um dissacarídeo (N-acetilglicosamina) e o ácido glucurônico (Fig. 7), com textura viscosa, existente em todos os tecidos do corpo humano, com funções biológicas destacadas no líquido sinovial de todas as articulações, no humor aquoso dos olhos e nos tecidos conjuntivos, sendo uma importante molécula de glicosaminoglicano (GAG) na constituição da matriz cartilaginosa das articulações . Esta molécula é o único GAG não sulfatado, possuindo a capacidade de se associar a proteínas para formar agregados moleculares, mas não forma proteoglicanos (33). Sua aplicação na Medicina tem início da década de 80, com aprovação para o uso intra-articular, indicado como redutor inflamatório, (FIG. 8), Synvisc®, porém, após mais de uma década do uso para tal fim, diversos estudos não demonstraram essa ação anti-inflamatória, até porque as alterações inflamatórias do

líquido sinovial não são iguais aos exudatos inflamatórios clássicos, o que dificulta a avaliação de agentes desinflamatórios, Isto determinou a mudança de sua indicação e propriedade terapêutica para visco reposição, conseqüentemente, visco terapia, havendo, dentro dessa proposta, melhora da dor e da função articular a médio e longo prazo, quando realizadas aplicações seriadas (34). Nos primórdios de 1990, sua utilização na prática médica com produtos pioneiros para correções estéticas da face, (Restylane®), (FIG. 8), sendo utilizado como repositor de volume e correções de linhas de expressão, ganhou o mundo da estética sendo utilizado em larga escala até hoje em todo o mundo (35), (36).

Na figura 7, abaixo as características do dissacarídeo que compõe o Ac. Hialurônico.

A: Fórmula Molecular $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$



B: Fórmula Estrutural

IG.7: Fórmula Molecular (A) e Fórmula Estrutural (B) do Ac. Hialurônico.

As ilustrações abaixo apresentam dois produtos da indústria farmacêutica muito utilizado na prática médica, constituídos de Ac. Hialurônico.



FIG. 8: Produtos comercializados feitos a partir de Ac. Hialurônico: Synvisc, na Ortopedia, para terapia de visco suplementação e o Juvéderm utilizado na Dermatologia estética, para o tratamento das rugas.

2.4 Trigel

Constituído a partir da associação dos três materiais descritos acima e utilizando uma mistura de 1ml de HÁ, fabricante : Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, nome comercial “SupraHyal Duo” sendo que em 1ml desse produto temos : Hialuronato de Sódio= 10mg, cloreto de sódio:8,52mg, fosfato dissódico: 0,6mg, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e água para injetáveis...qsp, Associado com Poli Vinil Alcool 88,7%, Fabricante : Sigma/Aldrich, hidratado previamente na seguinte proporção: 1gr do PVA para 10ml de soro fisiológico 9% , utilizado 1ml dessa solução associado com 10mg de pó de Ti, Fabricante Ti Brasil S/A, com 60 mesh de diâmetro. Que foram homogeneizados durante 3 minutos em MIXER, obtivemos uma solução densa semelhante a um gel de cor cinza clara onde podemos observar a presença das partículas de Ti em seu interior, (Fig. 4). Em tese, o TRG teria as seguintes propriedades: Uma fonte de reparação tecidual (visco terapia) dada pelo HÁ, a capacidade amortecedora do polímero PVA, que se hidrata, formando o hidrogel, constituindo se em proteção mecânica de prolongada duração O Ti, pela sua propriedade de osteointegração formaria um tampão sobre as áreas de matriz óssea exposta o que possibilitaria o afluxo de novos condrócitos.

Nesse trabalho buscamos constatar que o TRG tem propriedades de um “compósito”, uma vez que esperamos funções biológicas desse composto superiores àquelas em que seus componentes possuem isoladamente. Conforme se demonstrará a seguir o TRG possui estabilidade físico-química em sua forma, pH e densidade, quando preservado em temperatura ambiente e armazenado em recipiente asséptico, analisados em três diferentes intervalos de tempo: Ato da preparação, três dias e sete dias.

2.5 Análise Estatística

Foi utilizada como ferramenta eletrônica para construção de gráficos da análise estatística dos dados coletados da força de tração das patas direitas lesionadas e tratadas com diferentes materiais através de ensaio onde os animais eram colocados

com suas patas direita e depois esquerda, amarradas em um dinamômetro e na extremidade oposta ao dinamômetro havia uma “toca” para fuga dos mesmos (fig. 18). Esse aparato de fuga acoplado ao dinamômetro possibilitou uma constância maior na direção da fuga o que facilitou a leitura do numeral no visor do aparelho de dinamômetro, em KgF, que se constatava cada vez que o animal tentava fugir para a “toca”, sendo que o dado coletado em três tentativas de fuga foi o de maior valor. Para comparação entre os diferentes tratamentos, os dados de força de tração dos animais foram coletados previamente à cirurgia e após a cirurgia com 15 dias, um mês e três meses. Foram coletados os dados referentes à pata não-operada (esquerda) e à pata operada (direita), tratada ou não (*Sham*) com as diferentes combinações de materiais. Os dados correspondem a média de três medições diferentes. Para análise estatística, foi feito um teste Two-way Anova e os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p \leq 0,01$ e então aplicada possibilitando a elaboração de gráficos representativos da força de tração sobre as patas lesionadas e tratadas com diferentes biomateriais com a utilização do software de análise estatística Graphpad Prism. Baseado nesta análise, o único tratamento que apresentou uma melhora significativa em relação ao controle não-tratado (SHAM) e uma resposta de força similar à pata saudável (Esquerda) um mês e três meses após a cirurgia, foi o tratamento com Trigel. Conforme demonstrado à frente na sessão de resultados, (Fig. 20 a 28).

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL:

3.1 Modelo Animal:

(protocolo de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) No. 18/2015 (IQ-USP).

Nesse ensaio com modelo animal foi realizada uma lesão cirúrgica intra articular no joelho direito da pata pélvica de ratos Wistar machos com seis meses de vida. Os animais foram submetidos à anestesia geral com Isoflurano e antes da abordagem cirúrgica da cavidade intra articular do joelho. Os meniscos foram dissecados e perfurados com broca de 2mm de diâmetro com limitador de profundidade de 2mm e, em seguida, essa lesão perfurante foi aspirado por meio de agulha 23G e seringa de 10ml. Nos primeiros 30 dias, foram utilizados 15 animais, divididos em três grupos, cada qual com cinco animais. Cada grupo foi submetido à uma intervenção cirúrgica no joelho do membro pélvico direito. Todos os procedimentos foram realizados na Sala Cirúrgica do Biotério do NUCEL-FM-USP, utilizando-se capela de fluxo laminar e anestesia geral por Isoflurano 30% com fluxo contínuo de Oxigênio 70% (3,0L/min). Os animais foram tratados com os biomateriais isoladamente ou associados entre si e somente no grupo do TRIGEL, foi realizado uma associação com células tronco-mesenquimais da polpa dentária de dente de leite humano, obtidas no Banco de Células do Laboratório NUCEL-FM-USP. Conforme será descrito a seguir, avaliou-se o potencial terapêutico de um gel gerado através da mistura, nas seguintes proporções : 1ml de HÁ, fabricante : Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, nome comercial “SupraHyal Duo” sendo que em 1ml desse produto temos : Hialuronato de Sódio= 10mg, cloreto de sódio:8,52mg, fosfato dissódico: 0,6mg, acido clorídrico, hidróxido de sódio e água para injetáveis ...qsp, Associado com Poli Vinil Alcool 88,7%, Fabricante : Sigma/Aldrich, hidratado previamente na seguinte proporção: 1gr do PVA para 10ml de soro fisiológico 9%A, utilizado 1ml dessa solução associado com 10mg de pó de Ti,, Fabricante Ti Brasil S/A, com 60 mesh de diâmetro. Que foram homogeneizados durante 3min. A opção por esses materiais para formarem o TRG foi devido às suas conhecidas propriedades de biocompatibilidade, com excelência reconhecida na prática

médica, proporcionando tolerância a choques mecânicos, lubrificação articular e propriedades biológicas únicas, como no caso do titânio, sendo essa associação aqui denominada de TRIGEL. Este compósito foi aplicado sobre a lesão padrão, descrita acima, na quantidade de 0,5ml por animal, nos respectivos grupos de animais lesionados e tratados. Após a aplicação dos biomateriais associados, procedeu-se ao fechamento do acesso cirúrgico da articulação, através de sutura com fio de mononylon 5.0, agulhado (Technofio). Após acordarem da anestesia, os animais foram envolvidos em pano flanelado por uma hora e recolocados em suas respectivas gaiolas, para hidratação com acréscimo de 10 gotas de cataflam para 500ml de água no bebedouro da gaiola e alimentação, sendo que nenhum animal foi a óbito, no decorrer do procedimento cirúrgico.

3.2 Teste de Contaminação e Citotoxicidade:

Antes de se proceder à utilização dos biomateriais envolvidos nesse estudo, realizou-se um cultivo dos mesmos em meio LB (Luria-Bertani), que é específico para detecção de crescimento bacteriano. As amostras foram incubadas nesse meio de cultura, sob agitação constante (250 rpm) por diferentes períodos de tempo: 24, 48 e 72h, porém nenhum crescimento bacteriano foi observado, tanto para os biomateriais isolados ou para as associações entre eles. Os materiais analisados foram:

PVA (fabricante *Sigma Aldrich*). HA (fabricante *Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A*) e Ti (fabricante *TI Brasil S/A*). Foram utilizados 0,5 ml de cada material, isoladamente, ou das associações entre eles, a saber: PVA +HA; PVA +Ti; HA+Ti e do TRIGEL. Essa mesma metodologia foi aplicada para meio de cultivo celular DMEM 4500mg/ glucose (*Sigma Aldrich*), em placa de cultivo celular K-006, com fundo chato, fabricante *Kasvi*. Em todos os poços de cultivo foram cultivadas células mesenquimais humanas de polpa dentária (MSC) em combinações com os materiais acima mencionados. A análise de microscopia óptica invertida, após sete e 15 dias, demonstrou crescimento celular

normal das MSCs em todos os poços analisados, portanto, nenhum sinal de citotoxicidade foi encontrado nos seis poços cultivados.

3.3 Características físico– químicas do Trigel:

Devido sua constituição na forma de solução densa, semelhante a um gel, procedemos a análise desse compósito o “ TRG”, buscando a determinação de alguns parâmetros de densidade e pH, para tanto foram analisadas três amostras do TRG, visando compreender se ocorreria mudanças nestes aspectos físico e químico após o dia do preparo e após armazenamento em recipiente asséptico fechado e guardados à temperatura ambiente. Foram analisadas amostras em três diferentes intervalos de tempo: Logo após o preparo, essa mesma amostras com três dias e sete dias. Nenhuma mudança nestes valores físico-químicos foi encontrada tanto para pH como para a sua densidade.

A análise do pH foi feita através de papel fita (MColorpHast) que foi introduzido no TRG, sendo a mesma amostra analisada em seus respectivos momentos de intervalo de tempo já descritos acima. A amostra do TRG apresentou o pH médio de 7,4. Utilizando o viscosímetro (Anton Paar, modelo DMA 35N), constatou-se uma viscosidade média 1,0015 nos três intervalos de tempo.

3. 4 Formação dos Grupos para escolha da Lesão Padrão:

Grupo I: Cinco animais foram submetidos à exposição cirúrgica da articulação da pata pélvica direita com seus meniscos medial e lateral, os quais foram seccionados e removidos, utilizando-se bisturi com lamina 11 (Fig.9). Em seguida, realizou-se uma lesão osteo-cartilaginosa provocada por furadeira BD e broca de 2mm de diâmetro com limitador de profundidade de 2mm, seguido da aspiração de medula óssea femoral, através da lesão perfurante, utilizando-se seringa de 10ml e agulha 23 G.

Grupo II: Cinco animais foram submetidos à exposição cirúrgica da articulação da pata pélvica direita e não sofreram a remoção cirúrgica dos meniscos, seguindo-se com a lesão osteo-cartilaginosa provocada por furadeira BD e broca de 2mm com limitador de 2mm e realização de aspiração da medula óssea do osso femoral através da lesão perfurante via seringa de 10ml e agulha 23G.

Grupo III: Cinco animais foram submetidos à exposição cirúrgica da articulação com lesão osteo-cartilaginosa da pata pélvica direita, mas sofreram apenas uma lesão provocada por furadeira e broca de 2 mm com limitador de 2 mm de profundidade, sem aspiração da medula óssea e sem a remoção dos meniscos.

Após 30 dias da realização das lesões cirúrgicas os animais foram autopsiados em câmara de CO₂ do Biotério de Experimentação do NUCEL-FM-USP, removendo cirurgicamente as patas de cada animal. As 15 patas foram catalogadas por grupos e enviadas à empresa HISTOTECH, em tubos do tipo Falcon” de 50ml contendo solução de 3,7% de formaldeído em água bidestilada, para fixação do material e confecção de lâminas histológica, as quais foram coradas pela técnica de HE, após período de 30 dias para descalcificação. Nas análises histológicas, por meio de microscopia óptica, a lesão do grupo A, foi eleita como a Lesão Padrão deste modelo animal para OA, pois demonstrou o menor grau de reparação tecidual espontâneo (Fig. 9).

3.5 A Lesão Padrão

A figura abaixo demonstra aspecto macroscópico da lesão padrão e micoroscópico.

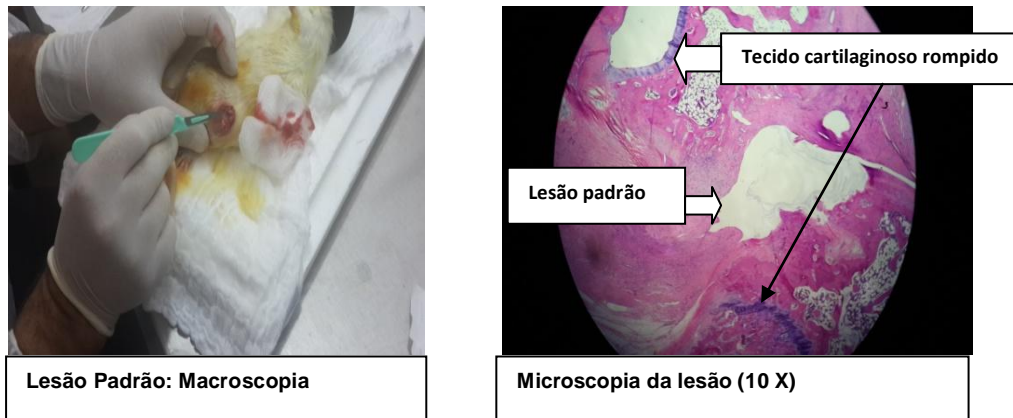


FIG 9: Lesão Padrão: Etapa de acesso cirúrgico da realização da lesão (imagem à esquerda) À direita imagem de microscopia óptica (Nikon 10 X) é possível observar bordas roxas lineares que correspondem à superfície do tecido cartilaginoso rompido e não restaurado e intensa presença de tecido fibroso, ilustrado pela área rósea em seu interior e vácuo (área branca).

Na figura abaixo demonstra-se a lesão no platô tibial, do joelho de Ratos Wistar.



FIG. 10: Joelho da pata pélvica e a lesão padrão: Pode se observar a fibrose em seu interior, ponto mais e esbranquiçado no platô tibial, indicado pela seta. (aumento de 8x), Samsung).

3.6 Formação dos Grupos de Animais para Tratamento:

Grupo A: Formado por seis animais sem lesão e sem tratamento

Grupo B: Sham: três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão, porém sem tratamento algum. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo C: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com HA. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo D: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com PVA. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo E: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com Ti. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo F: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com TRG. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo G: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com TRG+ MSC. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo H: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com HA + PVA. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo I: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com HA + Ti. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo J: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com PVA + Ti. Autopsiados após 15 dias, um mês e três meses, respectivamente.

Grupo K: Três grupos, de 3 animais cada um, foram submetidos à lesão padrão e tratados com MSC. Autopsiados após 15 dias, um mês e 3 meses, respectivamente.

3.7 Preparação das lâminas para análise histológica:

Para analisar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a evolução da resposta biológica de reparação tecidual, os animais foram tratados, de acordo com o esquema apresentado no item 3.5, por diferentes períodos de tempo (15 dias, um mês e três meses) e, então, submetidos à dissecação das patas para análise histológica. As lâminas foram preparadas a partir de blocos parafinados das articulações dissecadas e previamente descalcificadas, por trinta dias, sob a responsabilidade técnica da empresa HISTOTECH. Foram feitas colorações pelas técnicas de Hematoxilina- Eosina (HE), (figura 11) que é utilizada, em larga escala, até mesmo para alguns ensaios clínicos desde o início da década de 80, conforme estudos clínicos de consolidações de fraturas (NEURUBAY J. et al, 1980) (35). A simplicidade e clareza da técnica de HE permite ampla visualização das diferenças morfológicas da área lesionada no platô tibial, (Figura 12) como a identificação da lesão em nível de microscopia óptica. Até mesmo estudos clínicos recentes incluíram essa técnica para acompanhar histologicamente a adaptação biológica de implantes de *scaffolds* em tecidos ósseos (36). Seguindo o mesmo protocolo técnico de descalcificação, a empresa HISTOTECH, foi responsável pela produção das lâminas com a coloração das pelo corante Tricômio de Masson, utilizado com o intuito de identificar os diferentes tecidos envolvidos no reparo da lesão padrão, tais como: tecidos cartilaginoso, tecido ósseo e conjuntivo denso (fibrose). Essa técnica de coloração é utilizada desde a década de 70 em estudos de quantificação e diferenciação de células no tecido ósseo (Melsen F. et al, 1978) (35), sendo utilizada, ainda hoje, em estudos complexos que envolvem quantificação e diferenciação de tecidos no reparo de tecido ósseo (37, (38). Em muitas peças de dissecação das patas que foram enviadas para o preparo das lâminas foi possível determinar o local exato do corte sobre a lesão para confecção das lâminas devido ao extravasamento de conteúdo do TRG, (figuras 13 e 14) para tecidos adjacentes, e em outras patas dissecadas foram necessários vários cortes para se atingir a região da lesão.

As Figuras abaixo (Figuras 11 e 12) representam aspectos histológicos da cartilagem de Ratos Wistar com seis meses de vida e de seu joelho da pata pélvica.

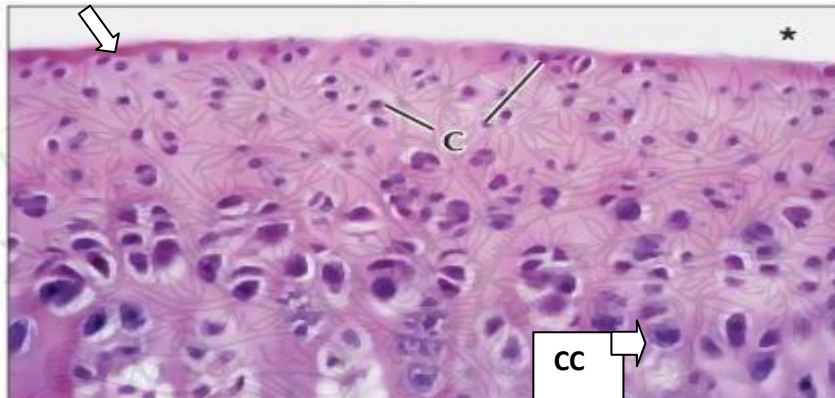


Fig.11:

Atlas:

Superfície Cartilaginosa da articulação de Ratos Wistar:

Lâmina de microscopia óptica com aumento de 100x, corada pela técnica de Hematoxilina – Eosina (HE). Pode-se observar uma estrutura complexa com quatro camadas distintas, sendo a mais acima, em coloração violeta (seta branca), as fibras de colágeno e hialina, logo abaixo temos uma região caracterizada pela presença de células de forma arredondada (C); as mais profundas são os condroblastos (CC), que se encontram distribuídos de modo colunar e em fileiras paralelas e na região mais próxima à superfície da cartilagem estão os condrócitos (C). A camada mais profunda está a região subcondral que é a área de transição com o tecido ósseo.

© Elsevier, Inc. - Netterimages.com
© ELSEVIER, INC. - NETTERIMAGES.COM

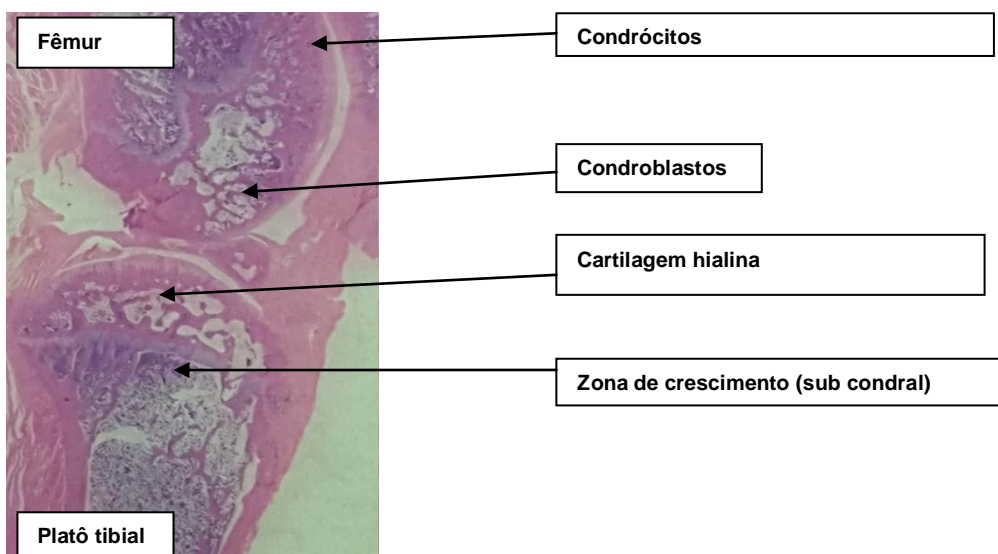


Fig.12: Atlas de Histologia de Joelho de Rato Wistar: Indivíduo macho com seis meses de vida do Grupo A. Observam-se as diferentes estruturas da articulação normal, indicadas pelas setas. Lâmina corada pela técnica de HE, com aumento de 8x (Samsung).

Aspecto macroscópico da articulação tratada com o TRIGEL

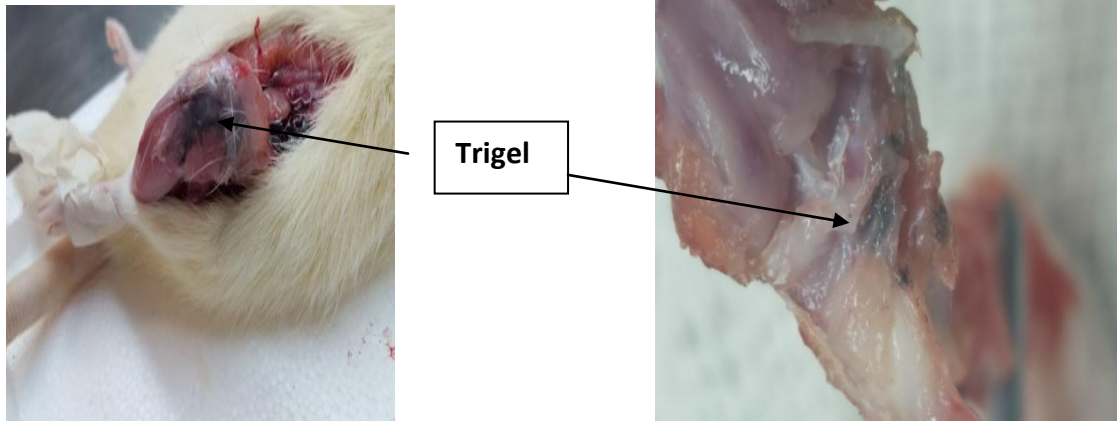


Fig.: 13 Trigel após três meses da aplicação

Fig. 14: Trigel após três meses, visão intra-articular

Aspecto macroscópico do implante do biomaterial "TRIGEL", após três meses de sua implantação, totalmente integrado ao tecido muscular devido extravasamento de bio material que foi aplicado sobre a lesão padrão intra-articular sem comprometimento da força de tração conforme demonstraram as análises estatísticas comparativas com outros grupos.

Tabela 1: Comparação dos resultados histológicos entre os diferentes Grupos de animais em seus respectivos períodos de tempo da autopsia: formação de tecido fibroso e cartilaginoso.

GRUPOS	15 DIAS	1 MÊS	3 MESES
B	T. FIBROSO : + T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE
C	T. FIBROSO : + T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE
D	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE
E	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE
F	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. +	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. ++
G	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. +	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. ++
H	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE
I	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE
J	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : +++ T. CARTIL. AUSENTE
K	T. FIBROSO : + T. CARTIL. AUSENTE	T. FIBROSO : ++ T. CARTIL. AUSENTE	TECIDO FIBROSO : +++ T. CARTIL. ++

Lâminas dos grupos **F**, **G** e **K**, são os únicos que apresentaram formação de tecido cartilaginoso no reparo da lesão articular a partir de um mês.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

Grupo A: Controle: Animais sem lesão e sem tratamento algum.

Grupo B: Sham

Como pode ser observado, (figura 15, 16 e 17), houve pouca resposta reparadora espontânea nos primeiros 15 dias após a lesão. A partir do primeiro mês após a lesão, observa-se uma cobertura de tecido fibroso sobre esta lesão, a qual tende a se espessar após um mês. No terceiro mês, foi possível observar que o tecido fibroso sobre a lesão espessou-se ainda mais, atingindo a maior quantidade de tecido fibroso, quando comparado com os animais Sham tratados por diferentes períodos de tempo ou com qualquer outro grupo de animais. Assim, quando comparado com os nove grupos de animais que sofreram a lesão e foram tratados com biomaterial isoladamente ou associado, o grupo (Sham) foi o que apresentou a maior quantidade de tecido fibroso no final nas análises, após três meses da lesão.

Grupo C: HA

A resposta de reparação tecidual sobre a lesão se inicia após 15 dias, observando-se uma fina camada de tecido fibroso sobre a lesão, a qual se mostra mais espessa nos animais autopsiados após um mês. Na análise dos animais autopsiados após três meses, este tecido fibroso se mantém inalterado, não tendo sido observada a formação de tecido cartilaginoso, em nenhum dos três períodos de tempo, (Tabela1).

Grupo D: PVA

A resposta de reparação tecidual sobre a lesão padrão se inicia com 15 dias e na análise histológica dos animais autopsiados com um mês há uma quantidade de tecido fibroso significativa sobre a lesão padrão em relação aos grupos acima (HA) e (Sham) e este tecido não tem sua espessura aumentada quando analisamos histologicamente as lâminas dos animais autopsiados com três meses, (Tabela 1).

Grupo E: Ti

observou-se um padrão de reparação tecidual da lesão muito semelhante àquela apresentada pelos animais tratados com PVA, em todas os períodos de tempo de realização da autópsia (15 dias, um mês e três meses), (Tabela1).

Grupo F: TRG

Nos primeiros 15 dias já foi possível observar a presença de uma camada de tecido fibroso, em níveis significativos, sobre a lesão, porém sem evidência de tecido cartilaginoso. No entanto, os animais autopsiados após um mês da lesão já se observa uma camada de tecido cartilaginoso, qual se apresenta mais espessa nos animais autopsiados após três meses, (figura16 e 17).

Grupo G: TRG+MSC

Neste grupo de animais, observou-se o mesmo padrão de reparação tecidual sobre a lesão, em relação ao grupo TRG, com imagens histológicas praticamente idênticas em todos os períodos de tempo até a realização da autópsia, ou seja: 15 dias, um mês e três meses, (figura16 e 17).

Grupo H: HA + PVA

Observou-se uma significativa presença de tecido fibroso sobre a lesão após 15 dias da lesão. Este tecido fibroso se espessa após um mês e se mantém quando se analisa as lâminas dos animais autopsiados após três meses, (Tabela1).

Grupo I: HA+Ti

Apesar de não ter sido possível detectar a presença do pó de (Ti), na maioria das lâminas fica evidente a formação de tecido fibroso significativo sobre a lesão, desde os 15 dias iniciais, sendo que esse tecido se espessa após um mês se mantém até três meses, com padrão muito semelhante àquele dos grupos: D, E, H. , (Tabela 1).

Grupo J: PVA+Ti

Após 15 dias da lesão, observa-se a significativa presença de tecido fibroso sobre a lesão, o qual se espessa mais quando observamos as lâminas dos animais deste grupo autopsiados após um mês, mantendo-se inalterado nas lâminas dos animais

autopsiados após três meses, com um padrão semelhante a todos os grupos que receberam PVA e Ti isoladamente (grupos D e E), ou em combinação com HA ou PVA (grupos H, I e J), (Tabela 1).

Grupo K: MSC

A partir de 15 dias é possível detectar uma camada delgada de tecido fibroso sobre a lesão, quando comparada ao grupo Sham, ocorrendo um espessamento desta camada após um mês, quando é possível identificar uma fina camada de tecido cartilaginoso, a qual se mantém nos animais autopsiados após três meses, conforme se observa nas imagens destas lâminas. (Fig. 16 e 17)

Na Figura 15 abaixo apresenta-se um corte histológico do joelho de Rato Wistar com seis meses de idade do grupo Sham.

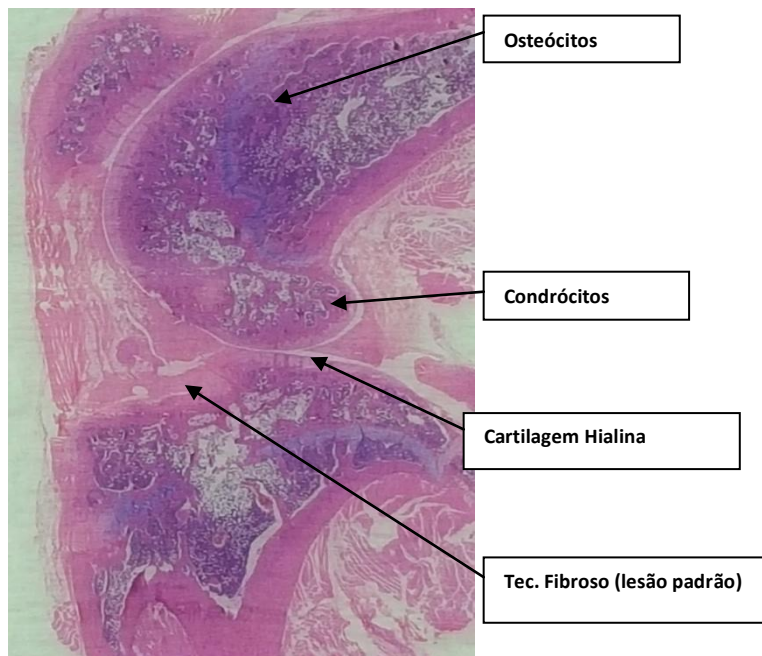


FIG. 15: Grupo Sham: Aspecto histológico da articulação do joelho da pata posterior direita de Ratos Wistar machos de seis meses de vida, decorridos três meses da lesão, coradas pela técnica de HE, com aumento de 8x, (Samsung), demonstrando a lesão.

Na fig. 16, são apresentados os aspectos de cortes histológicos dos grupos B, G, F e K, corados pela técnica de HE.

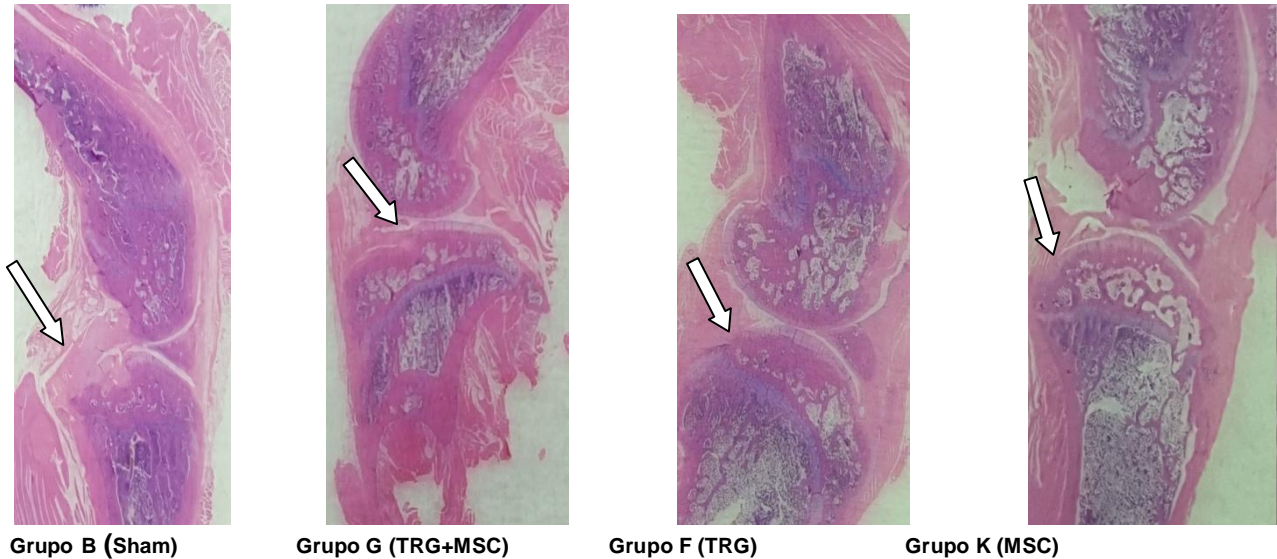


FIG. 16: Aspecto histológico do Joelho direito de ratos Wistar, aumento 8X, (Samsung). No grupo **B**, observa-se tecido róseo, representado grande quantidade de fibrose além a depressão no platô tibial (seta), indicando o local da lesão. No Grupo **G**, pode-se observar a preservação de tecido cartilaginoso recobrimdo área com pequeno grau de fibrose no local da lesão (seta). No Grupo **F**, observa-se uma pequena depressão na camada de tecido cartilaginoso, que recobre totalmente a área da lesão (seta), o mesmo ocorrendo no Grupo **K**, (seta).

Na Fig. 17, são apresentados os cortes histológicos dos joelhos de animais dos Grupos A, B, G, F e K corados pela técnica de Tricômio de Masson.

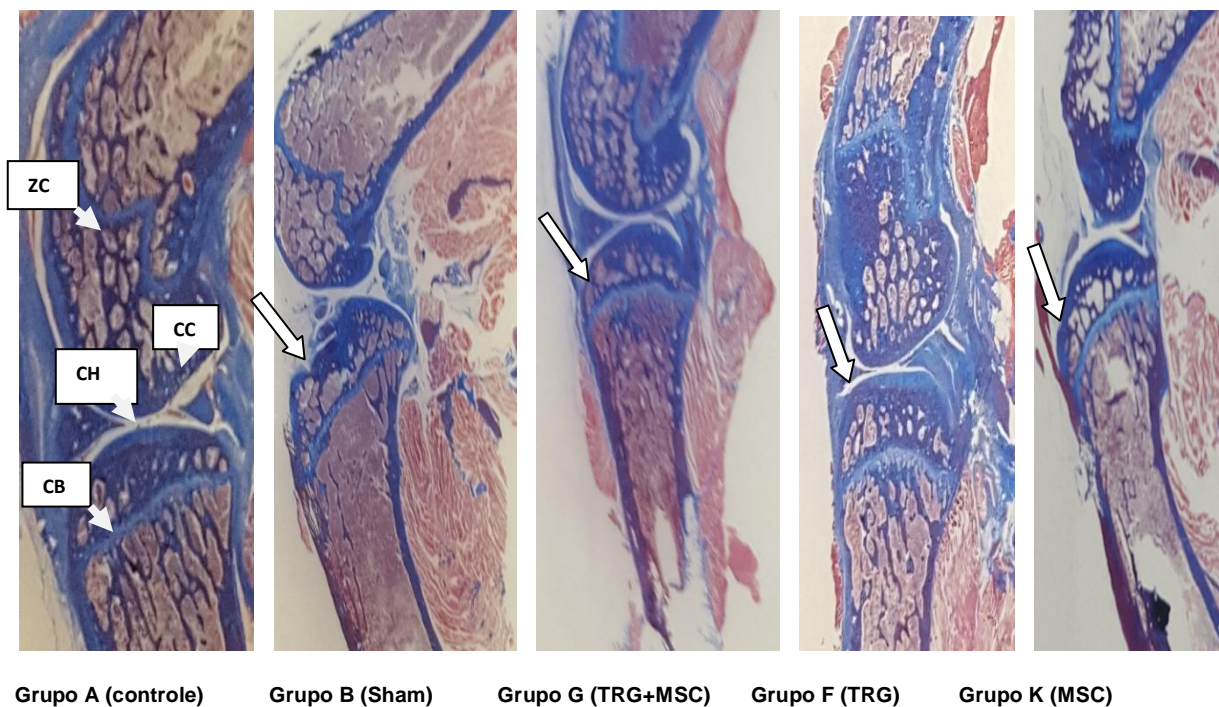


FIG.17: Aspecto histológico do joelho direito de ratos Wistar macho após **coloração com Tricômio de Masson**., (aumento 8X, Samsung). Grupos **G**, **F** e **K**, foram os únicos deste estudo que formaram tecido cartilaginoso, comparados com o grupo B Sham e com o Grupo **A** (controle). Observa-se na ilustração do grupo **A**, a Cartilagem Hialina (Sigla CH), Condrócitos, (Sigla CC), a Zona de Crescimento, (Sigla ZC). No grupo **B** (Sham), observa-se presença de tecido fibroso em azul escuro na região da lesão (seta), além a depressão no platô tibial (seta), o local da lesão. No Grupo **G**, pode-se observar a preservação de tecido cartilaginoso recobrendo área com pequena fibrose no local da lesão (seta). No Grupo **F**, observa-se pequena depressão na camada de tecido cartilaginoso, que recobre totalmente a área da lesão (seta), o mesmo ocorrendo no Grupo **K**, (seta).

4.2 Efeito da lesão e dos diferentes tratamentos na Força de Tração das patas.

Para a medição da força de tração das patas lesionadas, construiu-se um aparato de fuga, acoplado a um dinamômetro, permitindo, assim, medir a força de tração da pata do animal, o qual, ao tentar fugir para o abrigo com sua pata pélvica amarrada ao dinamômetro, aciona o dinamômetro, o qual indica a força exercida em KgF, indicada no visor do aparelho. (Fig. 18 e 19).



FIG. 18: Utilização de dinamômetro: E a construção de aparato de fuga acoplado ao dinamômetro para medição da força de tração.



Modelo da empresa Lafayette neuroscience



Modelo da empresa Bioseb

FIG.19: Modelos Comerciais, utilizados para a aferição de força de tração de patas para ratos Wistar.

Foram feitas análises estatísticas para comparação da média das força de tração KgF, das patas pélvicas direitas operadas e tratadas com biomateriais em relação com a média das forças de tração da pata pelvica esquerda (não operada), em seus respectivos grupos e comparadas, estatisticamente, com a do grupo Sham lesionado mas sem o tratamento com biomaterial, Grupo B (SHAM), o qual, nesta análise, foi colocado como grupo controle no estudo da recuperação da força de tração. A ideia foi comparar a recuperação da força de tração da pata direita nos seguintes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses após a lesão.

OA, Resultados são apresentados em seguida nas Figuras 20 a 28:

Grupo C: AC. HIALURÔNICO

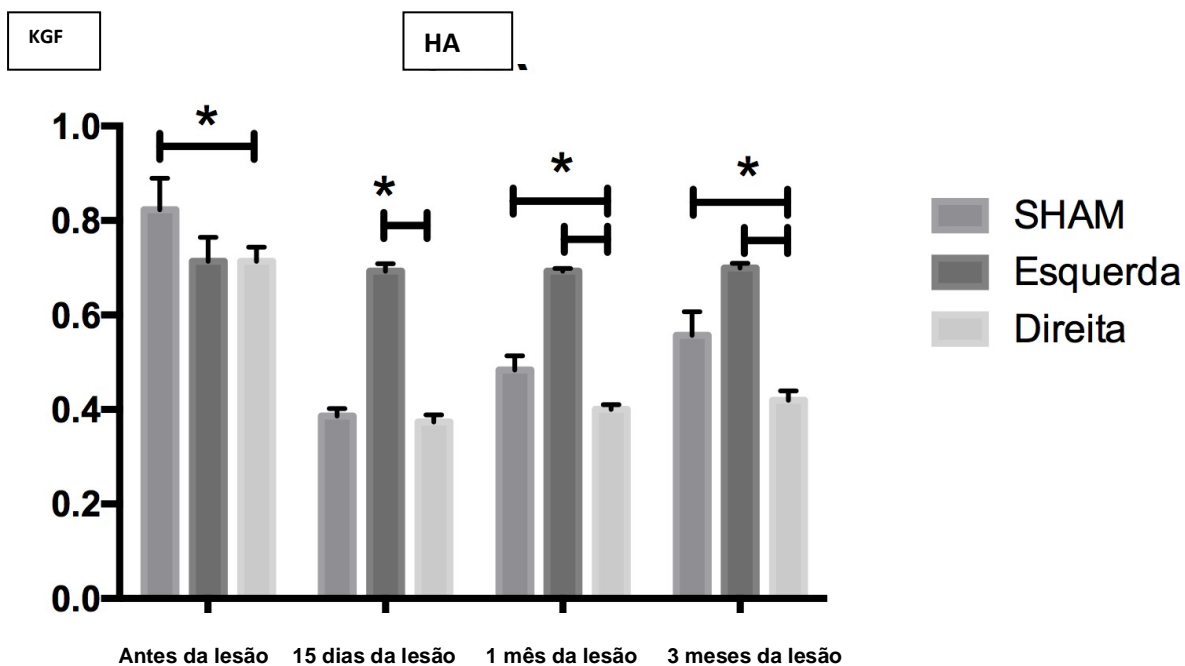


Fig. 20: Análise da força de tração (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após a lesão no joelho e tratamento com HÁ. Os animais foram autopsiados três diferentes intervalos de tempo (15 dias, um mês e três meses). Observa-se que após a lesão houve perda de força de tração das patas lesionadas nos dois grupos (Sham e HA), desde os grupos autopsiados após 15 dias sendo que a pata esquerda (não lesionada) se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observa-se que a recuperação da força de tração da pata direita de maior expressão estatística foi a que ocorreu no grupo Sham, após um mês e três meses.

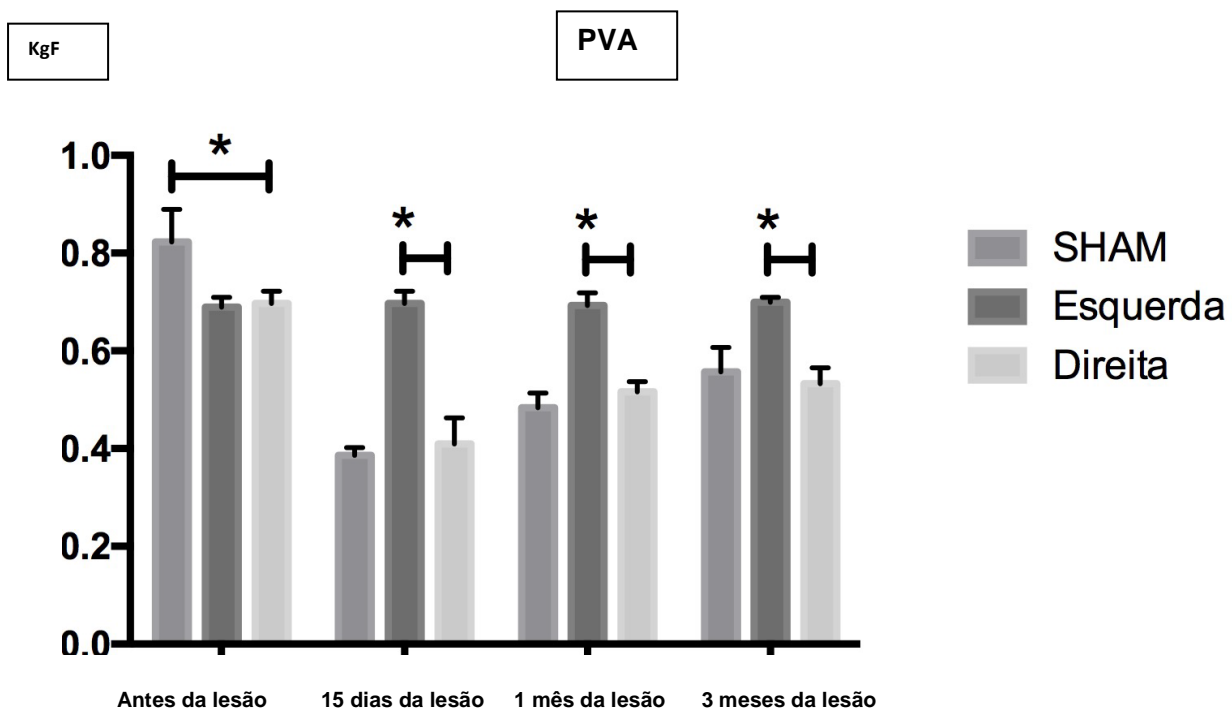
Grupo D: PVA

Fig. 21: Análise da força de tração (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após lesão e tratamento com PVA. Os animais foram autopsiados após três diferentes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses. Observa-se que após a lesão houve perda da força de tração das patas lesionadas nos dois grupos (Sham e PVA), ocorrendo isto desde os grupos autopsiados após 15 dias, sendo que a pata esquerda (não lesionada) se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observa-se que a recuperação da força de tração de maior expressão foi a que ocorreu no grupo PVA, nos 2 momentos iniciais, 15 dias e um mês, mas no final, após três meses, houve uma diferença de baixa relevância estatística na recuperação da força de tração na pata direita a favor do grupo Sham.

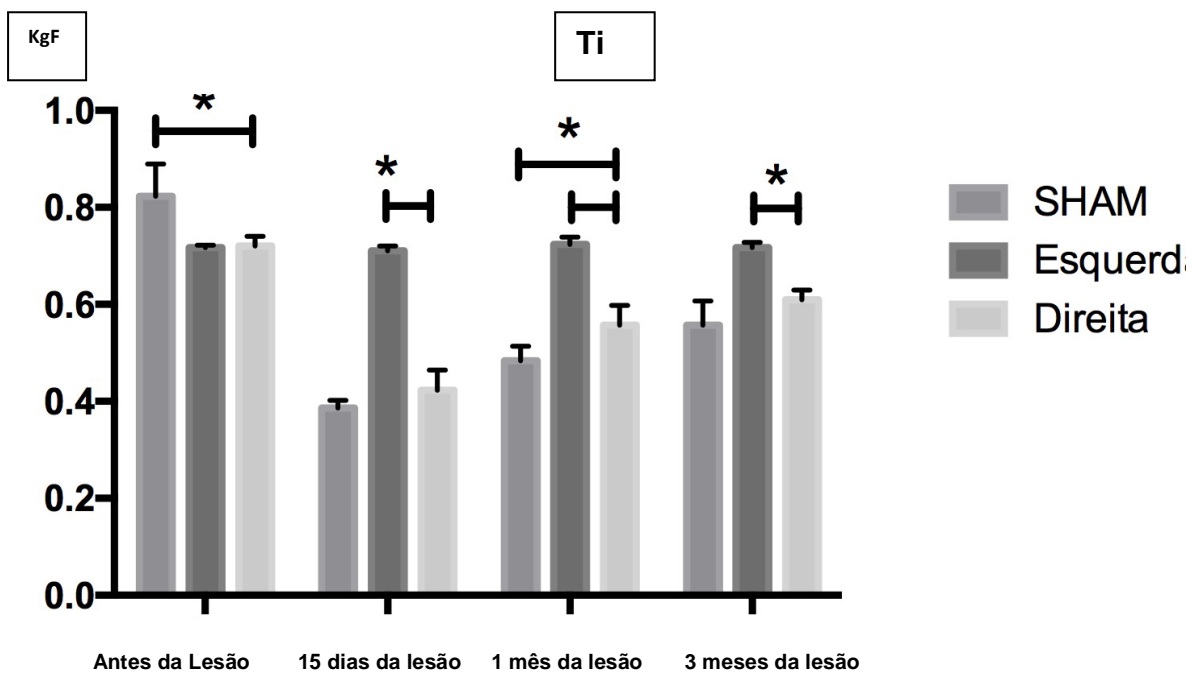
Grupo E: TITÂNIO

Fig. 22: Análise estatística da força de tração (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após a lesão e tratamento com Ti. Os animais foram autopsiados em três diferentes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses. Observa-se que após a lesão houve perda da força de tração das patas lesionadas nos dois grupos (Sham e Ti), desde os grupos autopsiados após 15 dias, sendo que a pata esquerda (não lesionada) se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observa-se que a recuperação da força de tração de maior expressão foi a que ocorreu no grupo Ti, nos três períodos de tempo, havendo uma diferença estatística da recuperação da força de tração na pata direita a favor do grupo Ti.

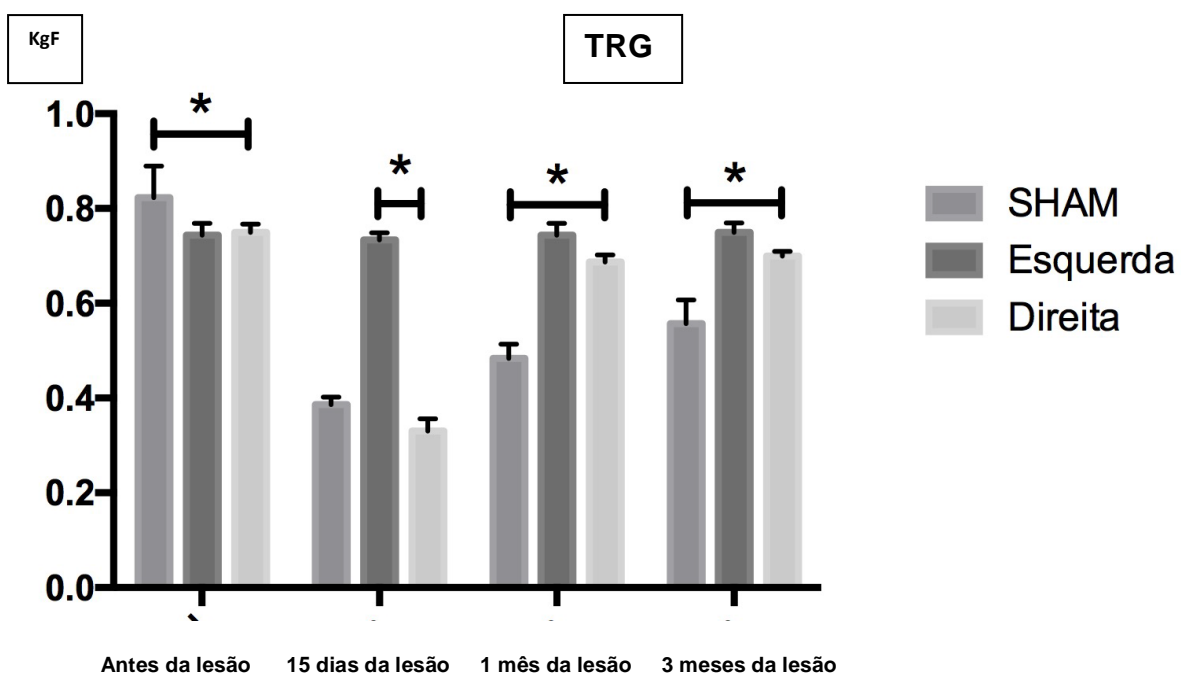
Grupo F: TRIGEL

Fig. 23: Análise da força de tração (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após a lesão e tratamento com TRG. Os animais foram autopsiados em três diferentes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses. Observa-se que, após a lesão, houve perda da força de tração das patas lesionadas nos dois grupos (Sham e TRG), desde os grupos autopsiados após 15 dias, sendo que a pata esquerda (não lesionada) se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observa-se que a recuperação da força de tração de maior expressão foi a que ocorreu no grupo Sham após 15 dias e depois superada pelo grupo TRG em 1 mês, e, após três meses, essa diferença estatística da recuperação da força de tração na pata direita a favor do grupo TRG, foi significativa, alcançando quase o mesmo nível de normalidade da pata não operada (esquerda) desde um mês após a lesão.

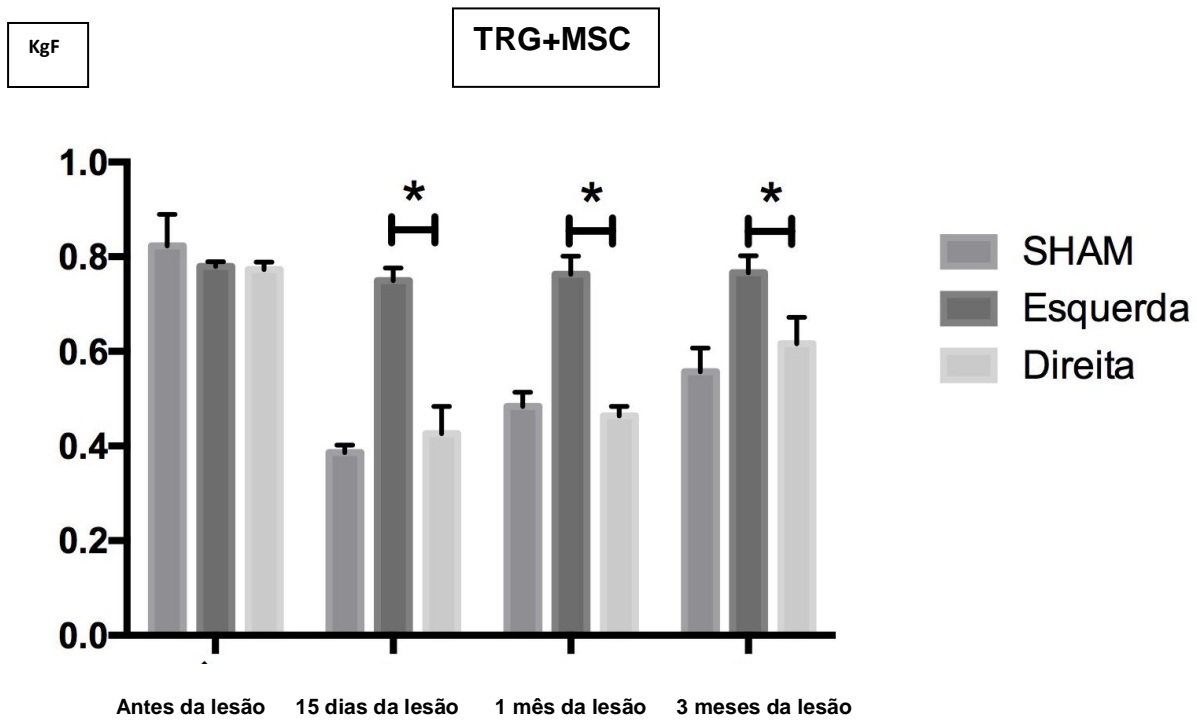
Grupo G: TRIGEL+ CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

FIG.24: Análise da força de tração (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após lesão e tratamento com TRG+MSC. Os animais foram autopsiados em três diferentes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses. Observa-se que após a lesão houve perda da força de tração das patas lesionadas nos dois grupos (Sham e TRG+MSC), desde os grupos autopsiados após 15 dias, sendo que a pata esquerda (não lesionada) se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observa-se que a recuperação da força de tração de maior expressão foi a que ocorreu no grupo TRG+ MSC após 15 dias, sendo depois superada, de modo não significativo estatisticamente, pelo grupo TRG+MSC, após 1 mês, mas após três meses, essa diferença estatística da recuperação da força de tração na pata direita a favor do grupo TRG+MSC foi um pouco mais significativa em relação ao grupo Sham. Em comparação com o gráfico anterior do grupo TRG, observa-se que a intensidade de recuperação da força de tração na pata direita foi expressivamente maior no grupo TRG em relação ao grupo TRG+MSC.

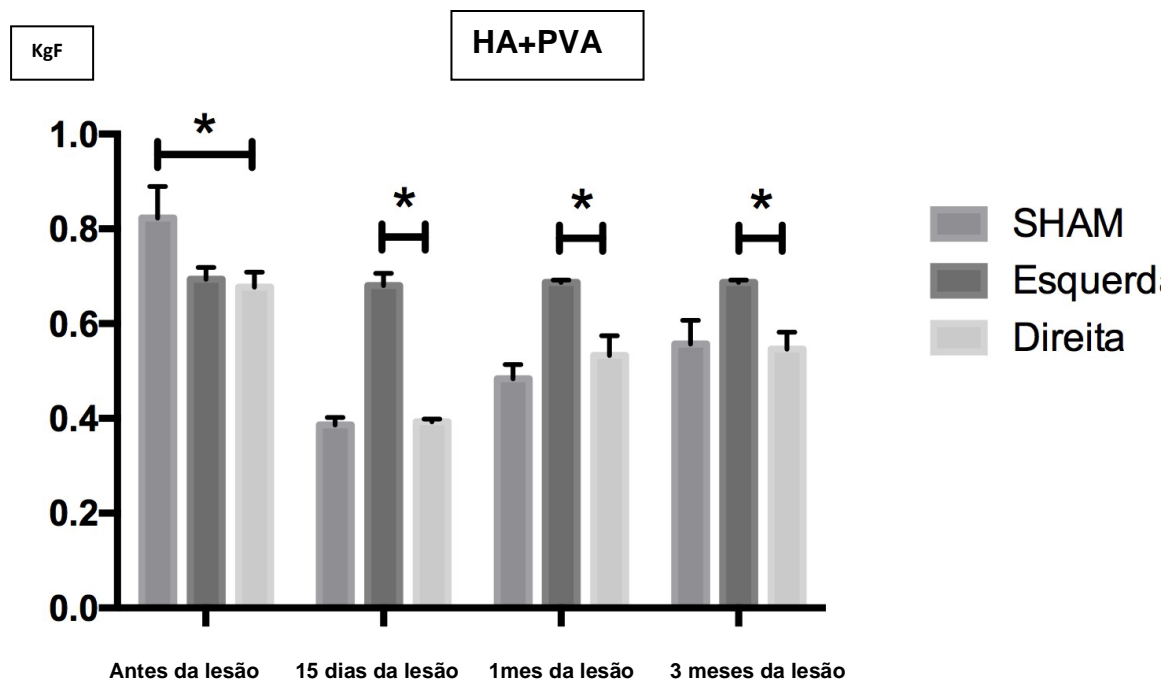
Grupo H: AC. HIALURÔNICO+PVA

Fig. 25: Análise da força de tração (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após a lesão padrão e tratamento com HA+PVA. Os animais foram autopsiados em três diferentes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses. Observa-se que após a lesão houve perda de força de tração das patas lesionadas nos dois grupos Sham e HA+PVA, ocorrendo isto desde os grupos autopsiados com 15 dias, sendo que a pata esquerda não lesionada se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observamos que a recuperação de força de tração de ocorreu de modo estatístico idêntico nos dois grupos Sham e (HA+PVA), após 15 dias, mas com um mês, houve maior recuperação de força de tração do grupo HA+PVA, mas no final com três meses houve uma diferença de baixa relevância estatística na recuperação da força de tração na pata direita a favor do grupo Sham.

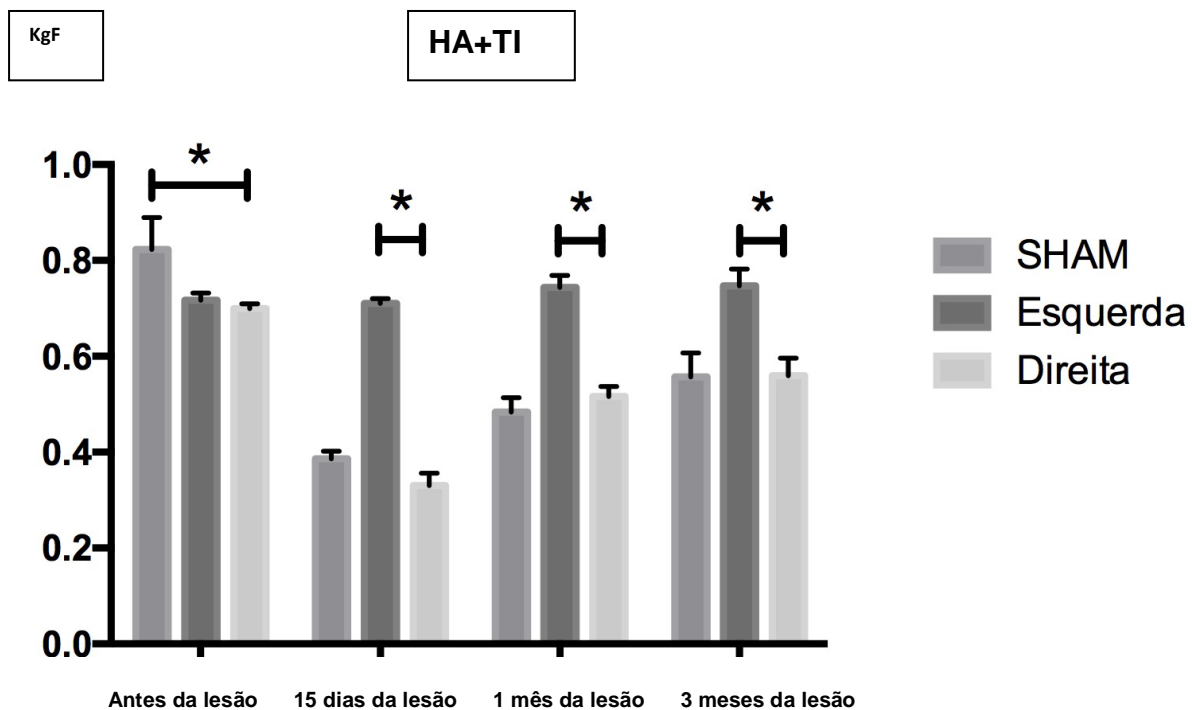
Grupo I: Ac. HIALURÔNICO+ TITÂNIO

Fig. 26: Análise da força de tração, (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após lesão e tratamento com HA+Ti. Os animais foram autopsiados em três diferentes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses. Observa-se que, após a lesão, houve perda de força de tração das patas lesionadas nos dois grupos (Sham e HA+Ti), desde os grupos autopsiados após 15 dias, sendo que a pata esquerda (não lesionada) se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observa-se que a recuperação da força de tração é de pouca relevância estatística a favor do grupo Sham após 15 dias e que ocorreu o inverso após um mês no grupo HA+Ti e após três meses não houve uma diferença estatística da recuperação da força de tração na pata direita a favor de nenhum dos dois grupos (Sham e HA+Ti).

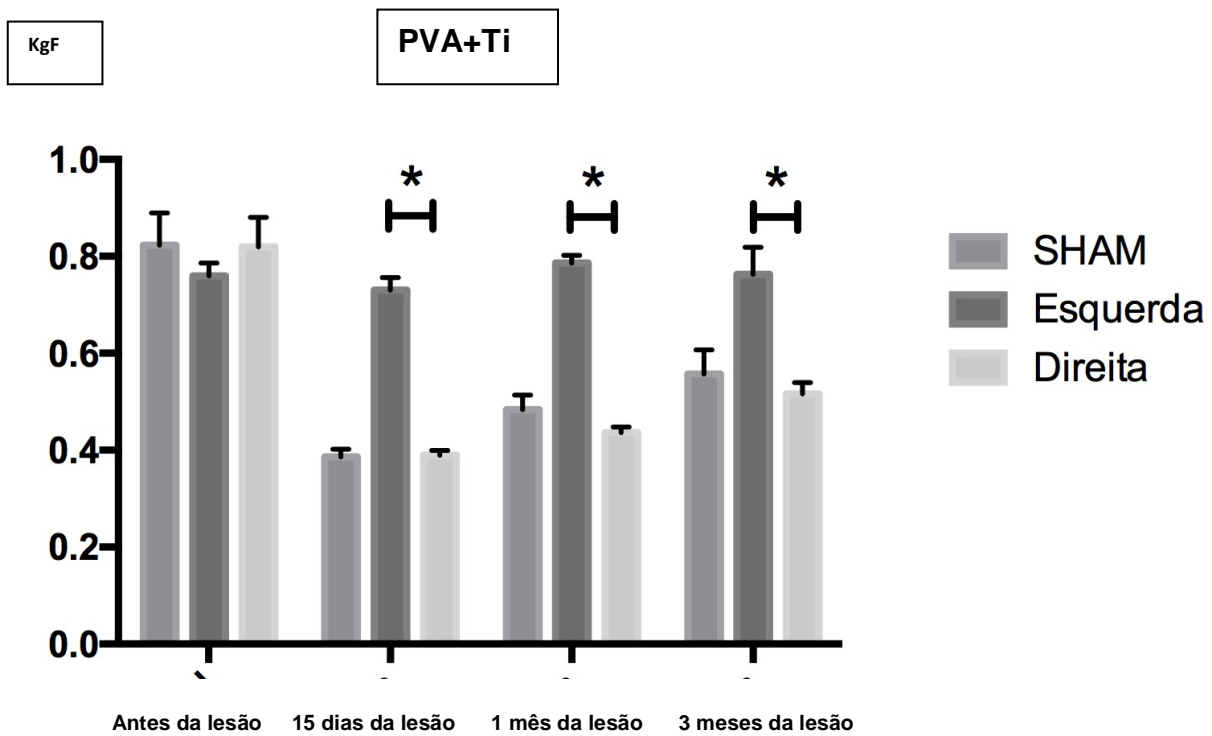
Grupo J: PVA + TITÂNIO

FIG. 27: Análise da força de tração, (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após lesão padrão e tratamento com PVA+Ti. Os animais foram autopsiados em três diferentes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses. Observa-se que, após a lesão, houve perda da força de tração das patas lesionadas nos dois grupos (Sham e PVA+ Ti), desde os grupos autopsiados após 15 dias, sendo que a pata esquerda (não lesionada) se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observa-se que a recuperação da força de tração foi de igual expressão estatística nos dois grupos após 15 dias, mas após um mês, houve um pequeno aumento, de baixa expressão estatística, a favor do grupo Sham em relação ao grupo PVA+Ti, sendo que, após três meses, a análise estatística da recuperação da força de tração da pata direita do grupo Sham, foi maior em relação ao grupo PVA+Ti.

Grupo K: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

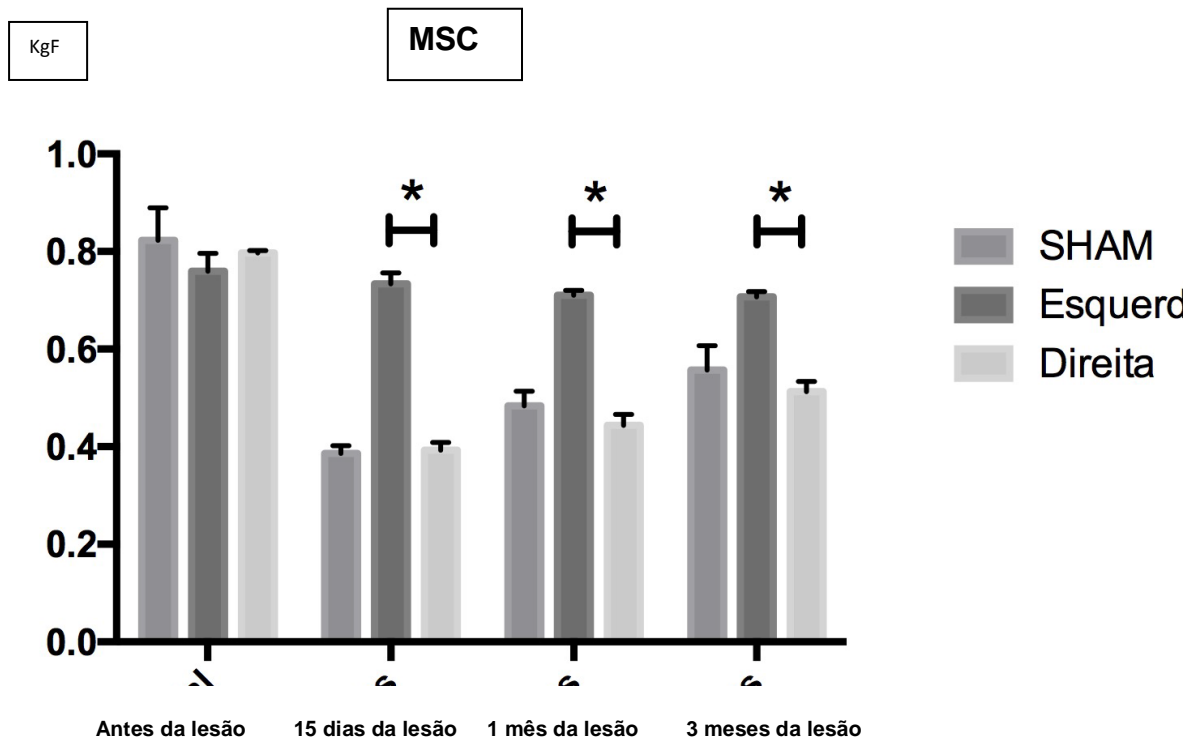


Fig.28: Análise estatística da força de tração, (em KgF), da pata direita em Ratos Wistar machos, após lesão e tratamento com MSC e depois autopsiados em três diferentes intervalos de tempo: 15 dias, um mês e três meses. Observa-se que, após a lesão, houve perda da força de tração das patas lesionadas nos dois grupos (Sham e MSC), desde os grupos autopsiados após 15 dias, sendo que a pata esquerda (não lesionada) se manteve com a mesma força nos três períodos de tempo. Observa-se que a recuperação da força de tração foi de igual expressão estatística após 15 dias, sendo depois superada, de modo não significativo estatisticamente, pelo grupo Sham. Após um mês e três meses, essa diferença estatística da recuperação da força de tração na pata direita a favor do grupo Sham foi um pouco mais significativa em relação ao grupo MSC. Em comparação com o gráfico do grupo TRG+ MSC, observa-se que a intensidade de recuperação da força de tração na pata direita, após um mês e três meses, foi maior no grupo TRG+MSC em relação ao grupo Sham e, paradoxalmente, nesse grupo MSC, ocorreu o inverso, sendo o grupo Sham com maior recuperação da força de tração em relação ao grupo MSC.

5. DISCUSSÃO

Os animais dos grupos **F** (TRG), **G** (TRG + MSC) e **K** (MSC), que receberam os biomateriais: TRG, TRG+ MSC e MSC, respectivamente foram os únicos que, de acordo com as diversas análises histológicas, apresentaram a capacidade de reparar a lesão provocada, conforme se constata pela formação de tecido cartilaginoso sobre a região que foi submetida à lesão padrão. Este efeito foi mais facilmente visualizado no grupo **F** (TRG) do que nos outros dois grupos, que receberam as células-tronco, ou seja, grupo **G** (TRG + MSC) e grupo **K** (MSC), nos quais se visualiza uma camada mais delgada de tecido cartilaginoso o que mostra a viabilidade regenerativa quando do uso de células-tronco mesenquimais no tratamento de lesões articulares (39), (40). A possibilidade de problemas técnicos no momento da injeção contendo as células-tronco deve ser considerada como causa provável desse resultado, inferior ao do grupo **K** (MSC). A suspensão de MSCs pode ter diluído a concentração dos componentes do TRG, ou mesmo, parte do material aplicado pode ter extravasado para fora do compartimento intra-articular arrastando o gel para os tecidos adjacentes, uma vez que estas células estavam em solução de soro fisiológico 0,9%, o que pode ser constatado ao se visualizar a imagem, (Figura 13). Observou-se, também, que em alguns grupos, como o **E** (Ti), **J** (PVA+Ti) e **I** (HA+PVA), ocorreu grande formação de tecido fibroso sobre a área da lesão padrão, conforme pode ser visto nas lâminas coradas com Tricômio de Masson, sendo comum, aos três grupos, a presença do Ti, sugerindo que o mesmo pode contribuir para a formação de maior quantidade de tecido fibroso sobre a superfície da lesão. Observa-se que o Ti promoveu esta formação de tecido fibroso a partir de 15 dias, aumentando após um mês e três meses, sugerindo que a velocidade de formação do tecido fibrótico influencia positivamente a recuperação da força de tração das patas lesionadas e tratadas apenas com Ti. Esta formação fibrótica não é observada nos três grupos que receberam o HA, a saber, grupos **C** (HA), **H** (HA+PVA) e **I** (HA+Ti), pois se observa que o tecido fibroso se forma mais lentamente, não sendo tão espesso, o que leva a recuperação de força de tração mais tardiamente, quando comparados com o grupo **F** (TRG). Nos grupos **F** (TRG) e **G** (TRG+ MSC) observou-se, também, uma resposta semelhante de maior recuperação de força de tração em relação aos animais do grupo **B** (Sham), não ocorrendo o mesmo com o grupo **K** (MSC), muito provavelmente pela perda das células durante a injeção para tratamento da lesão. Até o

primeiro mês, as patas operadas apresentaram menos força de tração no dinamômetro em relação à pata não operada (lado esquerdo) em todos os grupos. Nos grupos autopsiados após 15 dias, pode-se observar que há pouca diferença na recuperação da força de tração das patas direita (operada) dos animais que receberam biomateriais em comparação com o grupo que foi operado e não recebeu nenhum tratamento, grupo **B** (Sham), sendo que a resposta de recuperação de força de tração nessa fase é um pouco maior. Conforme relatado nos resultados, no grupo **B** (Sham) após três meses da lesão, observou-se a presença de tecido fibroso intra-lesão e, também, sobre a lesão (FIG.15). Nos grupos que formaram um revestimento tecidual cartilaginoso sobre a lesão, observou-se uma área tecidual mais delgada justamente onde ocorreu a perfuração da lesão, ficando muito difícil sua identificação sem a microscopia (Figuras 16 E 17). Os demais grupos que possuem padrão histológico muito semelhante são os grupos: **D**(PVA), **J** (PVA+Ti), **I** (HA+Ti).

Verificou-se, através da força de tração, que a aplicação apenas de TRG, foi capaz de reparar a lesão, permitindo uma força de tração maior em relação aos demais grupos e, inesperadamente, maior até que o grupo **K** (MSC), enquanto as análises histológicas dos dois grupos indicaram aspectos muito semelhantes, sem qualquer aparente distinção entre as lâminas. A provável explicação para essa distinção nas forças de tração estaria na hipótese da ocorrência de uma diluição do TRG ao se acrescentar 0,3ml de solução de soro fisiológico 0,9% contendo as células-tronco MSC. Outra hipótese a ser considerada é a de que o número de animais analisados nos grupos tenha levado a um vício estatístico. O fato relevante é o que o TRG favoreceu o crescimento de uma camada de tecido cartilaginoso nos dois grupos nos quais este gel foi utilizado, a saber: grupos **F** (TRG) e **G** (TRG+MSC), sendo que o tecido cartilaginoso de maior espessura ocorreu no grupo **F** (TRG), em relação aos outros dois grupos que formaram tecido cartilaginoso. Isto talvez possa justificar o melhor resultado na força de tração do grupo **F** (TRG) em relação aos demais grupos. Há evidências a favor do TRG, porém, deve-se considerar o número ainda pequeno de animais por grupo neste ensaio, exigindo mais estudos com grupos contendo um maior número de animais.

6. CONCLUSÕES:

1. A grande capacidade de reparação espontânea dos ratos Wistar machos com seis meses de idade foi algo inesperado, que, em parte, frustrou as expectativas, uma vez que se propôs criar uma lesão padrão em animais mais idosos (de seis meses) como um modelo animal para o estudo da osteoartrose humana. No entanto todos os detalhes da técnica cirúrgica foram de muito valor para a padronização da lesão e sua aplicação a outras espécies animais.
2. Animais de maior porte, como coelhos, ou mesmo primatas, poderão ser modelos mais adequados para essa análise da OA.
3. Apesar deste problema de reparação espontânea da lesão, os resultados aqui apresentados indicaram, claramente, que o biomaterial TRG favoreceu o reparo tecidual dos animais lesionados e tratados, quando comparados com os grupos tratados na ausência do TRG, tanto aqueles tratados com os biomateriais isoladamente como de modo combinado.
4. É necessário esclarecer melhor o papel de cada biomaterial isoladamente e em combinação entre eles e o TRG.
5. A participação da fração de HA na reparação tecidual parece ser a de atrasar a formação do tecido fibroso. 6. A presença do PVA ou de Ti isoladamente favorece a formação de tecido fibroso sobre a lesão padrão, o que não ocorre quando esses dois biomateriais são associados (PVA+Ti).
6. Novos ensaios, utilizando o mesmo modelo de lesão padrão, porém com animais de maior porte são necessários, tratando-se com o TRG, em comparação com seus biomateriais isoladamente e analisando a formação (ou não) de tecido cartilaginoso sobre a lesão padrão.
7. Apesar da provável falha na técnica de injeção das células-tronco MSC, foi possível observar que as mesmas tem atuação terapêutica, isoladamente, no tratamento da lesão padrão desde a fase de 15 dias, porém, com resultado um pouco inferior ao grupo **F** (TRG) tanto na análise histológica como na recuperação da força de tração, em relação ao grupo **F** (TRG).

7. REFERÊNCIAS:

1. O que é Osteoartrite? *Revista da Sociedade Brasileira de Reumatologia*, 2017, oct 27. <https://www.reumatologia.org.br/doencas/principais-doencas/osteoartrite-artrose/>
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE/2013), <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?edicao=9161&t=sobre>
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE / 2013), <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?edicao=9161&t=resultados>
4. Watterson JR, Esdaile JM. Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000 Sep-Oct;8(5):277-84.
5. Bedson J, Jordan K, Croft P How do GPs use x rays to manage chronic knee pain in the elderly? A case study. *Ann Rheum Dis*. 2003 May;62(5):450-4.
6. Pelletier J-M, Roughley PJ, DiBattista JA, et al. Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Sem Arthritis Rheum* ; 20(6) suppl 2: -25;1991.
7. Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res*; 40(1):1-11; 1999.
8. Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Corelli M, et al. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and health chondrocytes. *ClinExp Rheum*; 19:139-145; 2001.
9. Glansbeek HL, Van Beuningen HM, Vitters EL, Morris EA, Van Der Kraan PM, Van Der Berg WB. Bone morphogenetic protein 2 stimulates articular cartilage proteoglycan synthesis in vivo but does not counteract interleukin-1 α , effects on proteoglycan synthesis and content. *Arthritis Rheum* 40(6):1020-1028 1997.
10. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*; 43(9):1916-1926; 2000

11. Loeser RF. *Chondrocyte integrin expression and function. Biorheology*; 37 (1-2):109-116; 2000.
12. Ishiguro N, Ito T, Ito H, Iwata H et al. *Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover. Arthritis Rheum*; 42(1):9-136; 1999
13. Wu JJ, Lark MW, Chunt LE, Eyre DR. *Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X and XI of cartilage. J Biol Chem*; 266(9): 5625-5628; 1991.
14. Martel-Pelletier, Cloutier JM, Pelletier J-P. *Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. J. Orthop. Res*; 8(3):336-344; 1990.
15. Buttle DJ, Handley CJ, Ilic MZ, et al. *Inhibition of cartilage proteoglycan release by specific inactivator of cathepsin B and inhibitor of matrix metalloproteinases: evidence for two converging pathways of chondrocyte-mediated proteoglycan degradation. Arthritis Rheum*; 36():1709-1717; 1993.
16. Mort JS, Recklies AD, Poole AR. *Intracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. Arthritis Rheum*; 27(5): 509-515; 1994.
17. Pelletier J-P, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Fernandes JC, et al. *Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo. Arthritis Rheum*; 43(6): 90-99; 2000
18. Pelletier JP, Martel-Pelletier J. *The pathophysiology of osteoarthritis and the implication of the use of hyaluronan and hyaluronan as therapeutic agents in viscosupplementation. J Rheum*; 20 (suppl 39):19-24; 1993.
19. Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. *Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. Science*; 235: 893-895, 1987.
20. Kimbal ES, Persico FJ, Vought JL. *Substance P, neurokinin A, and neurokinin B induce generation of IL-1-like activity in P388D1 cells: possible relevance to arthritic disease. J Immunol*; 141(10):3564-3569; 1998.

21. Nero H ,Dahlberg ,Dahlberg Le 6-Week Web-Based Osteoarthritis Treatment Program: Observational Quasi-Experimental Study; *J.Med Internet Res.* e422. doi: 10.2196/jmir.9255. A 6-2012.
22. Vicent G, Pesce V, Bizzoca D, Nappi V, Palmiotto F, Carozzo M, Moretti B. Perioperative plasmatic presepsin levels in patients undergoing total hip or knee replacement: a preliminary study. *J Biol Regul Homest. Agents*: 31(4):1081-1086; 2017.
23. Zaborowska M, Welch K, Brånemark R, Khalilpour P, Engqvist H, Thonsem P, Trobos M. Bacteria – material surface intereactions: methodological development for the assessment of implant surface induced anti bacterial effects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*;103(1):179-87. doi: 10.1002/jbm.b.33179. Epub 2014 May , 2015 Jan.
24. Palmquist A, Grandfield K, Norlindh B, Mattsson T, Brånemark R, Thomsen P. J R Bone-titanium oxide interface in humans revealed by transmission electron microscopy and electron tomography. *J R Soc Interface*.:396-400. doi: 10.1098/rsif.2011.0420. Epub 2011 Aug 17. 2012 Feb 7
25. Oliveira WF, Arruda IRS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, Correia MTS. Functionalization of titanium dioxide nanotubes with biomolecules for biomedical applications. *Mater. Sci Eng C Mater Biol Appl.*;81:597-606. doi: 10.1016/j.msec.2017.08.017; 2017.
26. Yao JJ, Lewallen EA, Trousdale WH, Xu W, Thaler R, Salib CG, Reina N, Abdel MP, Lewallen DG, van Wijnen AJ. Local Cellular Responses to Titanium Dioxide from Orthopedic Implants. *Biores Open Access*;6(1):94-103. doi: 10.1089/biores; 2017.
27. Awad NK, Edwards SL, Morsi YS. A review of TiO₂ NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants. *Mater Sci Eng C Mater Biol App*;76:1401-14. doi: 10.10163. Review. edtion 2017
28. Yang Y, Zhao X, Li X, Yan Z, Liu Z, Li Y. Effects of anti-CD44 monoclonal antibody IM7 carried with chitosan polylactic acid-coated nano-particles on the treatment of ovarian cancer. *Oncol* 99-104. doi: 10.3892/ol.2016.5413;2017.
29. Fei Zhang , Juan Wu , Ding Kang a & Hongbin Zhang . Development of a complex hydrogel of hyaluronan and PVA embedded with silver nanoparticles and its facile studies on *Escherichia coli*. Department of Polymer Science and Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China .Feb 2013.
30. Pillai MM, Gopinathan J, Senthil Kumar R, Sathish Kumar G, Shanthakumari S,Sahanand : Tissue engineering of human knee meniscus using functionalized and reinforced silk-polyvinyl alcohol composite three-dimensional scaffolds: Understanding the in vitro and in vivo behavior. *Tissue Engineering Laboratory, PSG Institute of Advanced Studies, Coimbatore 641004, India.* 2018 Feb 20
31. Kobayashi M. A study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus in vivo. *Biomed Mater Eng.*;14(4):505-15; 2004.
- 32 . Kobayashi M, Oka M. Characterization of a polyvinyl alcohol-hydrogel artificial articular cartilage prepared by injection molding. *J Biomater Sci Polym Ed.*;15(6):741-51; 2004.

33. Nicholls MA , Fierlinger A , Niazi F , Bhandari M *The Disease-Modifying Effects of Hyaluronan in the Osteoarthritic Disease State.* Nicholls MA , Fierlinger A , Niazi F , Bhandari M. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 2017 Aug 11;10:1179544117723611. doi: 10.1177/1179544117723611. eCollection 2017.
34. Shi WJ¹ , Tjoumakaris FP , Lendner M , Freedman KB. *Biologic injections for osteoarthritis and articular cartilage damage: can we modify disease?* Phys Sportsmed. 2017 Sep;45(3):203-223. doi: 10.1080/00913847.2017.1357421. Epub 2017 Jul 28.
35. Abate M , Salini V. *Safety and tolerability of intra-articular hyaluronic acid (Sinovial®/GELSYN-3tm) injections in the treatment of knee osteoarthritis.* *J Biol Regul Homeost Agents.* (4):1139-1145; 2017
36. Zille H , Paquet J , Henrionnet C , Scala-Bertola J , Leonard M , Six JL , Deschamp F , Netter P , Vergès J , Gillet P , Grossin L. *Evaluation of intra-articular delivery of hyaluronic acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rat knees.* *Biomed Mater Eng.*;20(3):235-42. doi: 10.3233/BME-2010.
37. Maiti SK , Ninu AR , Sangeetha P , Mathew DD , Tamilmahan P , Kritaniya D , Kumar N , Hescheler J. *Mesenchymal stem cells-seeded bio-ceramic construct for bone regeneration in large critical-size bone defect in rabbit.* *J. J Stem Cells Regen Med.*;(2):87-99. eCollection 2016.
38. Melsen F , Melsen B , Mosekilde L. *An evaluation of the quantitative parameters applied in bone histology.* *Acta Pathol Microbiol Scand A.*;86(1):63-9; 1978.
39. Tong X , Malo MKH , Burton IS , Jurvelin JS , Isaksson H , Kröger H. *Histomorphometric and osteocytic characteristics of cortical bone in male subtrochanteric femoral shaft.* *J Anat.*;231(5):708-717. doi: 10.1111/joa.670. 2017.
40. Xu X , Hu J , Lu H. *Histological observation of a gelatin sponge transplant loaded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma in repairing an annulus defect.* *PLoS One.*;(2):e0171500. doi: 10.1371/journal.pone.0171500. eCollection 2017.
41. Emadedin M , Aghdami N , Taghiyar L , Fazeli R , Moghadassali R , Jahangir S , Farjad R , Baghaban Eslaminejad M. *Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis.* *Arch Iran Med.* :422-8. doi: 0157/AIM.0010. 2012
42. *Treatment of Knee Osteoarthritis with Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study.* Orozco L , Munar A , Soler R , Alberca M , Soler F , Huguet M , Sentís J , Sánchez A , García-Sancho J. *Transplantation.* 2013 May 15.

8. SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Luiz Antonio Ribeiro
Mogi das Cruzes, 01 de Agosto de 1959

2. EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Colégio Policursos, 1977, Mogi das Cruzes-SP

Graduação: Faculdade de Medicina da Universidade de Mogi das Cruzes-SP-1986

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Especialização: Mestrado “Latu Sensu”

Acupuntura Médica, Associação Paulista de Acupuntura Médica, São Paulo, 1988

Medicina do Trabalho, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 1988

Homeopatia, Sociedade Brasileira de Homeopatia, São Paulo, 1991

International School of Lipoplasty- Dr. Piere Fournier-, Paris, 1991.

Medicina Estética e Obesidade, Instituto Magistral de Pesquisa, São Paulo, 1995

Terapia Ortomolecular, Sociedade Brasileira de Oxidologia, São Paulo, 1995

Biotechnology e Terapia Celular baseado em Células-tronco aplicada à Saúde, Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG-2010.

4. OCUPAÇÃO

Médico Responsável, Sócio proprietário da Clinica Médica Spazio, Mogi das Cruzes, SP- desde 1995.