

LUIZ RENATO AGRIZZI DE ANGELI

Injeção local de Preparado de Células de Polpa Dentária na epífise femoral proximal em um modelo experimental da necrose avascular da cabeça femoral em crescimento: um estudo experimental em porcos imaturos

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2024

LUIZ RENATO AGRIZZI DE ANGELI

Injeção local de Preparado de Células de Polpa Dentária na epífise femoral proximal em um modelo experimental da necrose avascular da cabeça femoral em crescimento: um estudo experimental em porcos imaturos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Roberto Guarniero

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Angeli, Luiz Renato Agrizzi de

Injeção local de Preparado de Células de Polpa Dentária na epífise femoral proximal em um modelo experimental da necrose avascular da cabeça femoral em crescimento : um estudo experimental em porcos imaturos / Luiz Renato Agrizzi de Angeli; Roberto Guarniero, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) - Programa do Sistema Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1 Doença de Legg-Calvé-Perthes 2. Isquemia 3. Modelos animais 4. Suínos 5. Células-tronco de polpa dentária humana 6. Tratamento biológico I. Guarniero, Roberto, orient. II. Título

USP/FM/DBD-049/24

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, a Nosso Senhor Jesus Cristo, Nossa Senhora Mãe de Deus, e São José seu glorioso esposo. Sem Deus nada seríamos e devemos a Ele todas as glórias.

À minha amada esposa Ana Paula Trevizani Dalmaso de Angeli, por todo apoio incondicional que me deu durante toda minha carreira, abdicando de si mesma para o bem da nossa família.

Às minhas filhas Maria e Isabel Trevizani Dalmaso Agrizzi de Angeli, e ao novo bebê que estamos esperando. Que sejam iluminados por Deus em suas vidas e possam ser líderes para suas famílias e para a sociedade no futuro.

Aos meus pais João Luiz de Angeli e Regina Célia Agrizzi de Angeli, e à minha irmã Luiza Agrizzi de Angeli, que sempre me amaram incondicionalmente mesmo conhecendo todos os meus defeitos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Guarniero, orientador desta tese, pela ideia do projeto, pelo auxílio na execução, por todas as oportunidades apresentadas e por acreditar em mim desde o início.

Ao Prof. Flávio Pires de Camargo (*in memoriam*), por ter iniciado a tradição de estudos sobre a doença de Legg-Calvé-Perthes no Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo. Este trabalho revive a sua ideia de tratamento biológico da doença.

À Dra. Daniela Franco Bueno, por me auxiliar na pesquisa desde o primeiro momento e ter sido essencial para o desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. José Ricardo Muniz Ferreira, por acreditar no projeto de pesquisa e fornecer os insumos necessários para a realização dos experimentos generosamente. Sem a sua dedicação este projeto não existiria.

Ao Dr. Gustavo Bispo dos Santos, por me auxiliar em tantos passos cruciais na execução do projeto. Sem sua dedicação este trabalho não existiria.

À Maria do Carmo Nunes, pelo cuidado com os animais e auxílio na realização dos procedimentos cirúrgicos.

Ao Dr. Antonio Gorios Filho, que participou dos processos cirúrgicos doando seu tempo de maneira generosa para que esta pesquisa fosse concluída.

À Dra. Patrícia Moreno Grangeiro, amiga e companheira na jornada de aprendizado que tive desde a minha formação como ortopedista pediátrico. Meu crescimento no entendimento da doença de Legg-Calvé-Perthes não seria o mesmo sem a sua ajuda.

Ao Dr. Nei Botter Montenegro, pela liderança do grupo de Ortopedia Pediátrica e convivência dentro do IOT desde a minha formação como residente.

Aos Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, Prof. Dr. Gilberto Luis Camanho, e Prof. Dr. Tarcísio E. P. de Barros, Professores Titulares do Departamento de Ortopedia e Traumatologia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela liderança do Instituto de Ortopedia e Traumatologia no tempo em que estive em formação acadêmica.

À Banca de Qualificação desta Tese, Dra. Patrícia Moreno Grangeiro, e Dr. Raul Bolliger Neto, pelas sugestões e engrandecimento geral do trabalho.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar minha tese de Doutorado.

À Priscila Vargas, pelo apoio com formatação e revisão desta tese.

Ao Thiago Zaquieu Lima, pelo apoio na análise estatística desta tese.

À Dra. Bárbara Livia Correa Serafim, pelo auxílio na publicação desta pesquisa e de muitas outras nas quais trabalhamos juntos.

Às Tânia Borges e Rosana Moreno Costa, por toda a paciência com os processos relativos à minha tese junto à Secretaria da Pós-Graduação.

Aos amigos de trabalho Dr. Felippi Guizardi Cordeiro, Dr. João Pedro Ramos Sampaio Rocha, Dr. Fellipe Bravim Catellan, e Dr. Gustavo Felipe Marques de Souza Vargas, por me auxiliarem todos os dias a ser um cirurgião melhor.

Aos doadores de material biológico, sem os quais este trabalho seria impossível.

*“Não te comprazes nas tuas habilidades e talentos,
para não desagadares a Deus,
a quem pertencem todos os teus dons.”*

Tomás de Kempis

*“Por que tanto medo, homens de pouca fé?”, respondeu ele.
Então, levantando-se, repreendeu os ventos e o mar,
e fez-se uma grande calma.”*

Mt 8:26

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

RESUMO

Angeli LRA. Injeção local de Preparado de Células de Polpa Dentária na epífise femoral proximal em um modelo experimental da necrose avascular da cabeça femoral em crescimento: um estudo experimental em porcos imaturos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

INTRODUÇÃO: a necrose avascular idiopática juvenil da epífise femoral proximal, ou Doença de Legg-Calvé-Perthes, é uma das principais causas de deformidades permanentes da articulação do quadril. As principais pesquisas experimentais estudam o uso de terapias biológicas associadas ou não a outros procedimentos, como a retirada de apoio do membro. A utilização de células-tronco de polpa dentária humana (CTPDh) ainda não foi estudada para este propósito em modelos suínos. O objetivo deste estudo é avaliar se a injeção local de CTPDh induz a mineralização óssea na epífise femoral proximal em um modelo experimental da necrose avascular da cabeça femoral no porco imaturo. **MÉTODOS:** dez porcos imaturos com peso entre 8 kg e 13 kg foram submetidos a um procedimento cirúrgico para induzir a osteonecrose da epífise femoral proximal do lado direito. Em 5 animais (Grupo Intervenção – GI) foram realizadas injeções de CTPDh logo após a indução da osteonecrose, e nos outros 5 animais (Grupo Comparação – GC) não foi realizado nenhum procedimento adicional. Os quadris esquerdos dos espécimes foram utilizados como controles. Todos os animais foram submetidos à eutanásia 8 semanas após a indução da isquemia. Análises macroscópicas, radiográficas e histológicas foram realizadas. **RESULTADOS:** a mineralização óssea foi maior nos quadris induzidos à osteonecrose no GI em comparação com o GC ($p = 0,0356$). Estima-se que a média do índice de mineralização aumente 77,78% após a injeção de CTPDh. Contudo, a avaliação radiográfica do índice epifisário mostrou maior colapso nos quadris direitos do GI em comparação com os quadris direitos do GC ($p < 0,001$). A avaliação macroscópica mostrou uma chance aumentada da cabeça femoral injetada apresentar um formato plano ($p = 0,049$). Não foi observada a presença de ossificação heterotópica ou transformação maligna em nenhum quadril avaliado. **CONCLUSÃO:** a injeção local de CTPDh aumenta a mineralização óssea em um modelo suíno experimental da necrose avascular juvenil da epífise femoral proximal. Contudo, os quadris tratados apresentaram maior deformidade em comparação com os controles.

Palavras-chave: Doença de Legg-Calvé-Perthes. Isquemia. Modelos animais. Suínos. Células-tronco de polpa dentária humana. Tratamento biológico.

ABSTRACT

Angeli LRA. Local injection of Dental Pulp Cell Preparation into the proximal femoral epiphysis in an experimental model of avascular necrosis of the growing femoral head: an experimental study in immature pigs [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

INTRODUCTION: juvenile idiopathic avascular necrosis of the proximal femoral epiphysis, or Legg-Calvé-Perthes disease, is one of the main causes of permanent hip joint deformities. Currently, experimental research is directed at studying biological therapies associated or not with other procedures such as non-weight-bearing. The use of human dental pulp stem cells (hDPSC) has not yet been studied for this purpose in swine models. This investigation aims to evaluate whether local injection of hDPSC induces bone mineralization in the proximal femoral epiphysis in an experimental model of avascular necrosis of the femoral head in immature pigs. **METHODS:** ten immature pigs weighing between 8 kg and 13 kg underwent a surgical procedure to induce osteonecrosis of the proximal femoral epiphysis on the right side. In 5 animals (Intervention Group – IG) hDPSC injections were performed immediately after the induction of osteonecrosis in the right hip, and in the other 5 animals (Control Group – CG) no additional procedure was performed. The left hips were used as controls. All animals were euthanized 8 weeks after ischemia induction. Macroscopic, radiographic, and histological assessments were performed. **RESULTS:** bone mineralization was greater in the right hips of the IG compared to the CG ($p = 0.0356$). It is estimated that the average mineralization index increases by 77.78% after hDPSC injection in hips submitted to avascular necrosis induction. However, radiographic evaluation of the epiphyseal index showed a greater collapse in the right hips of the IG compared to the right hips of the CG ($p < 0.001$). Macroscopic evaluation showed a higher chance of the femoral head to be flat ($p = 0,049$). The presence of heterotopic ossification or malignant transformation was not observed in any hip evaluated. **CONCLUSION:** injection of hDPSC into the proximal femoral epiphysis increases bone mineralization compared to epiphyses induced only to avascular necrosis in a piglet model of ischemic osteonecrosis. However, the treated hips presented more deformity compared with the non-treated hips.

Keywords: Legg-Calvé-Perthes disease. Ischemia. Animal models. Swine. Human dental pulp stem cells. Biologic treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia do ato cirúrgico mostrando as ligaduras intracapsulares no colo femoral realizadas com fios absorvíveis, após a secção do ligamento da cabeça do fêmur.....	39
Figura 2 - Fotografias do ato cirúrgico demonstrando o procedimento de injeção de Células Tronco de Polpa Dentária humana na epífise femoral proximal por via direta.....	40
Figura 3 - Imagem radiográfica de uma das peças avaliadas exemplificando a medição do índice epifisário	41
Figura 4 - Exemplo da dissecção das peças anatômicas após a eutanásia.....	42
Figura 5 - Exemplos de cortes histológicos realizados no plano coronal.....	43
Figura 6 - Imagens microscópicas de cortes histológicos corados pela coloração von Kossa (0,5x)	60
Figura 7 - Avaliação qualitativa macroscópica do formato da cabeça femoral	63
Figura 8 - Avaliação qualitativa macroscópica da qualidade da cartilagem articular	95
Figura 9 - Medição do índice epifisário radiográfico nos grupos.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Teste de viabilidade celular comparando duas amostras de hidrogel. Não se encontrou diferença na viabilidade celular entre as amostras avaliadas. Os valores de p foram obtidos utilizando Teste T	52
Tabela 2 -	Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a indução de necrose avascular na cabeça do fêmur e a distribuição da mineralização influenciam na mineralização do membro	56
Tabela 3 -	Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia na mineralização da cabeça do fêmur.....	60
Tabela 4 -	Contagem dos casos conforme as categorias combinadas de modelo experimental (i.e., indução, ou não, da osteonecrose) e formato da cabeça do fêmur, seguida do teste não paramétrico de Fisher e estimativa do intervalo de 95% de confiança para a respectiva razão de chances.....	68
Tabela 5 -	Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o modelo experimental (i.e., indução, ou não, da osteonecrose) influencia na esfericidade da cabeça do fêmur.....	68
Tabela 6 -	Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia na esfericidade da cabeça do fêmur.....	72
Tabela 7 -	A análise confirmatória consiste na reprodução do ajuste do modelo (definido na Tabela 6).....	74
Tabela 8 -	Descrição dos pontos relativamente influentes conforme a Gráfico 14	74
Tabela 9 -	Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a esclerose subcondral influencia na esfericidade da cabeça do fêmur.....	76

Tabela 10 - A análise confirmatória consiste na reprodução do ajuste do modelo (definido na Tabela 8), porém desconsiderando individualmente, a cada etapa, as observações com influência (segundo distância de Cook) mais proeminentes.....	79
Tabela 11 - Descrição dos pontos relativamente influentes conforme o Gráfico 17	79
Tabela 12 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a indução de necrose avascular na cabeça do fêmur e a máxima espessura das traves influenciam na ossificação endocondral	85
Tabela 13 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia na ossificação endocondral.....	88
Tabela 14 - A análise confirmatória consiste na reprodução do ajuste do modelo (definido na Tabela 12), porém desconsiderando individualmente, a cada etapa, as observações com influência (segundo distância de Cook) mais proeminentes.....	90
Tabela 15 - Descrição dos pontos relativamente influentes conforme a Gráfico 25	90
Tabela 16 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a indução de necrose avascular na cabeça do fêmur influencia na qualidade da cartilagem.....	96
Tabela 17 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia qualidade da cartilagem	99
Tabela 18 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a indução de necrose avascular na cabeça do fêmur e a mineralização influenciam no índice epifisário	105
Tabela 19 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia no índice epifisário	109
Tabela 20 - A análise confirmatória consiste na reprodução do ajuste do modelo (definido na Tabela 19), porém desconsiderando individualmente, a cada etapa, as observações com influência (segundo distância de Cook) mais proeminentes.....	112

Tabela 21 - Descrição dos pontos relativamente influentes conforme a Gráfico 39	112
--	-----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição amostral da mineralização da cabeça do fêmur	53
Gráfico 2 - Distribuição da mineralização da cabeça do fêmur condicionada aos níveis de características biológicas não controladas.....	54
Gráfico 3 - Tamanho dos efeitos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 2.....	57
Gráfico 4 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 2.....	58
Gráfico 5 - Relação essencial entre variáveis	59
Gráfico 6 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 3.....	61
Gráfico 7 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 3.....	62
Gráfico 8 - Distribuição da esfericidade da cabeça do fêmur conforme a indução da osteonecrose avascular, o tratamento com o enxerto de células dentárias pluripotentes e demais características biológicas não controladas	64
Gráfico 9 - Relação essencial entre variáveis	67
Gráfico 10 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 4.....	69
Gráfico 11 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 5.....	70
Gráfico 12 - Relação essencial entre variáveis	71
Gráfico 13 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 6.....	72
Gráfico 14 - Medidas diagnósticas descrevendo a definição do modelo (Tabela 6) a partir dos dados.....	73
Gráfico 15 - Envelope da distribuição dos resíduos provenientes do ajuste do modelo (Tabela 6) aos dados delimitada pela respectiva banda de confiança	75

Gráfico 16 - Tamanho dos efeitos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 9.....	77
Gráfico 17 - Medidas diagnósticas descrevendo a definição do modelo (Tabela 9) a partir dos dados.....	78
Gráfico 18 -Envelope da distribuição dos resíduos provenientes do ajuste do modelo (Tabela 8) aos dados delimitada pela respectiva banda de confiança	80
Gráfico 19 - Distribuição da ossificação endocondral conforme a indução da osteonecrose avascular.....	82
Gráfico 20 - Relação essencial entre variáveis	83
Gráfico 21 - Força de associação estimada conforme o modelo definido na Tabela 12.....	85
Gráfico 22 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 11.....	86
Gráfico 23 - Relação essencial entre variáveis	87
Gráfico 24 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 13.....	88
Gráfico 25 - Medidas diagnósticas descrevendo a definição do modelo (Tabela 13) a partir dos dados.....	89
Gráfico 26 - Envelope da distribuição dos resíduos provenientes do ajuste do modelo (Tabela 13) aos dados delimitada pela respectiva banda de confiança	91
Gráfico 27 - Distribuição qualidade da cartilagem conforme a indução da osteonecrose avascular.....	93
Gráfico 28 - Relação essencial entre variáveis	94
Gráfico 29 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 16.....	96
Gráfico 30 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 16.....	97
Gráfico 31 - Relação essencial entre variáveis	98
Gráfico 32 - Tamanho dos efeitos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 16.....	100

Gráfico 33 - Distribuição amostral do índice epifisário	101
Gráfico 34 - Distribuição do índice epifisário condicionado aos níveis de características biológicas não controladas	103
Gráfico 35 - Relação essencial entre variáveis.	104
Gráfico 36 - Tamanho dos efeitos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 17.....	106
Gráfico 37 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 18.....	107
Gráfico 38 - Relação essencial entre variáveis	108
Gráfico 39 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 19.....	110
Gráfico 40 - Medidas diagnósticas descrevendo a definição do modelo (Tabela 19) a partir dos dados.....	111
Gráfico 41 - Envelope da distribuição dos resíduos provenientes do ajuste do modelo (Tabela 19) aos dados delimitada pela respectiva banda de confiança	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC	- <i>Akaike information criteria</i>
BAIS	- Biomaterial de acetato isobutirato de sucrose
BIC	- <i>Bayesian information criteria</i>
BMP-2	- Proteína morfogenética óssea do tipo 2
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CLM	- <i>Cumulative Link Models</i>
CTDTA	- Células-tronco derivadas de tecido adiposo
CTMO	- Células-tronco mesenquimais de ovinos
CTPDh	- Células-tronco de polpa dentária humana
DLCP	- Doença de Légg-Calvé-Perthes
GC	- Grupo Comparação
GI	- Grupo Intervenção
GP	- Grupo Perfuração
HCFMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	- Hematoxilina-eosina
IM	- Intramuscular
IOT-HCFMUSP	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IV	- Intravenoso
LIM-41	- Laboratório de Investigação Médica do Sistema Musculoesquelético 41
MLG	- Modelo linear generalizado
MLGM	- Modelos lineares generalizados mistos
MTT	- Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
PACS	- <i>Picture archiving and communication system</i>
RANK	- Ativador do receptor do fator nuclear kappa-B
RANKL	- Ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B
USP	- Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	24
3	REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1	MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ- PERTHES EM PORCOS	27
3.2	PROPRIEDADES REGENERATIVAS DAS CTPDH	35
4	MÉTODOS	37
4.1	O ESTUDO	38
4.2	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	41
4.3	AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E HISTOLÓGICA	42
4.4	DESCRIÇÃO DETALHADA DOS CUIDADOS REALIZADOS COM OS ANIMAIS.....	44
4.4.1	Informações referentes aos animais e cuidados.....	44
4.4.2	Cuidados pré-operatórios.....	44
4.4.3	Procedimento anestésico.....	44
4.4.4	Procedimento pós-operatório.....	44
4.4.5	Eutanásia	45
4.5	PRODUÇÃO DO HIDROGEL TERMOSENSÍVEL	45
4.6	PRODUTO DE TERAPIA AVANÇADA	47
4.7	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	48
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5	RESULTADOS	51
5.1	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	52
5.2	MINERALIZAÇÃO	52
5.2.1	Efeito da necrose	55
5.2.2	Efeito do tratamento.....	58
5.3	ESFERICIDADE DA CABEÇA DO FÊMUR.....	63
5.3.1	Efeito da necrose	66
5.3.2	Efeito do tratamento.....	70
5.4	OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA.....	81
5.4.1	Efeito necrose	83
5.4.2	Efeito tratamento.....	87
5.5	QUALIDADE DA CARTILAGEM	92
5.5.1	Efeito necrose	94
5.5.2	Efeito tratamento.....	98
5.6	ÍNDICE EPIFISÁRIO RADIOGRÁFICO	100
5.6.1	Efeito da necrose	104
5.6.2	Efeito do tratamento.....	107

6	DISCUSSÃO	114
6.1	O TRATAMENTO BIOLÓGICO DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ- PERTHES	115
6.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DO TRATAMENTO BIOLÓGICO DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES.....	116
6.3	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	119
6.4	PONTOS FORTES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS	121
7	CONCLUSÃO	123
	REFERÊNCIAS	125
	ANEXOS	132

1 INTRODUÇÃO

A necrose avascular idiopática juvenil da epífise femoral proximal é uma das principais causas de deformidades permanentes da articulação do quadril na infância¹⁻³. Na prática clínica, é conhecida como Doença de Legg-Calvé-Perthes (DLCP), e pode acometer pacientes com idades entre 2 e 14 anos, sendo mais comum no sexo masculino. É considerada a forma mais comum de osteonecrose da cabeça do fêmur em crianças, com a prevalência global anual variando entre 5,1 a 16,9 por 100.000⁴⁻⁶. A etiologia ainda é idiopática, contudo inúmeras teorias foram propostas incluindo processo inflamatório, trauma, oclusão vascular⁷, trombofilias, uso de tabaco durante a gestação e mutações do colágeno do tipo II. Apesar das diferentes teorias, a maioria dos pesquisadores acredita que a doença é multifatorial, com fatores genéticos e ambientais que levam a uma apresentação clínica e patológica comum⁸.

O evento chave da doença é a interrupção do fluxo vascular da cabeça femoral, que produz necrose isquêmica seguida por mudanças morfológicas que levam à perda da esfericidade da epífise proximal do fêmur. A interrupção do fluxo vascular é temporária, o que torna a doença autolimitada. Para melhorar o prognóstico das crianças afetadas pela doença, deve-se tentar diminuir a deformidade produzida pela osteonecrose durante a fase ativa da doença. Há evidências de que quanto maior for a deformidade da cabeça femoral, maior será a chance de os pacientes evoluírem com osteoartrite no futuro^{9,10}.

O tratamento está fundamentado em reduzir a deformidade da cabeça femoral e minimizar as suas complicações¹¹. Inúmeras formas de tratamento já foram propostas para a DLCP¹¹. Contudo, devido à escassez de casos para a produção de estudos clínicos randomizados, há poucas evidências concretas sobre qual delas é a melhor forma de tratamento para a doença. Desde a década de 1970, estudos experimentais em modelos animais têm sido realizados para tentar encontrar respostas em relação à abordagem da doença¹². A partir dos anos 2000, foram publicados vários estudos em modelos animais que elucidaram pontos importantes em relação às opções de tratamento, como a retirada de apoio no membro acometido¹ e a utilização de terapias biológicas para aumentar a mineralização óssea e diminuir a deformidade da cabeça femoral necrosada¹³.

Revivendo a ideia de se tratar a doença de maneira biológica, como proposto pelo Professor Flávio Pires de Camargo em 1957¹⁴, atualmente as principais pesquisas experimentais são direcionadas ao estudo de terapias biológicas

associadas ou não a outros procedimentos como a artrodiastase, as osteotomias ou à retirada de apoio do membro¹⁵⁻¹⁷. A partir destes estudos, será possível expandir tais terapias para o tratamento da doença em seres humanos, permitindo abreviar o tempo de tratamento e diminuir a deformação da cabeça femoral, produzindo melhores resultados clínicos e radiológicos para as crianças acometidas.

As células-tronco de polpa dentária humana (CTPDh) possuem um excelente potencial de diferenciação osteogênica¹⁸⁻²⁴. Em adição, essas células não sofrem rejeição imunológica em modelos animais testados no passado, o que exclui a necessidade da produção de um modelo animal *knock-out*²³⁻²⁶. Contudo, o uso de CTPDh para tratamento da osteonecrose do quadril ainda não foi estudada em modelos suínos imaturos. Um estudo realizado em ovinos maduros mostrou uma regeneração óssea mais rápida após a implantação local de CTPDh na epífise femoral proximal induzida à osteonecrose²³. Pela viabilidade da aquisição deste tipo de material biológico, que pode ser cultivada a partir de uma amostra de dentes provisórios de crianças, seu estudo pode viabilizar uma eficaz forma de tratamento para os pacientes com a DLCP no futuro.

Neste estudo pretendemos determinar qual a ação do uso de enxerto de células de polpa dentária nos aspectos radiográficos, clínicos e histopatológicos em um modelo experimental da DLCP. O modelo experimental no porco em crescimento facilita o estudo da sequência de eventos celulares e estruturais que ocorrem após a isquemia da epífise femoral proximal²⁷. A motivação do presente trabalho é avaliar se a injeção local de CTPDh induz a mineralização óssea na epífise femoral proximal em um modelo experimental da necrose avascular da cabeça femoral no porco imaturo.

2 OBJETIVOS

O objetivo primário desta tese é:

Avaliar se a injeção local de enxerto de CTPDh induz a mineralização óssea na epífise femoral proximal em um modelo experimental da necrose asséptica da cabeça femoral no porco imaturo.

Os objetivos secundários desta tese são:

- a) Avaliar as características histológicas e morfológicas da cabeça femoral dos animais analisados, com a utilização de radiografias e análise macroscópica.
- b) Avaliar a segurança e viabilidade da técnica proposta no modelo experimental.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES EM PORCOS

Desde a década de 1970, estudos experimentais em porcos são realizados para tentar encontrar respostas em relação à abordagem da doença.

Schulitz et al.²⁸, em 1977, realizam experimentos em 13 porcos imaturos (*mini-pigs*), executando a ligadura de todas as veias que fazem a drenagem da cabeça femoral no compartimento intra-abdominal. A hipótese formulada é de que a DLCP pudesse ser provocada por congestão venosa. Após avaliação dos achados, visibiliza-se apenas fibrose, sem alterações significativas observadas nas radiografias, nem microscopicamente nem macroscopicamente.

Smith et al.²⁹, em 1982, realizam experimentos em seis *mini-pigs Gottingen* de 8 a 10 semanas de vida, pesando entre 2,5 kg e 3 kg, injetando microesferas de vidro na artéria ilíaca direita dos modelos animais. Apenas um porco sofre alterações radiográficas semelhantes às observadas na DLCP. Os autores concluem que as alterações observadas nas análises radiográfica e histológica deste animal sugerem que as alterações metafisárias presentes na DLCP são secundárias à isquemia epifisária. Além disso, os autores também citam a possibilidade de que as alterações visibilizadas na placa de crescimento da epífise femoral sejam responsáveis pela deformidade intrínseca da cabeça femoral.

Kim e Su³⁰, em 2002, realizam a secção do ligamento da cabeça do fêmur e uma ligadura no colo femoral direito de 25 porcos imaturos com fio não absorvível para estudar os aspectos histopatológicos e radiográficos induzidos pela necrose isquêmica. A eutanásia dos animais foi realizada entre 3 dias e 8 semanas após o procedimento cirúrgico. Os autores observam um pequeno achatamento da cabeça femoral dos animais analisados 4 semanas após a interrupção do fluxo sanguíneo e, nos animais analisados após 8 semanas, foram percebidas as deformidades mais graves. Antes de ocorrer a deformidade na cabeça, visibiliza-se uma área central de reabsorção óssea provocada pela ação osteoclástica. Esta área de reabsorção é preenchida por tecido fibrovascular que persiste até a oitava semana. Os autores percebem áreas de neoformação óssea, porém apenas em locais onde não há reabsorção osteoclástica, ou seja, onde ainda existe osso trabecular necrótico. Esta heterogeneidade da resposta celular é responsável pelo aspecto fragmentado observado nas radiografias. Por fim, os autores concluem que a persistência do tecido fibrovascular, a perda óssea precoce, e a

ausência de neoformação óssea homogênea na cabeça femoral são os eventos responsáveis pela deformação da epífise femoral proximal. Eles também citam que o modelo experimental criado por esta técnica é útil no estudo da necrose avascular da epífise femoral proximal em crescimento.

Pringle et al.³¹, em 2004, realizam uma ligadura no colo femoral direito com um fio absorvível de 18 porcos imaturos de 4 a 5 semanas de vida pesando entre 6 kg e 8 kg para estudar uma propriedade mecânica denominada rigidez de indentação. Em oito animais são realizadas cirurgias placebo e seis animais são submetidos a eutanásia sem nenhuma cirurgia realizada. Entre os animais operados, a eutanásia é realizada em duas, 4 e 8 semanas. Após a eutanásia, o teste de indentação é realizado nas cabeças femorais operadas e não operadas. Os resultados obtidos demonstram que a rigidez de indentação diminui de maneira significativa nas cabeças femorais necróticas, e que tanto a cartilagem e o osso dos espécimes avaliados têm papel mecânico relevante. Os autores sugerem que a retirada de carga da cabeça femoral e a instituição de tratamentos que estimulem a formação óssea precoce podem ser benéficos para pacientes com a DLCP.

Kim et al.³², em 2004, realizam uma ligadura no colo femoral direito com fio não absorvível de 50 porcos imaturos para estudar os aspectos histopatológicos e radiográficos das alterações radiolucidas metafisárias que aparecem junto à necrose da epífise femoral proximal. O quadril esquerdo dos animais é utilizado como controle. A eutanásia dos animais é realizada em duas, 4 e 8 semanas após o procedimento cirúrgico. Alterações radiolucidas metafisárias são observadas predominantemente nos espécimes analisados após 8 semanas. Estas alterações são correlacionadas com lesões histopatológicas da fise. O estudo sugere que estas lesões podem ter uma correlação maior com distúrbios de crescimento proximal do fêmur, quando observadas em pacientes com a DLCP.

Kim et al.³³, ainda em 2004, realizam uma ligadura no colo femoral direito com dois fios absorvíveis em 25 porcos imaturos de 4 a 5 semanas de vida pesando entre 5 kg e 8 kg para estudar o fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) e a ação na reparação da necrose presente na cartilagem epifisária. Seis porcos imaturos da mesma linhagem são utilizados como controles placebo. Nestes, é realizado o mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligadura do colo femoral. Os autores concluem que a expressão do FCEV é aumentada após indução da necrose avascular, e que este aumento facilita o reparo da necrose na área

subcondral da cartilagem epifisária, levando ao crescimento e ao desenvolvimento da cabeça femoral.

Kim et al.³⁴, em 2006, realizam uma ligadura no colo femoral direito com um fio inabsorvível de 18 porcos imaturos de 4 a 5 semanas de vida pesando entre 6 kg e 8 kg para estudar o efeito da inibição dos receptores ativador do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL) e ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) pela utilização de osteoprotegerina subcutânea na deformidade da cabeça femoral gerada pela necrose avascular. Uma solução salina é usada como controle. As doses foram administradas da segunda à oitava semana pós-operatória. Os autores concluem que a inibição da proteína de membrana RANKL diminui a reabsorção óssea e a deformidade da cabeça femoral em porcos imaturos após a indução da necrose avascular. Os autores ainda ressaltam que o fato de os efeitos da osteoprotegerina serem reversíveis são uma possível vantagem no tratamento de doenças como a DLCP.

Aya-ay et al.³⁵, em 2007, realizam a ligadura no colo femoral direito com um fio inabsorvível de 27 porcos imaturos pesando entre 6 kg e 9 kg para estudar a retenção, distribuição e efeitos da administração local de ibandronato na cabeça femoral após a indução de necrose avascular. O quadril esquerdo é utilizado como controle. A injeção local é realizada diretamente na cabeça femoral uma semana após a indução da necrose. Doze animais recebem injeção com ibandronato marcado com carbono 14 (¹⁴C-ibandronato), para acessar a distribuição corporal do medicamento à injeção local. Os autores concluem que doses insignificantes do medicamento são encontradas fora da cabeça femoral em 48 horas, e que 99% do ¹⁴C-ibandronato injetado se encontra dentro da epífise femoral. Quinze animais foram randomizados em três grupos de cinco animais, os quais têm suas cabeças femorais injetadas com 280 microgramas de ibandronato, ou 550 microgramas de ibandronato ou solução salina. As análises radiográficas e histomorfométricas destes espécimes, após 7 semanas, revela melhor preservação da cabeça femoral do que os espécimes injetados com solução salina. Por fim, os autores concluem que a administração local de ibandronato pode ser uma estratégia segura e eficaz para o tratamento da necrose avascular da epífise femoral proximal em humanos, visto que diminui os efeitos sistêmicos da medicação e não necessita da restauração do fluxo sanguíneo para a região proximal do fêmur para ser adequadamente distribuída na região afetada pela necrose.

Koob et al.³⁶, em 2007, realizam a ligadura no colo femoral direito com um fio

absorvível de 18 porcos imaturos pesando entre 6 kg e 8 kg para estudar os efeitos biomecânicos causados pela indução de necrose avascular no osso e na cartilagem articular da epífise femoral proximal em crescimento. Em oito animais são realizadas cirurgias placebo, nas quais todos os passos são realizados, exceto a ligadura no colo femoral. Em seis animais não são realizadas cirurgias. Os animais foram submetidos à eutanásia duas, 4 e 8 semanas após a cirurgia. São retirados fragmentos dos espécimes analisados com uma trefina de 3,85 mm de diâmetro por 4,71 mm de comprimento. Estes fragmentos são submetidos a testes biomecânicos específicos. Os autores concluem que a partir da segunda semana a resistência dos fragmentos analisados diminui em torno de 50% a 60% em relação aos controles, e se mantém semelhante até a oitava semana. O estudo sugere que a diminuição das forças biomecânicas da cabeça femoral após indução da necrose é um fator relevante na patogênese da deformidade observada na DLCP.

Kim et al.³⁷, em 2009, realizam a ligadura com um fio inabsorvível no colo femoral direito de 65 porcos imaturos de 4 a 6 semanas de vida pesando entre 5 kg e 9 kg para estudar as alterações da placa de crescimento da epífise femoral proximal após a indução de necrose avascular. Os quadris do lado esquerdo foram utilizados como controles. Os animais foram submetidos à eutanásia em duas, 4 e 8 semanas após a cirurgia. Os autores concluem após uma série de análises histológicas e radiológicas que a maioria das placas de crescimento das epífise femorais proximais não sofrem lesões significativas após a indução da necrose avascular. Grande parte dos espécimes mantém a viabilidade e função da placa de crescimento mesmo com a interrupção total do fluxo vascular epifisário. Estes achados sugerem que a fise é irrigada não somente pelos vasos epifisários, como se acreditava anteriormente.

Gong et al.³⁸, em 2011, realizam ligaduras com dois fios inabsorvíveis nos colos femorais direito e esquerdo de 12 porcos imaturos com 5 a 6 semanas de vida pesando entre 5 kg e 6 kg para estudar os efeitos causados pela realização de perfurações múltiplas na epífise femoral proximal após a indução da necrose avascular. São realizadas três perfurações com fios de Kirschner de 1,57 mm nos quadris esquerdos, 3 semanas após a indução da necrose, por uma via medial, através da placa de crescimento. Os animais são submetidos à eutanásia em 3, 6, 9 e 12 semanas após a indução da necrose. Os autores concluem que a porcentagem de revascularização é maior nos quadris que são submetidos às perfurações múltiplas, e que este procedimento não aparenta produzir barras ósseas na fise.

Contudo, as perfurações não previnem o colapso da cabeça femoral e não promovem a neoformação óssea.

Russo et al.³⁹, em 2012, realizam a secção do ligamento da cabeça do fêmur e a ligadura com um fio inabsorvível dos colos femorais direito e esquerdo de 10 porcos imaturos de 3 meses de vida pesando entre 10 kg e 15 kg para estudar o efeito da administração de ibandronato subcutâneo e injeção local de plasma rico em plaquetas na epífise femoral proximal após a indução de necrose avascular. O quadril esquerdo é utilizado como controle. Os animais são divididos em dois grupos. O grupo A é formado por 5 animais que recebem ibandronato subcutâneo a partir do 10º dia do pós-operatório, três vezes por semana por 6 semanas. O subgrupo A1 recebe injeção de plasma rico em plaquetas no quadril direito e o subgrupo A2 não recebe nenhum tratamento adicional no quadril esquerdo. O grupo B é formado por 5 animais que não recebem ibandronato subcutâneo. O grupo B1 recebe injeção de plasma rico em plaquetas no quadril direito e o subgrupo B2 não recebe nenhum tratamento adicional no quadril esquerdo. O estudo não cita em qual momento é realizada a injeção de plasma rico em plaquetas. Ocorreram complicações em dois animais, que faleceram. Logo, oito animais foram analisados. Os autores concluíram que a terapia combinada preserva a arquitetura trabecular da epífise femoral e previne a deformidade na fase inicial da necrose isquêmica. Esses achados sugerem que a combinação de terapias antirreabsortivas e anabólicas pode ter efeito positivo na prevenção do colapso da epífise femoral proximal após a necrose avascular no esqueleto em crescimento.

Kim et al.¹, em 2012, realizam a secção do ligamento da cabeça do fêmur e a ligadura com um fio inabsorvível do colo femoral direito de 16 porcos imaturos de 6 a 8 semanas de vida pesando entre 6 kg e 8 kg para estudar os efeitos da retirada de apoio do membro acometido após a indução da necrose avascular. Os animais são randomizados em dois grupos de oito animais. O primeiro grupo é submetido a uma amputação transtibial no mesmo ato cirúrgico da indução da necrose avascular, para mimetizar a retirada de apoio. O segundo grupo não é submetido a nenhum procedimento adicional. Os resultados encontrados apontam para uma melhor forma residual da cabeça femoral nos animais tratados com a retirada de apoio. Contudo, as análises histológicas, anatomopatológicas e de micro-tomografia evidenciam uma grande rarefação óssea na epífise femoral nestes animais, ou seja, um desbalanço entre a reabsorção óssea e a formação óssea.

Cheng et al.⁴⁰, em 2014, realizam a secção do ligamento da cabeça do fêmur e

a ligadura com um fio inabsorvível no colo femoral direito de 12 porcos imaturos de 6 a 8 semanas de vida pesando entre 10 kg e 15 kg para estudar os efeitos da injeção local da proteína morfogenética óssea do tipo 2 (BMP-2) recombinante humana e bisfosfonato na epífise femoral proximal após a indução da necrose isquêmica. Os quadris esquerdos são utilizados como controles. Os animais são divididos em 3 grupos de quatro animais. O primeiro grupo recebe injeção de solução salina, o segundo grupo recebe injeção de um biomaterial de acetato isobutirato de sucrose (BAIS) e BMP-2 recombinante humana e o terceiro grupo recebe injeção de BAIS, BMP-2 recombinante humana e bisfosfonato. As injeções são realizadas no mesmo ato cirúrgico da indução da necrose. Os autores concluem que o biomaterial de BAIS é um meio eficiente de carrear a BMP-2 recombinante humana à epífise femoral proximal. O estudo também demonstra que a injeção de BMP-2 recombinante humana sem bisfosfonato não foi capaz de prevenir a deformidade da epífise femoral. Contudo, quando injetada com bisfosfonato, demonstra bons resultados na manutenção do formato da cabeça femoral.

Kim et al.¹³, em 2014, realizam a secção do ligamento da cabeça do fêmur e a ligadura com um fio inabsorvível no colo femoral direito de 18 porcos imaturos de 6 a 8 semanas de vida pesando entre 6 kg e 8 kg para estudar os efeitos da injeção local de BMP-2 e bisfosfonato na epífise femoral proximal após a indução de necrose isquêmica. No mesmo ato cirúrgico é realizada a amputação transfemoral no membro do lado operado para simular a retirada de apoio. Destes, seis animais recebem aplicação local de BMP-2, seis receberam aplicação local de BMP-2 associado ao ibandronato, e seis não recebem nenhum tipo de terapia biológica local. Os resultados da análise final evidenciam uma menor absorção óssea e uma maior neoformação óssea nos porcos que foram tratados com terapias biológicas. O volume ósseo encontrado na epífise femoral é significativamente maior no grupo que tratado com ibandronato e BMP-2 em relação ao grupo tratado apenas com BMP-2. Ossificação heterotópica é encontrada em quatro dos seis animais submetidos à injeção de BMP-2 e ibandronato.

Zou et al.⁴¹, em 2015, realizam a ligadura com dois fios absorvíveis no colo femoral direito de 15 porcos imaturos de duas a 3 semanas de vida pesando entre 8 e 10 libras para estudar os efeitos da injeção local de clodronato e sinvastatina na epífise femoral proximal após a indução da necrose isquêmica. Os animais são divididos em quatro grupos: o primeiro grupo não recebe tratamento; o segundo

grupo recebe apenas o veículo da injeção, composto por um biomaterial de carboximetilcelulose e glutaraldeído; o terceiro grupo recebe apenas clodronato; o quarto grupo recebe apenas sinvastatina; e o quinto grupo recebe clodronato e sinvastatina. A injeção é realizada 1 semana após indução da isquemia, por via lateral. Os resultados obtidos após as análises radiológicas e histológicas demonstram que os animais do quinto grupo não sofrem colapso da epífise femoral do quadril direito. Todavia, todos os animais dos outros grupos demonstraram entre 66% a 100% de colapso no quadril direito. Os autores concluem que a abordagem biológica com sinergismo entre drogas antirreabsortivas (clodronato) e osteogênicas (sinvastatina) pode ser benéfica no tratamento de pacientes com a DLCP, com o intuito de diminuir a deformidade da cabeça femoral durante o curso da doença.

Adapala et al.⁴², em 2016, realizam a secção do ligamento da cabeça do fêmur e a ligadura com dois fios absorvíveis no colo femoral direito de 12 porcos imaturos para estudar os efeitos pró-inflamatórios do osso necrótico sobre os macrófagos a partir da ativação do receptor do tipo Toll 4 (TLR-4). O quadril esquerdo é utilizado como controle. Em três porcos imaturos são realizadas cirurgias placebo, nas quais a cabeça femoral é exposta, porém não é realizada a indução da necrose avascular. Em cinco porcos não operados é realizada a coleta de medula óssea da tíbia para cultivo de macrófagos *in vitro*. Os animais são submetidos à eutanásia 8 semanas após a indução da necrose avascular. Os autores concluem que o osso necrótico estimula a resposta inflamatória dos macrófagos a partir da ativação do TLR-4.

Aruwajoye et al.⁴³, em 2017, realizam a secção do ligamento da cabeça do fêmur e a ligadura com um fio absorvível no colo femoral direito em 20 porcos imaturos de 5 a 8 semanas de vida pesando entre 6 kg e 12 kg para estudar as propriedades materiais das epífises femorais tratadas com BMP-2 e ibandronato após a indução da necrose avascular. Os animais são divididos em quatro grupos de cinco espécimes. O primeiro grupo recebe injeção intraóssea local de ibandronato; o segundo grupo recebe injeção intraóssea local de BMP-2; o terceiro grupo recebe injeção intraóssea local de ibandronato e BMP-2; e o quarto grupo não recebe tratamento. As injeções são aplicadas uma semana após a indução da necrose. Os quadris esquerdos e os quadris direitos dos porcos que não receberam injeções foram utilizados como controles. Os autores concluem que os grupos tratados com BMP-2 ou com BMP-2 e ibandronato preservam as propriedades materiais da epífise femoral semelhantes às do osso normal. Contudo, as cabeças femorais tratadas

apenas com ibandronato mantêm características semelhantes às cabeças necrosadas e não tratadas.

Upasani et al.⁴⁴, em 2017, realizam a secção do ligamento da cabeça do fêmur e a ligadura com um fio absorvível no colo femoral direito de 24 porcos imaturos de 5 a 9 semanas de vida pesando entre 7,3 kg e 15 kg para estudar os efeitos da indução da necrose vascular sobre a morfologia acetabular. Os quadris esquerdos são utilizados como controles. Os animais são submetidos à eutanásia 8 semanas após o procedimento cirúrgico. As análises de tomografia computadorizada realizadas na bacia dos espécimes demonstram alterações morfológicas semelhantes às descritas em pacientes com a DLCP. As deformidades observadas são a diminuição da versão e do *tilt* acetabulares, além da diminuição dos ângulos de cobertura acetabulares superiores, posteriores e inferiores.

Aruwajoye et al.⁴⁵, em 2018, realizam a ligadura com um fio no colo femoral direito de 18 porcos imaturos de 6 a 8 semanas de vida pesando entre 8 kg e 11 kg para estudar o efeito da realização de perfurações epifisárias múltiplas comparado ao efeito da realização de uma perfuração única transfisária após a indução de necrose avascular. Os quadris esquerdos são utilizados como controles. No mesmo ato da indução da necrose é realizada uma amputação transfemoral para simular a retirada de carga no membro operado de todos os animais. Eles são divididos em três grupos de seis espécimes: o primeiro grupo não é submetido a procedimentos adicionais; o segundo grupo é submetido à perfuração única transfisária; e o terceiro grupo é submetido a perfurações epifisárias múltiplas. As perfurações são realizadas 1 semana após a indução da necrose, por via lateral, atravessando a placa de crescimento do quadril direito. A perfuração única é realizada com uma broca canulada com diâmetro externo de 5 mm. As perfurações múltiplas transfisárias são realizadas com fios de Kirschner de 2 mm de diâmetro, uma em cada quadrante, totalizando quatro perfurações transfisárias. É administrada calceína na dose de 20 mg/kg 5 dias e um dia antes da eutanásia. Os animais são submetidos à eutanásia 8 semanas após a primeira cirurgia. Os autores concluem que as perfurações epifisárias múltiplas produzem um maior volume ósseo e estimulam uma maior formação óssea do que a retirada de carga isolada ou associada à perfuração única transfisária. Além disso, é ressaltado que não são observadas diferenças entre a largura da fise e o crescimento do colo femoral entre os grupos que são submetidos a perfurações.

Martínez-Álvarez et al.⁴⁶, em 2023, realizam um estudo em 27 porcos

imaturos com 4 semanas de vida pesando entre 5 kg e 6 kg para avaliar os resultados da inoculação transfisária de células-tronco mesenquimais extraídas dos próprios animais. A necrose avascular é induzida pela ligadura com um fio não absorvível no colo femoral direito e sem a secção do ligamento da cabeça do fêmur. Os quadris esquerdos são utilizados como controles. Treze animais são tratados com a inoculação das células-tronco mesenquimais e 14 animais são injetados com soro fisiológico. Os autores detectam que 78% das cabeças femorais do grupo controle apresentam deformidade extensa, sendo que apenas 15% das cabeças femorais tratadas apresentam características semelhantes. Os autores concluem que a enxertia de células-tronco mesenquimais estimula a regeneração óssea e tem o potencial de preservar a esfericidade da cabeça femoral em um modelo experimental da necrose avascular do quadril no porco imaturo.

3.2 PROPRIEDADES REGENERATIVAS DAS CTPDH

Costa et al.²⁴, em 2008, realizam um estudo em ratos não imunossuprimidos para testar a capacidade regenerativa de CTPDh extraídas de dentes provisórios de crianças na reconstrução de defeitos craniais grandes. Oito animais foram utilizados no estudo, sendo que seis foram tratados com CTPDh e dois são utilizados como controles. Análises moleculares revelam a presença de CTPDh no novo osso formado, e mostram capacidade de diferenciação em tecido muscular, gorduroso e ósseo. Não há rejeição imunológica ao tratamento. Os resultados sugerem que o uso de CTPDh é promissor para a reconstrução de grandes defeitos cranianos humanos.

Kerkis et al.²⁵, em 2008, realizam um estudo para testar o potencial regenerativo da inoculação sistêmica de CTPDh em um modelo animal da distrofia muscular em cachorros da raça golden retriever. Seis animais são incluídos no estudo. Quatro animais são tratados com injeções arteriais ou intramusculares e dois animais são utilizados como controles. Nos animais tratados não são encontrados sinais de rejeição imunológica das células transplantadas. Um dos animais que recebe injeções mensais de CTPDh apresenta melhora clínica significativa.

Gomes et al.²⁶, em 2010, realizam um estudo para testar o potencial regenerativo de um folheto de células produzidas por engenharia de tecidos composto de CTPDh para a reconstrução da superfície ocular de coelhos. O modelo animal utilizado é de deficiência total de células-tronco límbicas, e os animais não

são imunossuprimidos durante o processo. Os resultados mostram que o transplante de CTPDh é bem-sucedida para a reconstrução do epitélio da córnea neste modelo animal.

Feitosa et al.²³, em 2010, realizam um estudo experimental em oito ovinos esqueleticamente maduros de 1 ano de vida, para estudar o efeito da inoculação transfusária de células-tronco mesenquimais de ovinos (CTMO) e CTPDh nos quadris submetidos à indução da necrose avascular por injeção de etanol. Quatro animais são utilizados como controles. Dois animais são tratados com CTMO e dois animais são tratados com CTPDh. Os tratamentos são realizados 6 semanas após a indução da osteonecrose. Nenhum animal foi submetido à imunossupressão. Os resultados mostram que ambas as linhagens de células se proliferam no modelo animal, conforme observado na análise imuno-histoquímica das peças avaliadas. Os ovinos injetados com CTDPh apresentam melhor regeneração óssea do que os animais do grupo controle.

Chalisserry et al.¹⁸, em 2017, publicam uma revisão sobre o potencial terapêutico das CTPDh. No artigo, os autores relatam que a biologia das células-tronco se tornou importante na medicina regenerativa e na terapia de engenharia de tecidos desde a descoberta e caracterização das células-tronco mesenquimais. As células-tronco de origem dentária são relativamente fáceis de se obter e exibem alta plasticidade e recursos múltiplos, representando um padrão-ouro para reconstrução óssea em humanos. Elas podem ser utilizadas para reparar defeitos corporais em terapias autólogas de baixo risco. Desta forma, a capacidade de diferenciação osteogênica das CTPDh é bem demonstrada *in vitro* e *in vivo*, com expressão de marcadores ósseos específicos no osso recém-formado.

Pinheiro et al.⁴⁷, em 2019, avaliam o potencial osteogênico de três tipos diferentes de linhagens de células-tronco, derivadas do cordão umbilical, músculo orbicular da boca e da polpa dentária decídua. Dez linhagens de cada origem são induzidas à diferenciação osteogênica *in vitro*, e a matriz óssea formada por cada cultura é quantificada. Os resultados demonstram que as células derivadas da polpa dentária e do músculo orbicular demonstram maior potencial osteogênico que as células derivadas do cordão umbilical, após 21 dias de cultivo. Os autores concluem que este potencial aumentado é referente à origem neural destas duas linhagens.

4 MÉTODOS

4.1 O ESTUDO

Este trabalho é um estudo experimental do tipo Ensaio Experimental Comparativo. O estudo foi aprovado pela Comissão Científica Do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HCFMUSP), pelo protocolo IOT 1149, e também foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP, pelo protocolo nº 141/15 (Anexo A). O estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica do Sistema Musculoesquelético 41 (LIM-41) no IOT-HCFMUSP. A avaliação histológica foi realizada no laboratório privado HistoCell.

Foram utilizados 10 animais suínos imaturos com base em uma amostra de conveniência, com idades entre 70 e 165 dias de vida e pesos variando entre 8 kg e 13 kg. A necrose avascular da epífise femoral proximal direita foi induzida cirurgicamente nos 10 animais. O quadril esquerdo foi utilizado como controle. O protocolo de indução da necrose avascular é baseado em modelos já descritos^{30,36,37,39,40}.

Os animais foram divididos em dois grupos: cinco animais foram alocados no Grupo Comparação (GC), os quais tiveram os quadris direitos submetidos ao procedimento de indução da osteonecrose sem procedimentos adicionais. Os outros cinco animais restantes foram alocados no Grupo Intervenção (GI). Estes tiveram seus quadris direitos submetidos à indução da osteonecrose seguida de injeção de CTPDh no mesmo ato cirúrgico - semelhante ao realizado por Cheng et al.⁴⁰ – a fim de simular uma intervenção precoce sobre a indução osteonecrose da cabeça femoral.

O procedimento cirúrgico de indução da necrose consistiu na realização de duas ligaduras intracapsulares no colo do fêmur direito dos animais com fios absorvíveis do tipo Vicryl 2-0 (Ethicon INc., Somerville, NJ) e na secção do ligamento da cabeça do fêmur (Figura 1). O procedimento tem o objetivo de interromper o fluxo sanguíneo para a epífise femoral proximal. O acesso cirúrgico foi realizado por uma via lateral direta entre o intervalo dos abdutores curtos do quadril, seguida por capsulotomia por via lateral do quadril direito, sem danificar o *labrum*. No GC, após a indução da necrose, realizou-se a redução do quadril e o fechamento dos planos por camadas. No GI, após a indução da necrose, realizou-se o procedimento de injeção de CTPDh na epífise femoral proximal.

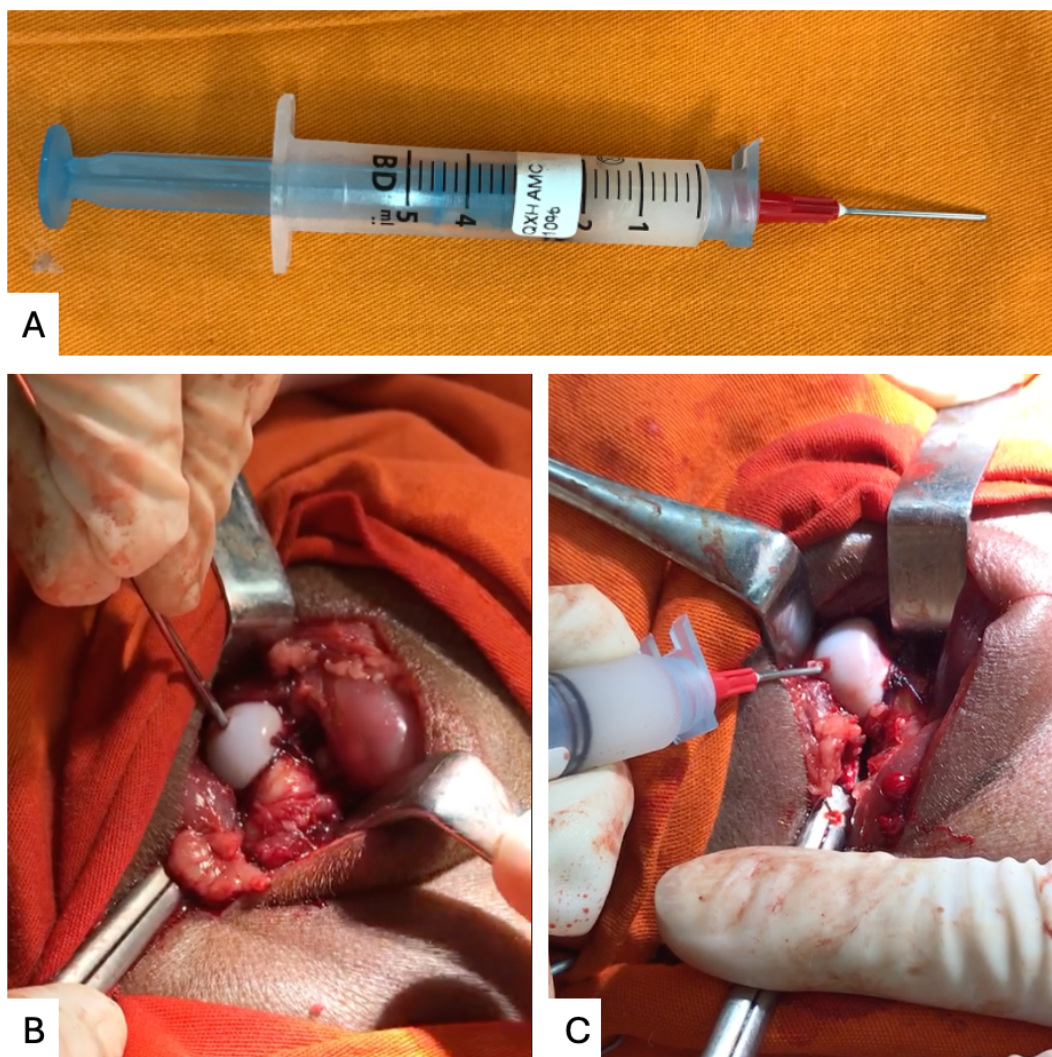
Figura 1 - Fotografia do ato cirúrgico mostrando as ligaduras intracapsulares no colo femoral realizadas com fios absorvíveis, após a secção do ligamento da cabeça do fêmur



Fonte: arquivo pessoal do Dr. Luiz Renato Agrizzi de Angeli.

O procedimento de injeção de CTPDh na epífise femoral proximal foi realizado por via direta (Figura 2). Um fio de Kirschner 1,5 mm foi utilizado para perfurar a cartilagem articular da cabeça femoral, apontando para o centro da epífise. Após a passagem da cartilagem articular, utilizando-se uma seringa de 5 mL com uma agulha de 1,2 x 25 mm preenchida com CTPDh adicionadas a um meio de Hidrogel, 2 mL da solução contendo 1×10^6 células foi injetada na cabeça femoral, tomando cuidado para que não ocorresse perda de material para a articulação. Após a remoção da agulha da epífise femoral, o orifício criado foi ocluído com cera de osso e o quadril foi reduzido na articulação. O fechamento dos planos foi realizado por camadas.

Figura 2 - Fotografias do ato cirúrgico demonstrando o procedimento de injeção de Células Tronco de Polpa Dentária humana (CTPDh) na epífise femoral proximal por via direta



A: seringa contendo CTPDh e hidrogel. B: Perfuração da epífise femoral proximal com fio de Kirschner 1,5 mm. C: Injeção de CTPDh e hidrogel na epífise femoral proximal, com cuidado para não ocorrer extravasamento do material. Fonte: arquivo pessoal do Dr. Luiz Renato Agrizzi de Angeli.

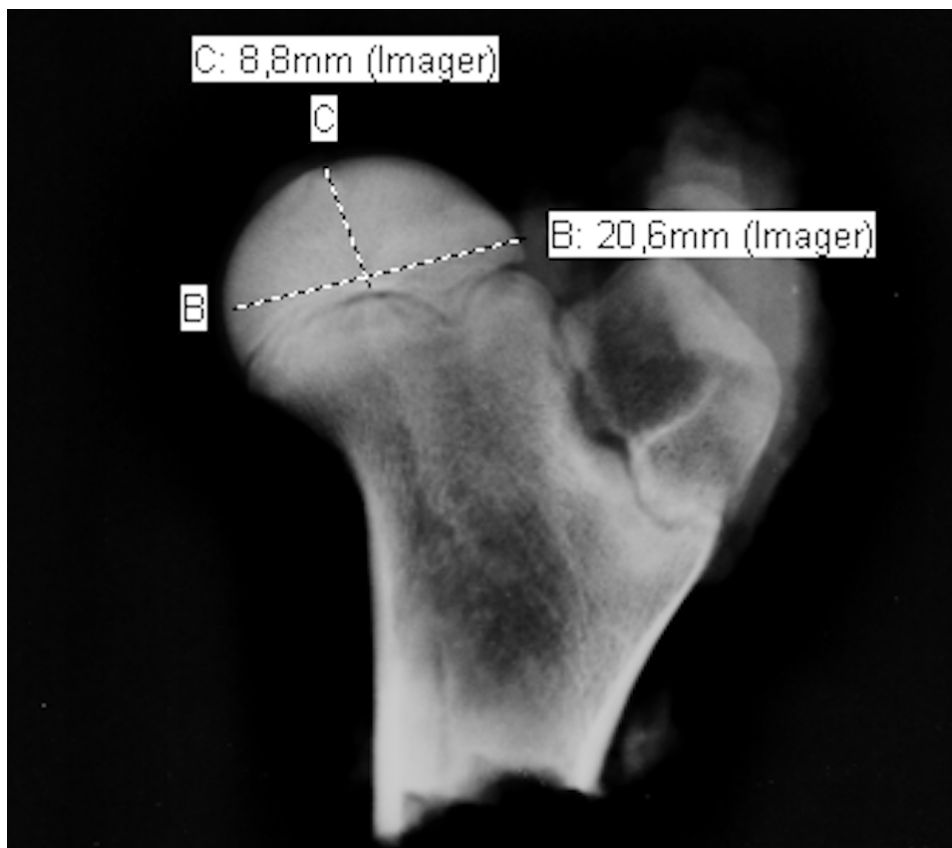
Todos os animais dos dois grupos foram observados por um período total de 8 semanas a contar do dia da indução da isquemia, quando foram submetidos à eutanásia para avaliação dos resultados. Aos animais foi permitida a carga total no membro operado, conforme aceitação.

4.2 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Todos os animais foram submetidos a avaliação radiográfica de ambos os quadris. Os exames radiográficos dos quadris direito e esquerdo foram realizados em projeção anteroposterior. Os exames foram realizados logo após a eutanásia. As peças dos quadris dos animais foram dissecadas, e as radiografias foram realizadas apenas com a região proximal dos fêmures, evitando assim artefatos de sobreposição de imagens.

O grau de deformação da epífise femoral foi medido pelo índice episfário, que é definido pela altura máxima dividida pelo diâmetro máximo da epífise femoral do quadril em uma radiografia anteroposterior⁴⁴. Com o achatamento da epífise femoral, a altura tende a diminuir, ao passo que o diâmetro tende a aumentar, o que resulta na redução do índice episfário. As medições foram realizadas no software *picture archiving and communication system* (PACS) do IOT-HCFMUSP (Figura 3).

Figura 3 - Imagem radiográfica de uma das peças avaliadas exemplificando a medição do índice episfário



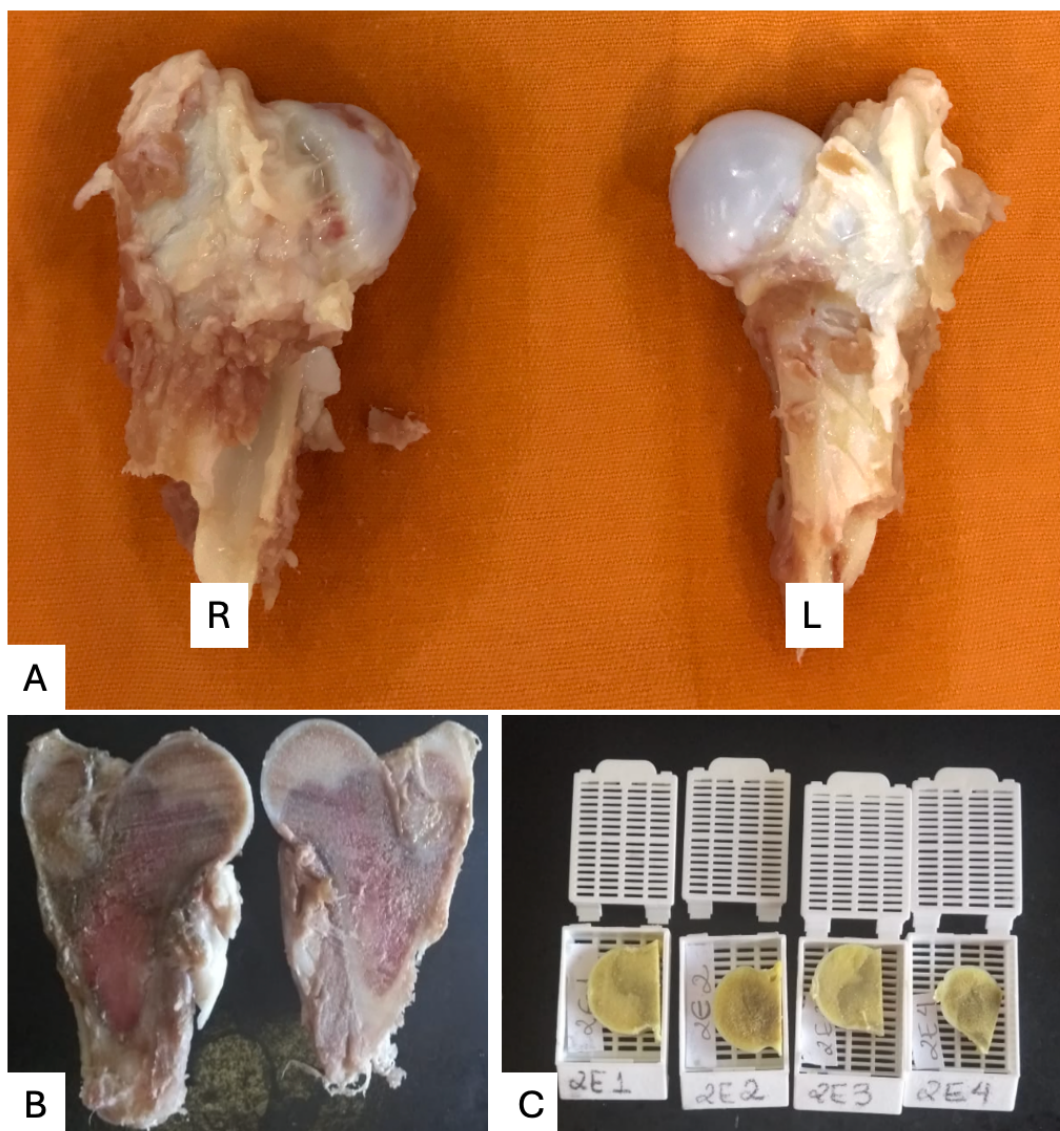
A linha C demonstra a altura episfária, medida do ponto mais alto da epífise femoral até a placa de crescimento. A linha B demonstra a largura da epífise femoral em seu maior diâmetro. O índice episfário é calculado pela divisão de C por B (Índice Episfário = C/B).

4.3 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E HISTOLÓGICA

Os quadris direito e esquerdo dos animais foram cuidadosamente dissecados. Foram realizados exames macroscópicos e microscópicos das amostras obtidas (Figura 4). No exame macroscópico, foi avaliada a esfericidade da cabeça femoral baseada na classificação de Stulberg modificada por Huhnstock et al.⁴⁸ (plana, oval e esférica).

Foram feitos cortes com 3 mm de espessura nas cabeças e colos femorais com serra no plano coronal. Cada amostra assim obtida foi analisada macroscopicamente e microscopicamente.

Figura 4 - Exemplo da dissecação das peças anatômicas após a eutanásia

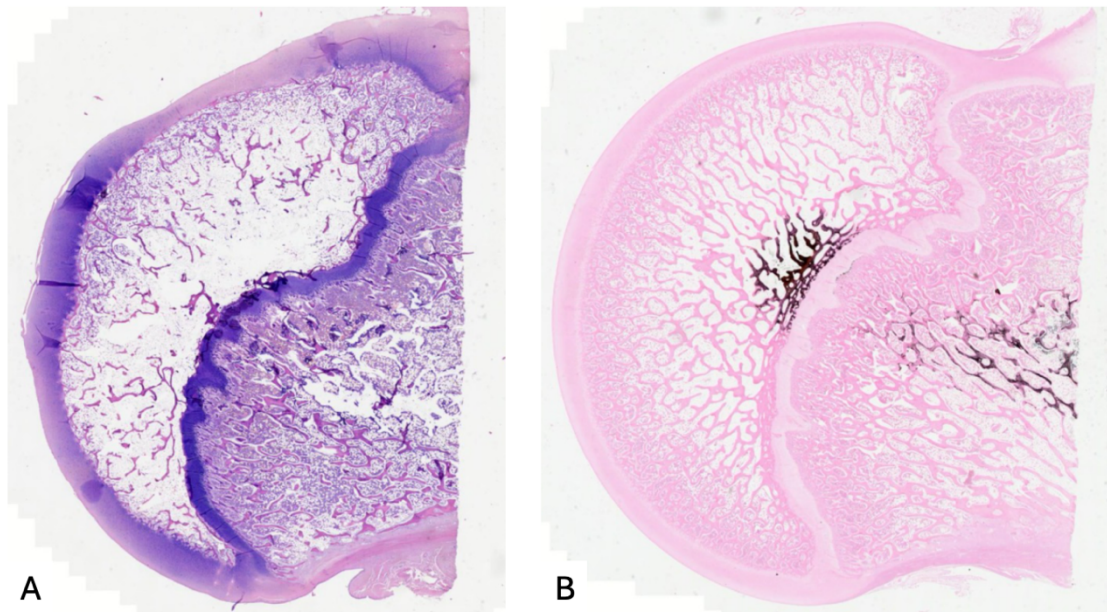


A: comparação entre o quadril direito (R) e esquerdo (L) de um dos animais do Grupo Comparação. Perceba o colapso do quadril direito, evidenciado pela perda de esfericidade da cabeça femoral. B: secção no plano coronal do quadril esquerdo. C: epífises femorais seccionadas em cortes de 3 mm.

Fone: arquivo pessoal do Dr. Luiz Renato Agrizzi de Angeli.

Cada uma das amostras foi fixada em formalina a 10%, embebida em parafina e cortada em fatias com 6 μ m. As secções assim obtidas foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE), pela coloração von-Kossa e examinadas sob microscopia óptica comum (Figura 5).

Figura 5 - Exemplos de cortes histológicos realizados no plano coronal



A: exemplo de um corte histológico de um quadril direito do Grupo Comparação (submetido à indução da osteonecrose) corado pela hematoxilina-eosina (0,5x). Perceba a rarefação celular e do trabeculado na epífise femoral. B: exemplo de um corte histológico de um quadril esquerdo do Grupo Comparação corado pela coloração von Kossa (0,5x). O trabeculado ósseo se encontra intacto em toda a epífise femoral.

Foram avaliados os seguintes parâmetros nos cortes histológicos corados com HE entre os quadris induzidos à isquemia e seus controles: evidência de Osteonecrose; ossificação endocondral; espessura da cartilagem articular; qualidade do osso subcondral; características da medular óssea; relação entre a matriz mineral óssea e a matriz orgânica e espessura da cartilagem articular.

Foram avaliados os seguintes parâmetros nos cortes histológicos corados pela coloração von-Kossa entre os quadris induzidos à isquemia e seus controles: porcentagem de mineralização da epífise femoral; e a distribuição da mineralização.

4.4 DESCRIÇÃO DETALHADA DOS CUIDADOS REALIZADOS COM OS ANIMAIS

4.4.1 Informações referentes aos animais e cuidados

Foram utilizados porcos imaturos brancos procedentes do mesmo produtor. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, um local adequado para a manutenção das espécies, com cuidador local. Foram utilizados serviços de limpeza local, despejo adequado de dejetos segundo as normas sanitárias locais, água e ração adequadas para a espécie.

4.4.2 Cuidados pré-operatórios

No período pré-operatório os animais ficaram em jejum durante 4 horas.

4.4.3 Procedimento anestésico

Os animais receberam medicação pré-anestésica com associação de cetamina (3 mg/kg intramuscular - IM) e midazolan (0,4 mg/kg IM). A indução da anestesia foi realizada com isoflurano (3,5%) com auxílio de máscara e a manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano (2%) e fentanil (0,2 µg/kg/h intravenoso - IV). Para a intubação foi administrado 5mg/kg de propofol. Imediatamente antes do início da cirurgia foi realizada antibioticoprofilaxia com cefazolina (30 mg/kg IV). Ao final do procedimento cirúrgico foi realizada analgesia com dipirona (25 mg/kg IV) e morfina (3 mg/kg IV), curativo na região da ferida cirúrgica e um cateter periférico para administração de fármacos analgésicos e anti-inflamatório no pós-operatório.

4.4.4 Procedimento pós-operatório

Foi realizado tratamento medicamentoso analgésico pós-operatório com dipirona (25 mg/kg SC) e cloridrato de tramadol (3 mg/kg SC) a cada 8 horas por 5 dias.

4.4.5 Eutanásia

Os animais foram submetidos à morte indolor induzida, seguindo o cronograma das avaliações de imagem.

Os animais receberam medicação pré-anestésica com associação de cetamina (3 mg/kg IM) e midazolam (0,4 mg/kg IM). A indução da anestesia foi realizada com isoflurano (3,5%) com auxílio de máscara para facilitar a venopunctura de veia auricular. Após confirmação do plano anestésico, foi administrado cloreto de potássio por via endovenosa.

4.5 PRODUÇÃO DO HIDROGEL TERMOSENSÍVEL

Para o presente estudo foi desenvolvido um substituto ósseo injetável bioabsorvível (hidrogel) com propriedades bioativas composto pelos polímeros quitosana-xantana-metilcelulose e grânulos de fosfato de cálcio, na fase hidroxiapatita.

Primeiramente, a produção base do hidrogel foi realizada na razão mássica de 1:1 de quitosana e xantana. A solução de quitosana a 1% m/v (Sigma-Aldrich, 83% de desacetilação), foi preparada em solução composta de 2% v/v de ácido láctico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em água ultrapura (Milli-Q Direct Q 8/16 System) e homogeneizada em agitador mecânico (Tecnal, São Paulo, Brasil), com uma rotação de 1000 rpm. Além do complexo polieletrólito de quitosana-xantana, o polímero metilcelulose foi utilizado na concentração de 10% descrito pelo fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e pela literatura como uma concentração onde a transição sol-gel ocorre entre 30°C e 34°C. Para a adição da metilcelulose foram realizadas as seguintes etapas: dispersão do pó de metilcelulose em 1/3 do volume de solvente aquecido à 80 °C; adição de mais 1/3 do volume de solvente em temperatura entre 2°C e 8°C, em agitação; e adição do 1/3 restante de solvente para adequação da concentração e do comportamento líquido em baixas temperaturas.

Os grânulos de fosfato de cálcio foram obtidos após a síntese de hidroxiapatita adotando o método de precipitação química em meio aquoso^{49,50}. O método compreende, primeiramente, a produção de uma solução precursora rica em íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , com razão molar Ca/P de 1,67. Para obter a solução precursora foi necessário produzir duas soluções, uma rica em íons Ca^{2+} e outra rica em íons

PO_4^{3-} A primeira foi obtida a partir da mistura de 250 mL de hidróxido de cálcio (0,5 mol/L, Merck KGaA-Darmstadt, Alemanha) e 250 mL de ácido láctico (1 mol/L, Merck KGaA-Darmstadt, Alemanha) dissolvido em água ultrapura (Milli-Q Direct Q 8/16 System) e homogeneizada em agitador magnético (Quimis, São Paulo, Brasil). A segunda foi uma solução de 250 mL de ácido fosfórico (0,3 mol/L, Merck KGaA-Darmstadt, Alemanha). As soluções foram então misturadas, adicionando-se a solução de ácido fosfórico à solução de ácido láctico e hidróxido de cálcio com o auxílio de uma bomba peristáltica (Tecnal, São Paulo, Brasil) a uma taxa de 8 mL/min. A solução foi mantida em agitação por 24 horas em temperatura ambiente (de 24 °C) e umidade de 59% (Incoterm, modelo: 7663.02.0.00). Para que ocorra a precipitação do fosfato de cálcio: hidroxiapatita, foi necessário adicionar 250 mL de hidróxido de potássio a 1 mol/L na solução precursora. Após a precipitação, o sistema foi mantido em repouso por 24 horas; nesta etapa é importante que o pH fique em torno de 12 para que haja formação do fosfato de cálcio desejado.

O pó precipitado foi então filtrado com papel de filtro (Qualy, J.Prolab – 80 gramas, 18,5 cm), em sistema a vácuo (DVP, modelo ZA 60S) à 400 mbar. O pó retido foi lavado com água ultrapura para a retirada dos íons de potássio até que se alcançasse o pH igual a 7 no líquido filtrado. Para a produção dos grânulos de hidroxiapatita, o pó produzido foi seco a 70°C por 12 horas. O pó produzido foi macerado, utilizando um gral e pistilo de ágata, e transferido para uma peneira granulométrica entre 150 e 300 μm (A bronzinox, malha de 100 e caixilho inox 5" x 2") e peneirado.

O final da produção do hidrogel de quitosana-xantana-metilcelulose com partículas de hidroxiapatita consistiu na mistura dos produtos descritos acima, misturados com espátula em temperatura inferior à 8°C até completa homogeneização.

4.6 PRODUTO DE TERAPIA AVANÇADA

Para a entrega do produto de terapia avançada, a associação das células ao hidrogel ocorreu em duas etapas:

- a) **Preparação das células:** as CTPDh (DPSC - PT5025, LONZA) foram descongeladas e ressuspensas em DPBS 1X (Thermo Fisher Scientific). A contagem celular foi realizada utilizando o equipamento Countess™, e uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células foi centrifugada a $300 \times g$ por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet celular foi ressuspensado em 600 μ L de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%.
- b) **Associação das células no hidrogel:** um volume de 1,4 mL do hidrogel esterilizado foi homogeneizado com os 600 μ L de células ressuspensas em solução fisiológica. A mistura final de 2 mL foi aspirada em uma seringa de 5 mL, garantindo uma distribuição uniforme das células no hidrogel. Este processo não apenas facilita a manipulação do material para a extrusão, mas também promove um ambiente propício à aderência e proliferação celular, essencial para a regeneração óssea.

4.7 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) é um protocolo amplamente utilizado em estudos com cultivo celular para mensurar quantitativamente a atividade metabólica celular indicando a viabilidade e/ou proliferação celular. O protocolo do ensaio de MTT se baseia na conversão do sal tetrazólio (MTT) amarelo em um derivado de formazan púrpura na mitocôndria das células viáveis. Os resultados obtidos são baseados na quantificação dos cristais de formazan após solubilizá-los, e a solução colorida é medida por meio de um equipamento (espectrofotômetro) utilizando a absorvância de 570 nm (nanômetros) e a diferença entre os grupos foi realizado para verificar a viabilidade celular da amostra contendo produto (hidrogel + CTPDh). Quanto mais escura a solução, maior o número de células viáveis, metabolicamente ativas.

Foram semeadas em uma placa de cultivo de 12 poços as amostras em triplicata para o teste de viabilidade nos diferentes grupos referentes a duas amostras do hidrogel:

Placa 1: controle positivo – células-tronco 1×10^4 células por poço; controle negativo – 1 mL de hidrogel I sem células; grupo hidrogel I com 1×10^4 células/mL; grupo hidrogel I com 1×10^5 células/mL.

Placa 2: controle positivo – células-tronco 1×10^4 células por poço; controle negativo – 1 mL de hidrogel II sem células; grupo hidrogel II com 1×10^4 células/ml; grupo hidrogel II com 1×10^5 células/mL.

Após a adição das CTPDh nas diferentes amostras de hidrogel, as mesmas foram cultivadas por 48 horas para a adesão celular no hidrogel com o meio de cultivo basal (DMEM F12 + 15% Soro fetal bovino). Após esse período as amostras foram lavadas com 3 mL de PBS para retirada do excesso de meio basal, em seguida foram adicionados aos poços de cultivo 500 μ L de 0,05 mg/mL de MTT. Todas as placas foram devidamente embrulhadas em papel alumínio para manterem-se ao abrigo de luz por 4 horas na incubadora (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação, 500 μ L de DMSO (Dimethyl sulfoxide; (CH₃)₂SO - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram colocados em cada poço cultivado e todas as placas foram agitadas em um agitador horizontal por 5 minutos para homogeneização da solução. Por conseguinte, foram transferidos os conteúdos para uma placa de leitura de 96 poços e então lidas no espectrofotômetro

(TECAN, infinity 200 PRO, Suíça), com leitura em filtro de absorvância de 570 nm, com valores processados pelo programa Magellan 3. A absorvância do produto solubilizado é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A presente análise tem por objetivo testar o efeito da indução da necrose avascular na cabeça do fêmur de porcos e avaliar o efeito do tratamento com a enxertia de células dentárias pluripotentes sobre a epífise femoral após a necrose. Tal propósito foi abordado em plano experimental concebido para testar os fatores de modo independente. Assim, a inferência do efeito da osteonecrose se baseou na comparação entre a articulação direita - induzida à osteonecrose avascular - e o lado contralateral poupado da lesão do mesmo animal, considerando que nenhum dos lados recebeu o tratamento com o enxerto celular. Dada a natureza pareada desta comparação, a suposição de independência entre as mensurações de ambos os lados do mesmo indivíduo se torna inverossímil, sendo a respectiva correlação representada pelo caráter longitudinal do modelo estatístico. Desta forma, a inferência do eventual efeito da indução da osteonecrose avascular foi fundamentada pela representação da sua relação com os desfechos de interesse por meio da modelagem paramétrica no escopo dos modelos lineares generalizados mistos (MLGM), cuja distribuição era assumida, a cada situação, conforme a natureza da resposta e função de ligação da média da resposta à combinação (linear) dos preditores definida visando otimizar o ajuste. Em todos os casos, o componente misto do modelo, como definido pela execução do experimento, consistiu no efeito aleatório do indivíduo, representado por um intercepto independente para cada animal.

Por sua vez, a análise do efeito do tratamento com o enxerto de CTPDh se restringiu ao subconjunto das articulações do lado direito, induzidas à osteonecrose avascular, sendo apenas uma parte delas tratada com o implante celular pluripotente. Nesse contexto não pareado, a manifestação do tratamento sob o membro necrosado é confrontada com o estado das articulações também lesada, mas de animais diferentes. Assim, as relações entre o tratamento e os desfechos de interesse foram representadas por modelos lineares generalizados, de modo que a distribuição assumida para a resposta se mostrava coerente à sua natureza e aos

dados e a ligação da média da resposta à combinação (linear) dos preditores atendia à necessidade para a qualidade do ajuste. Diante de respostas ordinais, recorreu-se aos *Cumulative Link Models* (CLM), como generalizações da regressão logística, sob as suposições de chances proporcionais (i.e., a razão de chances para um aumento na escala ordinal não depende do nível desta escala) e *thresholds* flexíveis.

De todo modo, toda inferência foi inicialmente orientada por uma análise exploratória prévia, indicando possíveis padrões de relação a fundamentar modelos plausíveis. Após ajuste aos dados, os modelos foram selecionados e validados, de modo a embasar inferências válidas. Naturalmente, os métodos de validação foram definidos conforme a classe do modelo e disponibilidade de ferramentas desenvolvidas e implantadas. No caso dos MLGM, a validação da representação dos dados pelo modelo se deu pelas medidas diagnósticas baseadas nos resíduos de cada modelo. Por sua vez, a validação de um CLM foi respaldada pelas medidas de *Akaike information criteria* (AIC), *Bayesian information criteria* (BIC) e *Hessian* condicional. Em virtude do tamanho amostral conciso, a avaliação da significância estatística de cada coeficiente de um modelo (portanto, do efeito por ele representado) se deu por teste de razão de máxima verossimilhança, dada suas propriedades favoráveis de convergência. Além disso, a significância estatística de qualquer efeito (ou associação) manteve-se condicionada a um nível de significância $\alpha = 0,05$. Por fim, todas as análises, gráficos e tabelas foram geradas no programa RStudio (Posit, Boston, MA).

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Os resultados apresentados a seguir foram normalizados com os valores da absorbância do controle negativo. O cultivo em ambas as amostras de hidrogel mostraram a perda de aproximadamente metade das células plaqueadas. Em comparação entre os tipos de hidrogel, não houve diferença na viabilidade quando comparados os grupos, independentemente da quantidade de células plaqueadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Teste de viabilidade celular comparando duas amostras de hidrogel. Não se encontrou diferença na viabilidade celular entre as amostras avaliadas. Os valores de p foram obtidos utilizando Teste T

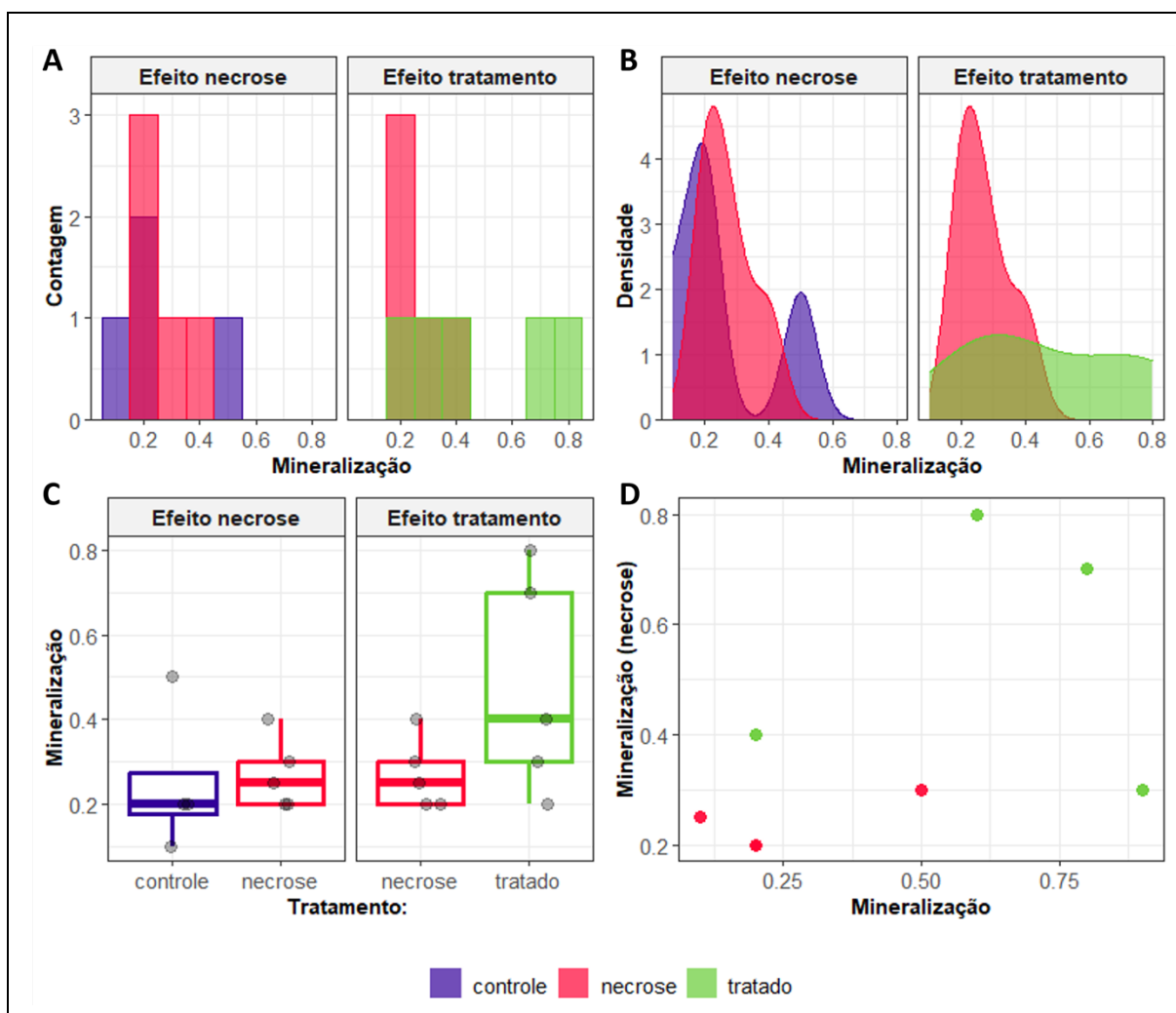
		Teste Viabilidade MTT			Média Triplicata	Desvio Padrão	p	
HIDROGEL I	Controle Positivo	Células	0,352	0,346	0,3663	0,355	0,01	
		Células + Hidrogel I 10 ⁵ cels/mL*	0,1979	0,1591	0,1622	0,173	0,02	
	Controle Negativo	Células + Hidrogel I 10 ⁴ cels/mL**	0,1589	0,1579	0,1625	0,160	0,00	
		Hidrogel I	0,0741	0,0627	0,0612	0,066	0,01	
HIDROGEL II	Controle Positivo	Células	0,3453	0,3655	0,3772	0,363	0,02	
		Células + Hidrogel II 10 ⁵ cels/mL*	0,18568	0,18339	0,1845	0,185	0,00	0,394*
	Controle Negativo	Células + Hidrogel II 10 ⁴ cels/mL**	0,14632	0,14752	0,1664	0,153	0,01	0,41**
		Hidrogel II	0,0453	0,0447	0,0445	0,045	0,00	

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

5.2 MINERALIZAÇÃO

Em termos qualitativos, nota-se que os níveis de mineralização nas cabeças de fêmur submetidas à necrose avascular se distribuem de modo semelhante em relação aos membros poupados da lesão (Gráfico 1-A, 1-B e 1-C). Não obstante, apenas entre os casos de osteonecrose, percebe-se que aqueles que receberam o enxerto de células dentárias mostraram uma ampla dispersão dos valores, enquanto os membros sem tratamento concentram a mineralização em níveis mais baixos. Desta forma, entende-se não haver indicativo de que a indução da necrose tenha afetado a mineralização da cabeça do fêmur, e que o tratamento com as células pluripotentes pode ter ampliado a dispersão desta resposta.

Gráfico 1 - Distribuição amostral da mineralização da cabeça do fêmur

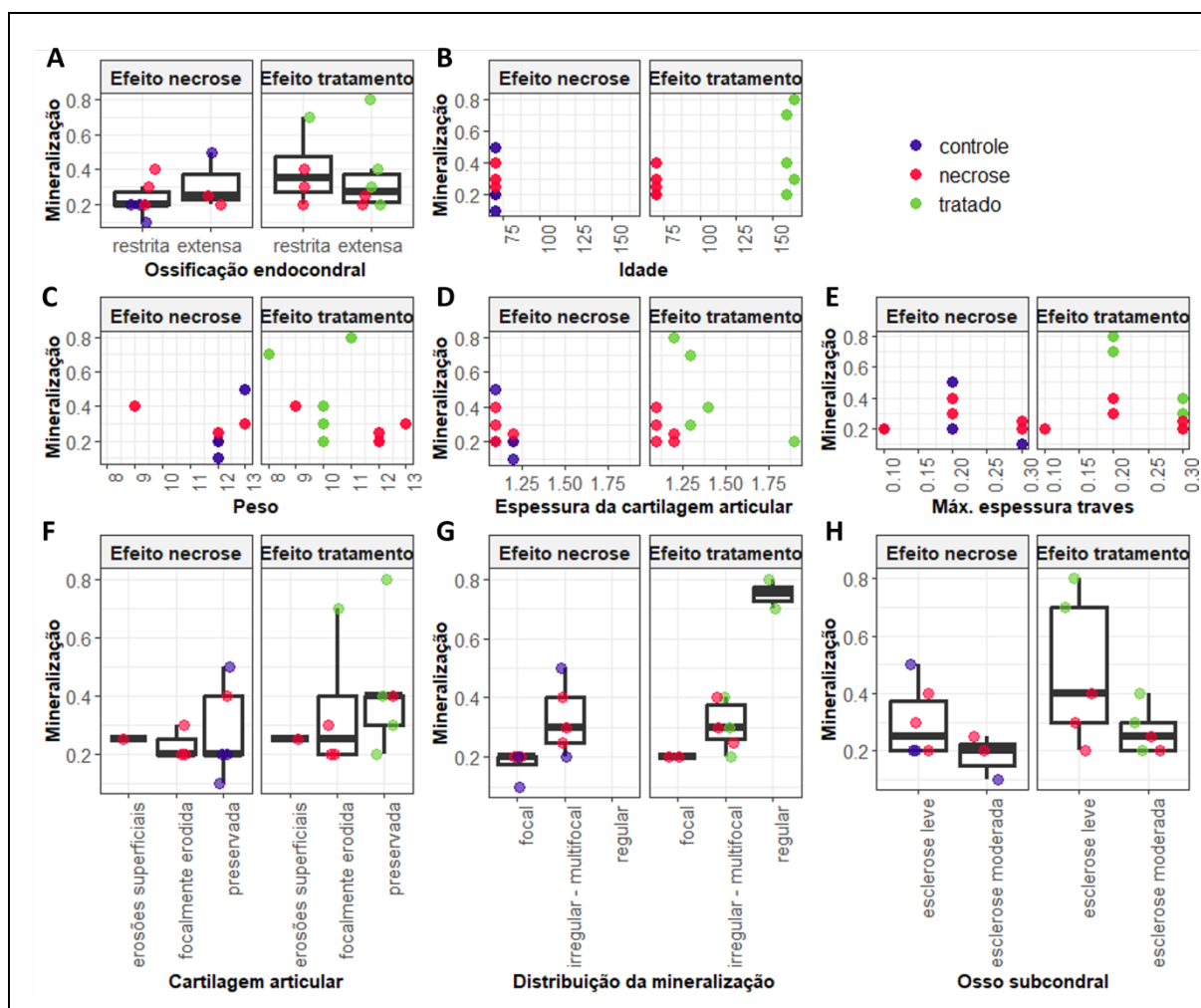


Nos painéis identificados como “Efeito necrose”, as cabeças de fêmur submetidas à necrose (em vermelho) são comparadas ao respectivo membro contralateral (em roxo) dos indivíduos que não receberam o enxerto de células dentárias (i.e., comparação pareada). Por sua vez, o subplot intitulado “Efeito do tratamento” avalia o desfecho da aplicação das células pluripotentes nas cabeças de fêmur com osteonecrose (em verde) em comparação aos membros necrosados dos outros animais que não receberam o enxerto celular (em vermelho - comparação não pareada). Em C, os diagramas de caixa têm, nas linhas horizontais, a representação do primeiro, segundo (ou mediana) e terceiro quartil, enquanto as linhas verticais ilustram os limites esperados da distribuição. Em D, cada ponto representa um indivíduo, cuja mineralização da cabeça de fêmur submetida à necrose é apresentada no eixo vertical, enquanto a medida análoga no membro contralateral é mostrada no eixo horizontal. Nesse contexto, os pontos verdes indicam os sujeitos que receberam o enxerto de células dentárias (apenas) no sítio necrosado, diferentemente dos pontos vermelhos que não receberam qualquer tratamento.

No que se refere à idade dos animais, a própria definição dos grupos experimentais estipulou dois estratos etários, porém sem que esta diferença de idade repercutisse em notória influência sobre a mineralização da cabeça do fêmur (Gráfico 2B). Ainda que a idade dos animais fosse mais homogênea, senão binária, o peso dos indivíduos mostrou uma maior variabilidade, evidenciando uma possível correlação inversa entre a massa corpórea e a mineralização entre as cabeças de fêmur induzidas à necrose (Gráfico 2C - Efeito tratamento). Nesse caso, o

tratamento com CTPDh parece não interferir na especulativa correlação entre peso e mineralização. Por outro lado, parece não haver indícios de uma possível associação entre mineralização e peso quando foram considerados ambos os lados dos sujeitos não tratados com o enxerto celular (Gráfico 2C - Efeito necrose).

Gráfico 2 - Distribuição da mineralização da cabeça do fêmur condicionada aos níveis de características biológicas não controladas



Nos painéis identificados como “Efeito necrose”, as cabeças de fêmur submetidas à necrose (pontos vermelhos) são comparadas ao respectivo membro contralateral (pontos roxos) dos indivíduos que não receberam o enxerto de células dentárias (i.e., comparação pareada). Por sua vez, o *subplot* intitulado “Efeito do tratamento” avalia o desfecho da aplicação das células pluripotentes nas cabeças de fêmur com osteonecrose (pontos verdes) em comparação aos membros necrosados dos outros animais que não receberam o enxerto celular (pontos vermelhos - comparação não pareada). Os diagramas de caixa têm, nas linhas horizontais, a representação do primeiro, segundo (ou mediana) e terceiro quartil, enquanto as linhas verticais ilustram os limites esperados da distribuição. Sobrepostos aos diagramas, encontram-se os valores de cada observação.

5.2.1 Efeito da necrose

Diante do plano experimental direcionando a coleta de dados, foram propostos modelos estatísticos plausíveis para explicar e descrever os indícios levantados na análise exploratória desenvolvida acima. Em seguida, esses modelos foram selecionados e finalmente validados de modo a se assegurar a acurácia das inferências que sustentam. Então, no contexto de comparação pareada entre os membros dos indivíduos não tratados com o enxerto celular (para a análise do efeito da necrose), confirmou-se a significância estatística da associação entre a mineralização da cabeça do fêmur a sua distribuição (Tabela 2; estimativa = 0,1257, erro pad. = 0,0340, lambda = 7,3911, GL = 1, p = 0,0066). No caso, estima-se que, em média, o índice de mineralização aumente em 0,1257 nos membros com distribuição irregular-multifocal em relação àqueles com disposição focal. Em contraste, os dados não proveram evidência suficiente para sustentar um efeito da necrose avascular induzida sobre a média (ou localização) da mineralização da cabeça do fêmur (Tabela 2; estimativa = 0,0284, erro pad. = 0,0482, lambda = 0,2911, GL = 1, p = 0,5895). Mas por outro lado, as evidências mostraram-se suficientes para endossar a significância estatística do efeito da necrose sobre a dispersão da mineralização (Tabela 2; estimativa = 2,0462, erro pad. = 0,9569, lambda = 3,9184, GL = 1, p = 0,0478), cuja variabilidade foi estimada a reduzir em decorrência da indução da lesão.

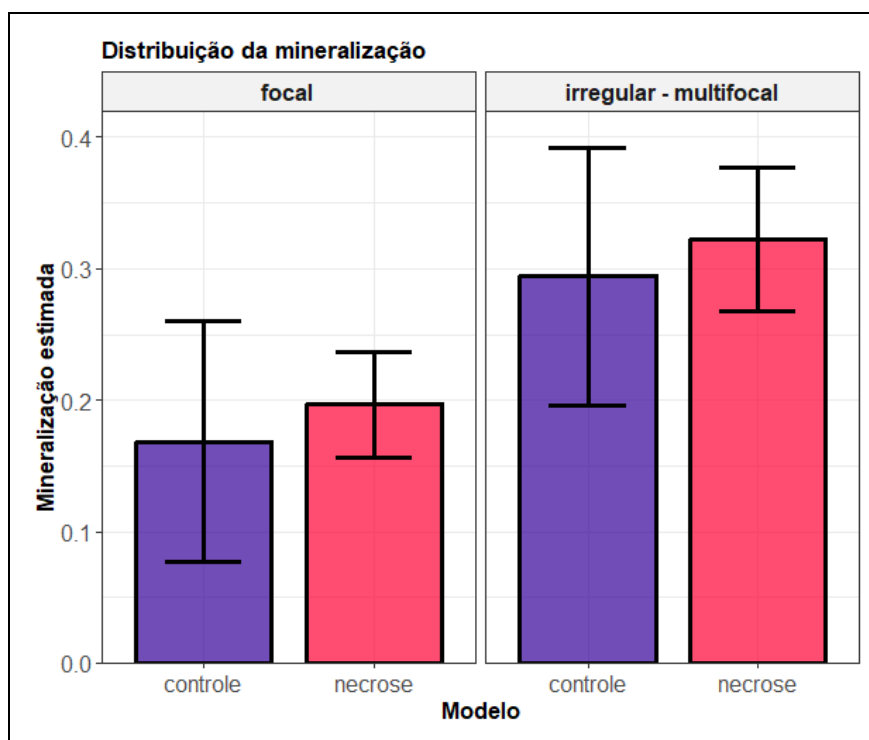
Tabela 2 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a indução de necrose avascular na cabeça do fêmur e a distribuição da mineralização influenciam na mineralização do membro

MLGM gama com ligação identidade para a mineralização					
	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança		
			Lambda	GL	p
Localização / média					
(Intercepto)	0,168341	0,046837			
Modelo: necrose x controle	0,028422	0,048184	0,29112	1	0,589504
Distrib. mineral.: multifocal x focal	0,125702	0,034013	7,391117	1	0,006555
Escala / dispersão					
(Intercepto)	1,728108	0,697075			
Modelo: necrose x controle	2,046238	0,956868	3,91837	1	0,047761

O modelo restringe-se à comparação pareada entre os membros dos indivíduos não tratados com o enxerto dentário. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna "Estimativa" informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna "Erro pad."), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, "Lambda" indica a estatística do teste, enquanto "GL" informa os graus de liberdade e "p", como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLGM = modelos lineares generalizados mistos.

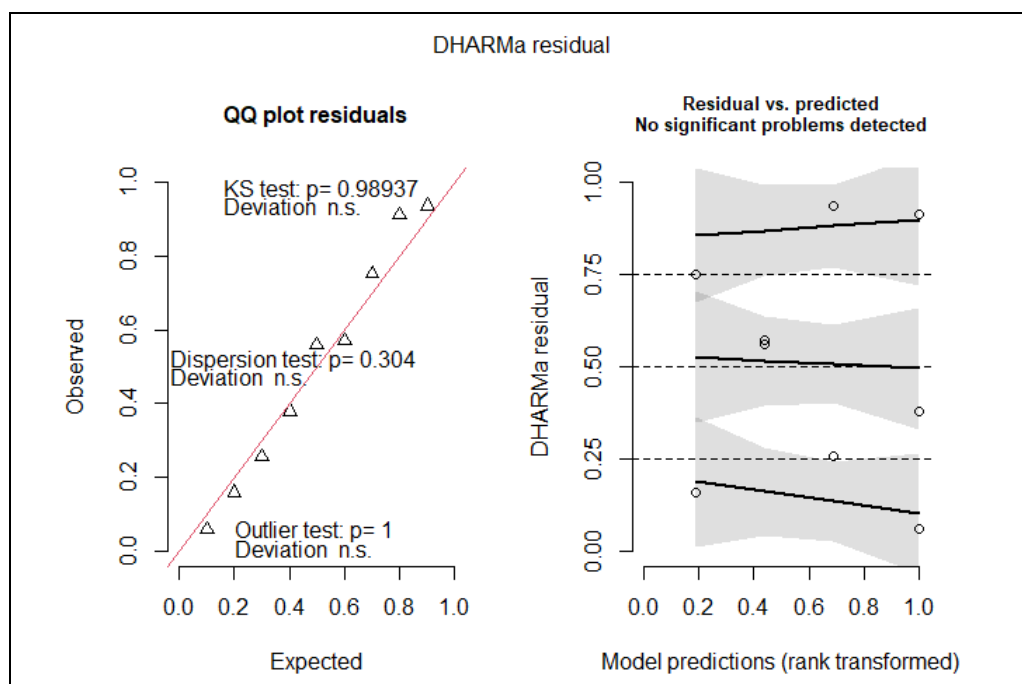
Os resultados descritos acima encontram-se ilustrados no Gráfico 3. Nesse contexto, evidencia-se uma mineralização média mais acentuada nas cabeças do fêmur com distribuição irregular-multifocal em relação aos casos de espalhamento focal desta mineralização. Além disso, é estimado que a indução de necrose avascular não afete significativamente o nível de mineralização (representado pela sua média), mas que promova a homogeneidade entre as medidas de mineralização. Por fim, convém lembrar que tais inferências remetem à comparação pareada entre os membros dos mesmos indivíduos, os quais não foram tratados com o implante de células dentárias pluripotentes.

Gráfico 3 - Tamanho dos efeitos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 2



As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com a distribuição da mineralização e indução (ou não) de necrose avascular na cabeça do fêmur. Por sua vez, as barras verticais ilustram os intervalos de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

Finalmente, o modelo definido na Tabela 2 tem a sua fidelidade na representação dos dados validada na Gráfico 4. Tal validação baseia-se, sobretudo, na análise dos resíduos, como o que sobra da mineralização observada que não pôde ser explicada pela relação entre resposta e preditores conforme descrita pelo componente sistemático, representando, assim, o erro aleatório do modelo estatístico. Nesta circunstância, ao acompanhar a sua distribuição desenvolvida em teórica (Gráfico 4A), os resíduos comprovam a concordância dos dados em relação às propriedades e suposições probabilísticas do modelo, validando, pois, a especificação do seu componente aleatório. Além disso, os resíduos decorrentes do ajuste do modelo mostraram uma dispersão qualitativamente uniforme ao longo dos valores ajustados, indicando que toda relação entre resposta e preditores foi apropriadamente contemplada pelo componente sistemático do modelo. E ainda, tal padrão indica que a representação da estrutura de variância do modelo é adequada e fiel aos dados. Desta forma, ao validar o ajuste do modelo aos dados, estende-se naturalmente esta validade às inferências sustentadas pelo modelo em questão.

Gráfico 4 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 2

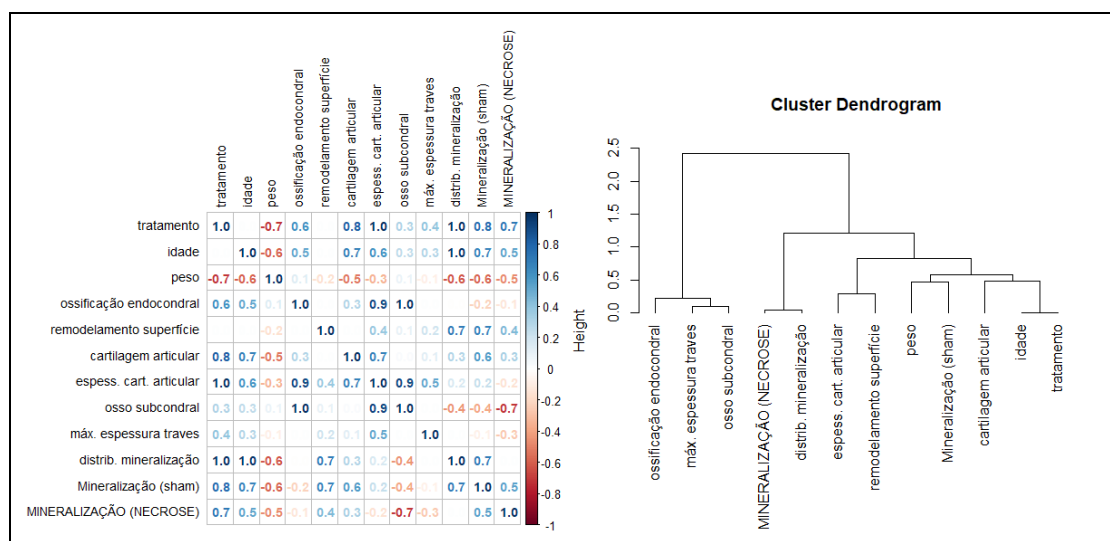
À esquerda, a distribuição observada dos resíduos decorrentes do ajuste do modelo aos dados (eixo vertical) é contraposta ao seu comportamento teórico esperado (eixo horizontal), sendo a linha unitária vermelha indicativa da condição de igualdade. À direita, os resíduos são distribuídos conforme os valores ajustados das respectivas observações.

5.2.2 Efeito do tratamento

As análises apresentadas nesta sessão remetem à comparação entre membros submetidos à necrose avascular de indivíduos diferentes, sendo alguns deles tratados com o enxerto de células dentárias pluripotentes. Nesta circunstância, sobressaem, em termos de correlação policórica (Gráfico 5A), a relação da mineralização na cabeça de fêmur necrosada com o tratamento ($\text{corr} = 0,7$) e o nível de esclerose do osso subcondral ($\text{corr} = -0,7$). Em sequência, tanto a medida de mineralização no membro contralateral poupado da necrose ($\text{corr} = 0,5$), como a idade ($\text{corr} = 0,5$) e peso ($\text{corr} = -0,5$) dos animais apresentaram uma correlação qualitativamente substancial com a mineralização na cabeça de fêmur necrosada, anda que em um grau intermediário. É digno de nota que o propósito dos coeficientes apresentados se limita à exploração dos dados, de modo que não se exime da possibilidade de tais relações serem espúrias, principalmente as de menor associação. Além disso, observa-se que a mineralização no membro necrosado apresenta maior similaridade em relação ao espalhamento desta mineralização na própria cabeça do fêmur (Gráfico 5B). Por sua vez, a distância da mineralização sob necrose mostrou-se intermediária quando comparada à espessura da cartilagem

articular, remodelamento da superfície, a mineralização do membro contralateral, o estado da cartilagem articular, o peso e idade do animal, além do tratamento (ou não) com células pluripotentes.

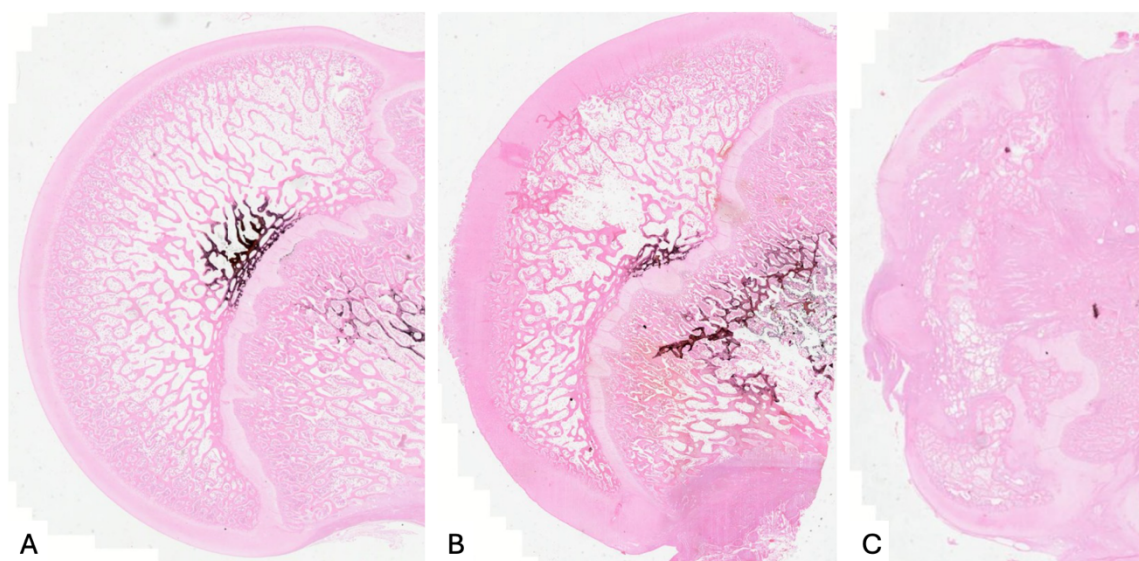
Gráfico 5 - Relação essencial entre variáveis



À esquerda, a matriz de correlação policórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

As análises de caráter exploratório detalhadas acima ajudam a direcionar as possibilidades de modelagem em coerência com os padrões de informação providos pela amostra. Após seleção e validação de modelo, ratificou-se a significância estatística do efeito do tratamento com o enxerto celular sobre a mineralização da cabeça de fêmur necrosada (Tabela 3; estimativa = 0,5754, erro pad. = 0,2516, lambda = 4,4148, GL = 1, p = 0,0356). Nesse caso, estima-se que a média do índice de mineralização aumente 77,78% após o implante de células dentárias pluripotentes em relação aos membros também com necrose induzida, porém sem a aplicação do tratamento (Figura 6). Além disso, o tratamento com enxerto celular parece associado ao aumento na variabilidade da mineralização da cabeça de fêmur com necrose avascular induzida. Ainda que o grau de evidência fornecido pela amostra seja insuficiente para confirmar a sua significância estatística (Tabela 3; estimativa = -1,2467, erro pad. = 0,8723, lambda = 1,9086, GL = 1, p = 0,1671), o efeito do tratamento sobre a dispersão da resposta foi mantido no modelo para aprimorar o seu ajuste aos dados, corrigindo um padrão sugestivo de heterocedasticidade.

Figura 6 - Imagens microscópicas de cortes histológicos corados pela coloração von Kossa (0,5x)



A: quadril esquerdo do Grupo Comparação. A epífise femoral apresenta distribuição trabecular normal e formato esférico. B: quadril direito do Grupo Comparação. A epífise femoral apresenta distribuição trabecular heterogênea e diminuída, além de perda de altura epifisária e do formato esférico. C: quadril direito do Grupo Intervenção. A epífise femoral, apesar de apresentar maior colapso, demonstra maior densidade trabecular óssea em comparação aos quadris representados nas figuras A e B.

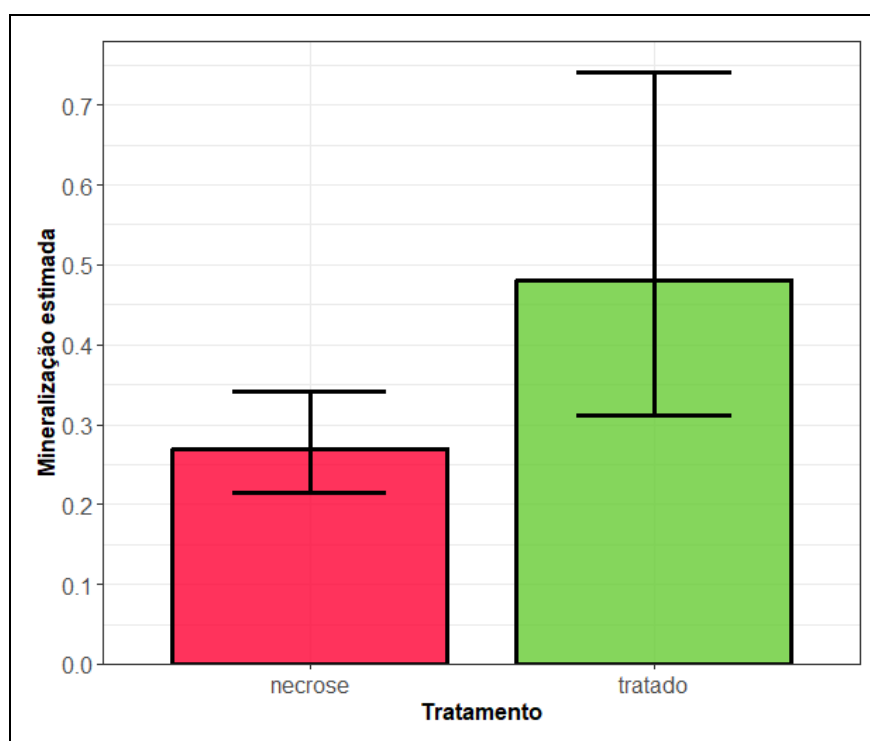
Tabela 3 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia na mineralização da cabeça do fêmur

MLG gama com ligação logarítmica para a mineralização					
	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança		
			Lambda	GL	p
Localização / média					
(Intercepto)	-1,30933	0,11889			
Tratamento: tratado x necrose	0,575365	0,251607	4,414781	1	0,035629
Escala / Dispersão					
(Intercepto)	2,649667	0,625142			
Tratamento: tratado x necrose	-1,24665	0,872256	1,908586	1	0,16712

O modelo baseia-se na comparação entre membros submetidos a necrose de indivíduos diferentes, sendo que apenas uma parte deles recebeu o tratamento. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna "Estimativa" informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna "Erro pad."), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, "Lambda" indica a estatística do teste, enquanto "GL" informa os graus de liberdade e "p", como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLG = modelo linear generalizado.

Os resultados descritos acima refletem nos valores preditos pelo modelo estatístico conforme exibido no Gráfico 6. Nesse contexto, destaca-se o aumento estimado na média da mineralização em decorrência do tratamento com o enxerto dentário nas cabeças de fêmur induzidas à necrose em comparação com os membros submetidos à mesma lesão, porém não tratados. Além disso, nota-se um aumento qualitativo na incerteza associada ao intervalo de confiança na estimativa da mineralização média do membro implantado com células pluripotentes em virtude um aparente aumento na variabilidade da resposta decorrente do tratamento.

Gráfico 6 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 3

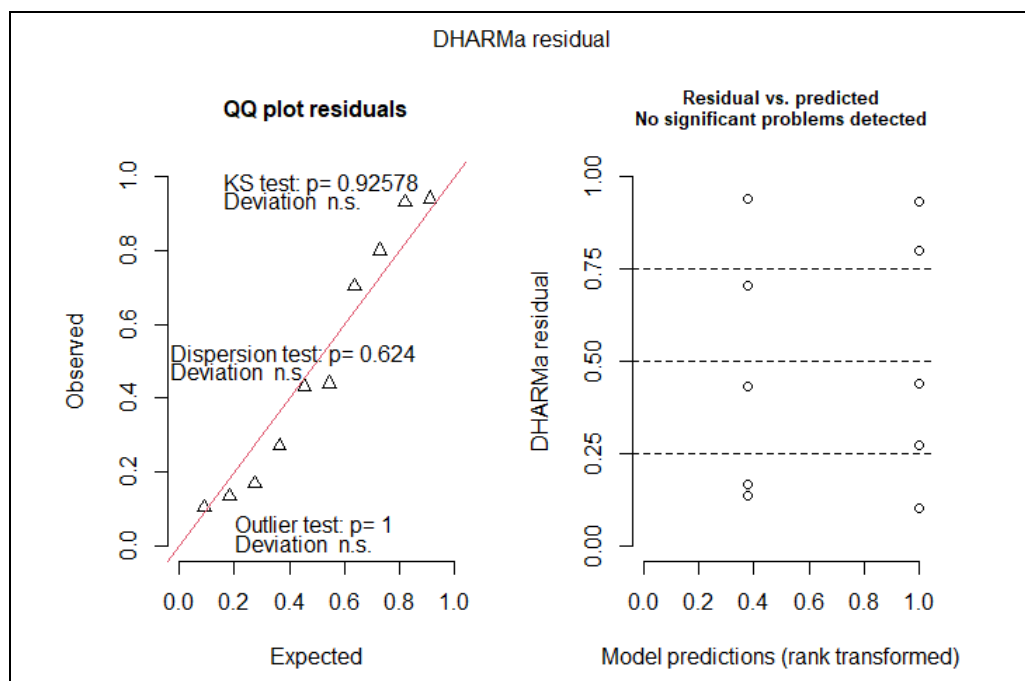


As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com o tratamento (ou não) com o enxerto de células dentárias pluripotentes. Por sua vez, as barras verticais ilustram os intervalos de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

Assim como todo modelo estatístico, o modelo especificado na Tabela 3 é composto pela combinação de dois componentes: o sistemático, que descreve a relação entre a resposta e preditores, e o aleatório, assim denominado por descrever o erro aleatório, portanto incerto. Desse modo, a validação do modelo fica condicionada à demonstração que ambos os componentes como especificados representam fielmente os dados. Ao dispersar-se de maneira uniforme ao longo dos valores ajustados (Gráfico 7B), os resíduos indicam que todo padrão na relação

entre resposta e preditores foi apropriadamente representado no componente sistemático, restando apenas ruído. Além disso, a distribuição uniforme dos resíduos sustenta que a estrutura de variância dos dados foi apropriadamente contemplada no modelo. Além disso, os resíduos apresentaram uma distribuição bastante semelhante ao seu comportamento teórico, desenvolvido sob a premissa de satisfação completa, pelos dados, das suposições e propriedades probabilísticas do modelo. Desta forma, a validação dos componentes sistemático e aleatório implica na fidedignidade da representação da informação contida na amostra pelo modelo estatístico, assegurando a validade das inferências e conclusões que sustenta.

Gráfico 7 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 3

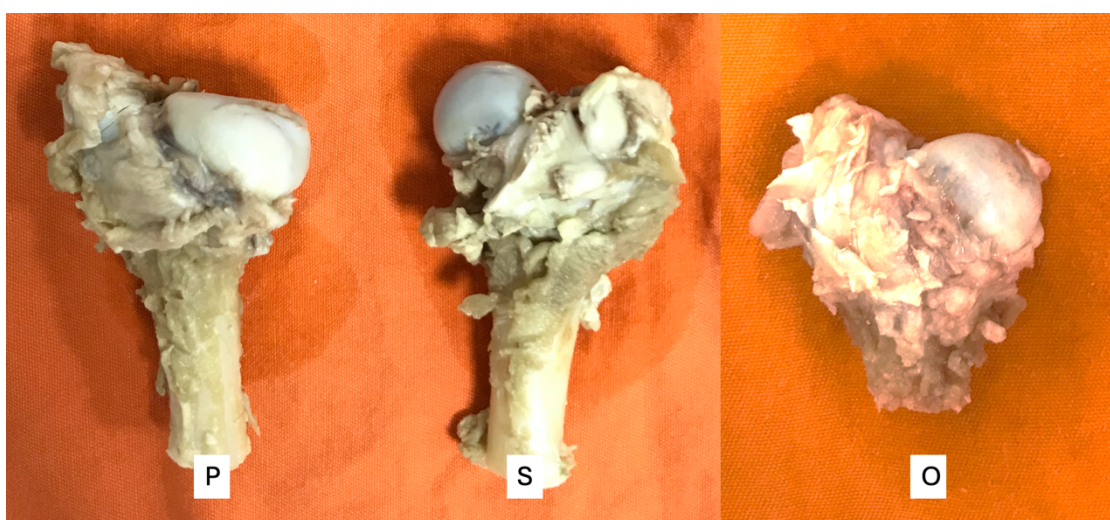


À esquerda, a distribuição observada dos resíduos decorrentes do ajuste do modelo aos dados (eixo vertical) é contraposta ao seu comportamento teórico esperado (eixo horizontal), sendo a linha unitária vermelha indicativa da condição de igualdade. À direita, os resíduos são distribuídos conforme os valores ajustados das respectivas observações.

5.3 ESFERICIDADE DA CABEÇA DO FÊMUR

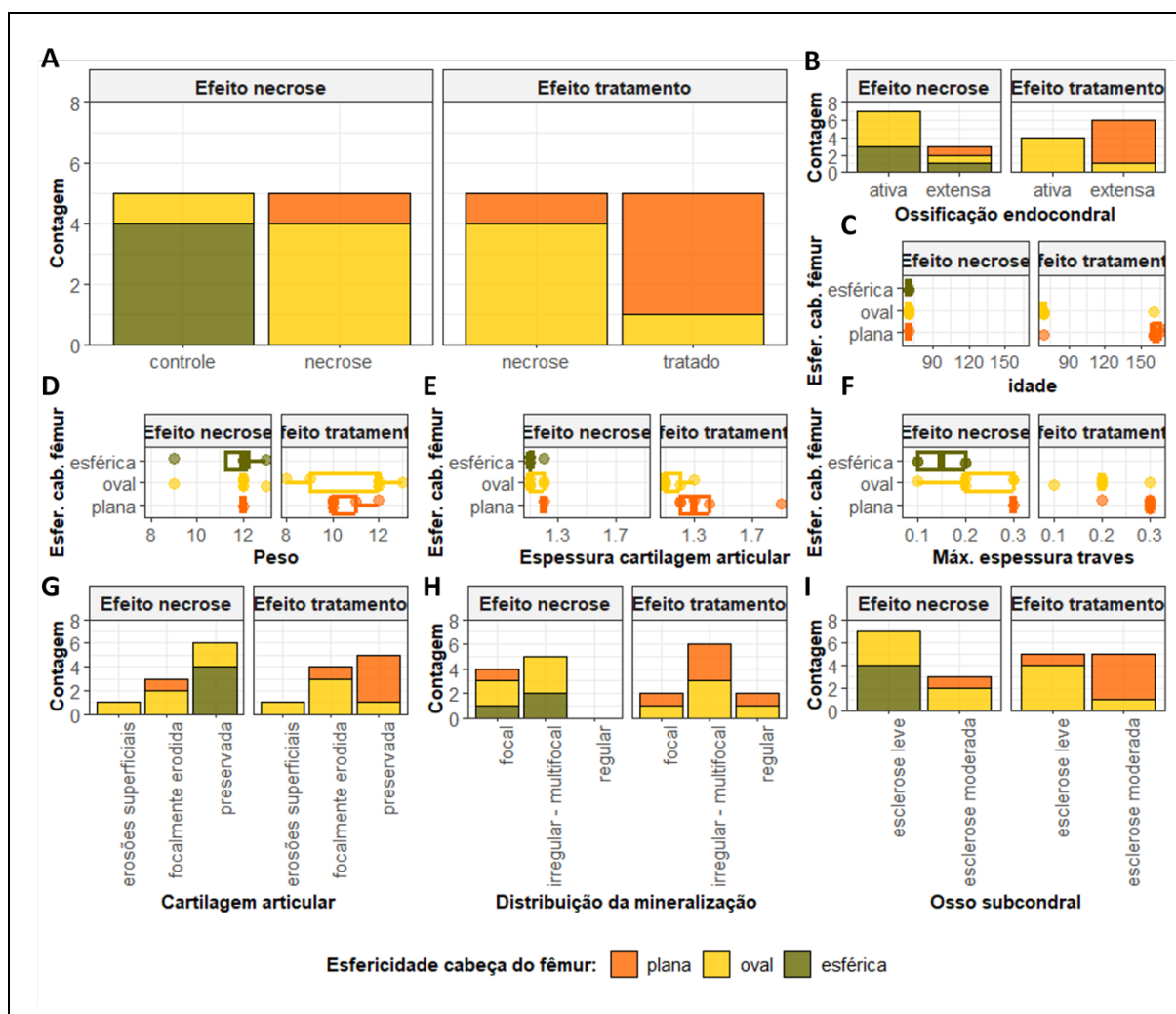
Entre os indivíduos que não receberam o tratamento com o implante de células dentárias pluripotentes, 80% das cabeças de fêmur poupadas da indução da necrose (controle) apresentaram um aspecto esférico, sendo os 20% restante representado por uma observação única, cuja cabeça do fêmur se mostrou oval. Por sua vez, a indução da necrose no membro ipsilateral desses mesmos animais repercutiu em uma aparência oval em 80% das cabeças de fêmur e um formato plano na observação restante (Gráfico 8A - Efeito necrose). Em contraste, a aplicação do enxerto de células dentárias parece associada a uma maior deformação das cabeças de fêmur induzidas à necrose, uma vez que a proporção dos casos com formato plano aumentou para 80%, acompanhado da redução da incidência do aspecto oval para um único caso (Gráfico 8A - Efeito tratamento). Em outras palavras, a maioria das cabeças de fêmur poupadas de manipulação apresentaram um formato esférico, enquanto os membros submetidos à necrose mostraram-se preponderantemente ovais quando não tratados com as células pluripotentes (Figura 7). Não obstante, o tratamento com o enxerto celular parece ter afetado ainda mais a esfericidade da cabeça do fêmur pós-necrose, sendo que, na maioria dos casos, a formato do membro mostrou-se plano.

Figura 7 - Avaliação qualitativa macroscópica do formato da cabeça femoral



P: cabeça femoral plana. S: cabeça femoral esférica. O: cabeça femoral oval. Fonte: arquivo pessoal do Dr. Luiz Renato Agrizzi de Angeli.

Gráfico 8 - Distribuição da esfericidade da cabeça do fêmur conforme a indução da osteonecrose avascular, o tratamento com o enxerto de células dentárias pluripotentes e demais características biológicas não controladas



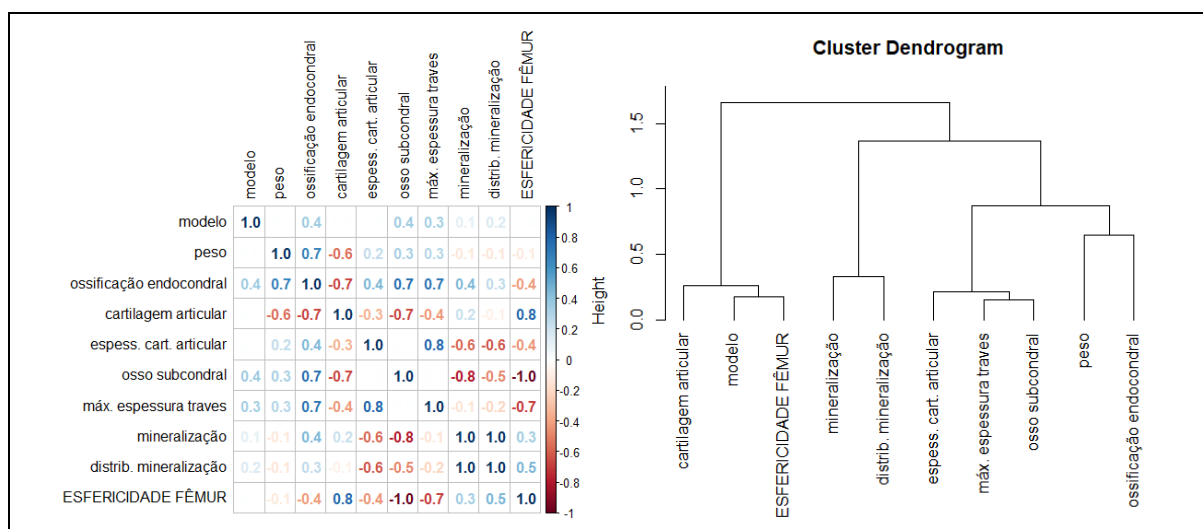
Nos painéis identificados como “Efeito necrose”, as cabeças de fêmur submetidas à necrose são comparadas ao respectivo membro contralateral (controle) dos indivíduos que não receberam o enxerto de células dentárias (i.e., comparação pareada). Por sua vez, o subplot intitulado “Efeito do tratamento” avalia o desfecho da aplicação das células pluripotentes nas cabeças de fêmur com osteonecrose (tratado) em comparação aos membros necrosados dos outros animais que não receberam o enxerto celular (necrose - comparação não pareada). Os diagramas de caixa têm, nas linhas verticais, a representação do primeiro, segundo (ou mediana) e terceiro quartil, enquanto as linhas horizontais ilustram os limites esperados da distribuição.

Em seguida, foram avaliadas as possíveis interferências por características biológicas não controladas. Nesse contexto, não há indícios contundentes de que a ossificação endocondral possa distorcer a apreciação do efeito da necrose, uma vez que a distribuição da esfericidade parece qualitativamente semelhante independentemente do nível da ossificação (Gráfico 8B - Efeito necrose). Por outro lado, percebe-se um desequilíbrio maior associado à ossificação endocondral no caso da avaliação do efeito do tratamento, uma vez que todas as observações com ossificação ativa restrita apresentaram formato oval de cabeça de fêmur, enquanto o

aspecto mostrou-se plano em 83,33% dos casos com ossificação ativa extensa (Gráfico 8B - Efeito tratamento). No que se refere à idade (Gráfico 8C) e peso dos animais (Gráfico 8D) e espessura da cartilagem articular (Gráfico 8E), parece não haver indicativo de que estas características interfiram implicitamente nem no efeito da necrose, nem do tratamento, já que os dados sugerem independência, ao menos em termos qualitativos, em relação à esfericidade da cabeça do fêmur. Em sequência, nota-se alguma conexão entre a esfericidade da cabeça do fêmur e a máxima espessura das traves (Gráfico 8F). Ainda que baseada em tamanho amostral reduzido e potencialmente espúrio, a máxima espessura das traves predominante parece aumentar, à medida que a cabeça do fêmur se torna menos esférica. Por sua vez, o estado da cartilagem articular parece desempenhar uma relação dúbia com a esfericidade da cabeça do fêmur a depender do contexto. Entre os indivíduos que não foram tratados com o enxerto celular, a preservação da cartilagem aparenta estar associada à maior esfericidade do membro (Gráfico 8G - Efeito necrose), ao passo que a relação parece se inverter no subconjunto dos membros necrosados: quanto mais preservada a cartilagem, mais plana tende a ser a cabeça do fêmur (Gráfico 8G - Efeito tratamento). Por sua vez, a distribuição da mineralização aparenta não interferir na esfericidade da cabeça do fêmur. Tanto no subconjunto não tratado com o enxerto de células pluripotentes (Gráfico 8H - Efeito necrose) como entre os membros submetidos à necrose avascular (Gráfico 8H - Efeito tratamento) a proporção de cada condição de esfericidade manteve-se constante ao longo dos níveis da distribuição da mineralização. Por fim, os indícios providos pela amostra levantam suspeita de que um agravamento da esclerose do osso subcondral esteja associado a uma diminuição da esfericidade da cabeça do fêmur.

5.3.1 Efeito da necrose

Quando avaliadas ambas as articulações no subconjunto dos indivíduos não tratados com o enxerto dentário, notaram-se correlações (policóricas) expressivas da esfericidade da cabeça do fêmur em relação ao grau de esclerose do osso subcondral (Gráfico 9A, $\text{corr} = -1,0$), ao estado da cartilagem articular (Gráfico 9A, $\text{corr} = 0,8$) e a máxima espessura das traves (Gráfico 9A, $\text{corr} = -0,7$). Ainda que em um grau intermediário, a distribuição da mineralização (Gráfico 9A, $\text{corr} = 0,5$), a ossificação endocondral (Gráfico 9A, $\text{corr} = -0,4$) e a espessura da cartilagem articular ($\text{corr} = -0,4$) também mostraram alguma relação com a esfericidade da cabeça do fêmur, pelo menos em termos de correlação policórica no subconjunto de dados em questão. Convém lembrar, no entanto, que a correlação se limita a mensurar a relação entre um par de variáveis, sendo, portanto, particularmente sensível ao viés por variáveis confundidoras. Por exemplo, ao quantificar a correlação entre a distribuição da mineralização e a esfericidade da cabeça do fêmur, ignora-se a influência subjacente da indução da necrose, que acaba confundindo (ou enviesando) a sumarização da relação do par supracitado. Ainda mais em um contexto de tamanho de amostra reduzido, qualquer oscilação nos níveis das variáveis, mesmo que seja por acaso, repercute em expressiva mudança na magnitude do coeficiente de correlação. Diante de tantos riscos, a correlação acaba desempenhando uma função mais exploratória, como suporte na orientação da modelagem estatística. Contudo, o padrão das relações sumarizadas na matriz de correlações não foi completamente ratificado no dendrograma das distâncias entre as variáveis (ou grupo delas - Gráfico 9B). Nesse contexto, percebe-se que a esfericidade da cabeça do fêmur é mais similar em relação ao modelo experimental (indução – ou não – da osteonecrose avascular), seguido do estado da cartilagem articular.

Gráfico 9 - Relação essencial entre variáveis

À esquerda, a matriz de correlação policórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

Não obstante, o teste do efeito da indução da osteonecrose sobre a esfericidade da cabeça do fêmur tendeu a determinismo: nenhuma das cabeças de fêmur submetidas à osteonecrose apresentou formato esférico, enquanto esse padrão foi observado em quatro dos cinco membros (80%) poupados da lesão avascular (Tabela 4). Nesta circunstância, convém esclarecer que a baixa incidência de formatos planos da cabeça do fêmur (apenas um caso) acabou por impor a dicotomização das categorias desta resposta como esférica ou não esférica. Nesse cenário de aproximado determinismo, quase não há variabilidade para sustentar a teoria probabilística e os métodos estatísticos de quantificação da incerteza acabam funcionando precariamente, a exemplo da estimativa do intervalo de confiança para a razão de chances da associação entre a indução da osteonecrose e a esfericidade da cabeça do fêmur, o qual tendeu ao infinito (Tabela 4; teste exato de Fischer: $p = 0,0476$). Além disso, o ajuste do modelo estatístico paramétrico para descrever a relação entre estas variáveis também resultou na estimativa inflacionada do erro padrão do estimador (Tabela 5; erro pad. = $3,012e7$), inviabilizando o cálculo de intervalo de confiança para valores preditos (Gráfico 10). Mesmo assim, foi confirmada a significância estatística do efeito do modelo experimental sobre a esfericidade da cabeça do fêmur (Tabela 5; estimativa = 39,8931, $\lambda = 8,4562$, $GL = 1$, $p = 0,0036m$). Nesse sentido, estima-se que a chance de uma cabeça de fêmur não esférica seja de 25% entre os membros poupados da osteonecrose e que

tal chance aumente 17 vezes entre as cabeças de fêmur submetidas a necrose avascular, evidenciando novamente a alusão do determinismo nos métodos estatísticos.

Tabela 4 - Contagem dos casos conforme as categorias combinadas de modelo experimental (i.e., indução, ou não, da osteonecrose) e formato da cabeça do fêmur, seguida do teste não paramétrico de Fisher e estimativa do intervalo de 95% de confiança para a respectiva razão de chances

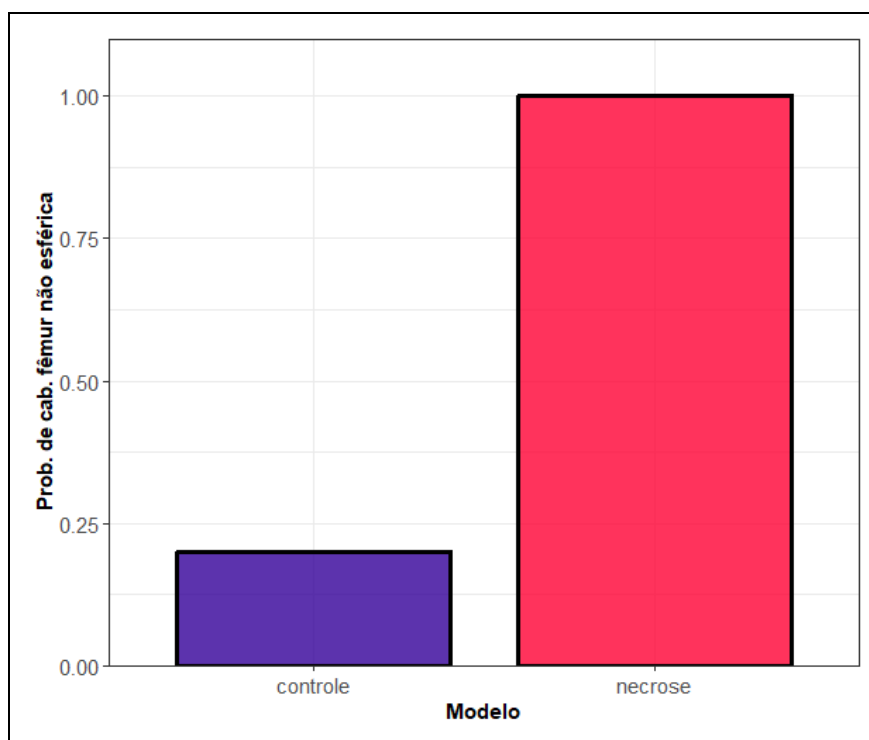
Tabela de contingência					
Esfericidade da cabeça do fêmur	Modelo		Teste exato de Fisher		
	controle	necrose	IC inferior	IC superior	p-valor
Esférica	4	0	1,0248	Inf	0,0476
Não esférica	1	5			

Tabela 5 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o modelo experimental (i.e., indução, ou não, da osteonecrose) influencia na esfericidade da cabeça do fêmur

MLGM logístico para a esfericidade da cabeça do fêmur					
	Estimativa	Erro pad.	Lambda	GL	p
(Intercepto)	-1,38629	1,118034			
modelo: necrose x controle	39,89314	30011996	8,456209	1	0,003638

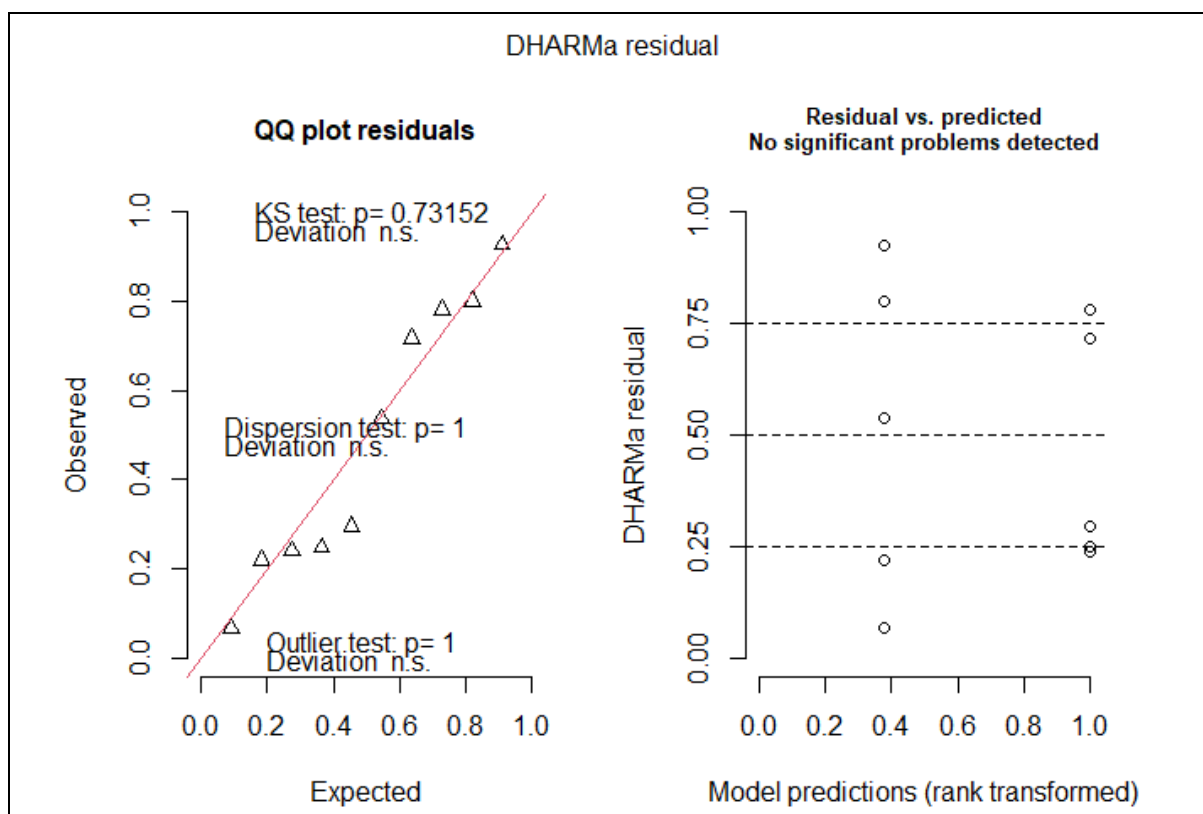
O modelo baseia-se na comparação entre ambos os membros dos mesmos animais que não receberam o tratamento celular. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna "Estimativa" informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna "Erro pad."), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, "Lambda" indica a estatística do teste, enquanto "GL" informa os graus de liberdade e "p", como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLGM = modelos lineares generalizados mistos.

Em sequência, o Gráfico 10 ilustra o tamanho do efeito da indução da necrose por meio dos valores preditos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 5. Nesse caso, a probabilidade de uma cabeça de fêmur não esférica entre os membros poupados da lesão avascular foi estimada em 20%, enquanto as cabeças de fêmur submetidas à necrose tem 100% de probabilidade estimada de desenvolver esse mesmo formato, ratificando a análise exploratória. No entanto, cabe lembrar que as inferências descritas acima limitam-se ao subconjunto de ambas as cabeças de fêmur dos animais que não receberam o tratamento com o enxerto de células dentárias pluripotentes.

Gráfico 10 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 4

As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com a indução (ou não) de necrose avascular na cabeça do fêmur. Foram omitidas as medidas de quantificação de incerteza, uma vez que a estimativa do erro padrão do estimador foi inflacionada no contexto de proximidade ao determinismo.

Para validação do modelo, como especificado na Tabela 5, demonstra-se que a distribuição dos seus resíduos se aproxima suficientemente do comportamento teórico esperado sob a premissa de conformidade completa das propriedades e suposições probabilísticas do modelo (Gráfico 11A). Além disso, não parece ter sobrado nenhuma estrutura nos resíduos quando distribuídos ao longo dos valores ajustados (Gráfico 9B), indicando que a relação entre resposta e preditor foi representada pelo modelo estatístico em sua totalidade. Contudo, o espalhamento dos resíduos chega a sugerir um padrão de afunilamento (Gráfico 9B), levantando suspeita de uma heterocedasticidade não incorporada na estrutura da variância assumida pelo modelo. No entanto, em um contexto de tamanho amostral reduzido, não houve informação suficiente para representar tal oscilação na variabilidade. Mas por outro lado, esta mesma concisão de informação acaba limitando as evidências de que tal padrão não seja ao acaso. De fato, se não fosse por um ou dois resíduos mais extremos, qualquer indício de heterocedasticidade passaria despercebido.

Gráfico 11 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 5

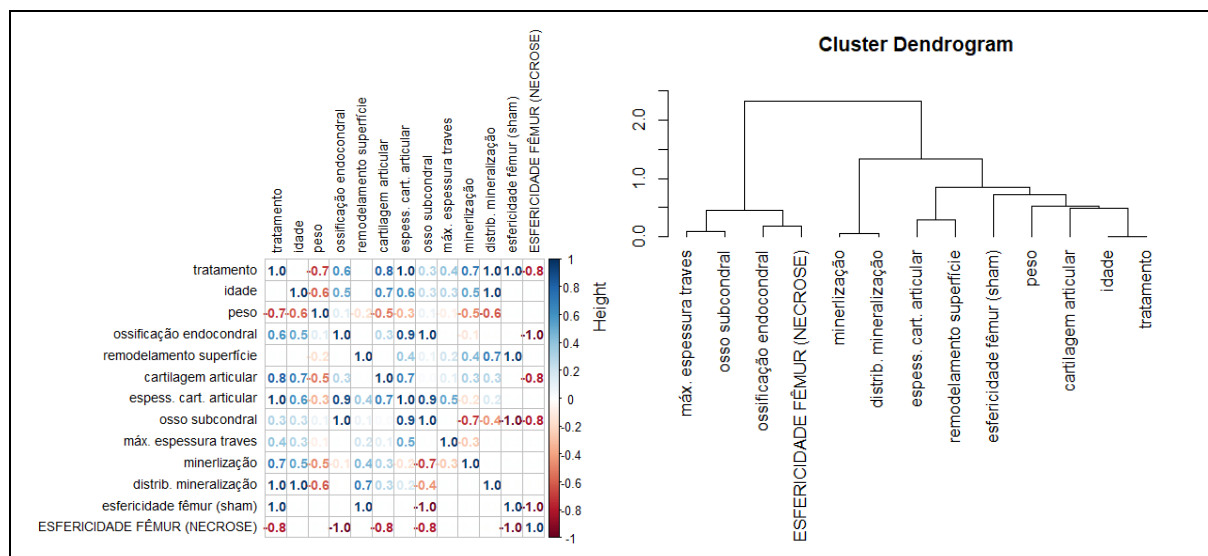
À esquerda, a distribuição observada dos resíduos decorrentes do ajuste do modelo aos dados (eixo vertical) é contraposta ao seu comportamento teórico esperado (eixo horizontal), sendo a linha unitária vermelha indicativa da condição de igualdade. À direita, os resíduos são distribuídos conforme os valores ajustados das respectivas observações.

5.3.2 Efeito do tratamento

Nesta sessão, as análises restringem-se aos membros submetidos à osteonecrose avascular, com particular ênfase à comparação não pareada quanto a aplicação (ou não) do tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes. Nesse contexto, observa-se que grande parte das correlações (policóricas) com a esfericidade da cabeça do fêmur não puderam ser calculadas, enquanto todos os coeficientes acessíveis mostraram-se bastante expressivos (Gráfico 12A). Assim, a esfericidade da cabeça do fêmur mostrou-se mais correlacionada com a ossificação endocondral ($\text{corr} = -1,0$), com o formato do membro contralateral (não manipulado; $\text{corr} = 1,0$), com o tratamento com o enxerto dentário, com a cartilagem articular e com o grau de esclerose do osso subcondral (todos com $\text{corr} = -0,8$). Por outro lado, a generalização destas relações em termos da distância matemática mostrou-se mais exequível, porém resultando em uma ratificação apenas parcial do cenário descrito pela matriz de correlações. No caso, a esfericidade da cabeça do fêmur

pós-osteonecrose mostrou-se mais similar à ossificação endocondral, seguida da máxima espessura das traves e do grau de esclerose do osso subcondral. Vale lembrar que tais análises não extrapolam a exploração especulativa dos dados sem qualquer controle de incerteza, de modo que não se exime da possibilidade de serem creditadas ao acaso.

Gráfico 12 - Relação essencial entre variáveis



À esquerda, a matriz de correlação policórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

Sob orientação da análise exploratória detalhada acima, foram propostos modelos estatísticos compatíveis com o plano experimental empregado. Depois de selecionados, apenas os modelos validados foram utilizados para embasar as inferências a partir dos dados. Nesse contexto, o efeito do tratamento com enxerto dentário mostrou-se estatisticamente significativo para que a cabeça femoral seja plana (Tabela 6; estimativa = -2,7726, erro pad. = 1,5811, lambda = 3,8549, GL = 1, p = 0,0496, poder = 0,6804). No caso, estima-se que o implante de células pluripotentes reduza em 93,75% a chance de a cabeça de fêmur ser oval em relação ao membro pós-necrose, porém não tratado com o enxerto dentário. Tal efeito é ilustrado na Gráfico 13, que apresenta uma probabilidade de cabeça de fêmur oval estimada em 80% para os membros submetidos a osteonecrose, mas excluídos do tratamento celular. Por sua vez, as cabeças de fêmur que receberam o enxerto dentário pluripotente após a indução da necrose têm 20% de probabilidade estimada de desenvolver um formato oval e conseqüentemente 80% de apresentar um

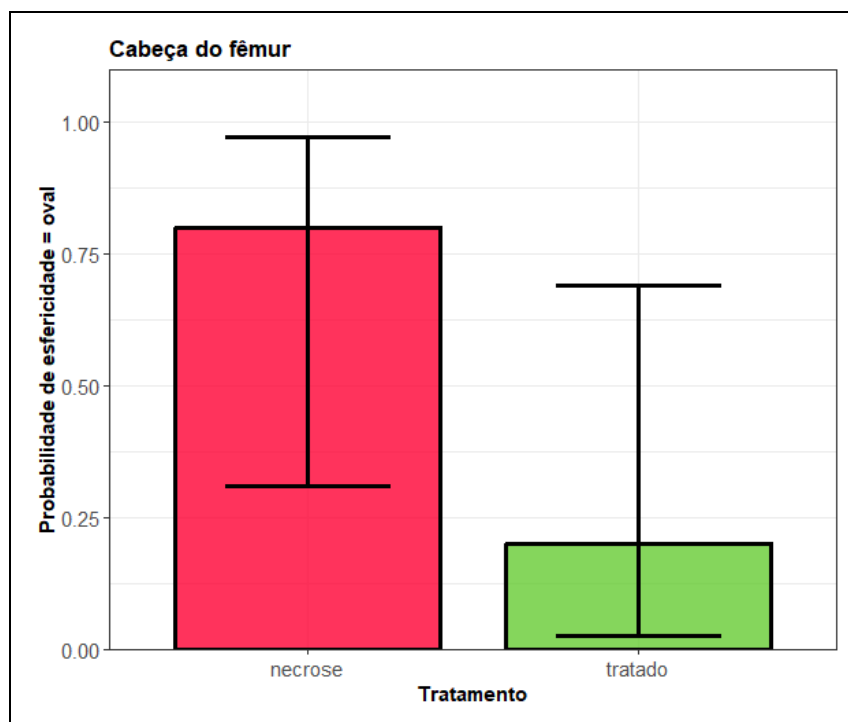
aspecto plano. Convém lembrar que o subconjunto dos dados que sustenta as análises descritas acima é desprovido de observações com formato esférico, de modo que as chances calculadas se referem a quantas vezes a probabilidade de uma cabeça de fêmur oval excede a probabilidade de um padrão plano.

Tabela 6 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia na esfericidade da cabeça do fêmur

	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança			Monte Carlo
			Lambda	GL	p	power
(Intercepto)	1,386294	1,118034				
Tratamento: tratado x necrose	-2,77259	1,581138	3,8549	1	0,0496	0,6804

O modelo baseia-se na comparação entre membros submetidos a necrose de indivíduos diferentes, sendo que apenas uma parte deles recebeu o tratamento. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna "Estimativa" informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna "Erro pad."), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, "Lambda" indica a estatística do teste, enquanto "GL" informa os graus de liberdade e "p", como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLG = modelo linear generalizado.

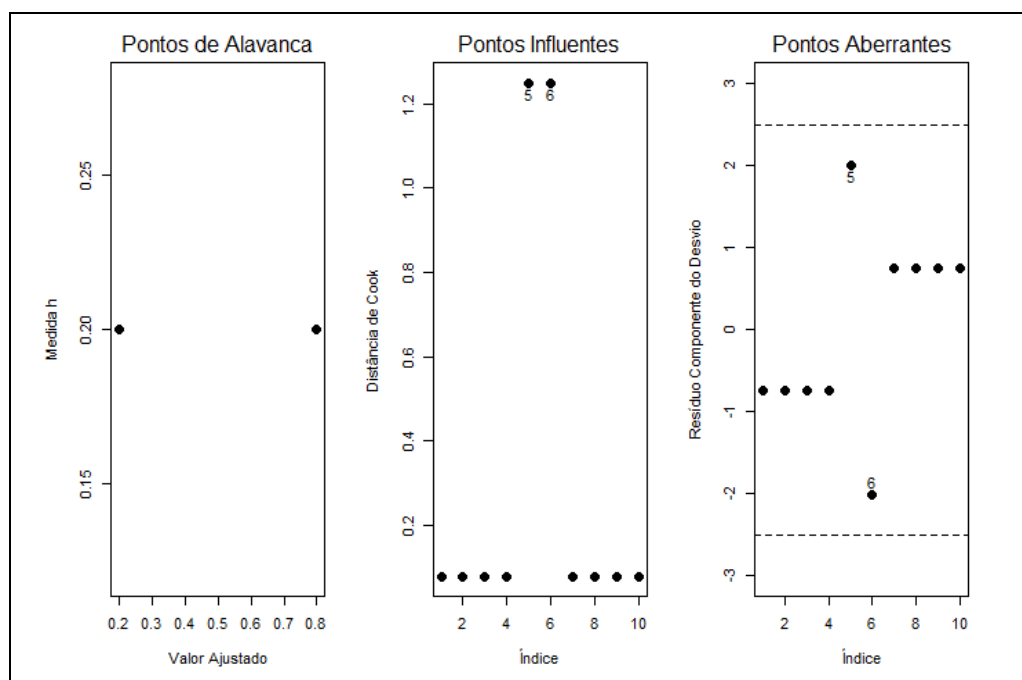
Gráfico 13 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 6



As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com o tratamento (ou não) com enxerto de células dentárias pluripotentes. Por sua vez, as barras verticais ilustram os intervalos de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

A validação do modelo especificado na Tabela 6 inicia-se pela avaliação das medidas de diagnóstico referentes ao seu ajuste aos dados. Nesse sentido, nota-se que as observações dispõem de quantidade de informação semelhante para se estimar o próprio valor predito (Gráfico 14A). Esta característica decorre da simplicidade do modelo, que conta com apenas um preditor, e do plano experimental, que aleatorizou tal fator em dois níveis balanceados em termos de tamanho de amostra. Em outras palavras, tanto o grupo tratado como o necrose contam com cinco observações, de modo que a predição do valor esperado em cada uma destas condições dispõe da mesma quantidade de informação. Em seguida, identificam-se duas observações (#5 e #6, conforme o índice na base de dados) como preponderantes na estimativa dos coeficientes do modelo, portanto na inferência do efeito do tratamento (Gráfico 14B). No caso, esses pontos exerceram maior influência na estimativa do modelo por apresentar uma condição de esfericidade da cabeça de fêmur mais discrepante do estimado pelo modelo a partir do padrão geral dos dados, porém ainda contemplado pelo acaso dimensionado pelo modelo (Gráfico 14C).

Gráfico 14 - Medidas diagnósticas descrevendo a definição do modelo (Tabela 6) a partir dos dados



A medida h (nos Pontos de Alavanca) informa a quantidade de informação disponível para se estimar o valor predito da resposta em cada observação e deriva da proximidade das observações quanto à configuração dos preditores. No gráfico de Pontos Influentes, a distância de Cook quantifica a influência de cada observação sobre as estimativas dos coeficientes do modelo. Por fim, o gráfico dos Pontos Aberrantes, apresentam a compatibilidade entre os valores predito a partir do modelo e o nível da resposta observado para cada ponto.

Para se avaliar a dimensão do viés potencialmente provocado pelas observações mais influentes (segundo as respectivas distâncias de Cook), reproduzimos sequencialmente o ajuste de um modelo análogo, porém desconsiderando cada uma das observações influentes individualmente. Desta forma, percebe-se que a remoção tanto da observação #5 como da #6 aumentam a magnitude, em termos absolutos, do coeficiente que descreve o efeito do tratamento (Tabela 7). Como resultado, o risco de falso positivo (i.e., p-valor) reduz, em ambas as situações para 0.0067 (Tabela 7). Ao se examinar as observações influentes, constata-se que são as únicas observações que contrastam do formato de cabeça de fêmur geral na mesma condição (Tabela 8). A observação #5, apesar da baixa probabilidade estimada (20%), refere-se ao único membro tratado com enxerto dentário a apresentar um aspecto oval. Por sua vez, a observação #6 consiste na única cabeça de fêmur necrosada e excluída do tratamento a apresentar um formato plano, ainda que a inferência estatística prediga um aspecto oval com 80% de probabilidade. Assim, a remoção de qualquer uma das observações influentes aproxima os dados do determinismo e torna o efeito do tratamento ainda mais inquestionável. Conclui-se, então, que o viés exercido por estas observações mais influentes se manifesta no sentido de reduzir o tamanho do efeito do tratamento e, portanto, não alteram a significância do seu efeito.

Tabela 7 - A análise confirmatória consiste na reprodução do ajuste do modelo (definido na Tabela 6)

Coeficiente	Análise confirmatória para a esfericidade da cabeça do fêmur (razão de verossimilhança)					
	Estimativas			p-valores		
	original	delta 5	delta 6	original	5	6
Tratamento: tratado x necrose	-2,77259	6,557	6,557	0,0496	0,0067	0,0067

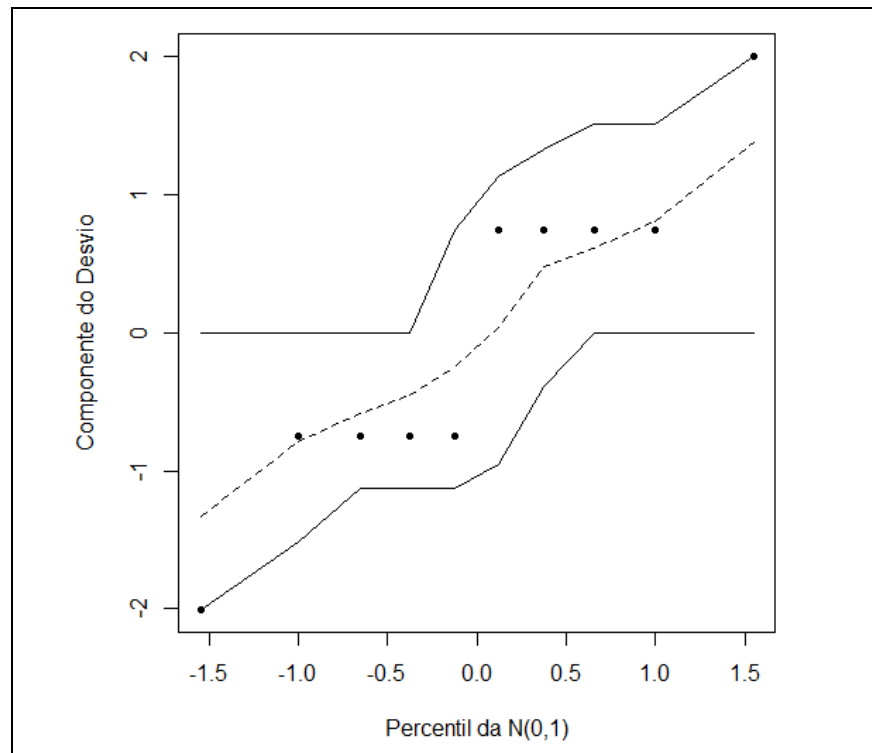
A repercussão da remoção de cada observação sobre o coeficiente do modelo é apresentada em termos proporcionais em relação à magnitude original e é exibida sob o rótulo “Estimativas”, na coluna intitulada por “delta” seguido da identificação da observação conforme o índice na base de dados. Por sua vez, o risco de falso positivo após a remoção de cada ponto influente é especificado na coluna identificada pelo índice da observação e comparado ao risco original sob o cabeçalho de “p-valores”.

Tabela 8 - Descrição dos pontos relativamente influentes conforme a Gráfico 14

Índice	Tratamento	Observações influentes	
		Esfericidade da cabeça do fêmur	Prob (esferic. = oval)
5	tratado	oval	0,2
6	necrose	plana	0,8

O modelo (como especificado na Tabela 6) é finalmente validado na Gráfico 15, a qual demonstra que a divergência observada no comportamento dos resíduos em relação ao preconizado teoricamente é adequadamente contemplado pelo componente aleatório do modelo.

Gráfico 15 - Envelope da distribuição dos resíduos provenientes do ajuste do modelo (Tabela 6) aos dados delimitada pela respectiva banda de confiança



Além do efeito do tratamento, a amostra forneceu evidências suficientes para ratificar a significância estatística da associação entre o grau de esclerose do osso subcondral e a esfericidade da cabeça do fêmur (Tabela 9; estimativa = -2,7726, erro pad. = 1,5811, lambda = 3,8549, GL = 1, p = 0,496, poder = 0,6872). Nesse contexto, estima-se que a chance de uma cabeça de fêmur necrosada apresentar um formato oval (em detrimento a um aspecto plano) diminui 93,75% nos casos com esclerose moderada do osso subcondral em relação à ocorrência leve. Não obstante, a concisão da amostra não dispõe de informação suficiente para que o efeito do tratamento seja testado simultaneamente à associação com o estado do osso subcondral em um mesmo modelo, de modo que a estimativa do efeito de um preditor seja controlado pela influência do outro. Desta forma, o dimensionamento da associação entre o grau de esclerose do osso subcondral e a esfericidade da

cabeça do fêmur permanece enviesada pelo efeito implícito do tratamento, cuja influência corroborada sobre o formato do membro permanece subjacente.

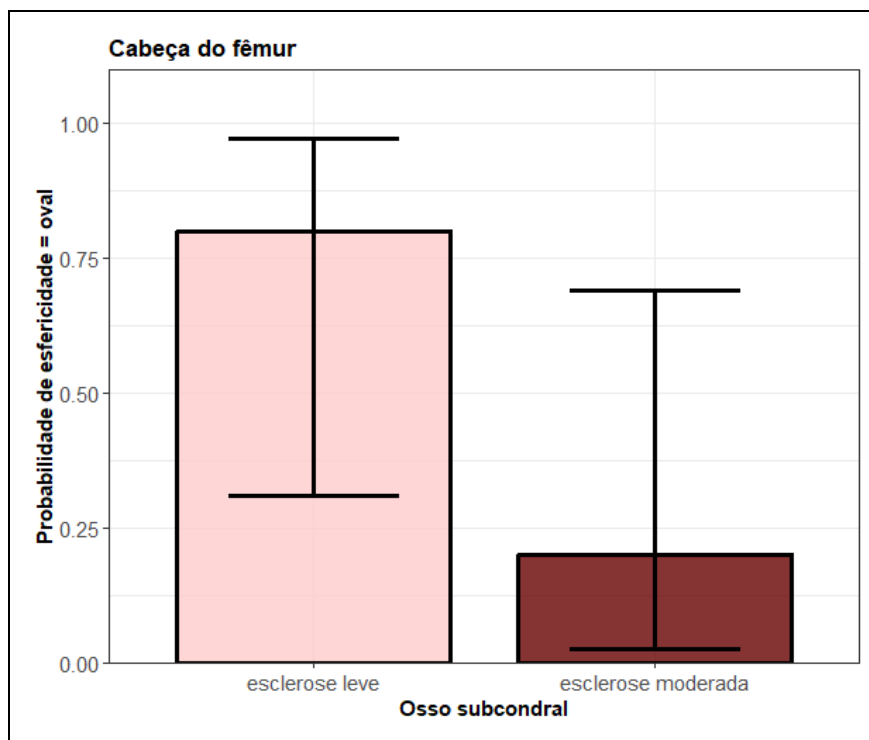
Tabela 9 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a esclerose subcondral influencia na esfericidade da cabeça do fêmur

MLG logístico para a esfericidade da cabeça do fêmur							
	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança			Monte Carlo power	
			Lambda	GL	p		
(Intercepto)	1,386294	1,118034					
Osso subcondral: esclerose moderada x leve	-2,77259	1,581138	3,8549	1	0,0496	0,6872	

O modelo baseia-se na comparação entre membros submetidos a necrose de indivíduos diferentes, sendo que apenas uma parte deles recebeu o tratamento. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna "Estimativa" informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna "Erro pad."), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, "Lambda" indica a estatística do teste, enquanto "GL" informa os graus de liberdade e "p", como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLG = modelo linear generalizado.

De todo modo, a associação entre o grau de esclerose do osso subcondral e a esfericidade da cabeça do fêmur é representada no Gráfico 16. Nesse cenário, estima-se que a probabilidade de uma cabeça de fêmur submetida a necrose avascular apresentar um formato oval seja de 80% quando acompanhada de um grau leve de esclerose do osso subcondral. De maneira complementar, as observações em tais condições apresentam um risco estimado em 20% de um padrão plano. Por sua vez, as articulações induzidas à necrose, mas com esclerose moderada do osso subcondral, têm apenas 20% de probabilidade estimada de desenvolver um formato oval da cabeça do fêmur e 80% de risco de apresentar o membro com aspecto plano.

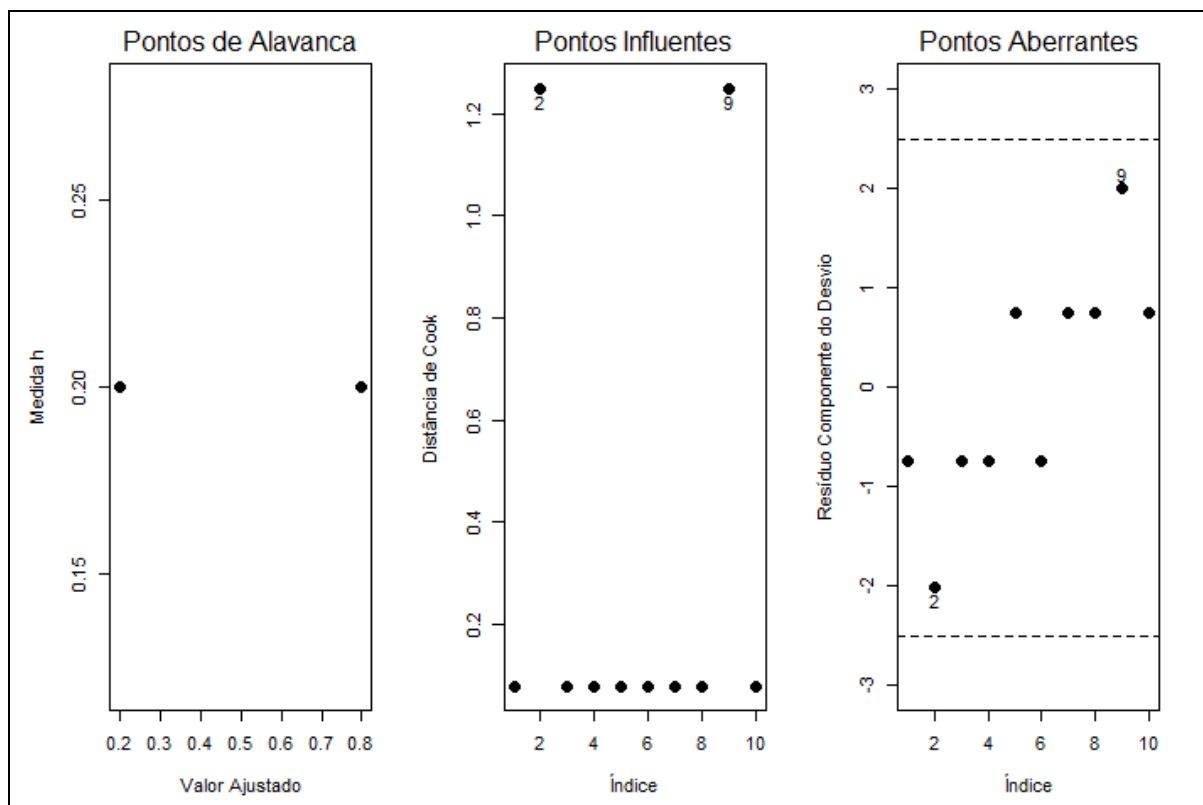
Gráfico 16 - Tamanho dos efeitos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 9



As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com o nível de esclerose do osso subcondral. Por sua vez, as barras verticais ilustram os intervalos de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

Em seguida, apresentam-se as medidas diagnósticas do modelo especificado na Tabela 9 para fins de validação do ajuste e da inferência sustentada por ele. De início, nota-se que a disponibilidade de informação para estimar o próprio valor predito é semelhante para cada observação (Gráfico 17A). Isso ocorre, uma vez que o modelo dispõe de apenas um predito binário, cujos níveis apresentaram a mesma incidência na presente amostra. No entanto, duas observações se destacaram quanto à influência sobre a estimativa dos coeficientes do modelo: #2 e #9, conforme o índice na base de dados (Gráfico 17B). Como são justamente esses coeficientes - que definem o modelo em função do tamanho do efeito, observações com influência desproporcional podem induzir viés na inferência das relações entre variáveis. Apesar de todos os pontos apresentarem a mesma alavanca, as observações #2 e #9 acabaram mostrando uma influência maior por apresentarem um formato de cabeça de fêmur mais discrepante do padrão da sua condição, conforme compreendido pelo modelo por meio da decodificação da informação provida pela amostra (Gráfico 17C).

Gráfico 17 - Medidas diagnósticas descrevendo a definição do modelo (Tabela 9) a partir dos dados.



A medida h (nos Pontos de Alavanca) informa a quantidade de informação disponível para se estimar o valor predito da resposta em cada observação e deriva da proximidade das observações quanto à configuração dos preditores. No gráfico de Pontos Influentes, a distância de Cook quantifica a influência de cada observação sobre as estimativas dos coeficientes do modelo. Por fim, o gráfico dos Pontos Aberrantes, apresentam a compatibilidade entre os valores preditos a partir do modelo e o nível da resposta observado para cada ponto.

Uma vez identificados os pontos relativamente mais influentes sobre a estimativa dos coeficientes do modelo (segundo a respectiva distância de Cook - Gráfico 17B), faz-se necessário dimensionar a extensão do eventual viés provocado por tais observações. Para isso, comparamos o modelo original à reprodução do ajuste de um modelo análogo, porém desconsiderando individualmente cada um dos pontos influentes. Nesse contexto, percebe-se que tanto a eliminação da observação #2 como da #9 aumentam, em termos absolutos, o coeficiente que quantifica a associação entre o grau de esclerose do osso subcondral e a esfericidade da cabeça de fêmur pós-necrose (Tabela 10). Por conseguinte, a probabilidade de a associação ser explicada pelo acaso (i.e., p-valor) se tornou ainda menor, $p = 0,0067$ para ambos os casos (Tabela 10). Assim, entende-se que as observações de influência proeminente, impelem o modelo a subestimar a força da associação entre as variáveis em questão sem, portanto, comprometer a sua significância estatística.

Tabela 10 - A análise confirmatória consiste na reprodução do ajuste do modelo (definido na Tabela 8), porém desconsiderando individualmente, a cada etapa, as observações com influência (segundo distância de Cook) mais proeminentes

Análise confirmatória para a esfericidade da cabeça do fêmur (razão de verossimilhança)						
Coefficiente	Estimativas			p-valores		
	original	delta 5	delta 6	original	5	6
Osso subcondral: esclerose moderada x leve	-2,77259	6,557	6,557	0,0496	0,0067	0,0067

A repercussão da remoção de cada observação sobre o coeficiente do modelo é apresentada em termos proporcionais em relação à magnitude original e é exibida sob o rótulo “Estimativas”, na coluna intitulada por “delta” seguido da identificação da observação conforme o índice na base de dados. Por sua vez, o risco de falso positivo após a remoção de cada ponto influente é especificado na coluna identificada pelo índice da observação e comparado ao risco original sob o cabeçalho de “p-valores”.

Ao avaliar os pontos relativamente influentes, constata-se que ambos apresentam um formato de cabeça de fêmur distinto das demais observações que compartilham do mesmo grau de esclerose do osso subcondral (Tabela 11). No caso da observação #2, apesar da probabilidade estimada predizer um aspecto oval para 80% das cabeças de fêmur necrosadas acompanhadas de esclerose leve no osso subcondral, tal observação apresentou um formato plano para o membro. Por outro lado, o ponto #9 apresentou uma cabeça de fêmur oval, contrariando as baixas probabilidades (20%) estimadas para esse padrão. Por serem os únicos diferentes dentro dos respectivos grupos, estas observações acabam por conferir a variabilidade aos dados necessária para o funcionamento apropriado das ferramentas estatísticas. Ao removê-las, o contexto tende ao determinismo e distancia-se do escopo da análise estatística.

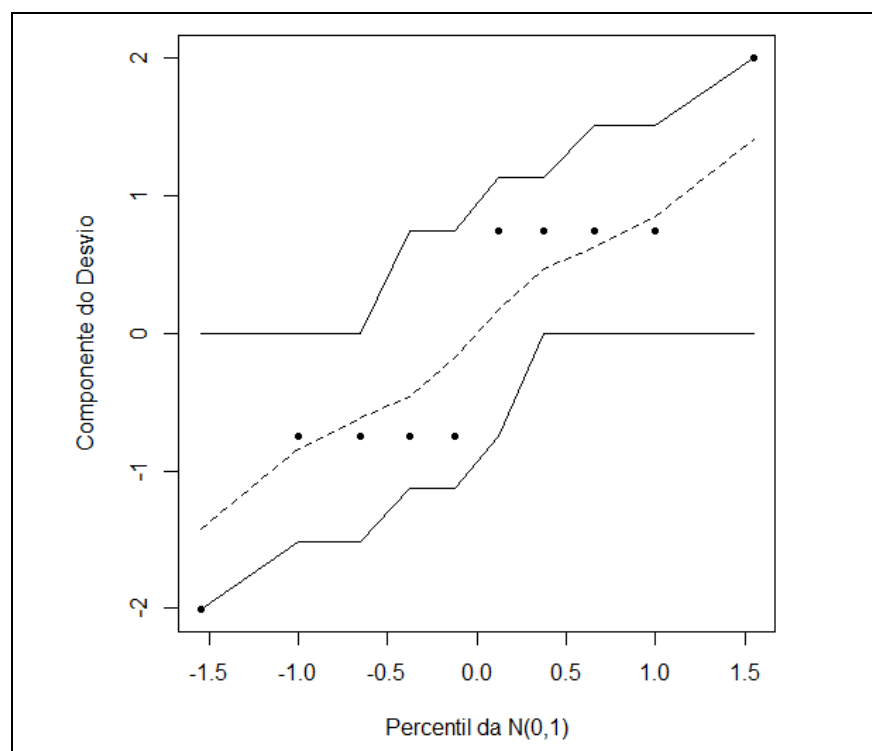
Tabela 11 - Descrição dos pontos relativamente influentes conforme o Gráfico 17

Índice	Observações influentes		
	Osso subcondral	Esfericidade da cabeça do fêmur	Prob(esferic. = oval)
2	esclerose leve	plana	0,8
9	esclerose leve	oval	0,2

Finalmente, a contenção dos resíduos dentro dos limites do envelope garante que a aleatoriedade da relação entre o grau de esclerose do osso subcondral e a esfericidade da cabeça do fêmur pós-necrose foi apropriadamente contemplada e representada no modelo (como definido na Tabela 9). Tal propriedade acaba por validar o modelo correspondente, confirmando a acurácia das inferências que sustenta. A esta altura, torna-se evidente a equivalência entre as medidas

diagnósticas e até as inferências baseadas nos modelos apresentados nas Tabelas 6 e 9, descrevendo, respectivamente, como o tratamento com as células pluripotentes e o grau de esclerose do osso subcondral se relacionam com a esfericidade da cabeça do fêmur necrosado. Isso ocorre, porque, coincidentemente, os dois casos apresentam, essencialmente, as mesmas distribuições condicionais (Gráfico 8A - Efeito tratamento e Gráfico 8I - Efeito tratamento).

Gráfico 18 -Envelope da distribuição dos resíduos provenientes do ajuste do modelo (Tabela 8) aos dados delimitada pela respectiva banda de confiança

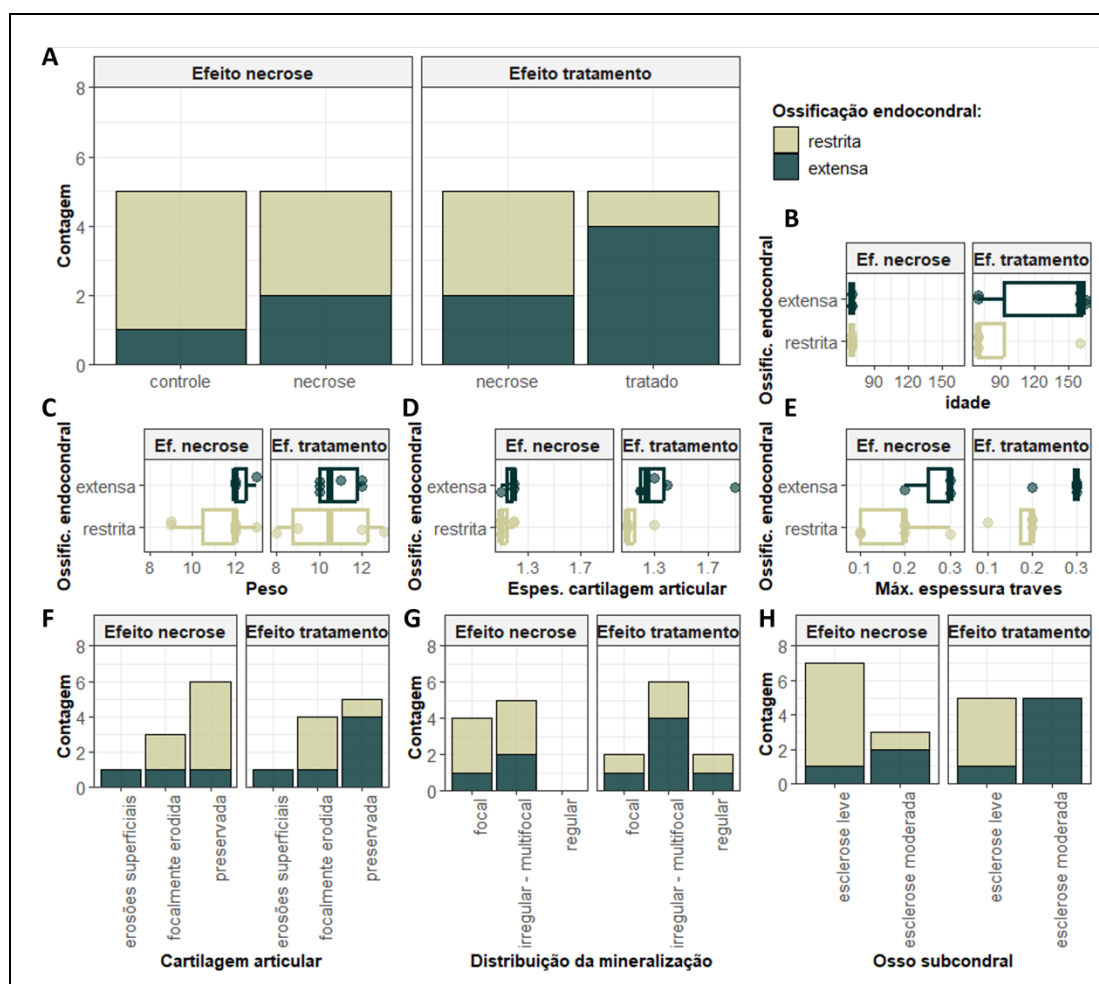


5.4 OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA

No que se refere à ossificação endocondral, os dados forneceram indícios bastante frágeis quanto ao possível efeito da indução da necrose avascular. No caso, dos cinco indivíduos excluídos do tratamento com o enxerto celular, apenas um dos membros contralaterais apresentou ossificação extensa, ao passo que tal desfecho foi observado em duas articulações ipsilaterais em relação à necrose (Gráfico 19A - Efeito necrose). Por sua vez, quando considerados apenas os membros submetidos à necrose, o tratamento com o enxerto dentário foi associado a um aumento um pouco mais expressivo na incidência de ossificações ativas extensas em relação ao controle pós-necrose: de dois para quatro membros (Gráfico 19A - Efeito tratamento). Além disso, entre os indivíduos isentados do tratamento celular, a idade mostrou-se completamente irrelevante para o nível de ossificação endocondral, até por efeito do plano experimental que controlou a idade dos animais a um único nível (Gráfico 19B - Efeito necrose). Em contraste, houve algum indicativo de que a ossificação endocondral ativa extensa possa estar associada com uma idade mais avançada no contexto restrito aos membros submetidos à necrose avascular (Gráfico 19B - Efeito tratamento). Por outro lado, parece não haver indício de que o peso dos animais esteja relacionado ao nível de ossificação endocondral, exceto por uma possível diferença de variabilidade, uma vez que a dispersão da massa corporal se mostra qualitativamente mais ampla entre os perfis de ossificação ativa restrita (Gráfico 19C). Além disso, particularmente entre os membros induzidos à necrose, a ossificação endocondral ativa extensa parece associada a cartilagens articulares mais espessas (Gráfico 19D - Efeito tratamento). Em sequência, nota-se que traves com espessura máxima mais expressivas tenderam a acompanhar o perfil de ossificação endocondral ativo extenso, sobretudo no caso dos membros necrosados para a comparação do tratamento (Gráfico 19E - Efeito tratamento). Ademais, observa-se que, entre os indivíduos excluídos do tratamento celular, em cada um dos três níveis de preservação da cartilagem, apenas um sujeito apresentou ossificação endocondral extensa, apesar da incidência bastante variável entre as categorias do estado da cartilagem (Gráfico 19F - Efeito necrose). Por outro lado, comparando-se os membros induzidos à necrose avascular, a ocorrência da ossificação endocondral ativa extensa foi mais frequente nos casos de cartilagem articular preservada (quatro observações de cinco) do que nos membros focalmente erodidos (um caso em quatro,

Gráfico 19F - Efeito tratamento). Em contraste, a distribuição da mineralização parece não ter qualquer relação com o nível de ossificação endocondral (Gráfico 19G). Por fim, o grau de esclerose do osso subcondral aparenta estar associado ao nível de ossificação endocondral, com uma tendência de que perfis de ossificação ativa extensa sejam mais frequentes quando acompanhados de esclerose moderada do osso do que em casos de ocorrências leves (Gráfico 19I). Tal padrão parece ocorrer tanto no contexto de comparações pareadas entre os membros dos indivíduos isentados do tratamento celular (Gráfico 19I - Efeito necrose), como na contraposição não pareada das articulações induzidas à necrose (Gráfico 19I - Efeito tratamento).

Gráfico 19 - Distribuição da ossificação endocondral conforme a indução da osteonecrose avascular

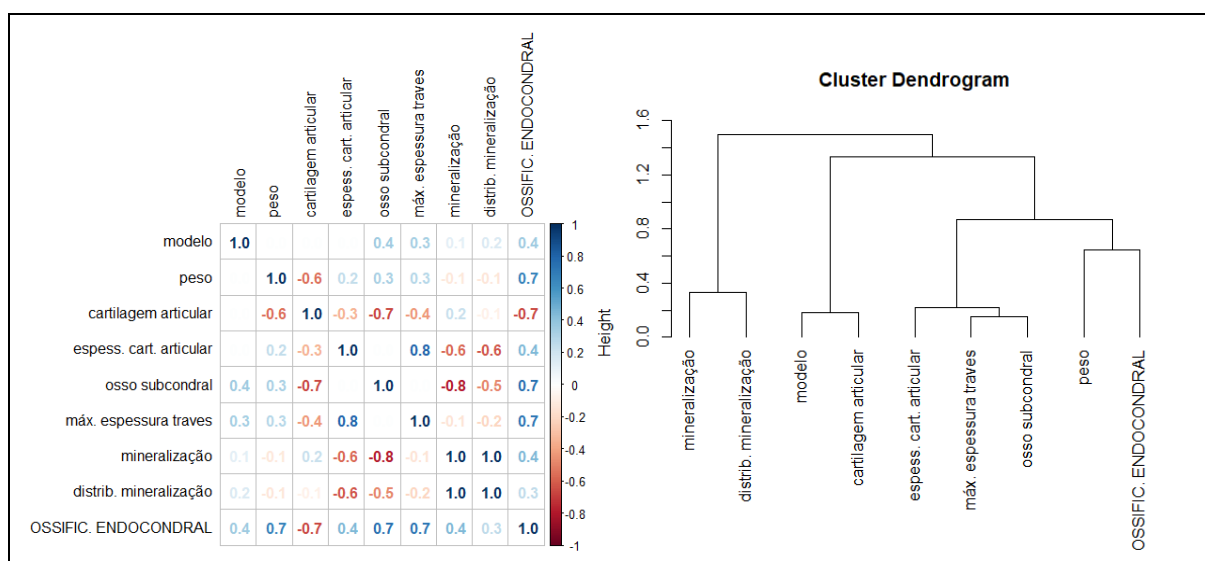


O tratamento com o enxerto de células dentárias pluripotentes e demais características biológicas não controladas. Nos painéis identificados como “Efeito necrose”, as cabeças de fêmur submetidas à necrose são comparadas ao respectivo membro contralateral (*controle*) dos indivíduos que não receberam o enxerto de células dentárias (i.e., comparação pareada). Por sua vez, o *subplot* intitulado “Efeito do tratamento” avalia o desfecho da aplicação das células pluripotentes nas cabeças de fêmur com osteonecrose (tratado) em comparação aos membros necrosados dos outros animais que não receberam o enxerto celular (necrose - comparação não pareada). Os diagramas de caixa têm, nas linhas verticais, a representação do primeiro, segundo (ou mediana) e terceiro quartil, enquanto as linhas horizontais ilustram os limites esperados da distribuição.

5.4.1 Efeito necrose

Como padrão na presente análise, os propósitos de se testar os efeitos da indução da necrose avascular e do tratamento com enxerto dentário pluripotente foram abordados separadamente e sustentados por subconjuntos de dados distintos (ainda que com a interseção dos membros induzidos à necrose, porém, excluídos do tratamento celular). No contexto da comparação pareada entre membros dos indivíduos isentados do tratamento, constatou-se uma correlação (policórica) modesta entre o modelo experimental (i.e., indução, ou não, da necrose avascular na cabeça do fêmur) e a extensão da ossificação endocondral (Gráfico 20A; $\text{corr} = 0,4$). Em concordância, a indução da necrose mostrou-se bastante distante, em termos matemáticos, do nível da ossificação endocondral, correspondendo a uma das menores similaridades do dendrograma (Gráfico 20B). Por outro lado, o peso dos animais ($\text{corr} = 0,7$), o estado da cartilagem articular ($\text{corr} = 0,7$), o grau de esclerose do osso subcondral ($\text{corr} = 0,7$), e a máxima espessura das traves ($\text{corr} = 0,7$) apresentaram indícios mais consistentes de associação com a ossificação endocondral. Exceto pela condição da cartilagem articular, tais relações foram ratificadas no dendrograma de distâncias, ainda que demonstrem similaridades qualitativamente intermediárias.

Gráfico 20 - Relação essencial entre variáveis



À esquerda, a matriz de correlação policórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

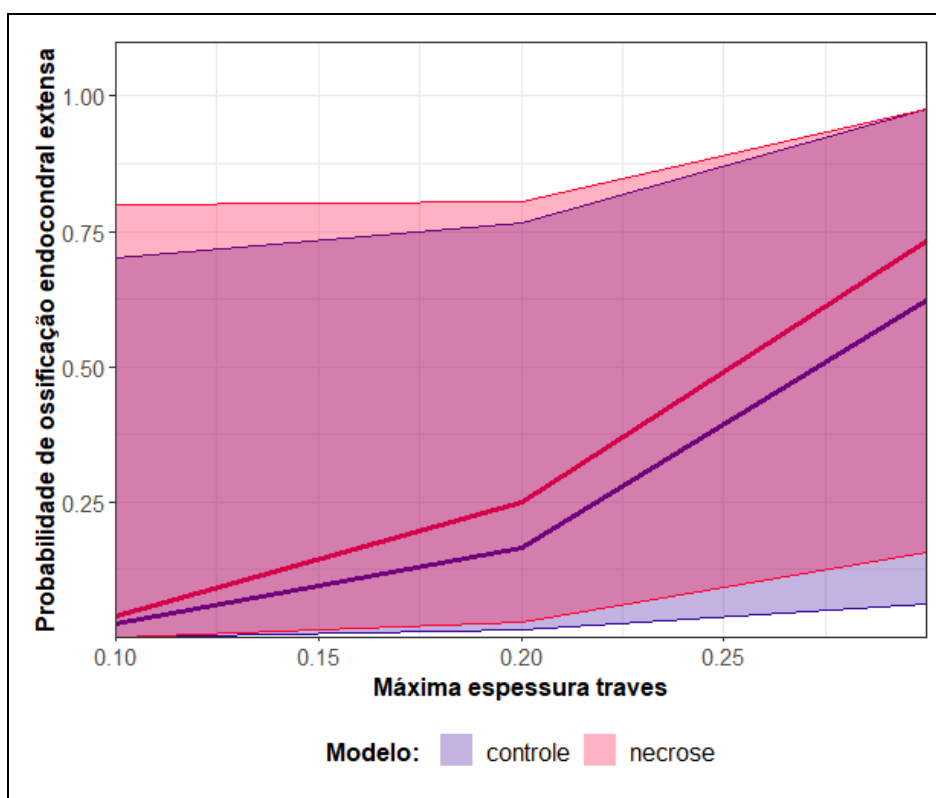
Como esperado, a tênue evidência de um eventual efeito da indução da necrose sobre a extensão da ossificação endocondral (conforme apontado na análise exploratória acima) se mostrou demasiadamente escassa (Tabela 12; estimativa = 0,5098, erro pad. = 1,7492, lambda = 0,0851, GL = 1, $p = 0,7705$), portanto estatisticamente insignificante. Por sua vez, os indícios de associação entre a ossificação endocondral e a máxima espessura das traves se mostraram mais contundentes (Tabela 12; estimativa = 21,1106, erro pad. = 14,2993, lambda = 3,2705, GL = 1, $p = 0,0705$), ainda que insuficientes para superar o nível de significância, permanecendo, assim, como uma tendência estatística. Ainda que a independência entre as variáveis represente um risco pouco encorajador, foi estimado que a chance de ossificação endocondral ativa extensa aumentaria 1,4730 e 9 vezes com o aumento de um milímetro na máxima espessura das traves. Convém esclarecer, no entanto, que a aparência excepcional de tal força de associação decorre, na verdade, do intervalo de distribuição da máxima espessura das traves ser bastante reduzido, de 0,1 mm a 0,3 mm. Assim, a estimativa da repercussão do aumento de 1 mm desse preditor representa a hipótese de incremento cinco vezes maior que todo o intervalo de dispersão observado nos dados. Desta forma, a ilustração dos valores estimados se torna uma abordagem mais informativa para se apreciar a tendência à associação entre ossificação endocondral e a máxima espessura das traves (Gráfico 21). Nesse contexto, ainda que imerso na incerteza decorrente do modelo experimental (i.e., indução, ou não, da necrose avascular), é possível observar uma propensão ao aumento na probabilidade de ossificação endocondral ativa extensa, à medida que se expande a espessura máxima das traves.

Tabela 12 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a indução de necrose avascular na cabeça do fêmur e a máxima espessura das traves influenciam na ossificação endocondral

MLGM logístico para a ossificação endocondral					
	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança		
			Lambda	GL	p
(Intercepto)	-5,83777	3,60329			
Modelo: necrose x controle	0,509821	1,749224	0,085099	1	0,770502
Máxima espessura traves	21,11058	14,29929	3,270538	1	0,070534

O modelo restringe-se à comparação pareada entre os membros dos indivíduos não tratados com o enxerto dentário. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna "Estimativa" informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna "Erro pad."), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, "Lambda" indica a estatística do teste, enquanto "GL" informa os graus de liberdade e "p", como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLGM = modelos lineares generalizados mistos.

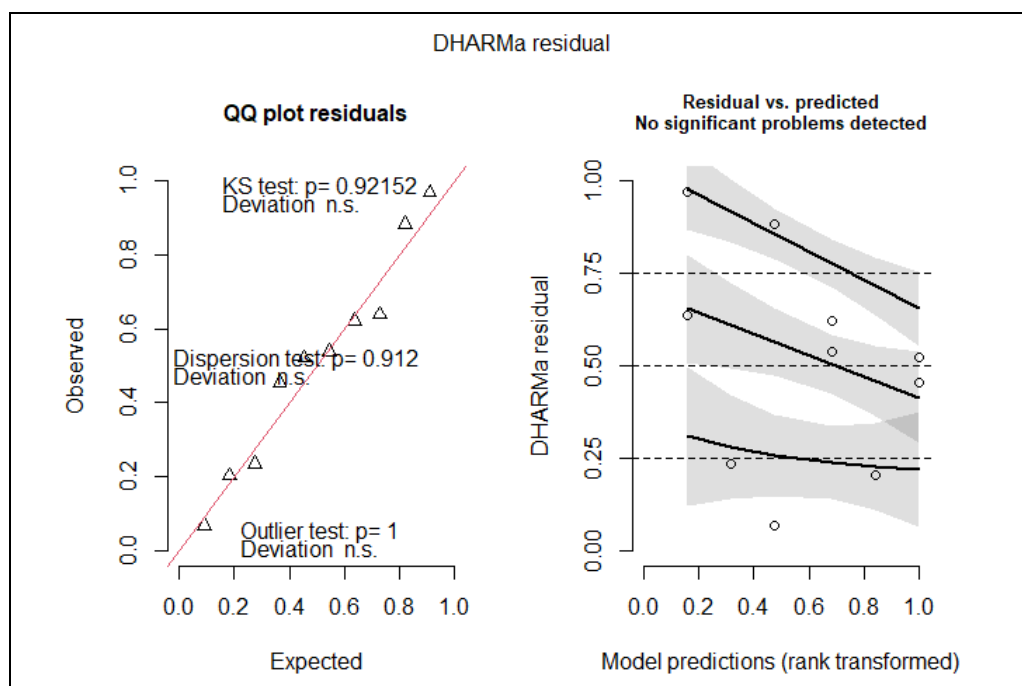
Gráfico 21 - Força de associação estimada conforme o modelo definido na Tabela 12



As linhas espessas em destaque indicam a progressão estimada da probabilidade de ossificação endocondral ativa extensa de acordo com a máxima espessura das traves em duas condições diferentes: sob osteonecrose induzida (em vermelho) e nos membros contralaterais poupados (em roxo). Por sua vez, as áreas de coloração suavizada ilustram bandas de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

Finalmente, o modelo estatístico especificado na Tabela 12 foi validado de acordo com as suas medidas diagnósticas exibidas no Gráfico 22. Nesse contexto, ressalta-se a proximidade entre a distribuição observada dos resíduos e o seu comportamento preconizado teoricamente (Gráfico 22A). Assim, confirma-se que, diante da presente amostra, o componente probabilístico do modelo retrata fielmente a aleatoriedade manifestada nos dados. Além disso, não há evidências de que a distribuição dos resíduos ao longo dos valores ajustados divirja de uma distribuição uniforme (Gráfico 22B), evidenciando que todo padrão consistente na relação entre resposta e preditores foi fielmente modelado pelo componente sistemático do modelo, cuja especificação da estrutura da variância se mostrou coerente com os dados. Em consequência da validação do modelo, certifica-se que as estimativas estejam apropriadamente fundamentadas na natureza dos dados, resultando em inferências acuradas.

Gráfico 22 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 11

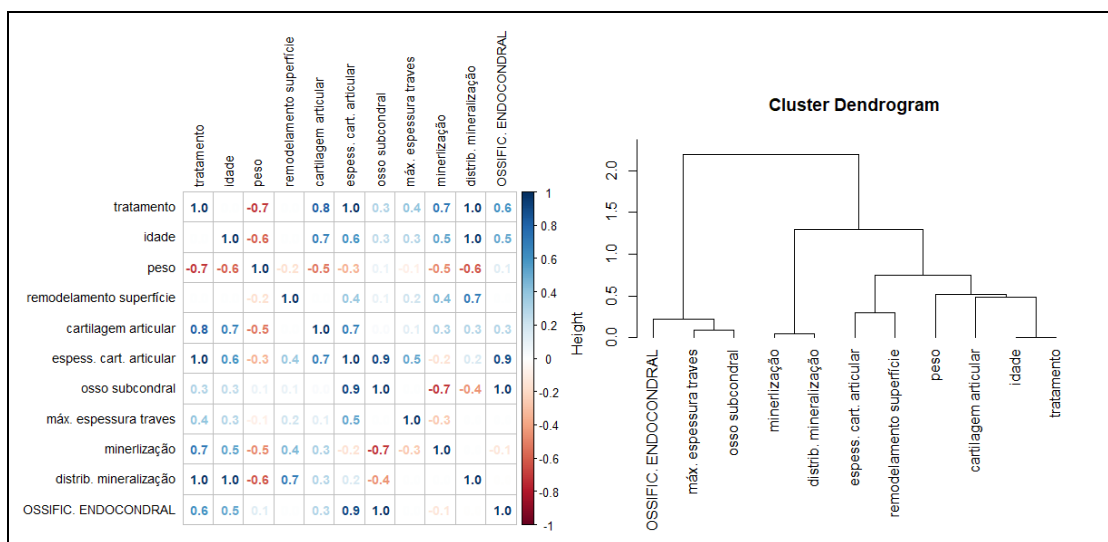


À esquerda, a distribuição observada dos resíduos decorrentes do ajuste do modelo aos dados (eixo vertical) é contraposta ao seu comportamento teórico esperado (eixo horizontal), sendo a linha unitária vermelha indicativa da condição de igualdade. À direita, os resíduos são distribuídos conforme os valores ajustados das respectivas observações.

5.4.2 Efeito tratamento

No subconjunto dos dados provenientes dos membros induzidos à necrose, percebe-se que a correlação (policórica) com a extensão da ossificação endocondral é dominada pela relação com o grau de esclerose do osso subcondral (Gráfico 23A, $\text{corr} = 1,0$) e a espessura da cartilagem articular ($\text{corr} = 0,9$). Esse padrão é parcialmente reproduzido na generalização das relações quanto à distância matemática (Gráfico 23B). No caso, tanto o estado do osso subcondral como a máxima espessura das traves mostraram (conjuntamente) uma acentuada similaridade em relação ao grau de ossificação endocondral. Convém esclarecer que a estimativa da correlação entre a máxima espessura das traves e a ossificação endocondral permaneceu inacessível. Em sequência, a aplicação do tratamento com enxerto de células pluripotentes ($\text{corr} = 0,6$) e a idade do animal ($\text{corr} = 0,5$) apresentaram correlações policóricas intermediárias com a extensão da ossificação endocondral, apesar da distância proeminente entre elas.

Gráfico 23 - Relação essencial entre variáveis



À esquerda, a matriz de correlação policórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

Em seguida, a Tabela 13 apresenta o modelo ajustado ao subconjunto dos dados pós-necrose para explicar como o tratamento com o enxerto dentário poderia influenciar na extensão da ossificação endocondral. Nesse contexto, constata-se que a tendência do implante celular em aumentar a probabilidade de ossificação

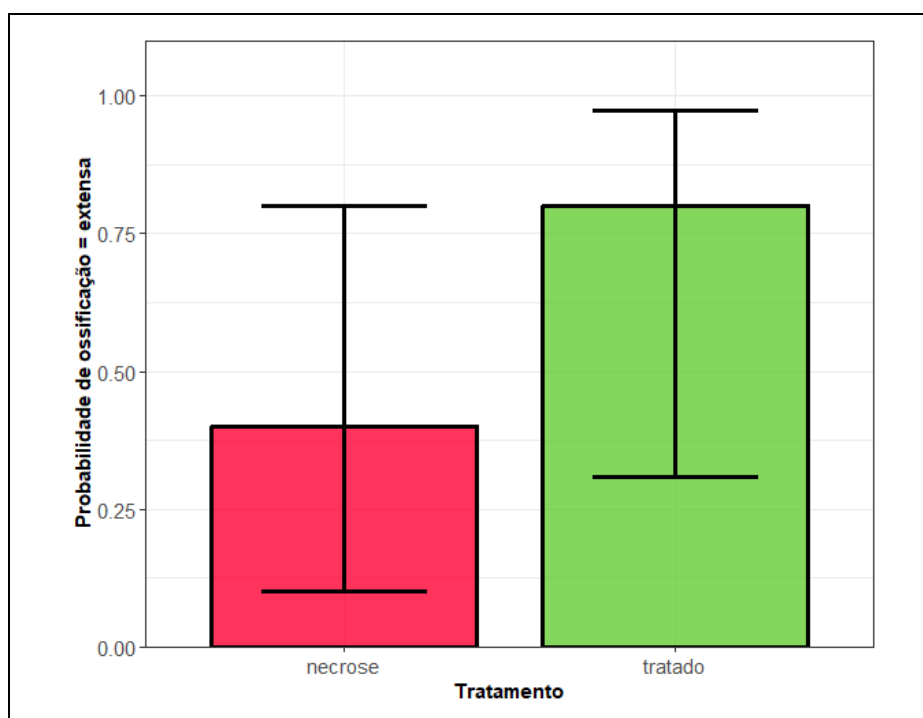
ativa extensa se sustenta em evidências demasiadamente frágeis (Tabela 13; estimativa = 1.7918, erro pad. = 1,4434, lambda = 1,7261, GI = 1, p = 0,1889, poder = 0,3758), de modo que a independência entre tais variáveis permanece bastante plausível. Esse cenário é retratado na Gráfico 24, a qual ilustra uma maior probabilidade de ossificação ativa extensa após o tratamento com células pluripotentes, porém encoberta pelo grau de incerteza nas estimavas.

Tabela 13 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia na ossificação endocondral

MLG logístico para a ossificação endocondral						
	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança			Monte Carlo
			Lambda	GL	p	power
(Intercepto)	-0,40547	0,912871				
Tratamento: tratado x necrose	1,791759	1,443375	1,726092	-1	0,188911	0,3758

O modelo baseia-se na comparação entre membros submetidos a necrose de indivíduos diferentes, sendo que apenas uma parte deles recebeu o tratamento. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna “Estimativa” informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna “Erro pad.”), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, “Lambda” indica a estatística do teste, enquanto “GL” informa os graus de liberdade e “p”, como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLG = modelo linear generalizado.

Gráfico 24 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 13

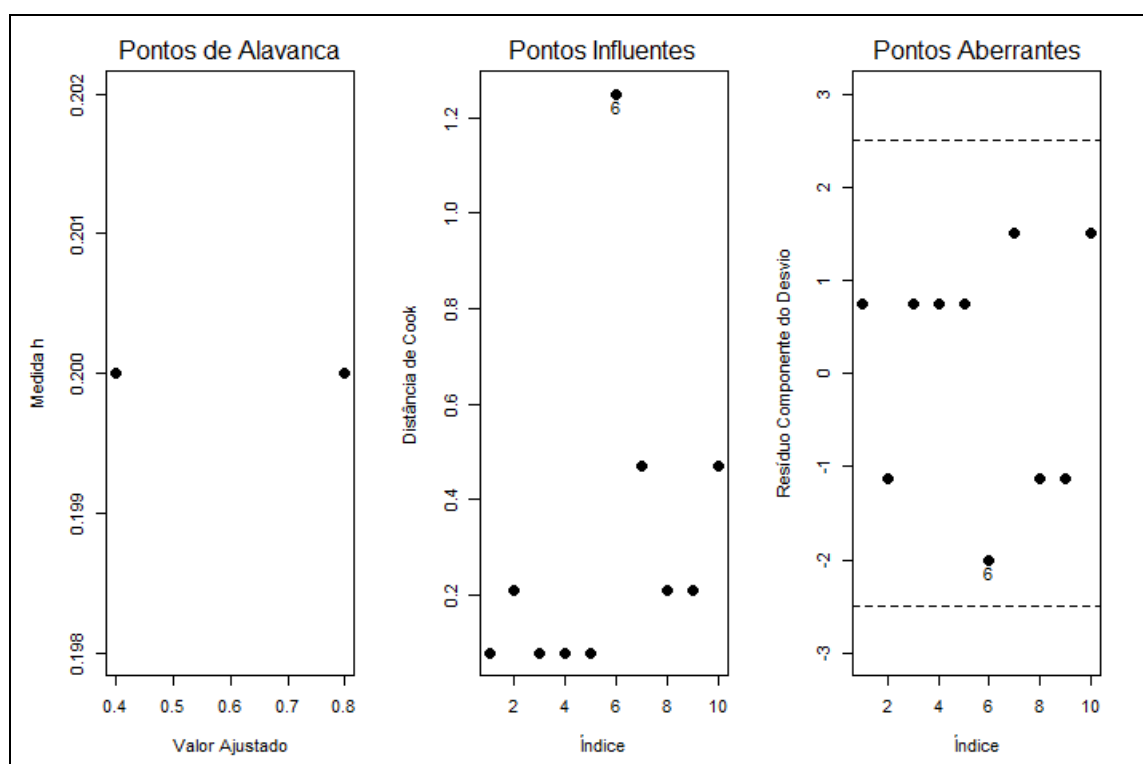


As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com o tratamento (ou não) com enxerto de células dentárias pluripotentes. Por sua vez, as barras verticais

ilustram os intervalos de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

Para se certificar da representatividade dos dados pelo modelo (como especificado na Tabela 13), prosseguiu-se com a análise das respectivas medidas diagnósticas. Nesse sentido, nota-se que o plano experimental balanceado em termos de tamanho amostral para os níveis do fator tratamento repercutiu em medidas iguais de alavanca (Gráfico 25A), indicando que todas as observações contam com a mesma disponibilidade de informação para se estimar seu respectivo valor predito (pelo modelo). Apesar de magnitudes de alavanca iguais, a observação #6 (conforme identificação pelo índice na base de dados) mostrou exercer maior influência relativa sobre a estimativa dos coeficientes do modelo (Gráfico 25B). Como esperado, tal influência desproporcional se deve a uma discrepância mais acentuada, nesse caso, entre a extensão da ossificação endocondral observada e a probabilidade predita conforme o modelo codifica a relação entre esta resposta e o tratamento, ainda que tal disparidade esteja contemplada apropriadamente na aleatoriedade do modelo (Gráfico 26C).

Gráfico 25 - Medidas diagnósticas descrevendo a definição do modelo (Tabela 13) a partir dos dados



A medida h (nos Pontos de Alavanca) informa a quantidade de informação disponível para se estimar o valor predito da resposta em cada observação e deriva da proximidade das observações quanto à configuração dos preditores. No gráfico de Pontos Influentes, a distância de Cook quantifica a influência

de cada observação sobre as estimativas dos coeficientes do modelo. Por fim, o gráfico dos Pontos Aberrantes, apresentam a compatibilidade entre os valores predito a partir do modelo e o nível da resposta observado para cada ponto.

Como habitual, a avaliação do potencial viés causado pela observação desproporcionalmente influente (conforme a respectiva distância de Cook, Gráfico 25B) se deu pela análise confirmatória: a comparação entre a inferência baseada no ajuste original e o modelo análogo definido na ausência de tal ponto influente. Nesta circunstância, constata-se que a remoção da observação #6 resultou no aumento expressivo do coeficiente que descreve o efeito do tratamento celular sobre a extensão da ossificação endocondral e, conseqüentemente, na significância estatística desse efeito (Tabela 14; $p = 0,0297$). Desta forma, entende-se que a observação #6 destoa do padrão geral da amostra e acaba por enviesar a inferência no sentido de subestimar o tamanho do efeito do tratamento com enxerto dentário sobre a ossificação endocondral. E ainda, especialmente diante do tamanho amostral conciso, tal viés culmina em impedir a significância estatística do efeito em questão.

Tabela 14 - A análise confirmatória consiste na reprodução do ajuste do modelo (definido na Tabela 12), porém desconsiderando individualmente, a cada etapa, as observações com influência (segundo distância de Cook) mais proeminentes

Análise confirmatória para ossificação endocondral (razão de verossimilhança)				
Coeficiente	Estimativas		p-valores	
	original	delta 6	original	6
Tratamento: tratado x necrose	1,791759469	10,14632515	0,1889107	0,029690245

A repercussão da remoção de cada observação sobre o coeficiente do modelo é apresentada em termos proporcionais em relação à magnitude original e é exibida sob o rótulo "Estimativas", na coluna intitulada por "delta" seguido da identificação da observação conforme o índice na base de dados. Por sua vez, o risco de falso positivo após a remoção de cada ponto influente é especificado na coluna identificada pelo índice da observação e comparado ao risco original sob o cabeçalho de "p-valores".

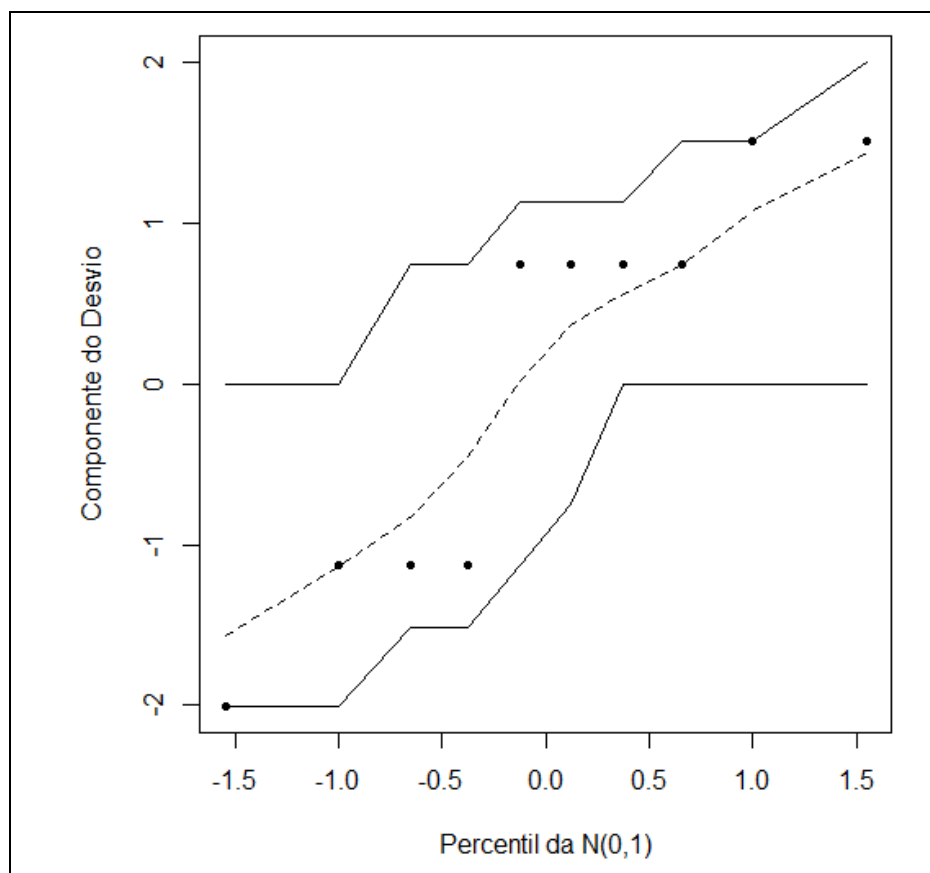
Conforme mencionado acima, a influência desproporcional da observação #6 sobre a estimativa dos coeficientes do modelo se deve a discrepância entre a extensão observada e estimada da ossificação endocondral. No caso, tal observação foi a única entre os membros tratados com o implante celular pluripotente a desenvolver ossificação restrita, apesar de o padrão extenso ser predito para esse caso com 80% de probabilidade (Tabela 15).

Tabela 15 - Descrição dos pontos relativamente influentes conforme a Gráfico 25

Observação influente			
Índice	Tratamento	Ossificação endocondral	Prob (ossificação = extensa)
6	tratado	ativa - restrita	0,8

Finalmente, o modelo descrito na Tabela 13 é validado em gráfico de envelope (Gráfico 26), garantindo também a validade das inferências fundamentadas por ele.

Gráfico 26 - Envelope da distribuição dos resíduos provenientes do ajuste do modelo (Tabela 13) aos dados delimitada pela respectiva banda de confiança

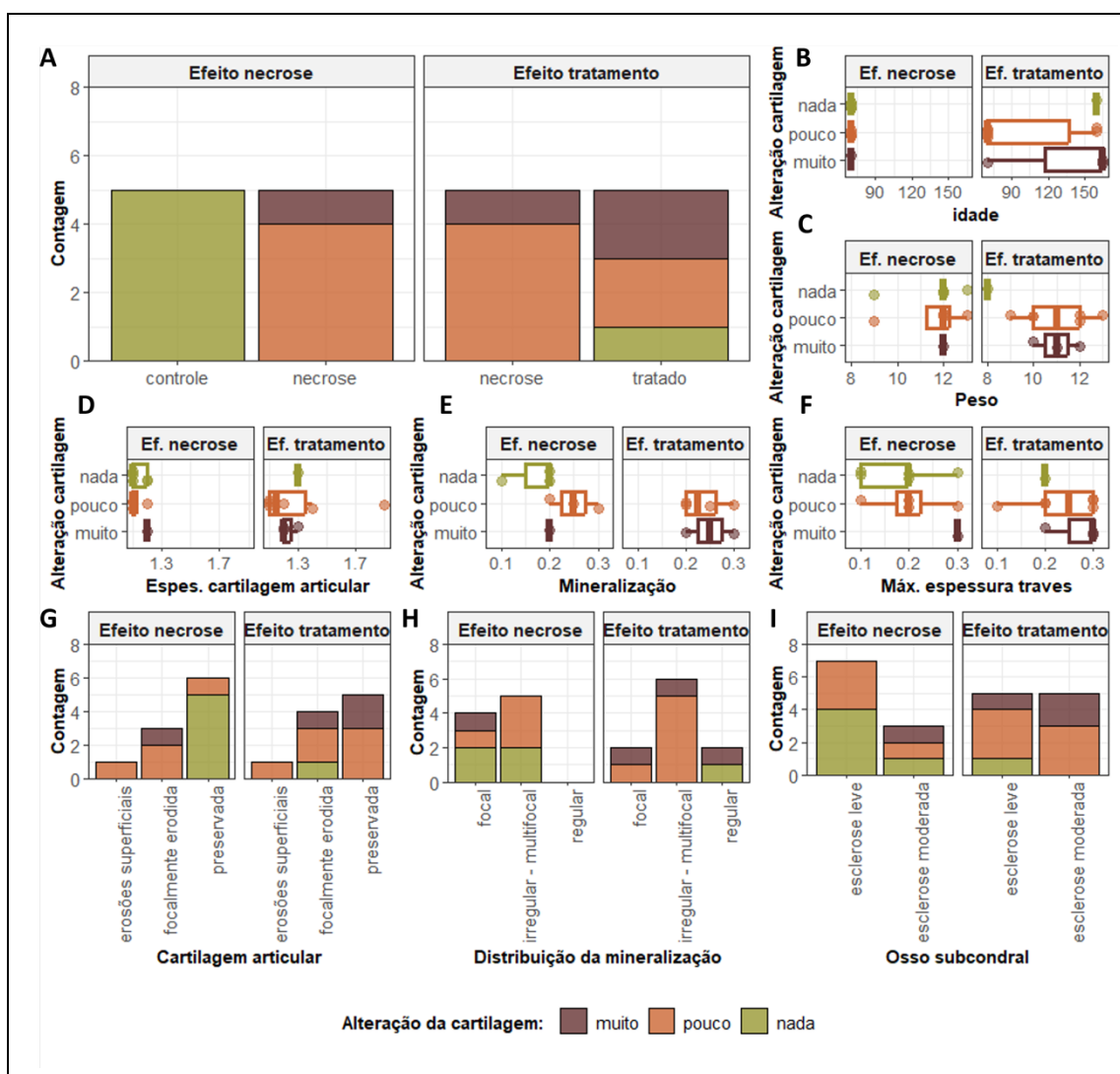


5.5 QUALIDADE DA CARTILAGEM

Como esperado, nenhuma das articulações poupadas da indução da necrose (e do tratamento celular) apresentaram qualquer alteração de cartilagem (Gráfico 27A - Efeito necrose). Por outro lado, quatro dos cinco membros (80%) submetidos à lesão avascular mostraram a cartilagem pouco alterada, sendo a observação restante identificada como muito alterada. Por sua vez, parece não haver indicativo de um eventual efeito do tratamento com o enxerto dentário sobre a alteração da cartilagem entre os membros previamente induzidos à osteonecrose avascular (Gráfico 27A - Efeito tratamento). No caso, em comparação com os membros necrosados e eximidos do tratamento, o implante de células pluripotentes precedeu a redução da incidência de cartilagens pouco alteradas e o surgimento de uma observação inalterada, porém, às custas do aumento unitário de cartilagem muito alterada. Tal inconsistência sugere que as mudanças observadas decorreram do acaso, na percepção visual superestimada pela amostra reduzida. Além disso, os indícios de uma possível associação da alteração da cartilagem com a idade (Gráfico 27B) e o peso (Gráfico 27C) e a espessura da cartilagem articular (Gráfico 27D) também parecem fundamentados em variações espúrias de observações individuais ao invés de sugerir um padrão consistente. Por sua vez, na comparação pareada entre as articulações dispensadas do tratamento celular, aparenta haver uma tendência de que cartilagens preservadas acompanhem índices mais baixos de mineralização (Gráfico 27E - Efeito necrose), ainda que o acaso não possa ser prontamente descreditado. Em oposição, entre os membros submetidos à osteonecrose, a distribuição da mineralização se mostrou essencialmente equivalente independentemente do grau de alteração da cartilagem (Gráfico 27E - Efeito tratamento). Novamente, parece não haver consistência na suspeita de associação entre a máxima espessura das traves e as alterações da cartilagem, já que qualquer diferença de distribuição decorre de variações de observações isoladas (Gráfico 27F). No que se refere ao nível de erosão da cartilagem articular, esta característica parece associada ao grau de alteração da cartilagem, particularmente na comparação pareada entre os membros excluídos do tratamento celular, uma vez que todas as articulações sem erosão mostraram um aspecto inalterado de cartilagem (Gráfico 27G - Efeito necrose). No entanto, tal indicativo de associação mostrou-se mais dúbio entre os membros induzidos à osteonecrose avascular (Gráfico 27G - Efeito tratamento). No caso, a proporção de

observações com muita (e pouca) alteração de cartilagem entre os membros com cartilagem articular focalmente erodida foi qualitativamente a mesma que no conjunto das cartilagens articulares preservadas. Por fim, parece não haver indícios consistentes de que a distribuição da mineralização (Gráfico 27H) e o grau de esclerose do osso subcondral (Gráfico 27I) estejam associados com as alterações da cartilagem. Em ambos os casos, diferenças visuais são presumivelmente decorrentes de variações isoladas, ou da escassa incidência em algumas condições.

Gráfico 27 - Distribuição qualidade da cartilagem conforme a indução da osteonecrose avascular

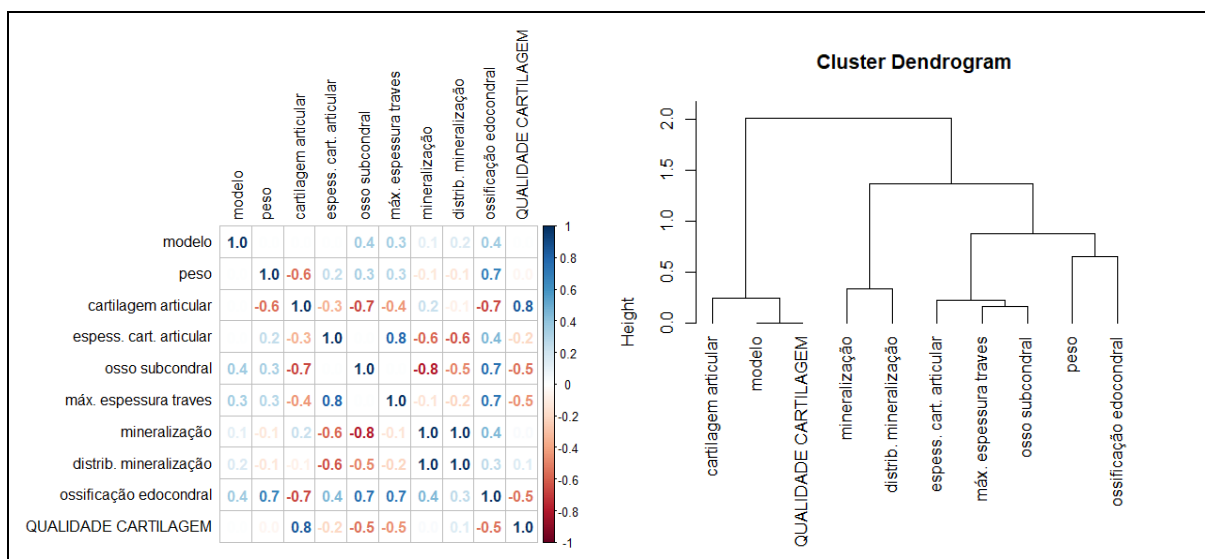


O tratamento com o enxerto de células dentárias pluripotentes e demais características biológicas não controladas. Nos painéis identificados como “Efeito necrose”, as cabeças de fêmur submetidas à necrose são comparadas ao respectivo membro contralateral (*controle*) dos indivíduos que não receberam o enxerto de células dentárias (i.e., comparação pareada). Por sua vez, o *subplot* intitulado “Efeito do tratamento” avalia o desfecho da aplicação das células pluripotentes nas cabeças de fêmur com osteonecrose (tratado) em comparação aos membros necrosados dos outros animais que não receberam o enxerto celular (necrose - comparação não pareada). Os diagramas de caixa têm, nas linhas verticais, a representação do primeiro, segundo (ou mediana) e terceiro quartil, enquanto as linhas horizontais ilustram os limites esperados da distribuição.

5.5.1 Efeito necrose

No contexto restrito às articulações eximidas do tratamento celular, constata-se que a correlação (polícórica) com a qualidade da cartilagem é dominada pela relação desta resposta com o nível de erosão da cartilagem articular (Gráfico 28A; corr = 0,8). Além disso, a correlação com a qualidade da articulação mostrou-se intermediária nos casos do grau de esclerose do osso subcondral (corr = -0,5), máxima espessura das traves (corr = -0,5) e extensão da ossificação endocondral (corr = -0,5). É digno de nota que a correlação (polícórica) entre o modelo experimental (indução, ou não, da osteonecrose avascular na cabeça do fêmur) e a qualidade da cartilagem permaneceu inacessível à estimação. No entanto, foi justamente esta relação que se mostrou de equivalência em termos de distância matemática (Gráfico 28B). Em sequência, confirmando a sumarização da relação pela correlação, o nível de erosão da cartilagem articular apresentou considerável similaridade em relação à qualidade da cartilagem articular.

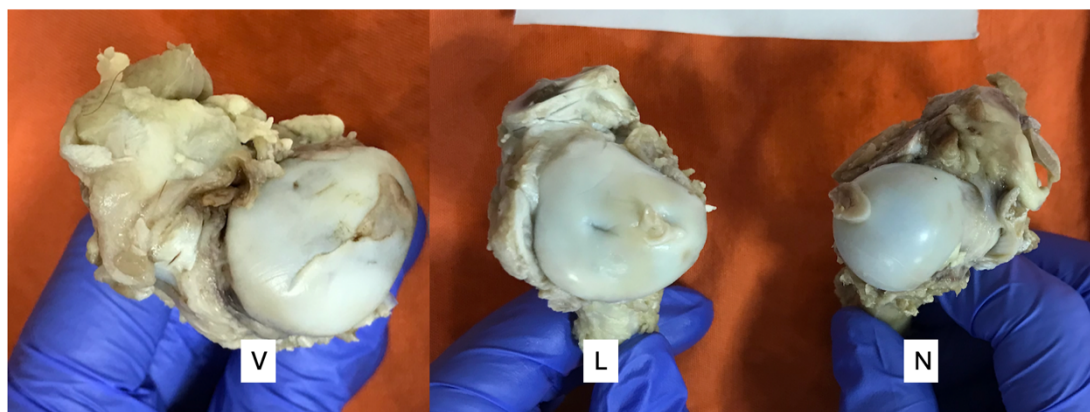
Gráfico 28 - Relação essencial entre variáveis



À esquerda, a matriz de correlação polícórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

Para embasar a inferência sobre a qualidade da cartilagem quanto aos efeitos e associações, a sua distribuição teve de ser dicotomizada diante da escassa incidência de cartilagens muito alteradas. Nesta conjuntura, a relação entre a indução da osteonecrose avascular da cabeça do fêmur e a qualidade da articulação se fez determinística: todos os casos de necrose apresentaram cartilagem alterada, ao passo que todos os membros poupados da osteonecrose mostraram cartilagens inalteradas. Nesse caso, foi confirmada a significância estatística do efeito da necrose (Tabela 16; estimativa = 78,8803, lambda = 13,8629, GL = 1, $p < 0,001$). Estima-se, desta forma, que a chance de uma articulação poupada da necrose desenvolver alteração de cartilagem seja virtualmente zero (precisamente, $6,5565e-18$) e que a indução da osteonecrose avascular aumente a chance de tal desfecho em 1.8084×10^{34} , tornando praticamente certa a alteração de cartilagem nos membros necrosados (Figura 8). Esse efeito é ilustrado no Gráfico 29. Contudo, diante da ausência de variabilidade inerente do determinismo, a estimativa do erro padrão do estimador do coeficiente falha, impedindo a representação da incerteza por meio do intervalo de confiança dos valores preditos.

Figura 8 - Avaliação qualitativa macroscópica da qualidade da cartilagem articular



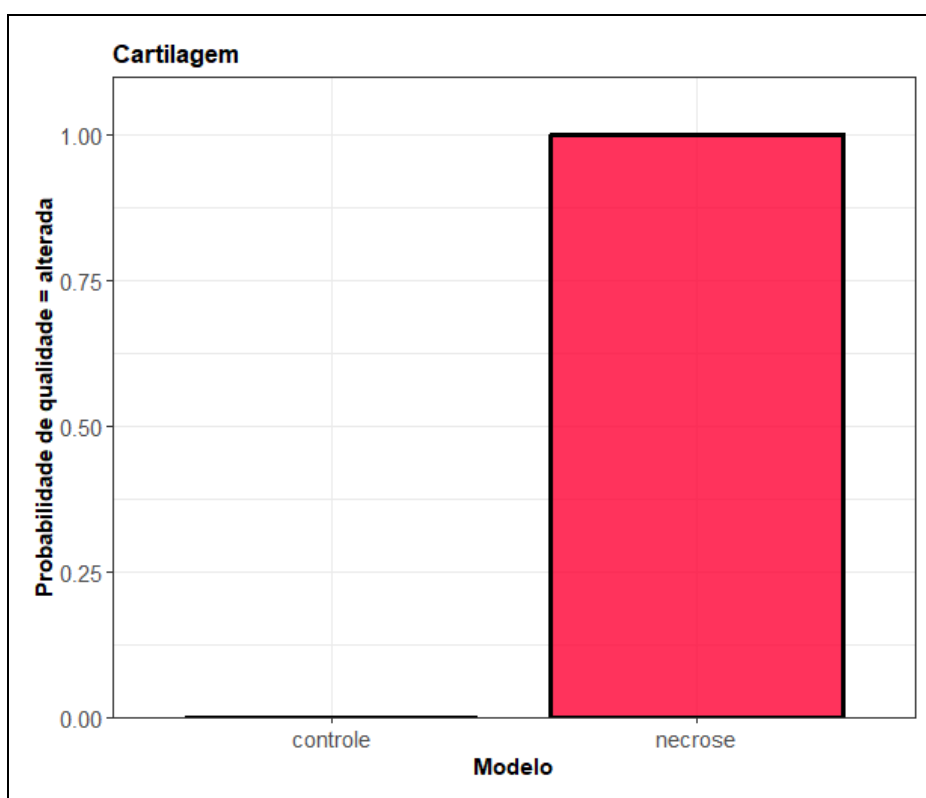
V: muito alterada. L: pouco alterada. N: normal

Tabela 16 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a indução de necrose avascular na cabeça do fêmur influencia na qualidade da cartilagem

	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança		
			Lambda	GL	p
(Intercepto)	-39,5661	30011996,4			
Modelo: necrose x controle	78,8803	42443372,3	13,8629	1	< 0,001

O modelo restringe-se à comparação pareada entre os membros dos indivíduos não tratados com o enxerto dentário. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna “Estimativa” informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna “Erro pad.”), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, “Lambda” indica a estatística do teste, enquanto “GL” informa os graus de liberdade e “p”, como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLGM = modelos lineares generalizados mistos.

Gráfico 29 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 16

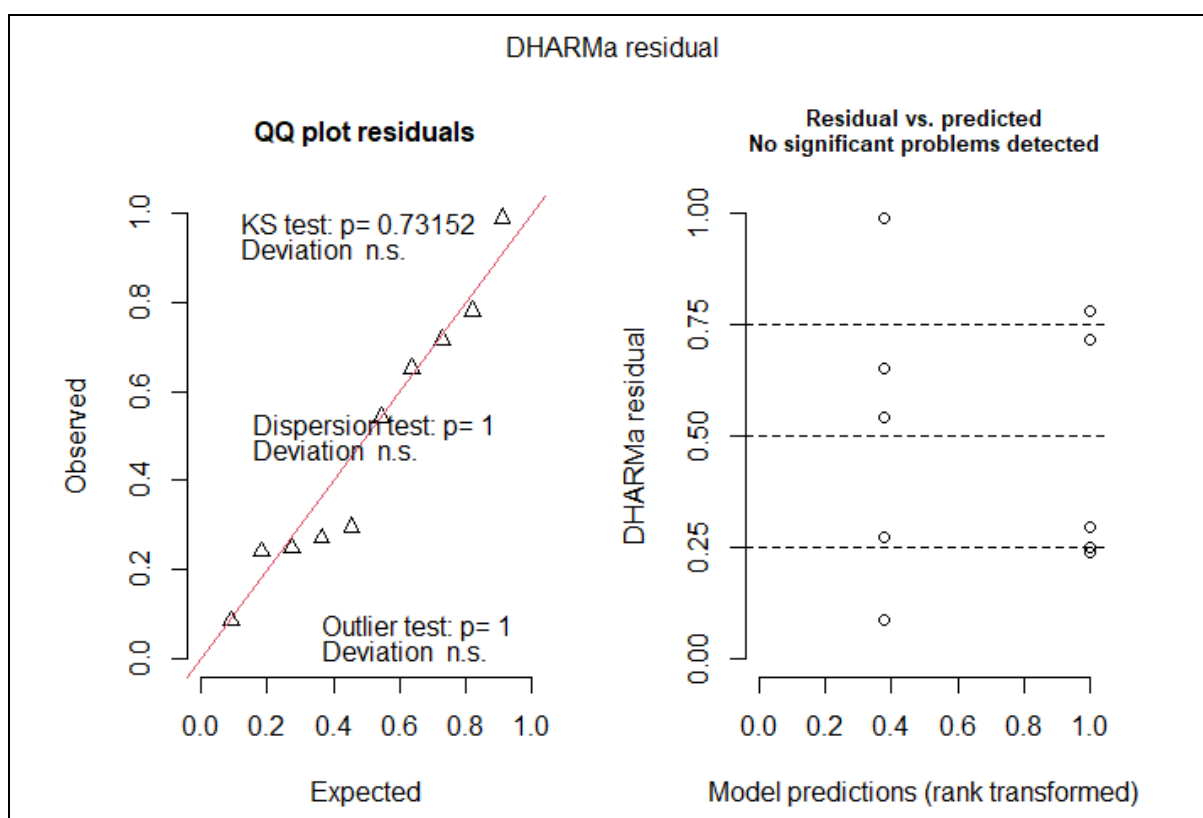


As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com a indução (ou não) de necrose avascular na cabeça do fêmur. Foram omitidas as medidas de quantificação de incerteza, uma vez que a estimativa do erro padrão do estimador falhou no contexto determinístico.

O modelo que sustenta as inferências acima (Tabela 16) é finalmente validado de acordo com suas medidas diagnósticas. Nesse sentido, observa-se uma satisfatória equivalência entre a distribuição dos resíduos correspondentes e o seu comportamento teoricamente preconizado diante do pressuposto de compatibilidade

completa entre os dados e as propriedades e suposições probabilísticas do modelo (Gráfico 30A). Além disso, a dispersão dos resíduos ao longo dos valores preditos parece desprovida de estrutura, indicando que a relação entre resposta e preditor foi completamente descrita pelo componente sistemático do modelo (Gráfico 30B). Há, no entanto, nesse cenário, alguma alusão a um padrão de afunilamento dos resíduos, que sugeriria uma heteroscedasticidade nos dados não contemplada no modelo, se não fosse pela fragilidade do indício, o qual depende de uma ou duas observações. Desta forma, conclui-se que não há evidência contundente que descredencie o modelo em questão quanto à representação da informação dos dados. Por conseguinte, valida-se também as inferências baseadas no modelo correspondente.

Gráfico 30 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 16

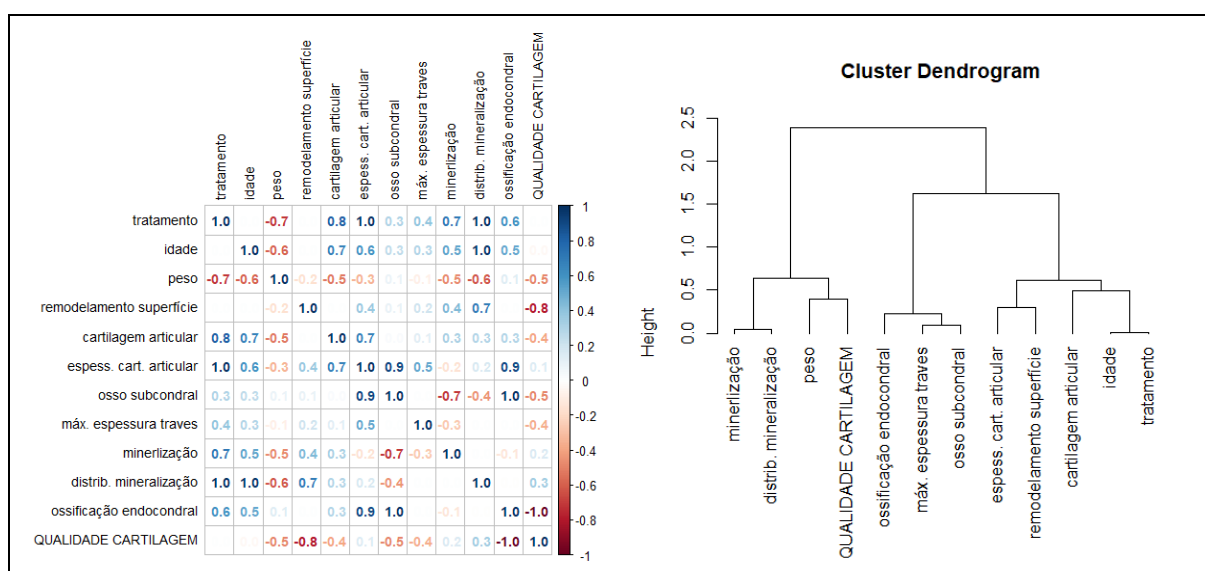


À esquerda, a distribuição observada dos resíduos decorrentes do ajuste do modelo aos dados (eixo vertical) é contraposta ao seu comportamento teórico esperado (eixo horizontal), sendo a linha unitária vermelha indicativa da condição de igualdade. À direita, os resíduos são distribuídos conforme os valores ajustados das respectivas observações.

5.5.2 Efeito tratamento

De forma intrigante, as relações essenciais entre as variáveis divergem consideravelmente no contexto dos membros induzidos à osteonecrose avascular (Gráfico 31) em relação ao subconjunto dos indivíduos excluídos do tratamento celular (Gráfico 28). No caso da comparação não pareada entre articulações necrosadas, a correlação (policórica) com a qualidade da cartilagem é dominada pela virtual equivalência com a extensão da ossificação endocondral (Gráfico 31; corr = -1,0), seguida do remodelamento de superfície (corr = -0,8). Por sua vez, o peso dos animais (corr = -0,5), o nível de erosão da cartilagem articular (corr = -0,4), o grau de esclerose do osso subcondral (corr = -0,5) e a máxima espessura das traves (corr = -0,4) mostraram correlação com a qualidade da cartilagem expressa por coeficientes intermediários. Não obstante, a mineralização e a sua distribuição tiveram correlações inexpressivas em relação à qualidade da cartilagem (corr = 0,2 e corr = 0,3, respectivamente), ao passo que a similaridade entre estas variáveis se mostrou proeminente no dendrograma das distâncias matemáticas (Gráfico 21B). Além disso, nota-se uma similaridade ainda maior entre a qualidade da cartilagem e peso do animal.

Gráfico 31 - Relação essencial entre variáveis



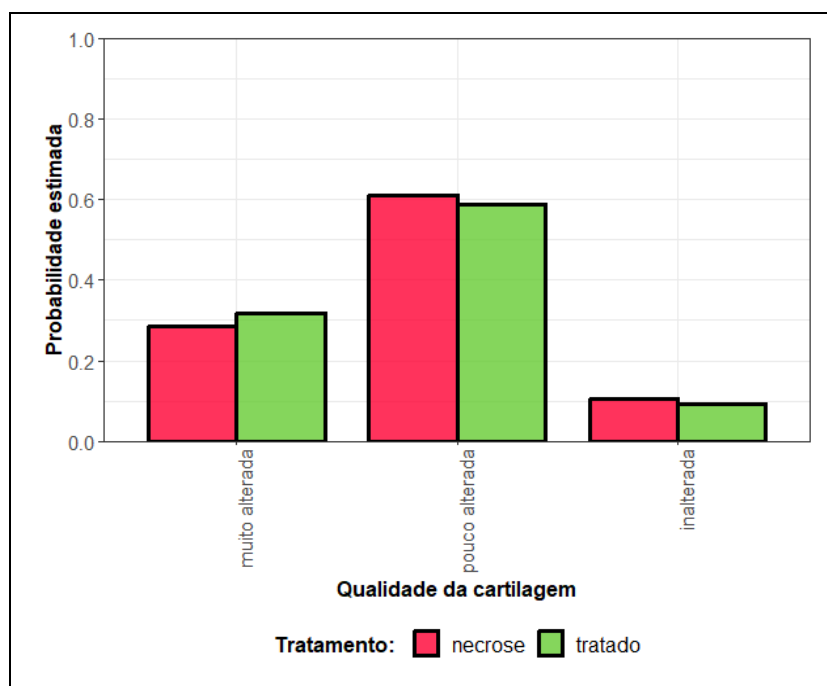
À esquerda, a matriz de correlação policórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

Em coerência com a análise exploratória, a inferência estatística não encontrou qualquer evidência que sustentasse um pretendo efeito do tratamento com a implantação de células pluripotentes sobre a qualidade da cartilagem (Tabela 17; estimativa = -0,161, erro pad. = 1,2692, lambda = 0,0161, GL = 1, p = 0,899). Ainda que a independência entre as variáveis seja demasiadamente provável e, portanto, seja mais sensato considerar a nulidade da relação, estima-se que um eventual efeito do tratamento celular resulte na redução de 14.87% na chance de uma redução de qualidade na escala de alteração da cartilagem. A inexpressividade do eventual efeito estimado é ilustrada no Gráfico 32, na qual as probabilidades estimadas para cada grau de qualidade da cartilagem se apresentam como praticamente equivalentes entre os membros tratados com o enxerto dentário após a necrose e as articulações submetidas à mesma lesão, porém, eximidas do tratamento.

Tabela 17 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia qualidade da cartilagem

CLM logístico para a qualidade da cartilagem					
	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança		
			Lambda	GL	p
Tratamento: tratado x necrose	-0,16101	1,26924	0,0161	1	0,89903

O modelo baseia-se na comparação entre membros submetidos a necrose de indivíduos diferentes, sendo que apenas uma parte deles recebeu o tratamento. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna "Estimativa" informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna "Erro pad."), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, "Lambda" indica a estatística do teste, enquanto "GL" informa os graus de liberdade e "p", como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo).

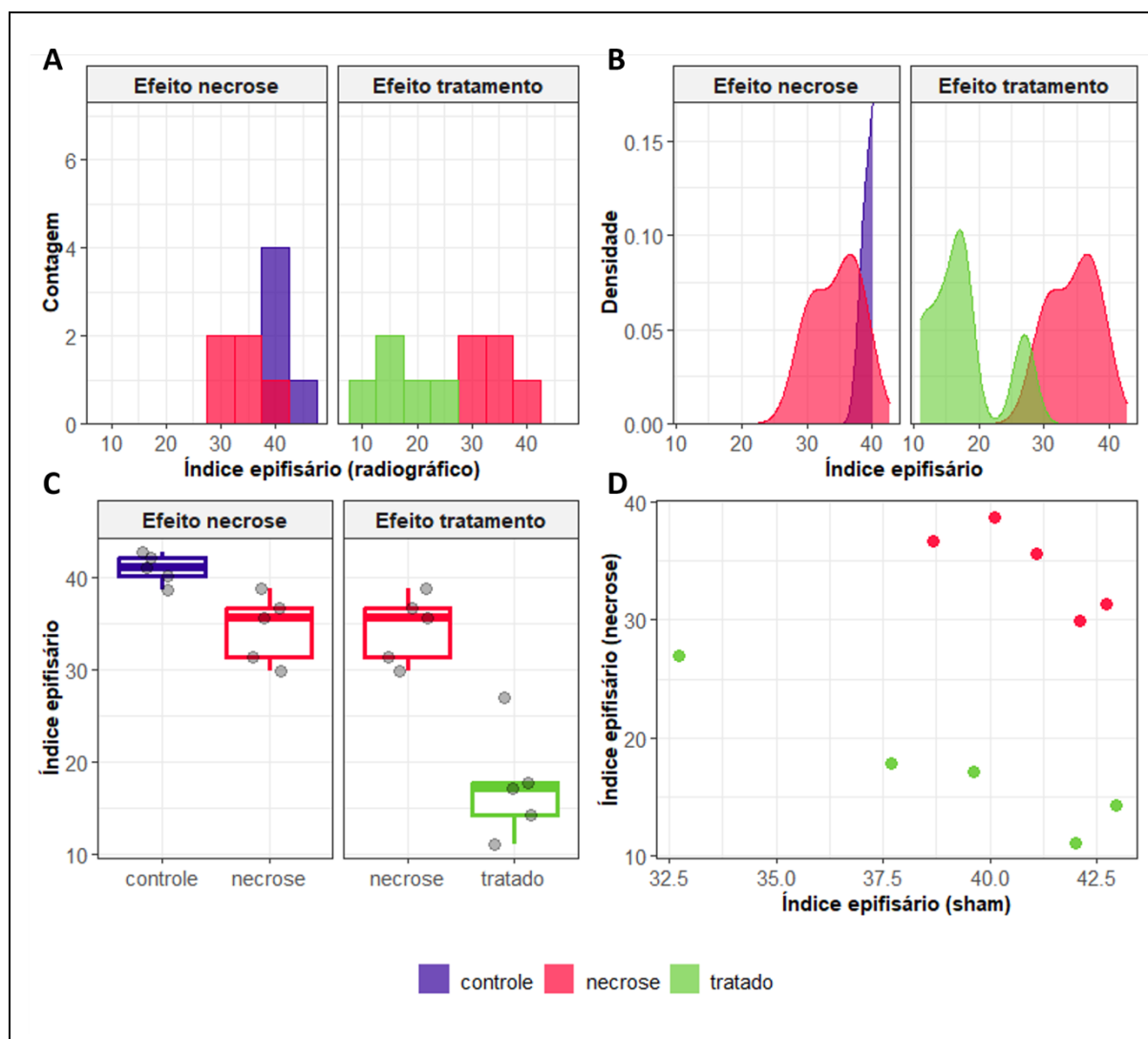
Gráfico 32 - Tamanho dos efeitos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 16

As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com o tratamento (ou não) com enxerto de células dentárias pluripotentes. Por sua vez, as barras verticais ilustram os intervalos de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

5.6 ÍNDICE EPIFISÁRIO RADIOGRÁFICO

O índice epifisário representa, em termos de porcentagem, a razão da altura da epífise em relação à sua largura e aparenta ser diminuído após a indução da necrose avascular na cabeça do fêmur (Gráfico 33A, B e C - Efeito necrose). Nesse contexto, as articulações poupadas da lesão exibem um valor mediano mais alto e uma dispersão qualitativamente menor do índice epifisário medido por radiografia do que os membros ipsilaterais (em relação à osteonecrose). Por sua vez, o tratamento com o implante de células pluripotentes aparenta estar associado à uma redução do índice epifisário radiográfico (Gráfico 33A, B e C - Efeito tratamento), cuja distribuição amostral se mostrou completamente dissociada das medidas de índice epifisário dos membros excluídos do tratamento celular após a osteonecrose. Ainda que as inclinações decrescentes desta relação sejam qualitativamente semelhantes, ela se manifesta em magnitudes distintas entre os membros tratados e os excluídos do tratamento. Assim, a relação entre as medidas de índice epifisário das articulações necrosadas e dos membros contralaterais mantém-se constante a despeito do tratamento celular, da mesma forma que o efeito do tratamento sobre o membro submetido à lesão avascular não depende do índice epifisário contralateral.

Gráfico 33 - Distribuição amostral do índice epifisário

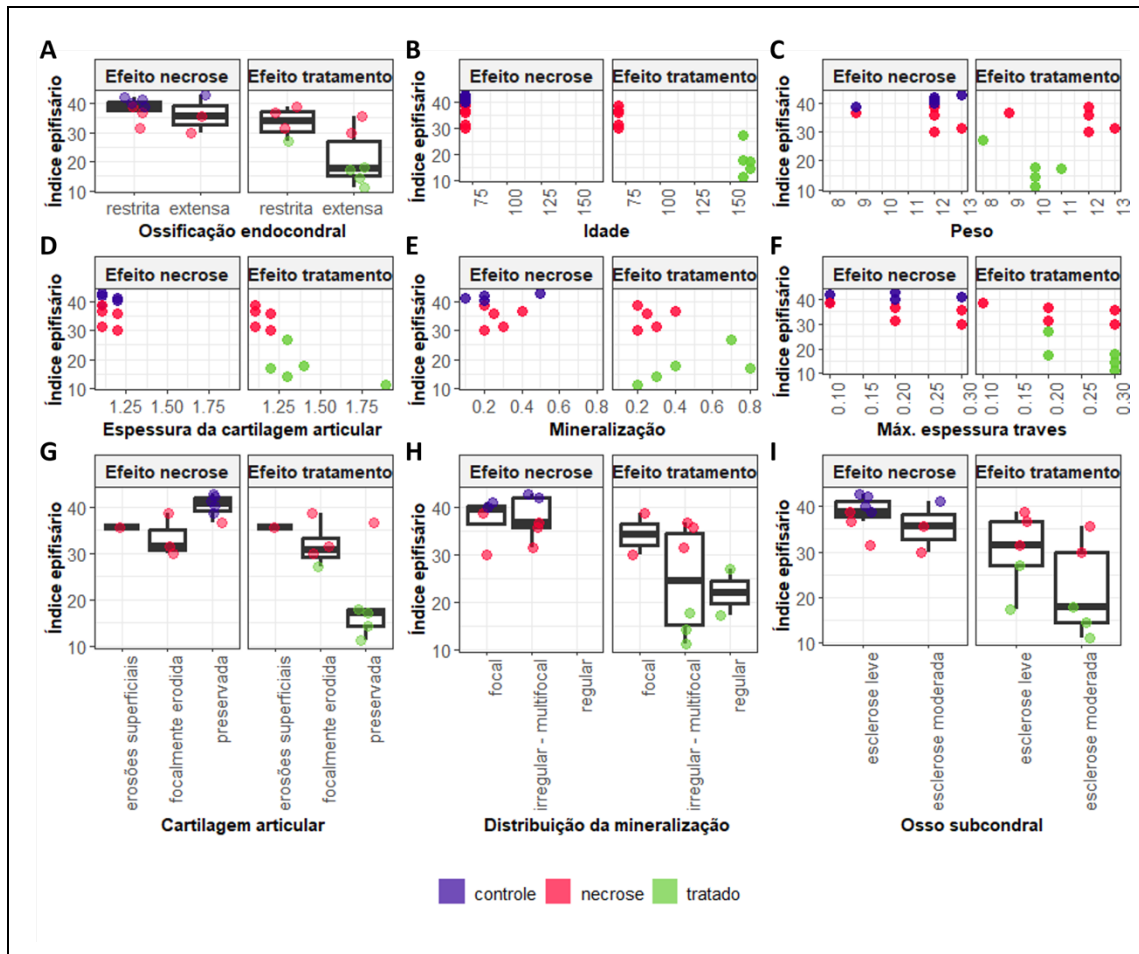


Nos painéis identificados como “Efeito necrose”, as cabeças de fêmur submetidas à necrose (em vermelho) são comparadas ao respectivo membro contralateral (em roxo) dos indivíduos que não receberam o enxerto de células dentárias (i.e., comparação pareada). Por sua vez, o *subplot* intitulado “Efeito do tratamento” avalia o desfecho da aplicação das células pluripotentes nas cabeças de fêmur com osteonecrose (em verde) em comparação aos membros necrosados dos outros animais que não receberam o enxerto celular (em vermelho - comparação não pareada). Em C, os diagramas de caixa têm, nas linhas horizontais, a representação do primeiro, segundo (ou mediana) e terceiro quartil, enquanto as linhas verticais ilustram os limites esperados da distribuição.

Ao se avaliar a possível relação entre o índice epifisário radiográfico e as demais características biológicas não controladas, percebe-se um indicativo de associação entre tal resposta e a extensão da ossificação endocondral no subconjunto das articulações eximidas do tratamento celular (Gráfico 34A - Efeito necrose). No caso, o índice epifisário que acompanha membros com ossificação ativa restrita parece se concentrar em valores mais elevados, ao passo que as articulações com ossificação endocondral ativa extensa tenderiam a dispersar suas medidas por níveis mais baixos de índice epifisário. Não obstante, convém

esclarecer que tal padrão pode ser espúrio, uma ilusão do acaso favorecida pelo tamanho amostral restrito, sobretudo da incidência de observações com ossificação endocondral ativa extensa. Por sua vez, a discrepância entre os níveis de ossificação endocondral quanto ao índice epifisário parece mais marcante quando restrita à comparação dos membros submetidos à osteonecrose avascular (Gráfico 34A - Efeito tratamento). Porém, é bastante possível que tal diferença seja explicada pelo tratamento celular e o desequilíbrio entre os níveis de ossificação quanto à ocorrência, ou não, do tratamento. Em outras palavras, a redução dos valores de índice epifisário observada entre os membros com ossificação endocondral ativa extensa pode, na verdade, decorrer da maior quantidade de observações tratadas com o enxerto celular pluripotente nesta condição do que entre as articulações com ossificação ativa restrita. Esse padrão de confusão com potenciais associações subjacentes se repete na maioria das covariáveis restantes, como nos casos da idade (Gráfico 34B) e peso dos animais (Gráfico 34C), mineralização (Gráfico 34E) e sua distribuição (Gráfico 34H), estado da cartilagem articular (Gráfico 34G) e grau de esclerose do osso subcondral (Gráfico 34I). Em todas estas situações, não aparenta haver indícios claros de que tais covariáveis estejam relacionadas com o índice epifisário, exceto por uma dicotomia nos níveis da resposta que é acompanhada por uma diferença quanto modelo experimental (i.e., indução, ou não, da osteonecrose avascular) ou no tratamento (i.e., implante, ou não, do enxerto dentário pluripotente). Isto é, o único padrão observável nos casos mencionados acima é uma separação dos pontos quanto à cor, a qual representa os níveis distintos de indução da necrose e tratamento celular. Cabe, no entanto, a ressalva ao possível, porém improvável, efeito de interação entre a mineralização e tratamento celular, de modo que a mineralização se mostre associada ao índice epifisário apenas diante da interferência da aplicação do enxerto dentário (Gráfico 34E - Efeito tratamento). Por sua vez, foi encontrado indício de associação entre a espessura da cartilagem articular e o índice epifisário radiográfico somente no subconjunto de dados das articulações induzidas à osteonecrose avascular (Gráfico 34D - Efeito tratamento). Por fim, o índice epifisário parece ser inversamente proporcional à máxima espessura das traves entre os membros induzidos à necrose avascular, sendo tal relação potencialmente intensificada pelo tratamento com infusão de células pluripotentes (Gráfico 34F).

Gráfico 34 - Distribuição do índice epifísario condicionado aos níveis de características biológicas não controladas

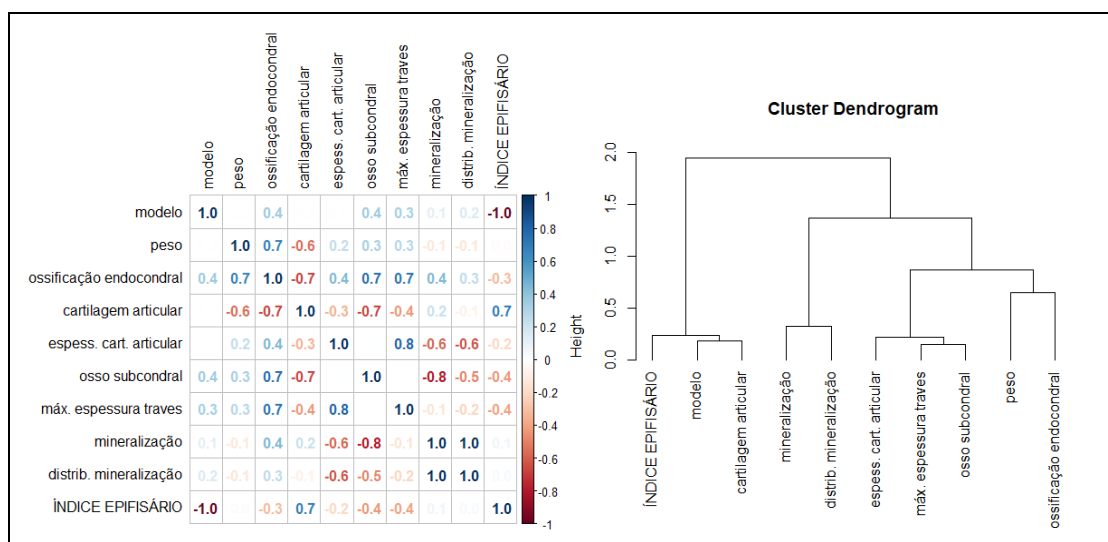


Nos painéis identificados como “Efeito necrose”, as cabeças de fêmur submetidas à necrose (pontos vermelhos) são comparadas ao respectivo membro contralateral (pontos roxos) dos indivíduos que não receberam o enxerto de células dentárias (i.e., comparação pareada). Por sua vez, o *subplot* intitulado “Efeito do tratamento” avalia o desfecho da aplicação das células pluripotentes nas cabeças de fêmur com osteonecrose (pontos verdes) em comparação aos membros necrosados dos outros animais que não receberam o enxerto celular (pontos vermelhos - comparação não pareada). Os diagramas de caixa têm, nas linhas horizontais, a representação do primeiro, segundo (ou mediana) e terceiro quartil, enquanto as linhas verticais ilustram os limites esperados da distribuição. Sobrepostos aos diagramas, encontram-se os valores de cada observação.

5.6.1 Efeito da necrose

No que se refere à correlação policórica estimada a partir do subconjunto de dados das articulações excluídas do tratamento, constata-se que a relação com o índice epifisário radiográfico é dominada pelo modelo experimental (i.e., indução, ou não, da osteonecrose avascular) em um nível de virtual equivalência (6A, corr = -1,0), seguido pelo estado da cartilagem articular (corr = 0,7). Tais relações são endossadas pelas distâncias matemáticas em dendrograma (Gráfico 35B). No caso, o estado da cartilagem articular se mostrou bastante similar ao modelo experimental e ambos conjuntamente similar ao índice epifisário radiográfico.

Gráfico 35 - Relação essencial entre variáveis.



À esquerda, a matriz de correlação policórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

Em um contexto inferencial, confirmou-se a significância estatística do efeito da indução da osteonecrose avascular sobre o índice epifisário (Tabela 18; estimativa = -7,1189, erro pad. = 1,5098, lambda = 8,6795, GL = 1, p = 0,0032). Nesse caso, estima-se que o índice epifisário das articulações submetidas à necrose seja, em média, reduzido em 7,1189 em comparação com os membros poupados da lesão avascular. Além de afetar a média da resposta, a indução da osteonecrose também foi associada, de modo estatisticamente significativo, a um aumento na variabilidade dos valores de índice epifisário radiográfico (Tabela 18; estimativa = 3,0001, erro pad. = 0,9488, lambda = 7,5358, GL = 2, p = 0,0231). E ainda, a média

do índice epifisário parece aumentar 4,5579 a cada incremento de uma unidade de mineralização, apesar de tal efeito não contar com evidência suficientemente robusta (Tabela 18; estimativa = 4,5579, erro pad. = 2,4166, lambda = 2,5952, GL = 1, p = 0,1072), de modo que a independência entre tais variáveis seja razoavelmente provável.

Tabela 18 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como a indução de necrose avascular na cabeça do fêmur e a mineralização influenciam no índice epifisário

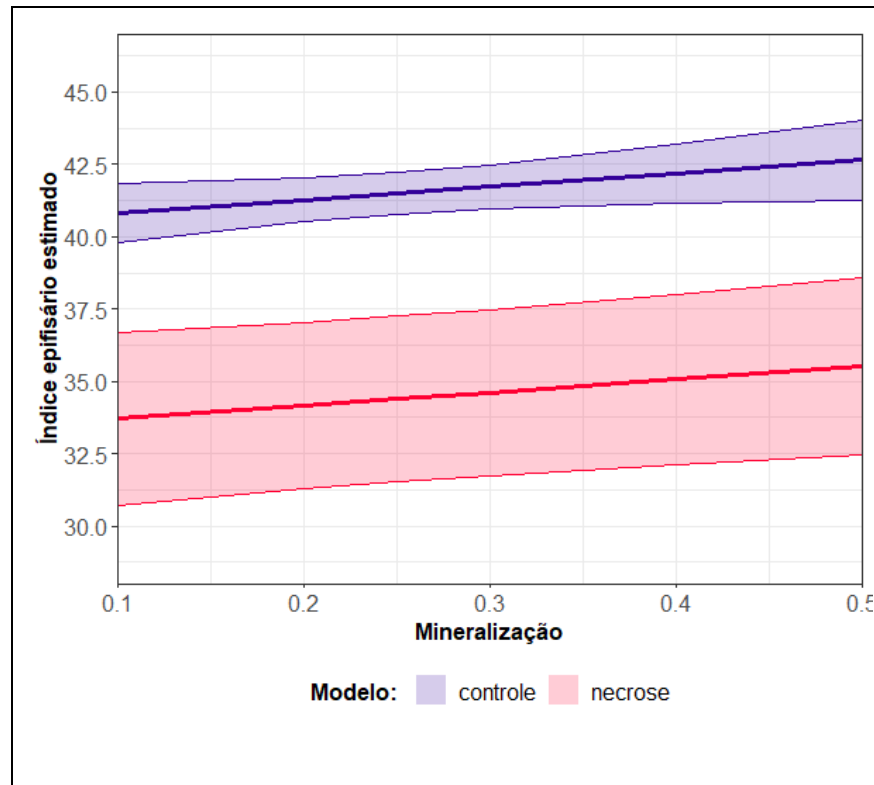
MLGM normal com ligação identidade para o índice epifisário					
	Estimativa	Erro pad.	Razão de verossimilhança		
			Lambda	GL	p
Localização / média					
(Intercepto)	40,36276	0,705981			
Modelo: necrose x controle	-7,11886	1,509836	8,6795	1	0,0032
Mineralização	4,557925	2,416609	2,5952	1	0,1072
Escala / dispersão					
(Intercepto)	-0,62804	0,707145			
Modelo: osteonecrose x controle	3,000084	0,948775	1,908586	1	0,16712

O modelo restringe-se à comparação pareada entre os membros dos indivíduos não tratados com o enxerto dentário. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna "Estimativa" informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna "Erro pad."), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, "Lambda" indica a estatística do teste, enquanto "GL" informa os graus de liberdade e "p", como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLGM = modelos lineares generalizados mistos.

As inferências descritas acima são representadas no Gráfico 36. Nesse contexto, nota-se que as retas que ilustram os valores preditos de índice epifisário radiográfico conforme a mineralização são paralelas, indicando o tamanho do efeito independe da indução da osteonecrose avascular. Além disso, dentro das bandas de confiança dos valores prováveis, é possível que ambas as retas sejam exatamente horizontais, implicando que a independência entre o índice epifisário e a mineralização seja uma condição bastante plausível. Entende-se, então, que a principal fonte de variação do índice epifisário seja a diferença de altura entre as retas, cada uma associada a uma categoria do modelo experimental. Desta forma, as articulações poupadas da osteonecrose apresentam um índice epifisário médio estimado maior que os membros submetidos a tal lesão. Por fim, observam-se também bandas de confiança mais amplas para a média predita do índice epifisário

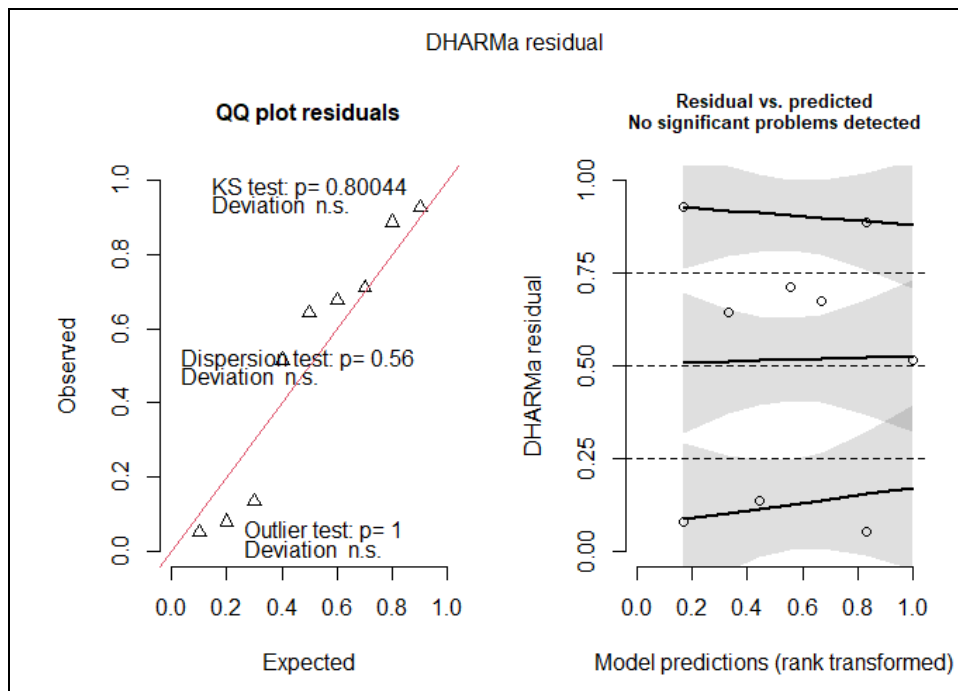
das articulações induzidas à osteonecrose avascular em virtude do aumento na variabilidade da resposta estimado para esta condição.

Gráfico 36 - Tamanho dos efeitos conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 17



As linhas espessas em destaque indicam a progressão estimada do índice epifisário conforme o nível de mineralização da cabeça do fêmur em duas condições diferentes: sob osteonecrose induzida (em vermelho) e nos membros contralaterais poupados (em roxo). Por sua vez, as áreas de coloração suavizada ilustram bandas de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

É importante destacar a validade das inferências descritas acima, uma vez que foram baseadas em modelo validado conforme as suas medidas diagnósticas. Nesse contexto, os resíduos provenientes do ajuste do modelo (como definido na Tabela 18) apresentaram distribuição compatível com o esperado diante da suposição de representação fiel dos dados (Gráfico 37A). Além disso, após definição da relação entre resposta e preditores pelo componente sistemático, não restou nenhum padrão da relação entre as variáveis, de modo que os distribuição dos resíduos ao longo dos valores preditos se apresentou como essencialmente uniforme, portanto, desprovida de estrutura (Gráfico 37B). Por fim, a especificação da variância incorporada ao modelo se mostrou representativa dos dados, uma vez que nenhum padrão de afunilamento foi observado (Gráfico 37B).

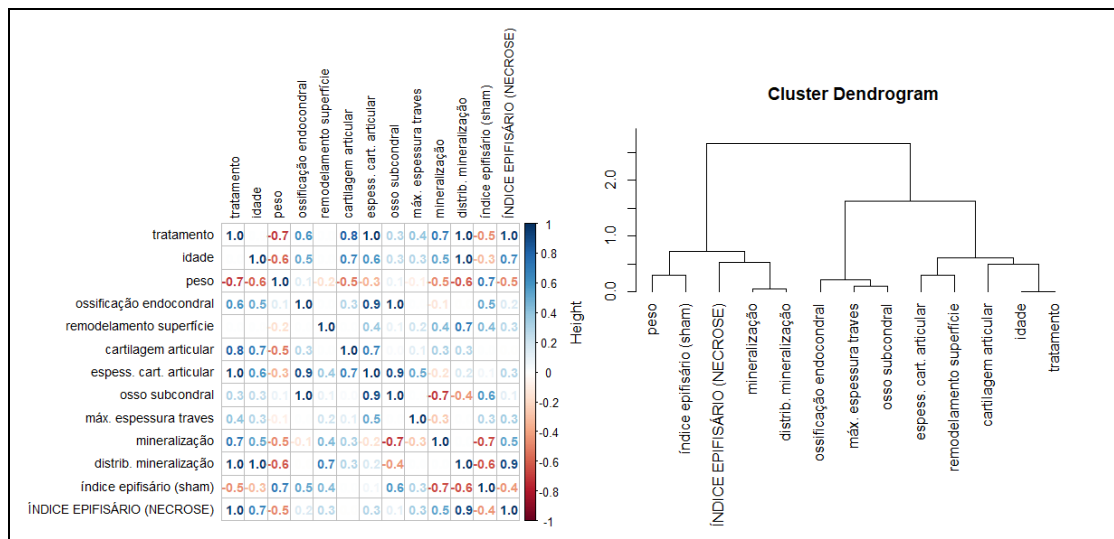
Gráfico 37 - Medidas diagnósticas para validação do modelo definido na Tabela 18

À esquerda, a distribuição observada dos resíduos decorrentes do ajuste do modelo aos dados (eixo vertical) é contraposta ao seu comportamento teórico esperado (eixo horizontal), sendo a linha unitária vermelha indicativa da condição de igualdade. À direita, os resíduos são distribuídos conforme os valores ajustados das respectivas observações.

5.6.2 Efeito do tratamento

No subconjunto das articulações induzidas à osteonecrose avascular, observa-se praticamente uma relação de equivalência, em termos de correlação policórica, entre as medidas de índice epifisário na articulação pós-necrose e o tratamento com o enxerto de células pluripotentes (Gráfico 38A, $\text{corr} = 1.0$). Contudo, tal resultado diverge drasticamente da acentuada distância entre as variáveis em dendrograma de similaridade (Gráfico 38B). Além disso, o índice epifisário ipsilateral em relação à osteonecrose avascular também apresentou correlação expressiva com a distribuição da mineralização ($\text{corr} = 0,9$) e a idade dos animais ($\text{corr} = 0,7$). Ainda que a similaridade entre o índice epifisário ipsilateral e a distribuição da mineralização tenha sido confirmada, o mesmo não pode ser dito quanto à distância entre tal resposta e a idade dos indivíduos. Em sequência, o peso dos animais, o índice epifisário contralateral e mineralização completam o conjunto de preditores com maior similaridade em relação ao índice epifisário do membro necrosado, ainda que tenham demonstrado correlações intermediárias ($\text{corr} = -0,5$, $\text{corr} = -0,4$, $\text{corr} = 0,5$, respectivamente).

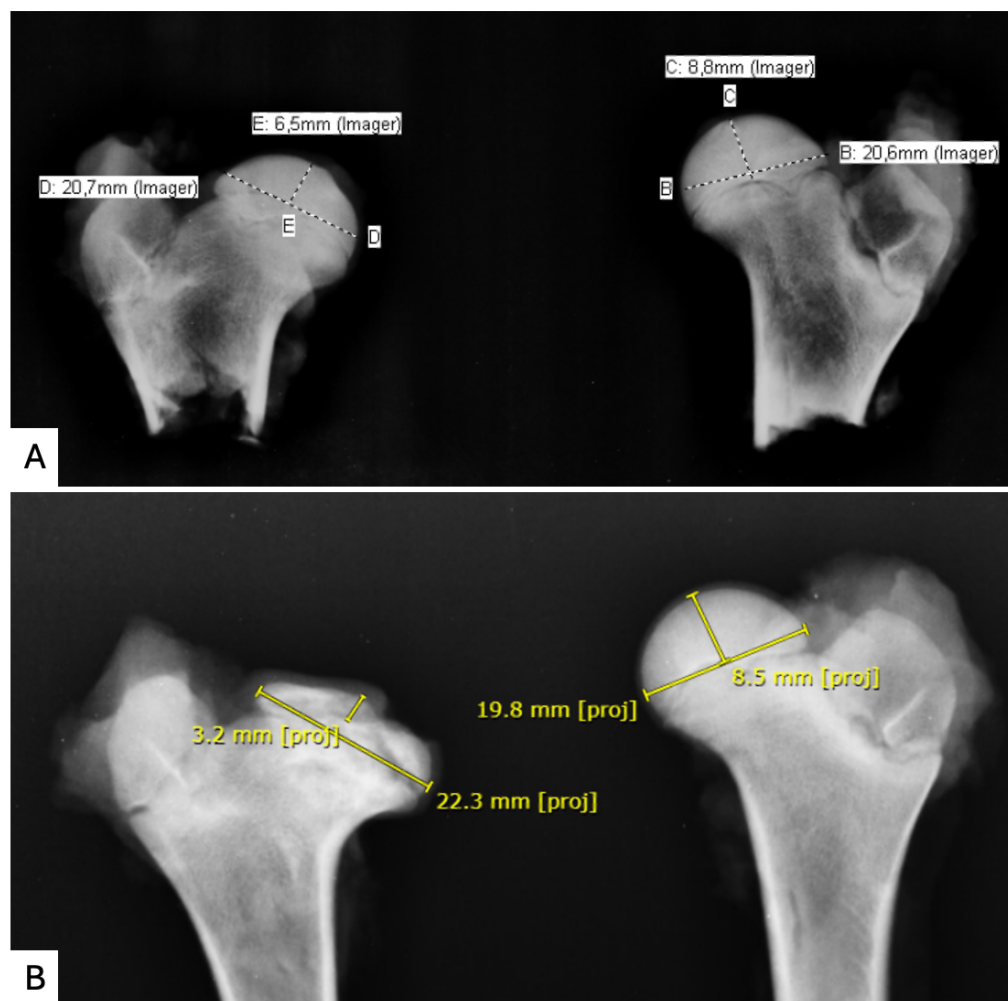
Gráfico 38 - Relação essencial entre variáveis



À esquerda, a matriz de correlação policórica sumariza a paridade das variáveis aos pares. À direita o dendrograma conecta as medidas, ou um conjunto delas, conforme a distância matemática que as separam. Assim, quanto menor for a altura em que ocorrer a ligação entre variáveis, maior a similaridade entre elas.

Em coerência à análise exploratória, foi confirmada a significância estatística do efeito do tratamento com enxerto dentário sobre o índice epifisário do membro previamente induzido à osteonecrose avascular (Tabela 19; estimativa = -0,6776, erro pad. = 0,1588, lambda = 12,2965, GL = 1, p < 0,001, poder = 0,9964). Assim, diante da robustez da evidência, estima-se que a aplicação de células pluripotentes reduza 49,22% da média do índice epifisário de uma articulação induzida à osteonecrose avascular em comparação aos membros com a mesma lesão, porém, eximidos do tratamento celular (Figura 9). O tamanho desse efeito é representado no Gráfico 39, em termos dos valores preditos e respectivos intervalos de 95% de confiança.

Figura 9 - Medição do índice epifisário radiográfico nos grupos



A: imagem da medição do índice epifisário em um dos espécimes do Grupo Comparação. O índice epifisário do quadril direito é $6,5/20,7 = 0,31$ e do esquerdo é $8,8/20,6 = 0,42$. B: imagem da medição em um dos espécimes do Grupo Intervenção. O índice epifisário do quadril direito é $3,2/22,3 = 0,14$ e do esquerdo $8,5/19,8 = 0,42$.

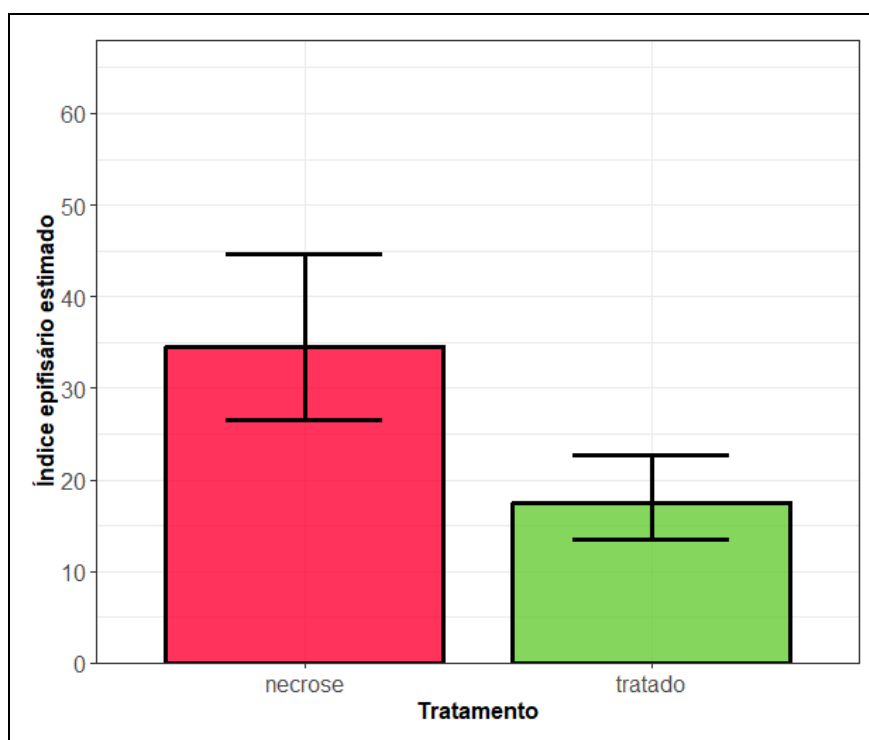
Tabela 19 - Modelo estatístico de regressão ajustado aos dados para explicar e prever como o tratamento com enxerto de células dentárias pluripotentes influencia no índice epifisário

	MLG gama com ligação logarítmica para o índice epifisário					
	Estimativa	Erro padrão	Razão de verossimilhança			Monte Carlo poder*
			Lambda	GL	p	
(Intercepto)	3,5402	0,1123				
Tratamento: tratado x necrose	-0,6776	0,1588	12,2965	1	< 0,001	0,9964

O modelo baseia-se na comparação entre membros submetidos a necrose de indivíduos diferentes, sendo que apenas uma parte deles recebeu o tratamento. A classe do modelo é informada no cabeçalho da tabela, juntamente com a função que liga a média da resposta à combinação (linear) dos preditores. A coluna “Estimativa” informa os coeficientes estimados do modelo conforme o efeito representado na linha correspondente. A cada estimativa, é apresentado o erro padrão do respectivo estimador (coluna “Erro pad.”), seguido das estatísticas do teste de razão de (máxima) verossimilhança para a avaliação da significância estatística do coeficiente, portanto, do efeito por ele representado. Nesse contexto, “Lambda” indica a estatística do teste, enquanto “GL” informa os graus de liberdade e “p”, como usualmente empregado, apresenta a probabilidade de o efeito correspondente ser creditado ao acaso (erro do falso positivo). MLG =

modelo linear generalizado.

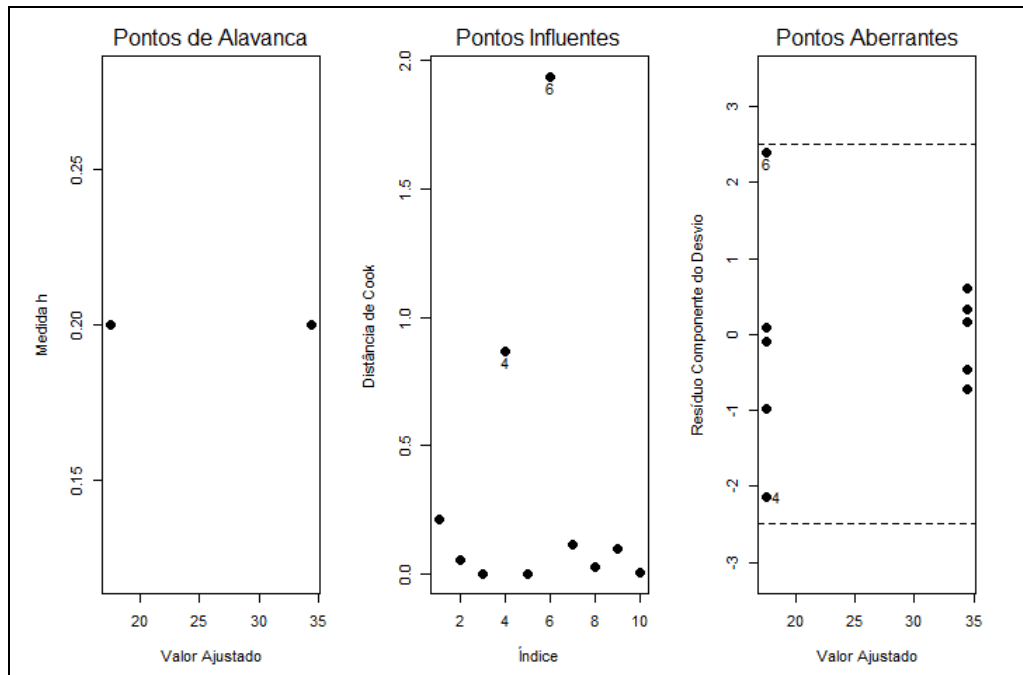
Gráfico 39 - Tamanho do efeito conforme estimado pelo modelo definido na Tabela 19



As colunas indicam os valores preditos pelo modelo de acordo com o tratamento (ou não) com enxerto de células dentárias pluripotentes. Por sua vez, as barras verticais ilustram os intervalos de 95% de confiança para o respectivo valor médio estimado.

Naturalmente, a confiança nas inferências baseadas em um modelo depende de o quão fielmente tal ferramenta estatística representa a informação dos dados. Assim, para a validade das conclusões, torna-se imprescindível avaliar a qualidade do ajuste do modelo aos dados por meio de suas medidas diagnósticas. À primeira vista, percebe-se que as categorias de tratamento contam com a mesma magnitude de alavanca (Gráfico 40A). Assim, entende-se que todas as observações contam com a contribuição semelhante dos outros pontos para a estimativa do valor predito. Mesmo assim, duas observações se destacaram quanto à influência sobre a estimativa dos coeficientes do modelo: #4 e #6, conforme os índices na base de dados (Gráfico 40B). Ao se investigar os pontos atípicos ao modelo, entende-se que esta influência desproporcional decorre da maior discrepância entre os valores observados da resposta e o esperado conforme o modelo representa a relação das variáveis, ainda que dentro da variabilidade devidamente explicada pelo acaso (Gráfico 40C).

Gráfico 40 - Medidas diagnósticas descrevendo a definição do modelo (Tabela 19) a partir dos dados



A medida h (nos Pontos de Alavanca) informa a quantidade de informação disponível para se estimar o valor predito da resposta em cada observação e deriva da proximidade das observações quanto à configuração dos preditores. No gráfico de Pontos Influentes, a distância de Cook quantifica a influência de cada observação sobre as estimativas dos coeficientes do modelo. Por fim, o gráfico dos Pontos Aberrantes, apresentam a compatibilidade entre os valores predito a partir do modelo e o nível da resposta observado para cada ponto.

Para se avaliar o potencial viés causado pelas observações relativamente influente sobre as inferências baseadas no modelo, procedemos com a análise confirmatória, a qual compara o ajuste original a um modelo análogo, porém, desconsiderando individualmente cada um dos pontos influentes. Nesse contexto, a remoção da observação #4 repercutiu na redução do valor absoluto do coeficiente relacionado ao efeito do tratamento celular (Tabela 20). Como resultado, a probabilidade de o efeito ser atribuído ao acaso aumentou, mas ainda se manteve abaixo do nível de significância ($p = 0,001$). Por sua vez, a eliminação do ponto #6 promoveu a mudança oposta: aumentou a estimativa do tamanho do efeito do tratamento. Em resumo, a influência exercida pelas observações #4 se manifesta como um viés no sentido de intensificar o efeito do tratamento celular sobre o índice epifísario, ao passo que a observação #6 age por subestimar tal efeito. Não obstante, nenhuma destas influências se mostraram suficientes para deturpar a inferência e descreditar a significância estatística do efeito do tratamento.

Tabela 20 - A análise confirmatória consiste na reprodução do ajuste do modelo (definido na Tabela 19), porém desconsiderando individualmente, a cada etapa, as observações com influência (segundo distância de Cook) mais proeminentes

Análise confirmatória para o coeficiente epifisário (razão de verossimilhança)						
Coeficiente	Estimativas			p-valores		
	original	delta 4	delta 6	original	4	6
Tratamento: tratado x necrose	-0,6776	-0,12803	0,214972	0,000454	0,000522	7,92E-06

A repercussão da remoção de cada observação sobre o coeficiente do modelo é apresentada em termos proporcionais em relação à magnitude original e é exibida sob o rótulo “Estimativas”, na coluna intitulada por “delta” seguido da identificação da observação conforme o índice na base de dados. Por sua vez, o risco de falso positivo após a remoção de cada ponto influente é especificado na coluna identificada pelo índice da observação e comparado ao risco original sob o cabeçalho de “p-valores”.

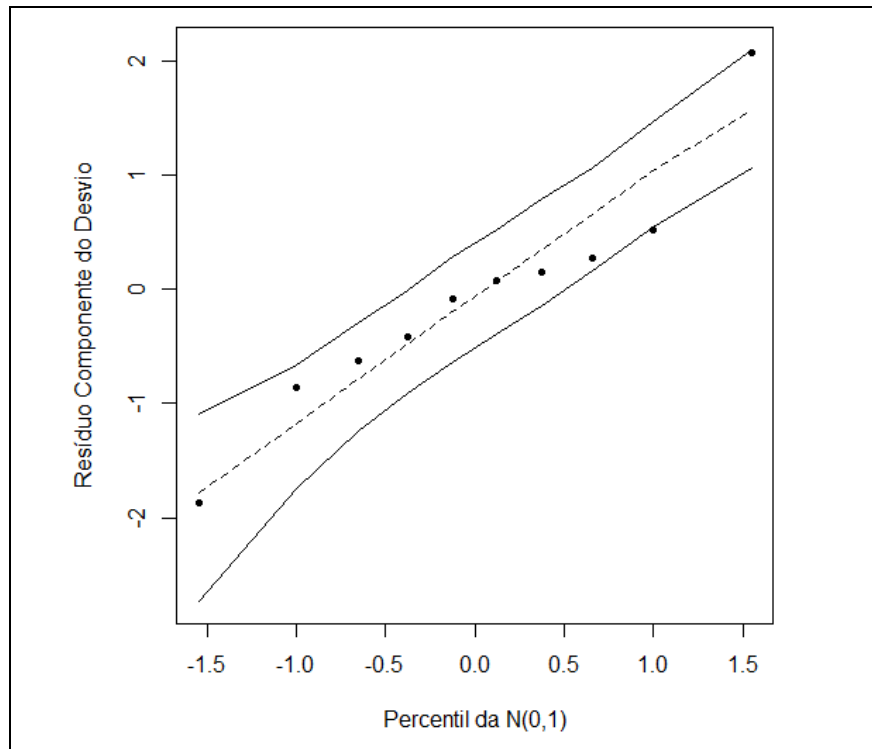
Ao se investigar as características das observações influentes, percebe-se que ambos consistem em articulações induzidas à osteonecrose avascular e tratadas com o implante celular pluripotente. Além disso, esses pontos correspondem aos extremos da distribuição amostral do índice epifisário para esta condição. No caso da observação #4, o índice epifisário observado foi o menor do seu grupo, abaixo do correspondente valor predito pelo modelo. Por outro lado, a observação #6 apresentou o maior valor de índice epifisário registrado entre os membros necrosados e tratados com o enxerto dentário, acima do valor predito para a sua condição (Tabela 21).

Tabela 21 - Descrição dos pontos relativamente influentes conforme a Gráfico 39

Observações influentes			
Índice	Tratamento	Índice epifisário	Índice epifisário estimado
4	tratado	11,16071	17,50732
6	tratado	27	17,50732

Finalmente, ratifica-se a validade do modelo definido na Tabela 19, conforme o respectivo gráfico de envelope (Gráfico 41). Então, por serem fundamentadas em um modelo corroborado, a validade se estende naturalmente para as suas inferências.

Gráfico 41 - Envelope da distribuição dos resíduos provenientes do ajuste do modelo (Tabela 19) aos dados delimitada pela respectiva banda de confiança



6 DISCUSSÃO

A principal motivação deste estudo foi testar a hipótese de que a injeção de CTPDh na epífise femoral proximal de porcos imaturos induzida à necrose avascular aumentaria a mineralização óssea da epífise, gerando maior sustentação e preservando a morfologia da cabeça femoral em comparação com os controles submetidos apenas à osteonecrose. Em relação ao desfecho primário do estudo (mineralização da epífise femoral), foi demonstrado um resultado positivo e estatisticamente significativo, favorável à hipótese principal formulada. Entretanto, o desfecho secundário (manutenção da esfericidade da cabeça femoral) se apresentou desfavorável à hipótese testada, visto que os quadris tratados com a injeção de CTPDh demonstraram maior deformidade do que os quadris submetidos apenas à necrose avascular.

Este estudo é de especial importância, pois é o primeiro a testar o efeito da aplicação de CTPDh em um modelo experimental da DLCP em suínos imaturos, como tratamento biológico. Dado que a DLCP geralmente ocorre em pacientes com idade ao redor de 6 anos, que é justamente a fase em que ocorre a perda dos “dentes-de-leite”, a obtenção de material autólogo celular da polpa dentária para cultivo e autoinoculação é possível e pouco invasiva, sendo uma possibilidade futura que pode beneficiar inúmeros pacientes com esta doença.

6.1 O TRATAMENTO BIOLÓGICO DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES

Ao longo dos mais de 100 anos da descoberta da DLCP, inúmeros estudos foram publicados sobre opções de tratamentos mecânicos para evitar a deformação da epífise femoral proximal afetada, com base no princípio de contenção da cabeça femoral^{11,51}. Opções de tratamento cirúrgico como as osteotomias femorais, osteotomias acetabulares e artrodiastase do quadril com fixadores externos são as opções mais comuns utilizadas atualmente para o tratamento da doença¹¹. Já em relação ao tratamento conservador, a retirada de carga prolongada vem ganhando evidência na literatura nos últimos anos⁵²⁻⁵⁴.

Apesar disto, poucos estudos foram publicados avaliando os resultados de tratamentos biológicos da doença nos seres humanos^{14,55-57}. O primeiro estudo que avaliou a possibilidade de tratamento biológico da DLCP em seres humanos foi publicado pelo Prof. Flávio Pires de Camargo, em 1957¹⁴. Uma série de 80 casos tratados pelo enxerto ósseo por inversão mostrou uma rápida revascularização, sendo que os melhores resultados baseados na manutenção da esfericidade da cabeça femoral foram

obtidos em pacientes que foram operados nos estágios iniciais da doença. Herrera-Soto e Price relataram bons resultados na realização da descompressão da epífise femoral de seis pacientes adolescentes com DLCP por perfuração com uma broca canulada e ou trefinas de 8 a 10mm e enxertia de osso autólogo ou substituto ósseo sintético⁵⁵. Os melhores resultados desta série foram reportados em pacientes que foram operados no estágio de fragmentação precoce (IIA)⁵⁸. Os mesmos autores publicaram uma revisão que recomendou, além da descompressão precoce para o mesmo subgrupo de pacientes, a realização de uma artroplastia acetabular do tipo prateleira (*shelf*) a fim de obter melhores resultados⁵⁷. Sivakumar et al.⁵⁶ publicaram um relato de dois casos submetidos à injeção epifisária de 2 mg de ácido zoledrônico em pacientes com diagnóstico de DLCP. Segundo os autores, os resultados foram satisfatórios e ambos os pacientes tiveram resultados clínicos satisfatórios. Até o momento, não foram publicados estudos comparativos prospectivos ou retrospectivos em seres humanos avaliando a eficácia de nenhuma terapia biológica para a DLCP.

6.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DO TRATAMENTO BIOLÓGICO DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES

Neste campo de pesquisa, os estudos em modelos animais experimentais têm mostrado bons resultados em relação ao aumento de densidade óssea da epífise femoral e preservação da esfericidade da cabeça femoral^{13,23,38,40,43,45,46,59-62}. O estudo que mais se assemelha à presente investigação foi o publicado por Cheng et al.⁴⁰, devido ao fato de as intervenções terem sido aplicadas no mesmo momento da indução da necrose avascular. Neste estudo, os autores concluíram que o biomaterial de BAIS é um meio eficiente de carrear a BMP-2 recombinante humana à epífise femoral proximal. O estudo também demonstrou que a injeção de BMP-2 recombinante humana sem bisfosfonato não foi capaz de prevenir a deformidade da epífise femoral. Contudo, quando injetada com bisfosfonato, obtiveram bons resultados na manutenção do formato da cabeça femoral. Em nosso estudo, decidimos por questão de logística e baseado no estudo de Cheng et al.⁴⁰ sobre a realização da aplicação da intervenção no mesmo tempo da indução da osteonecrose, por mais que acreditemos que as injeções realizadas após uma ou duas semanas sejam mais fidedignas para concluir que o tratamento pode ser eficaz, visto que é raríssimo que em um ser humano o tratamento seja iniciado no momento exato em que a epífise femoral sofreu isquemia.

A maioria dos estudos científicos que avaliou intervenções biológicas em modelos experimentais realizou a aplicação da intervenção após 1 ou 2 semanas da indução da osteonecrose^{13,38,43,45,59,60}. Em relação aos estudos baseados na utilização de BMP-2 como principal agente, Kim et al.¹³ realizaram um experimento em 18 porcos imaturos, sendo que seis animais receberam aplicação local de BMP-2, seis receberam aplicação local direta de BMP-2 associado ao ibandronato, e seis não receberam nenhum tipo de terapia biológica local. As injeções foram realizadas de uma a duas semanas após a indução da osteonecrose. Aruwajoye et al.⁴³ também estudaram a injeção de BMP-2 e ibandronato, uma semana após a indução da osteonecrose. Os autores concluíram que os grupos tratados com BMP-2 ou com BMP-2 e ibandronato mantiveram as propriedades materiais da epífise femoral semelhantes ao do osso normal. Ambos os estudos concluíram que a esfericidade e a mineralização óssea da cabeça femoral são mais bem preservadas com a associação de BMP-2 com um bisfosfonato. No presente estudo não foi utilizado um agente antirreabsortivo, o que pode ter contribuído para a perda de esfericidade da cabeça femoral no grupo tratado.

Sobre os estudos que utilizaram perfurações transfisárias como tratamento biológico, destacam-se os realizados por Aruwajoye et al.⁴⁵, Wang et al.⁵⁹ e Gong et al.³⁸. O primeiro⁴⁵ comparou a realização de múltiplas perfurações transfisárias com a tunelização única transfisária em porcos imaturos submetidos à indução clássica da osteonecrose avascular. Os porcos foram submetidos à amputação do membro direito para simular a retirada de carga. As intervenções foram aplicadas uma semana após a indução da necrose. Ambas as intervenções não causaram defeitos de crescimento na fise proximal do fêmur e as perfurações múltiplas estimularam maior formação óssea do que a tunelização. Já Wang et al.⁵⁹ associaram a uma perfuração única transfisária com um fio metálico de 1,2 mm de diâmetro com a injeção de BMP-2 e células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDTA) de coelhos em um experimento que envolveu 45 coelhos imaturos. A intervenção foi realizada duas semanas após a indução da osteonecrose. Os autores concluíram que a injeção de BMP-2 e CTDTA por via transfisária induziram maior formação óssea e menor deformação da cabeça femoral em relação ao grupo controle ou mesmo com o grupo que foi apenas submetido à perfuração sem inoculações. Já Gong et al.³⁸, realizaram três perfurações transfisárias com fios de Kirschner de 1,57 mm nos quadris esquerdos, 3 semanas após a indução da necrose, por uma via medial. Os

autores concluíram que a porcentagem de revascularização foi maior nos quadris que foram submetidos às perfurações múltiplas, e que este procedimento não aparenta produzir barras ósseas na fise. Contudo, as perfurações não preveniram o colapso da cabeça femoral e não promoveram a neoformação óssea. No presente estudo, a injeção local das CTPDh foi realizada por via direta na cabeça femoral, o que pode ter contribuído para maior deformação da epífise femoral proximal em relação ao grupo controle. Em adição, como Wang et al.⁵⁹ e Gong et al.³⁸ não observaram que as perfurações foram capazes de prevenir o colapso da epífise femoral, é muito provável que uma perfuração única com fio fino não seja capaz de aumentar a formação óssea na epífise por si só. Portanto, o efeito do aumento da mineralização encontrado em nosso estudo pode ser atribuído à inoculação de CTPDh, e não à perfuração em si.

Outra opção de tratamento biológico já estudada foi a utilização sistêmica de tocilizumab, uma substância inibidora da interleucina 6, uma substância que se encontra elevada no líquido sinovial de pacientes com DLCP e que é produzida por condrócitos⁶³. Kamiya et al.⁶⁰ induziram a osteonecrose em ratos imaturos de 6 semanas de vida a partir de um procedimento operatório de cauterização de quatro vasos que suprem a epífise femoral proximal direita. Um grupo controle no qual os vasos foram identificados - mas não cauterizados - foi utilizado para comparação. Os animais foram tratados com injeções de tocilizumab, iniciadas no 3º dia pós indução da osteonecrose e repetidas a cada semana por 6 semanas, totalizando seis doses. Os autores concluíram que a droga induz o aumento de volume ósseo nas epífises injetadas.

Os modelos experimentais da doença de Legg-Calvé-Perthes para testar os efeitos do tratamento biológico ganharam evidência na literatura na última década. Vários estudos que utilizaram diferentes espécimes animais e formas de tratamento encontraram bons resultados em relação à possibilidade de aumentar rapidamente o volume ósseo da epífise femoral a fim de prevenir o colapso da cabeça femoral necrosada. É possível que os efeitos do tratamento biológico sejam potencializados a partir da associação da retirada de carga no membro afetado e da adição de um agente inibidor da ação dos osteoclastos. Acreditamos que no nosso estudo - apesar de termos mostrado o aumento da mineralização óssea na epífise femoral proximal - não observamos a preservação da esfericidade da cabeça femoral devido ao fato de não termos realizado a amputação do membro estudado e de não termos

incluído no tratamento uma opção de bisfosfonato para inibir a reabsorção óssea osteoclástica. Outra variável que pode ter comprometido a morfologia da epífise femoral proximal é a injeção realizada por via direta associada à manutenção da carga livre no pós-operatório. É importante lembrar que estudos como o de Kim et al.¹³ que realizaram injeções diretas associaram a retirada de carga no membro estudado, conseguindo bons resultados na preservação da altura epifisária.

6.3 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente estudo apresenta várias limitações, que serão discutidas e certamente abordadas em estudos subsequentes desta linha de pesquisa.

A principal limitação da nossa investigação foi a falta de randomização dos grupos avaliados. Por questões relacionadas à operação de fornecimento das CTPDh e dos animais e a incapacidade de operarmos e mantermos mais de que cinco animais concomitantemente com nossa estrutura física, foi decidido pela não realização da randomização nesta investigação. Apesar disto, a metodologia descrita da indução da osteonecrose e os cuidados pós-operatórios foram exatamente os mesmos entre os grupos, sendo que a mesma equipe e o mesmo cirurgião realizaram todos os experimentos em todos os animais. Uma variável que não conseguiu ser controlada em relação à ausência de randomização foi a idade dos animais. O GC contou com cinco animais com 70 dias de vida, enquanto o GI foi composto de três animais de 160 dias e dois de 165 dias. Apesar disso, os pesos dos animais foram semelhantes, variando de 9 kg a 13 kg no GC e 8 kg a 11 kg no grupo intervenção. Os modelos estatísticos criados para a avaliação dos resultados não demonstraram que o peso e a idade foram fatores de confusão dos resultados obtidos. Ao final do experimento, encontrou-se um desfecho secundário indesejado, com maior deformidade no GI comparativamente com o GC, fazendo com que um viés de seleção tenha sido pouco provável.

Outra limitação do estudo foi a ausência de um terceiro grupo comparativo que seria submetido apenas à perfuração da epífise femoral, sem receber a injeção de CTPDh. O planejamento do estudo incluía este grupo, o qual seria chamado de Grupo Perfuração (GP). Contudo, devido a questões logísticas, e relacionadas ao total de animais que poderia ser fornecido ao estudo, foi optado pela exclusão deste grupo. Apesar de na literatura haver estudos que avaliaram o efeito de perfurações

únicas na epífise femoral com um grupo controle – como o estudo de Wang et al.⁵⁹ – até o momento não se demonstrou efeito benéfico ou prejudicial aos desfechos relacionados à perfuração única com agulha fina na epífise femoral. Como houve disponibilidade de apenas 10 animais para realizar o estudo e a realização de um terceiro grupo faria com que possuíssemos apenas três animais em dois grupos e quatro animais em outro grupo, foi decidido por excluir do trabalho o GP. Estudos como o de Kim et al.¹³, considerado um modelo para realização de investigações relacionadas ao tratamento biológico da necrose avascular do quadril em porcos imaturos, também não realizou um grupo controle com perfuração isolada. Desta forma, cremos que o efeito da perfuração em não tenha afetado o resultado do experimento. Em contrapartida, ressaltamos que a associação da perfuração direta da epífise femoral sem a proteção de carga pode ter sido um dos fatores que influenciou na maior deformidade do índice epifisário encontrada no GI.

Em relação ao efeito da inoculação das CTPDh, o presente estudo se limitou pela ausência de marcação de células e avaliação dos resultados a partir da realização de análises imuno-histoquímicas. Wang et al.⁵⁹ realizaram a marcação de células-tronco derivadas do tecido adiposo em seu experimento com bromodesoxiuridina. Os autores concluíram que a localização das células mudava da região mesenquimal da epífise femoral para o osso trabecular gradualmente da quarta até a oitava semana. Além disso, observaram que a intensidade do sinal de marcação diminuía com o tempo até a oitava semana, provavelmente sugerindo que a modulação celular sobre as células do próprio animal exerceu papel importante no aumento do volume ósseo na epífise femoral proximal. Portanto, concluímos que o efeito do aumento da mineralização óssea foi devido à injeção das CTPDh na epífise femoral, apesar de não ser possível afirmar se o efeito foi baseado apenas na modulação celular exercida pelas células implantadas ou se houve efeito direto dessas células no aumento do volume ósseo observado na cabeça femoral dos animais tratados.

6.4 PONTOS FORTES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo apresenta pontos fortes, dignos de nota. Trata-se de um estudo pioneiro, que pela primeira vez avaliou o uso de CTPDh no tratamento da osteonecrose induzida em um modelo animal da doença de Legg-Calvé-Perthes. Na última década, vários estudos investigaram a utilização de terapias biológicas para aumentar a mineralização óssea e, por conseguinte, diminuir a deformidade da epífise femoral submetida à indução da necrose avascular^{13,38,40,43,45,59,60}. O uso de células-tronco derivadas do tecido adiposo, BMP-2, bisfosfonatos e terapias sistêmicas como o a injeção de tocilizumab mostraram benefícios nos modelos estudados em porcos, ratos e coelhos. Contudo, nenhum deles apresentou uma opção de enxerto indutor da formação óssea que pudesse ser coletado e cultivado a partir de um dente de leite provisório, evitando assim a necessidade de um tratamento que utilize aloenxertos ou opções sintéticas que ainda não são disponíveis no Brasil, como o BMP-2. A viabilidade clínica para obtenção de CTPDh nos pacientes com DLCP é oportuna, visto que os pacientes que necessitam de intervenção geralmente apresentam de 6 a 10 anos de vida, idade onde a troca dos dentes provisórios e permanentes ocorre naturalmente¹¹. Isso torna o método de extração do enxerto pouco invasivo e mórbido para o paciente.

Além disso, o uso clínico deste tipo de enxerto para estimulação da formação óssea em pacientes com diagnóstico de fenda palatina, por exemplo, já foi estudado e tem sua segurança comprovada^{47,64,65}. Este estudo não encontrou nenhum efeito colateral relacionado à ossificação heterotópica na articulação dos quadril dos animais tratados - como foi relatado no estudo de Kim et al.¹³ pela injeção de BMP-2 e ibandronato - além de não termos identificado qualquer evidência de malignização nas epífises femorais avaliadas. O potencial osteogênico das CTPDh já foi extensamente estudado¹⁸, e este estudo adiciona mais uma possível aplicação do uso deste tipo de enxerto celular para o possível benefício futuro de pacientes com a DLCP.

Outro ponto forte destacado nesta investigação foi, contraditoriamente, o resultado obtido sobre a morfologia final das epífises femorais tratadas. Foi observado um colapso maior nos espécimes tratados com as CTPDh, em relação aos animais onde apenas a necrose foi induzida. Inferimos isto a partir do índice epifisário radiográfico e da avaliação macroscópica dos quadris logo após a eutanásia, dividindo as epífises em esféricas, ovais e planas, segundo a

classificação de Stulberg modificada por Huhnstock et al.⁴⁸. Fatores que podem ter influenciado este resultado indesejado foram: a injeção direta das células na epífise femoral proximal, e não por via transfisária; à manutenção da carga no pós-operatório; e a não associação de uma droga da classe dos bisfosfonatos com as CTPDh.

Os trabalhos de Kim et al.^{1,13,45} concluíram que as epífises femorais submetidas à indução da osteonecrose colapsavam ao longo das 8 semanas de observação, mas que a retirada de carga do membro operado – realizada a partir de uma amputação transfemoral – preservava o formato esférico da cabeça femoral. Outros estudos conseguiram demonstrar bons resultados da manutenção da esfericidade da epífise femoral proximal mesmo com a manutenção da carga, após o tratamento com terapias biológicas^{40,59}. Curiosamente, um estudo que avaliou o efeito de múltiplas perfurações transfisárias em porcos imaturos concluiu que este tratamento pode promover o aumento da vascularização, contudo sem promover a manutenção da esfericidade da cabeça femoral ou neoformação óssea³⁸. Em oposição a estes achados, Aruwajoye et al.⁴⁵ em um modelo semelhante, mas que foi submetido à amputação transfemoral para simular a retirada de carga, encontraram bons resultados na neoformação óssea e na manutenção da esfericidade da epífise femoral proximal a partir da realização de múltiplas perfurações transfisárias. Esta investigação mostrou que por mais que a mineralização óssea tenha aumentado na epífise femoral proximal após a injeção de CTPDh, o colapso e a deformidade da cabeça femoral ocorreram de forma bastante consistente. Portanto, em estudos futuros desta linha de pesquisa pretendemos associar a retirada de carga por meio da amputação transfemoral dos animais avaliados e a injeção por via transfisária das CTPDh, associada ou não aos bisfosfonatos, para ter certeza de que o colapso femoral não tenha sido induzido pelas próprias CTPDh. Este estudo futuro translacional será a base para que possamos avaliar a possibilidade de testar o tratamento em humanos se os resultados relativos à manutenção da esfericidade da cabeça forem positivos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a injeção de CTPDh na epífise femoral proximal de porcos imaturos induzida à necrose avascular aumenta a mineralização óssea em comparação com epífises induzidas apenas à necrose avascular. Apesar disso, o colapso e a deformidade da cabeça femoral foram maiores nas epífises tratadas.

REFERÊNCIAS*

* De acordo com Estilo Vancouver.

1. Kim HK, Aruwajoye O, Stetler J, Stall A. Effects of non-weight-bearing on the immature femoral head following ischemic osteonecrosis: an experimental investigation in immature pigs. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(24):2228-37.
2. Moreira MV, Dias LS, de Angeli LRA. The Long-Term Prognostic Value of Bone Scintigraphy in Legg-Calvé-Perthes Disease. *Ortho & Rheum Open Access J.* 2021;17(5).
3. Moreno Grangeiro P, Rodrigues JC, de Angeli LRA, Leão Filho H, Montenegro NB, Guarniero R, Dempsey M, Kim HKW. Feasibility of Magnetic Resonance Angiography in Patients With Legg-Calvé-Perthes Disease. *J Pediatr Orthop.* 2021;41(9):e774-e779.
4. Gray IM, Lowry RB, Renwick DH. Incidence and genetics of Legg-Perthes disease (osteochondritis deformans) in British Columbia: evidence of polygenic determination. *J Med Genet.* 1972;9(2):197-202.
5. Margetts BM, Perry CA, Taylor JF, Dangerfield PH. The incidence and distribution of Legg-Calvé-Perthes' disease in Liverpool, 1982-95. *Arch Dis Child.* 2001;84(4):351-4.
6. Molloy MK, MacMahon B. Incidence of Legg-Perthes disease (osteochondritis deformans). *N Engl J Med.* 1966;275(18):988-90.
7. de Camargo FP, de Godoy RM Jr, Tovo R. Angiography in Perthes' disease. *Clin Orthop Relat Res.* 1984;(191):216-20.
8. Kim HK, Herring JA. Pathophysiology, classifications, and natural history of Perthes disease. *Orthop Clin North Am.* 2011;42(3):285-95.
9. Stulberg SD, Cooperman DR, Wallensten R. The natural history of Legg-Calvé-Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am.* 1981;63(7):1095-108.
10. Mose K. Methods of measuring in Legg-Calvé-Perthes disease with special regard to the prognosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1980;(150):103-9.
11. Joseph B, Shah H, Perry DC. Epidemiology, natural evolution, pathogenesis, clinical spectrum, and management of Legg-Calvé-Perthes. *J Child Orthop.* 2023;17(5):385-403.
12. Gershuni DH, Hargens AR, Lee YF, Greenberg EN, Zapf R, Akeson WH. The questionable significance of hip joint tamponade in producing osteonecrosis in Legg-Calvé-Perthes syndrome. *J Pediatr Orthop.* 1983;3(3):280-6.
13. Kim HK, Aruwajoye O, Du J, Kamiya N. Local administration of bone morphogenetic protein-2 and bisphosphonate during non-weight-bearing treatment of ischemic osteonecrosis of the femoral head: an experimental investigation in immature pigs. *J Bone Joint Surg Am.* 2014;96(18):1515-24.
14. de Camargo FP. Revascularization of the neck of the femur in Legg-Calvé-Perthes syndrome; a new surgical technic; experience of 80 cases. *Clin Orthop.* 1957;10:79-86.

15. Luzo CAM, Guarniero R, Montenegro NB, De Godoy Junior RM. Experiência inicial com o uso de fixador externo articulado no tratamento da doença de Legg-Calvé-Perthes por meio de artrodiástase na fase ativa da moléstia. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*. 2016;51(3):337-45.
16. Sankar WN, Lavalva SM, Mcguire MF, Jo C, Laine JC, Kim HKW; International Perthes Study Group. Does Early Proximal Femoral Varus Osteotomy Shorten the Duration of Fragmentation in Perthes Disease? Lessons From a Prospective Multicenter Cohort. *J Pediatr Orthop*. 2020;40(5):e322-e328.
17. Volpon JB, Lima RS, Shimano AC. Tratamento da forma ativa da doença de Legg-Calve-Perthes pela artrodiastase. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)* 1998;33(1):8-14.
18. Chalisserry EP, Nam SY, Park SH, Anil S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J Tissue Eng*. 2013;8:2041731417702531.
19. Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(33):5658-68.
20. Liu J, Jin T, Chang S, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH. Matrix and TGF-beta-related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2007;43(3-4):120-8.
21. Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368(2):329-35.
22. Lucaciu O, Sorițău O, Gheban D, Ciuca DR, Virtic O, Vulpoi A, Dirzu N, Câmpian R, Băciuț G, Popa C, Simon S, Berce P, Băciuț M, Crisan B. Dental follicle stem cells in bone regeneration on titanium implants. *BMC Biotechnol*. 2015;15:114.
23. Feitosa ML, Fadel L, Beltrão-Braga PC, Wenceslau CV, Kerkis I, Kerkis A, Birgel Júnior EH, Martins JF, Martins Ddos S, Miglino MA, Ambrósio CE. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results. *Acta Cir Bras*. 2010;25(5):416-22.
24. de Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, Cerruti H, Alonso N, Passos-Bueno MR. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg*. 2008;19(1):204-10.
25. Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, Cabral RM, Maranduba CM, Gaiad TP, Morini AC, Vieira NM, Brolio MP, Sant'Anna OA, Miglino MA, Zatz M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med*. 2008;6:35.

26. Gomes JA, Gerales Monteiro B, Melo GB, Smith RL, Cavenaghi Pereira da Silva M, Lizier NF, Kerkis A, Cerruti H, Kerkis I. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(3):1408-14.
27. Gorios Filho A, Santos GBD, Guarniero JRB, Angeli LRA, Grangeiro PM, Guarniero R. EXperimental model study of ischemic necrosis induction of the growing femoral head. *Acta Ortop Bras.* 2022;30(2):e247996.
28. Schulitz KP, Dustmann HO, Sinn H. Gibt es einen Morbus Perthes durch venöse Stase? Experimentelle Untersuchungen am wachsenden Schwein [May Perthes' disease be due to venous block? Experimental investigations on growing pigs]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1977;115(3):299-304.
29. Smith SR, Malcolm AJ, Gregg PJ. Metaphyseal changes in Perthes' disease: an experimental study. *Br J Exp Pathol.* 1982;63(6):633-8.
30. Kim HK, Su PH. Development of flattening and apparent fragmentation following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in a piglet model. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(8):1329-34.
31. Pringle D, Koob TJ, Kim HK. Indentation properties of growing femoral head following ischemic necrosis. *J Orthop Res.* 2004;22(1):122-30.
32. Kim HK, Skelton DN, Quigley EJ. Pathogenesis of metaphyseal radiolucent changes following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86(1):129-35.
33. Kim HK, Bian H, Randall T, Garces A, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Increased VEGF expression in the epiphyseal cartilage after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. *J Bone Miner Res.* 2004;19(12):2041-8.
34. Kim HK, Morgan-Bagley S, Kostenuik P. RANKL inhibition: a novel strategy to decrease femoral head deformity after ischemic osteonecrosis. *J Bone Miner Res.* 2006;21(12):1946-54.
35. Aya-ay J, Athavale S, Morgan-Bagley S, Bian H, Bauss F, Kim HK. Retention, distribution, and effects of intraosseously administered ibandronate in the infarcted femoral head. *J Bone Miner Res.* 2007;22(1):93-100.
36. Koob TJ, Pringle D, Gedbaw E, Meredith J, Berrios R, Kim HK. Biomechanical properties of bone and cartilage in growing femoral head following ischemic osteonecrosis. *J Orthop Res.* 2007;25(6):750-7.
37. Kim HK, Stephenson N, Garces A, Aya-ay J, Bian H. Effects of disruption of epiphyseal vasculature on the proximal femoral growth plate. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(5):1149-58.
38. Gong SY, Kim HW, Park HW, Lee SY, Lee KS. Effects of multiple drilling on the ischemic capital femoral epiphysis of immature piglets. *Yonsei Med J.* 2011;52(5):809-17.

39. Russo B Dello, Baroni EL, Saravia N, Amelong V, Lubiniecky F, Asprea M, Williamns G, Rodriguez S. Prevention of Femoral Head Deformity after Ischemic Necrosis Using Ibandronate Acid and Growth Factor in Immature Pigs. *Surg Sci*. 2012;3(4):194-9.
40. Cheng TL, Murphy CM, Cantrill LC, Mikulec K, Carpenter C, Schindeler A, Little DG. Local delivery of recombinant human bone morphogenetic proteins and bisphosphonate via sucrose acetate isobutyrate can prevent femoral head collapse in Legg-Calve-Perthes disease: a pilot study in pigs. *Int Orthop*. 2014;38(7):1527-33.
41. Zou Y, Fisher PD, Horstmann JK, Talwalkar V, Milbrandt TA, Puleo DA. Synergistic local drug delivery in a piglet model of ischemic osteonecrosis: a preliminary study. *J Pediatr Orthop B*. 2015;24(6):483-92.
42. Adapala NS, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Kim HKW. Necrotic Bone Stimulates Proinflammatory Responses in Macrophages through the Activation of Toll-Like Receptor 4. *Am J Pathol*. 2016;186(11):2987-2999.
43. Aruwajoye OO, Aswath PB, Kim HKW. Material properties of bone in the femoral head treated with ibandronate and BMP-2 following ischemic osteonecrosis. *J Orthop Res*. 2017;35(7):1453-60.
44. Upasani VV, Jeffords ME, Farnsworth CL, Padilla D, Lopreiato N, Aruwajoye OO, Kim HKW. Ischemic femoral head osteonecrosis in a piglet model causes three dimensional decrease in acetabular coverage. *J Orthop Res*. 2018;36(4):1173-7.
45. Aruwajoye OO, Monte F, Kim A, Kim HKW. A Comparison of Transphyseal Neck-Head Tunneling and Multiple Epiphyseal Drilling on Femoral Head Healing Following Ischemic Osteonecrosis: An Experimental Investigation in Immature Pigs. *J Pediatr Orthop*. 2020;40(4):168-175.
46. Martínez-Álvarez S, Galán-Olleros M, Azorín-Cuadrillero D, Palazón-Quevedo Á, González-Murillo Á, Melen-Frajlich GJ, Ramírez-Orellana M, Epeldegui-Torre T, Forriol F. Intraosseous injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteonecrosis of the immature femoral head and prevention of head deformity: A study in a pig model. *Sci Prog*. 2023;106(2):368504231179790.
47. Pinheiro CCG, Leyendecker Junior A, Tanikawa DYS, Ferreira JRM, Jarrahy R, Bueno DF. Is There a Noninvasive Source of MSCs Isolated with GMP Methods with Better Osteogenic Potential? *Stem Cells Int*. 2019;2019:7951696.
48. Huhnstock S, Wiig O, Merckoll E, Svenningsen S, Terjesen T. The modified Stulberg classification is a strong predictor of the radiological outcome 20 years after the diagnosis of Perthes' disease. *Bone Joint J*. 2021 Dec;103-B(12):1815-20.
49. da Rocha DN, de Andrade Gobbo L, da Silva MHP. Production and characterization of niobate apatite. *J Mat Res Technol*. 2013;2(1):24–9.

50. Neves JG, Navarro da Rocha D, Lopes CC, Silva MHP, Sinhoreti MAC, Correr-Sobrinho L, Fraga MAA, Correr AB. Effect of pH level and calcination on the production of calcium phosphates by acidic route of wet precipitation. *Cerâmica* 2021;67(382):236-43.
51. Guarniero R. Legg-Calvé-Perthes Disease: 100 Years. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2011;46(1):1FC1-2.
52. Aarvold A, Lohre R, Chhina H, Mulpuri K, Cooper A. Dynamic deformation of the femoral head occurs on weightbearing in Legg-Calves-Perthes disease: a translational pilot study. *Bone Jt Open*. 2020;1(7):364-9.
53. Peck JB, Greenhill DA, Morris WZ, Do DH, McGuire MF, Kim HKW. Prolonged non-weightbearing treatment decreases femoral head deformity compared to symptomatic treatment in the initial stage of Legg-Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop B*. 2022;31(3):209-15..
54. Shah H, Singh KA, Joseph B. Does Prolonged Weight Relief Increase the Chances of a Favourable Outcome After Containment for Perthes Disease? *J Pediatr Orthop*. 2023;43(2):e144-e150.
55. Herrera-Soto JA, Price CT. Core decompression for juvenile osteonecrosis. *Orthop Clin North Am*. 2011 Jul;42(3):429-36.
56. Sivakumar R, Somashekar V, Singhi PK, Chidambaram M. Local Delivery of Single Dose Intra Epiphyseal Bisphosphonates to Prevent the Progression of Legg-Calve-Perthes Disease - Case Series. *J Orthop Case Rep*. 2020;10(5):65-8.
57. Herrera-Soto JA, Price CT. Core decompression and labral support for the treatment of juvenile osteonecrosis. *J Pediatr Orthop*. 2011;31(2 Suppl):S212-6.
58. Joseph B, Varghese G, Mulpuri K, Narasimha Rao K, Nair NS. Natural evolution of Perthes disease: a study of 610 children under 12 years of age at disease onset. *J Pediatr Orthop*. 2003;23(5):590-600.
59. Wang ZL, He RZ, Tu B, He JS, Cao X, Xia HS, Ba HL, Wu S, Peng C, Xiong K. Drilling Combined with Adipose-derived Stem Cells and Bone Morphogenetic Protein-2 to Treat Femoral Head Epiphyseal Necrosis in Juvenile Rabbits. *Curr Med Sci*. 2018;38(2):277-88.
60. Kamiya N, Kuroyanagi G, Aruwajoye O, Kim HKW. IL6 receptor blockade preserves articular cartilage and increases bone volume following ischemic osteonecrosis in immature mice. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;27(2):326-35.
61. Ren Y, Deng Z, Gokani V, Kutschke M, Mitchell TW, Aruwajoye O, Adapala NS, Kamiya N, Abu-Amer Y, Kim HK. Anti-Interleukin-6 Therapy Decreases Hip Synovitis and Bone Resorption and Increases Bone Formation Following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Bone Miner Res*. 2021;36(2):357-68.

62. Kuroyanagi G, Kamiya N, Yamaguchi R, Kim HKW. Interleukin-6 receptor blockade improves bone healing following ischemic osteonecrosis in adolescent mice. *Osteoarthr Cartil Open*. 2023;5(4):100386.
63. Kamiya N, Yamaguchi R, Adapala NS, Chen E, Neal D, Jack O, Thoveson A, Gudmundsson P, Brabham C, Aruwajoye O, Drissi H, Kim HK. Legg-Calvé-Perthes disease produces chronic hip synovitis and elevation of interleukin-6 in the synovial fluid. *J Bone Miner Res*. 2015;30(6):1009-13.
64. Leyendecker Junior A, Gomes Pinheiro CC, Lazzaretti Fernandes T, Franco Bueno D. The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review. *J Tissue Eng*. 2018;9:2041731417752766.
65. Leyendecker A Jr, Pinheiro CCG, Amano MT, Bueno DF. The Use of Human Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Agents for the in vivo Treatment of Immune-Related Diseases: A Systematic Review. *Front Immunol*. 2018 Sep 11;9:2056.

ANEXOS

Anexo A - Carta de Aceitação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**MODELO EXPERIMENTAL DO ESTUDO DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES (DLCP) – ESTUDO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS**” protocolo nº 141/15 sob a responsabilidade de **Roberto Guarniero** e **Gustavo Bispo dos Santos**, apresentado pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 25.09.2015

Vigência do Projeto	Agosto de 2017
Espécie/linhagem	Suíno Mini Pig Br1
Nº de animais	10
Peso/Idade	9 semanas
Sexo	macho
Origem	JR Mariano

CEUA-FMUSP, 25 de Setembro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 26.02.18 **Tomou Ciência** do documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº 141/15 intitulado “**MODELO EXPERIMENTAL DO ESTUDO DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES (DLCP) – ESTUDO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS**” apresentado pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia

- Carta datada de 15/01/2018 referente a inscrição do Doutorado do aluno Luiz Renato Agrizzi de Angeli, aprovado pela Comissão de Pós Graduação do DOT/FMUSP.

Pesquisador Responsável: **Roberto Guarniero**

CEUA-FMUSP, 26 de Fevereiro de 2018



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo B – Aprovação da Comissão Científica

**DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

COMISSÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO

Protocolo IOT nº 1149

Pesquisador Responsável: Prof. Roberto Guarniero
Pesquisador Executante: Luiz Renato Agrizzi de Angeli
Título: Modelo experimental da doença de Legg-Calvé-Perthes (DLCP) - Estudo experimental em suínos.
Grau de Pesquisa: Projeto Regular

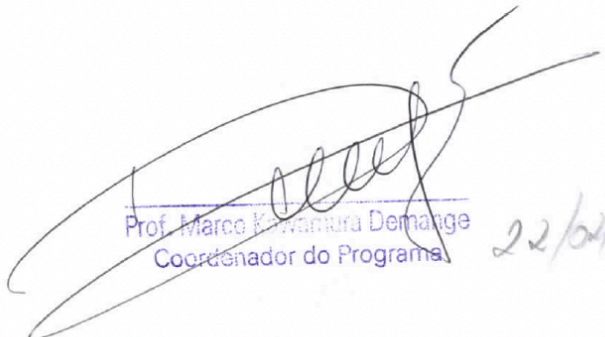
Parecer da Comissão de Científica DOT/FMUSP

DECISÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA EM 04/09/2015:

Projeto aprovado

Parecer da Comissão de Pós-Graduação DOT/FMUSP

Aprovado para Doutorado Dito


Prof. Marco Kawamura Demange
Coordenador do Programa

22/02/2018