

**LAÍS MEIRELES COSTA SILVA**

**EFEITO DO XENOTRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS OSTEOCONDRAIS CAPRINAS**

**Teresina**

**Piauí – Brasil**

**2017**

**LAÍS MEIRELES COSTA SILVA**

**EFEITO DO XENOTRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS OSTEOCONDRAIS CAPRINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração:

**Sanidade e Reprodução Animal**

Orientador:

**Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto**

Co-orientadora:

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Betânia Souza Monteiro**

**Teresina  
Piauí – Brasil  
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**S586e** Silva, Laís Meireles Costa

Efeito do xenotransplante de células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas em falhas osteocondrais caprinas / Laís Meireles Costa Silva - 2017.  
53 f.: il.

Dissertação ( Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

1.Células-tronco mesenquimais - Caprinos 2.Osteocondral  
3.Xenogênico I.Título

**CDD 636.089 607 97**

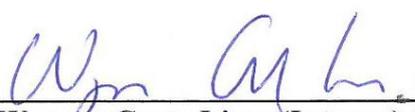
**EFEITO DO XENOTRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS OSTEOCONDRAIS CAPRINAS**

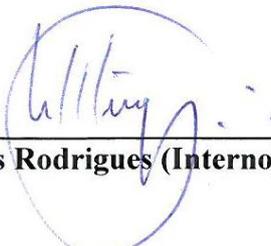
**LAÍS MEIRELES COSTA SILVA**

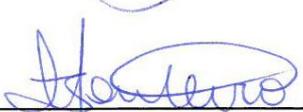
**Dissertação Aprovada em: 21/03/2017**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Presidente) / DCCV/CÇA/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Wagner Costa Lima (Interno) / CPCE/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcelo Campos Rodrigues (Interno) / DCCV/CCA/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Betânia Souza Monteiro (Externa) / UVV**

**Dedico,**

À Deus, por toda a força que me concedeu para a execução deste trabalho e que fez me manter na fé em toda a caminhada.

Aos meus pais, José Luíz e Edmée, pelo apoio em todos momentos e meus irmãos, Thiago e Carolina, por alegrarem minha vida.

Aos meus amigos, por mostrarem pra mim sempre que sou capaz de chegar aos meus objetivos.

## **Agradecimentos,**

*À Universidade Federal do Piauí, onde pude realizar minha pesquisa em um ambiente e estrutura adequados.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pela bolsa de estudo que me auxiliou financeiramente durante o período de realização do mestrado.*

*Ao professor Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto, meu orientador, que sempre esteve presente no decorrer do meu experimento, me ajudando em todas as etapas, e apoiando em todas as decisões a serem tomadas para melhor realização do trabalho.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Maria Acelina Martins de Carvalho, pela ajuda e por torcer sempre por mim.*

*Ao Departamento de Zootecnia, por permitir o alojamento dos animais em uma ambiente favorável para a pesquisa, e a todos os terceirizados que fazem parte deste Departamento, pela ajuda diária no manejo com os animais, e dessa forma, manter o bem-estar dos animais.*

*À todos que fazem parte da Clínica de Grandes Animais, sou muito grata, pela orientação para um manejo adequado, por tirar todas as dúvidas e por sempre me ajudarem em todos os momentos do experimento.*

*Ao professor Dr. João Macedo de Sousa, por permitir a realização dos exames para acompanhamento dos animais da pesquisa.*

*Ao Professor Dr. Marcelo Campos Rodrigues, pela ajuda importante no momento das cirurgias do experimento, para que todos os procedimentos fossem realizados de maneira satisfatória.*

*Aos residentes e pós-graduandos que fazem parte do Setor de Reprodução Animal, que sempre se mostravam à disposição para ajudar nos exames de ultrassonografia dos animais.*

*Aos meu colaboradores, Brenda Lurian, Ribamar Gonçalves, Marllós Henrique, Larisy Sterphany, Mariá Andrade, Huanna Rodrigues, Rayssa Fontenele e Daniele Benigno, agradeço por dedicarem um pouco do tempo para me ajudar e me apoiar e, dessa forma, poder realizar a pesquisa de forma precisa.*

*Aos meus colegas pós-graduandos, que não me puderam me ajudar diariamente, mas sempre torceram por mim e me auxiliaram no que estava ao alcance para a melhor execução da minha pesquisa.*

*A todos os funcionários do NUPCelt, Flávia, Fabiana, Janete e Hermínio por estarem sempre em prontidão para ajudar no que for preciso no desenvolvimento dos experimentos do núcleo.*

*Minha eterna gratidão aos meus pais, José Luiz e meus irmãos, Thiago e Carolina, pelo amor e confiança. Aos meus amigos que sempre acreditaram e torceram por mim.*

*“Tudo posso Naquele que me fortalece”*

*(Filipenses 4.13)*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUÇÃO .....	14
CAPÍTULO I .....	18
RESUMO .....	19
Introdução .....	20
Material e Métodos .....	23
<i>Declaração de ética</i> .....	23
<i>Animais</i> .....	23
<i>Obtenção das células-tronco mesenquimais xenogênicas</i> .....	24
<i>Avaliação microscópica da interação entre células-tronco mesenquimais e esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado</i> .....	24
<i>Obtenção do plasma rico em plaquetas xenogênico</i> .....	25
<i>Delineamento experimental</i> .....	25
<i>Indução das lesões osteocondrais</i> .....	26
<i>Realização dos tratamentos</i> .....	28
<i>Procedimentos histológicos</i> .....	28
<i>Avaliação macroscópica</i> .....	29
<i>Avaliação histológica</i> .....	29
<i>Análise estatística</i> .....	29
Resultados .....	30
Discussão .....	37
Conclusões .....	42
Referências .....	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	47
REFERÊNCIAS .....	48
APÊNDICES .....	53

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
Figura 1.	(A) Realização das três lesões osteocondrais de 4 mm de diâmetro em joelho de caprinos, dois defeitos na parte distal da tróclea femoral e um defeito na parte proximal. (B) Delimitação dos tratamentos propostos para cada falha osteocondral. Grupo I - células-tronco mesenquimais xenogênicas (CTM) em esponja de colágeno (EH); GRUPO II - Plasma de rico em plaquetas (PRP) em EH Grupo III – (controle) esponja estéril de colágeno hidrolisado.	26
Figura 2.	Placa de <i>petri</i> contendo quatro fragmentos de esponja hemostática de colágeno hidrolisado estéril, embebidas em solução de $1 \times 10^6$ CTM, $1 \times 10^6$ PRP, solução fisiológica estéril e associação entre CTM e PRP, respectivamente. *MSC = CTM	28
Figura 3.	Variação de alguns índices hematológicos em amostra de sangue equino submetida à concentração plasmática de plaquetas. I: Variação dos índices de hemácias e hematócrito no sangue total (a), no plasma pobre em plaquetas (b) e no plasma rico em plaquetas (c). II: Variação nos índices de leucócitos e plaquetas no sangue total (a), no plasma pobre em plaquetas (b) e no plasma rico em plaquetas (c). Em II a há variação anormal da curva pela presença de agregados plaquetários.	30
Figura 4.	Células-tronco mesenquimais medulares de coelho após 10 dias de cultivo com fragmento estéril de esponja hemostática de colágeno hidrolisada, fixada com paraformaldeído tamponado a 10% e coradas com May-Grunwald Giemsa. A: Colônia uniforme de células de morfologia fibroblastóide, com núcleo central, margeando o fragmento da esponja (★) (20x). B: Maior aumento da imagem anterior. Presença de células mononucleares (▼) sobre o fragmento de esponja (40x).	31

- Figura 5. Fotomicrografia de fragmento de esponja hemostática de colágeno hidrolisado. (A) Esponja sem tratamento, evidenciando a porosidade e hialinização do material. (B) Corte histológico da esponja após 10 dias de incubação em cultura com células-tronco mesenquimais medulares de coelho. Identifica-se presença de célula mononuclear, de cromatina frouxa, aderida às circunvoluções da matriz da esponja (40x). 32
- Figura 6. Lesões osteocondrais em tróclea femoral de caprinos após 60 dias. As lesões tratadas com CTL e CTM apresentaram o preenchimento do defeito quase na sua totalidade e coloração opaca. No grupo tratado com PRP, a superfície articular encontra-se mais desnivelada, com coloração mais escurecida, considerada uma cor não natural da cartilagem normal. 33
- Figura 7. Fotomicrografia das lesões osteocondrais em joelho de caprino após 60 dias de tratamento com esponja estéril de colágeno hidrolisado (CTL), células-tronco mesenquimais xenogênicas (CTM) em esponja de colágeno (EH), plasma de rico em plaquetas em EH (PRP). A: Superfície articular com presença de cartilagem hialina (CH) no grupo tratado com CTM, caracterizado pela presença de condrócitos dispostos em grupos isógenos (GI) na matriz cartilaginosa. (10x) B: Superfície articular com presença de fibrocartilagem no grupo tratado com PRP, caracterizado por fibras colágenas (FC) espessas entre as fileiras de condrócitos (C). (10x) C: Grupo tratado com a esponja de colágeno (CTL), apresentando superfície articular com presença de cartilagem hialina disposta em formato irregular e cercada por tecido ósseo. (10x) D: Osso subcondral maduro (O). São notados lamelas (L) e vasos sanguíneos (V). (4x). Hematoxilina-eosina. 36

**LISTAS DE TABELAS**

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
Tabela 1	Aspectos macroscópicos em lesões osteocondrais de caprinos com 60 dias.	34
Tabela 2	Aspectos histológicos em lesões osteocondrais de caprinos com 60 dias	35

## RESUMO

### **Efeito do xenotransplante de células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas em falhas osteocondrais caprinas**

Os defeitos osteocondrais do joelho são de ocorrência comum em seres humanos e animais, decorrem de lesões que envolvem profundamente o osso subcondral, comprometendo a espessura da cartilagem e, conseqüentemente, a função articular. Tal condição clínica está entre as causas mais comuns de incapacidade funcional em pacientes geriátricos em medicina humana e veterinária. Em medicina humana representa relevante impacto no sistema de previdência social, decorrente de aposentadorias por invalidez. Em medicina veterinária, compromete o tempo de utilização de animais atletas em competições e no serviço de guia aos humanos com deficiência visual. A terapia celular com células-tronco tem sido referida como relevante alternativa para o tratamento de lesões subcondrais crônicas em ensaios pré-clínicos. Contudo, a maior parte dos estudos utiliza transplante autogênico, com escassos dados científicos sobre xenotransplante. Tal modalidade de terapia celular é uma opção terapêutica inovadora, por tratar-se da utilização de células-tronco entre indivíduos de espécies diferentes, reduzindo o tempo de espera para tratamento. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito do xenotransplante de células tronco mesenquimais de polpa dentária de cutia, comparada ao plasma rico em plaquetas equino, como fonte primária de fatores de crescimento, na remodelagem de falhas osteocondrais cirurgicamente induzidas de caprinos nativos. Para tanto, induziu-se lesões osteocondrais profundas na região da tróclea femoral de caprinos, realizando-se os tratamentos uma única vez no trans cirúrgico em comparação à esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado, utilizada como padrão ouro para tratamento. As células-tronco foram previamente cultivadas associadas à esponja hemostática e, após 60 dias do tratamento, as falhas osteocondrais de todos os animais foram avaliadas macroscopicamente e histopatologicamente. Verificou-se que a esponja hemostática apresentou biocompatibilidade favorável ao desenvolvimento das células-tronco mesenquimais *in vitro*, permitindo a adesão das mesmas sem comprometimento de viabilidade. Não foram identificadas características macroscópicas e histopatológicas de rejeição do xenotransplante. A coloração e morfologia articular estava preservada em todos os animais, com evidências histopatológicas de remodelagem osteocondral. Dentre os grupos tratados, microscopicamente, identificou-se que o xenotransplante de células-tronco mesenquimais induziu reparação cartilágnea superior aos demais tratamentos, enquanto o plasma rico em plaquetas induziu formação de cartilágnea fibrocartilaginosa na área de falha. A esponja hemostática não induziu evidências de remodelagem relevante quando comparado aos demais tratamentos. Nenhuma falha, de nenhum tratamento, apresentou preenchimento completo até os 60 dias de observação. Pode-se inferir que o xenotransplante de células-tronco mesenquimais não exerceu efeito deletério sobre a cartilagem articular e ainda induziu formação de cartilagem hialina.

**Palavras-chave:** Células-tronco mesenquimais, osteocondral, xenogênico.

## ABSTRACT

### **Xenogenic cell therapy: effect of treatments with MSC and PRP on osteochondral lesions in goat knees**

Osteochondral defects of the knee are common occurrences in humans and animals, resulting from lesions that deeply involve the subchondral bone, compromising the thickness of the cartilage and, consequently, the joint function. Such a clinical condition is among the most common causes of functional disability in geriatric patients in human and veterinary medicine. In human medicine, it represents a significant impact on the social security system, resulting from disability pensions. In veterinary medicine, it compromises the time of use of animal athletes in competitions and in the guide service for visually impaired humans. Cell therapy with stem cells has been reported as a relevant alternative for the treatment of chronic subchondral lesions in preclinical trials. However, most studies use autogenic transplantation, with scarce scientific data on xenotransplantation. Such a modality of cellular therapy is an innovative therapeutic option, since it is the use of stem cells between individuals of different species, reducing the waiting time for treatment. The objective of this research was to evaluate the effect of the agoutis dental pulp mesenchymal stem cell xenotransplantation, compared to the equine platelet rich plasma, as the primary source of growth factors, in the remodeling of surgically induced osteochondral failures of native goats. In order to do so, deep osteochondral lesions were induced in the femoral trochlea region of goats, and the treatments were performed once in the surgical trans compared to the sterile hemostatic sponge of hydrolyzed collagen, used as a gold standard for treatment. Stem cells were previously cultured in association with the hemostatic sponge and, after 60 days of treatment, the osteochondral defects of all animals were evaluated macroscopically and histopathologically. It was verified that the hemostatic sponge presented biocompatibility favorable to the development of the mesenchymal stem cells in vitro, allowing the adhesion of the same without compromising of viability. No macroscopic and histopathological characteristics of xenotransplantation rejection were identified. The color and articular morphology were preserved in all animals, with histopathological evidence of osteochondral remodeling. Among the groups treated, microscopically, it was identified that the mesenchymal stem cell xenotransplantation induced superior cartilage repair to the other treatments, while the platelet-rich plasma induced fibrocartilaginous cartilage formation in the area of failure. The hemostatic sponge did not induce evidence of relevant remodeling when compared to the other treatments. No failure, no treatment, had complete completion until the 60 days of observation. It can be inferred that the mesenchymal stem cell xenograft did not have a deleterious effect on the articular cartilage and still induced hyaline cartilage formation.

**Key words:** Stem cells, osteochondral, xenogenic.

## INTRODUÇÃO

As lesões osteocondrais são caracterizadas por dor, rigidez e perda da mobilidade articular (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011), sendo de ocorrência comum em seres humanos e animais, induzindo alterações articulares degenerativas crônicas (CARNEIRO *et al.*, 2013). Essa enfermidade está entre as causas mais comuns de dor e incapacidade entre a população de meia-idade e idosos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011). Com isso, o emprego de animais como modelos experimentais para o estudo da patogênese de diversas afecções das doenças ósseas e cartilaginosas, permitiu avanços na descoberta de várias modalidades de tratamento, sejam eles clínicos ou cirúrgicos, propiciando o alívio dos sintomas ou erradicação das doenças. (HETTE, 2008).

Os defeitos osteocondrais, resultantes de lesão traumática ou de doenças crônico degenerativas, como as osteoartrites, por exemplo, possuem prognóstico reservado para o restabelecimento da função articular dado a limitada capacidade da cartilagem (FERNANDO *et al.*, 2001; LEVINGSTONE *et al.*, 2016). Isto representa um desafio ortopédico, visto que a natureza avascular da cartilagem e estrutura interfacial do tecido osteocondral, com região zonal complexa composta de osso subcondral, cartilagem calcificada intermediária e as regiões de cartilagem superficial, não favorecem o recrutamento, migração e nutrição celular, bem como estabilização das forças de tensão sobre as áreas afetadas (FERNANDO *et al.*, 2001; MATSIKO *et al.*, 2013). Os condrócitos, quando lesionados, não formam hematoma e não produzem fibrina, desempenhando apenas função de arcabouço para um novo tecido de reparação. Além disso, a ausência de estruturas vasculares limitam o número de células disponíveis para resposta inflamatória ao trauma (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, com os avanços do conhecimento da biologia celular e molecular, a ciência tem proposto tratamentos não convencionais para condições mórbidas crônico degenerativas, as quais atualmente não possuem tratamento eficaz (NOLAN *et al.*, 2008), dentre as quais estão representadas afecções ósseas e cartilaginosas (BOELONI *et al.*, 2009; JOSHI JUBERT *et al.*, 2017). Os estudos no ramo da medicina regenerativa têm sido representados em grande parte por um interesse crescente no uso das células-tronco na terapia destas doenças em decorrência de pouca resposta aos tratamentos atuais (NOLAN *et al.*, 2008; GOT'ES *et al.*, 2013). Ensaio pré-clínicos sugerem que o tratamento com células-tronco mesenquimais acelera o processo de reparação óssea e restaura precocemente a função do osso, minimizando os custos

e a morbidade do paciente (DOUAT, 2004; GOLDBERG *et al.*, 2017; RUBESSA *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017).

Os avanços na compreensão da biologia das células-tronco, bem como suas propriedades imunomoduladoras, sua plasticidade e cinética *in vitro*, contribuíram para a construção de uma perspectiva a curto prazo para utilização de células-tronco na terapia reconstrutiva de tecidos (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SHOU *et al.*, 2017). Contudo, apesar do grande potencial terapêutico destas células, sua eficácia para o tratamento de diferentes condições mórbidas, inclusive as ortopédicas, permanece dubitável (BARRETO *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2017).

Corroboram a estas relevantes dúvidas, a incerteza se populações de células-tronco teriam ou não a capacidade de ativar o sistema imunológico de reconhecimento de antígenos. Atualmente, sabe-se que células-tronco não expressam complexo de histocompatibilidade de classe II e não apresentam moléculas co-estimulatórias, como B7-1 e B7-2, não podendo atuar portanto, como células apresentadoras de antígeno (SOUZA *et al.*, 2010). Contudo, estas células expressam MHC classe I e algumas populações de células-tronco expressam moléculas de CD40 e CD40 ligante, as quais, podem, em algumas circunstâncias, serem identificados por *Toll Like Receptors* os quais, por sua vez, poderiam induzir ativação imunogênica (SOUZA *et al.*, 2010, SHIRJANG *et al.*, 2016). Por este motivo, a maioria dos ensaios pré-clínicos utilizam células-tronco autógenas para investigação de potencial terapêutico.

Para a adequada regeneração tecidual, é necessária uma correta sincronização de eventos celulares representadas pela mobilização de células do sistema imunológico inato para produzir uma resposta tecidual local, representada pela secreção de fatores de crescimento, citocinas e peptídeos quimotáticos a fim de mobilizar grupos celulares indiferenciados, mas comprometidos com a diferenciação do tecido alvo, localizadas na membrana basal e região de pericito vascular (CSAK *et al.*, 2007; MEIRELLES *et al.*, 2016). Estudos *in vitro* contemporâneos sugerem que algumas subpopulações de células-tronco, com características de multipotencialidade, possuem a capacidade de modular a intensidade e abrangência da resposta inflamatória efetora, mobilizar células equidistantes, induzir a secreção de fatores parácrinos e se diferenciar em osteoblastos e/ou condroblastos (BRUDER *et al.*, 1998; MEIRELLES *et al.*, 2016).

Dentre as populações conhecidas de células-tronco somáticas, as células-tronco mesenquimais apresentam maior plasticidade, podendo se diferenciar em tecidos mesodermis e não mesodermis (ARGÔLO NETO *et al.*, 2016). Não obstante, tem sido o grupo de células-

tronco mais utilizados em ensaios pré clínicos, dada a inexistência de controvérsias éticas e religiosas ao seu isolamento, como observado com relação a células-tronco embrionárias, por exemplo (COSTA *et al.*, 2016).

A polpa dentária constitui um nicho com elevada concentração de células-tronco mesenquimais (CARVALHO *et al.*, 2015). Por se localizar na região externa cranial do trato digestório e em dentes decíduos e permanentes, sua coleta é minimamente invasiva, inócua, não compromete a função mecânica do dente e é de baixo custo (JESUS *et al.*, 2011; FILHO *et al.*, 2013). Pesquisa recente na Universidade Federal do Piauí tem demonstrado que as células-tronco mesenquimais obtidas da polpa dentária de cutia (*Dasyprocta primnolopha*) apresentam características similares, com expressão de marcadores de superfície celular de indiferenciação e com capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (CARVALHO *et al.*, 2015).

Além da terapia celular com células-tronco, fatores de crescimento ou isolados concentrados destes fatores tem sido utilizados como terapia adjuvante para estimular o tecido alvo a se regenerar (CARNEIRO *et al.*, 2013; LENZA *et al.*, 2013). O plasma rico em plaquetas é um hemoderivado, utilizado como uma das principais fontes de fatores de crescimento para a reparação tecidual na rotina médica humana e veterinária. Rico em fatores endógenos derivados das plaquetas que modulam a resposta inflamatória para a fase de angiogênese, fibroplasia e/ou reepitelização, apresenta baixo custo para obtenção, coleta inócua ao paciente e ausência de resposta de rejeição (LUBOWITZ e POEHLING, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2013; LENZA *et al.*, 2013). É utilizado desde a década de 80 na odontologia humana, no trans operatório, para estimular o remodelamento do osso esponjoso alveolar. Suas propriedades imunológicas foram amplamente descritas, ressaltando como uma das poucas limitações ao seu uso, o baixo volume obtido do processamento do sangue (QIAO *et al.*, 2017; BAI *et al.*, 2017).

Os fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF's) têm sido relacionados à atividade mitótica das células sanguíneas e de vários tecidos em culturas soro-dependentes, sendo conhecidos por iniciar a reparação espontânea dos tecidos conjuntivos, inclusive do osso, aumentando as taxas de mitoses, angiogênese e estímulo da atividade macrofágica (CARNEIRO *et al.*, 2013).

O potencial regenerativo das células-tronco mesenquimais e do plasma rico em plaquetas vêm sendo investigado em diversos modelos animais para inúmeras afecções em tecidos moles e

duros (BARRY e MURPHY, 2004; RUBESSA *et al.*, 2017; JOSHI JUBERT *et al.*, 2017). Comumente tanto as células-tronco quanto os fatores de crescimento, por veiculação em meio líquido, são associados à biomateriais ou *scaffolds* sintéticos que permitam a manipulação e implantação cirúrgica no tecido alvo, preservando o material transplantado, favorecendo sua migração local e sem indução de rejeição (KRAMPERA *et al.*, 2007).

A esponja de colágeno hidrolisado (gelatina) liofilizada, de origem porcina, vem sendo utilizada na odontologia humana há mais de dez anos, para estimular a hemostasia no osso alveolar e proporcionar a arcabouço para a reestruturação óssea (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Suas propriedades físicas e químicas foram descritas abundantemente em literatura científica como um componente inócuo para a hemostasia tecidual, maleável, poroso, radiotransparente e reabsorvível, sendo seguro para uso em pacientes humanos e animais (ROCHA *et al.*, 2012).

O colágeno é um material biocompatível e seguro devido a suas características biológicas como biodegradabilidade e fraca antigenicidade, muito utilizado como carreador de medicamentos (JAIME *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010). A estrutura porosa da esponja hemostática proporciona capacidade de absorção de fluidos entre 40 a 50 vezes o seu próprio peso (BERENGUEL, 2006). Além disso, induz efeito hemostático imediato quando implantado em defeitos ósseos (JAIME *et al.*, 2005).

Dada a miríade de aspectos terapêuticos promissores ao uso das células-tronco mesenquimais na reparação tecidual e similar controvérsia sobre sua efetividade e capacidade de estimular o sistema imunológico inato, a presente pesquisa propôs-se a investigar o efeito clínico do xenotransplante de células tronco mesenquimais da polpa dentária de cutia (*Dasyprocta primnolopha*) comparado ao do plasma rico em plaquetas equino, como fonte primária de fatores de crescimento, veiculados em esponja hemostática porcina de colágeno hidrolisado, em falhas osteocondrais tibiais do joelho de caprinos.

Este trabalho encontra-se estruturado com uma introdução, manuscrito científico desenvolvido conforme as normas do periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira” (ISSN:1678-5150), considerações finais, referencial bibliográfico e apêndice com três artigos científicos na área de terapia celular com células-tronco, já publicados, desenvolvidos durante a vigência do mestrado.

**MANUSCRITO**

**EFEITO DO XENOTRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E  
PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM FALHAS OSTEOCONDRAIS CAPRINAS**

A ser submetido ao periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*

ISSN: 1678-5150

Qualis B1

## **Efeito do xenotransplante de células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas em falhas osteocondrais caprinas<sup>I</sup>**

Laís M. C. Silva<sup>II</sup>, Napoleão M. Argôlo Neto<sup>III\*</sup>

**RESUMO.**- [Efeito do xenotransplante de células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas em falhas osteocondrais caprinas] Os defeitos osteocondrais do joelho decorrem de lesões que se estendem do periósteo até o osso subcondral, acometendo toda a espessura da cartilagem, sendo de ocorrência comum em seres humanos e animais. Esta enfermidade está entre as causas mais comuns de incapacidade entre a população humana idosa e animais atletas. O transplante xenogênico de células-tronco constitui-se numa opção terapêutica inovadora, por tratar-se da utilização de células que não expressam MHC II entre indivíduos de espécies diferentes, reduzindo o tempo de espera para conseguir um doador. Contudo, persistem relevantes incertezas clínicas sobre a segurança terapêutica do seu uso. Objetivo: investigar o efeito clínico do xenotransplante de células tronco mesenquimais da polpa dentária de cutia (*Dasyprocta primnolopha*) comparado ao do plasma rico em plaquetas equino, veiculados em esponja hemostática porcina de colágeno hidrolisado, em falhas osteocondrais do joelho de caprinos. Para tanto, cinco animais foram submetidos às lesões cirúrgicas osteocondrais na região da tróclea femoral, seguido do tratamento xenogênico trans operatório com células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas e esponja hemostática. Não foram identificadas características macroscópicas e histopatológicas de rejeição do xenotransplante. A coloração e morfologia articular estava preservada em todos os animais, com evidências histopatológicas de remodelagem osteocondral. Dentre os grupos tratados, microscopicamente, identificou-se que o xenotransplante de células-tronco mesenquimais induziu reparação cartilágnea histopatologicamente superior aos demais tratamentos, enquanto o plasma rico em plaquetas induziu formação de cartilágnea fibrocartilaginosa na área de falha. A esponja hemostática não induziu evidências histopatológicas de remodelagem relevante quando comparado aos demais tratamentos. Nenhuma falha, de nenhum tratamento, apresentou preenchimento completo até os 60 dias de observação. Pode-se inferir que o xenotransplante de células-tronco mesenquimais não exerceu efeito deletério sobre a cartilagem articular e ainda induziu formação de cartilagem hialina.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Células-tronco, osteocondral, xenogênico.

---

<sup>II</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela.

<sup>III</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Socopo s/n, Teresina, PI 64049-550, Brasil. \*Autor correspondente: argolo\_napoleao@ufpi.edu.br.

## INTRODUÇÃO

As lesões osteocondrais são caracterizadas por dor, rigidez e perda da mobilidade articular (Albuquerque et al. 2011), sendo de ocorrência comum em seres humanos e animais, induzindo alterações articulares degenerativas crônicas (Carneiro et al. 2013). Esta enfermidade possui quadro clínico problemático devido ao seu limitado potencial de reparação (Tanya et al. 2016). Os defeitos osteocondrais do joelho decorrem de uma lesão onde se estende até o osso subcondral, acometendo toda a espessura da cartilagem e são geralmente de origem traumática, podendo ocorrer isoladamente ou em conjunto com lesões ligamentares ou meniscais (Batista et al. 2012), estando entre as causas mais comuns de incapacidade entre a população de meia-idade e idosos. (Albuquerque et al. 2011).

A osteoartrose, artrose ou osteoartrite é a forma mais frequente das doenças que afetam a cartilagem, assim como as lesões osteocondrais, sendo uma das principais causas de restrição e redução da qualidade de vida da população acima dos 50 anos (Júnior & Inácio 2013). Esta enfermidade é resultante de eventos que desestabilizam a síntese de condrócitos da cartilagem articular, matriz extracelular e osso subcondral, levando a uma incapacidade funcional progressiva (Fellet et al. 2007). Fatores biológicos, genéticos, bioquímicos, nutricionais e mecânicos contribuem para a etiologia desta doença (Felson 2004).

Com a profundidade da lesão e acometimento do osso subcondral, o processo de cicatrização é estimulado, ocorrendo um recrutamento de leucócitos, células mesenquimais e constituintes do plasma ricos em fatores condrogênicos, como o fator de crescimento derivado de plaquetas, por meio da formação de um hematoma na superfície articular danificada, e por fim, segue-se o modelamento da malha de fibrina que constitui um arcabouço para fibroblastos que ocupam a área lesionada, depois o tecido passa a apresentar um aspecto fibrocartilaginoso (Figueiras et al. 2009). Já na cicatrização de uma lesão que fica restrita à cartilagem hialina articular (defeito condral), os condrócitos, por não serem vascularizados, quando lesionados, não formam hematoma, não produzem fibrina e nem formam coágulo. A ausência da fase vascular no defeito condral limita o número de células disponíveis para resposta inflamatória ao trauma (José et al. 2004).

O tecido ósseo e cartilaginoso é dinâmico e está continuamente sob processo de remodelação importante para a manutenção da sua homeostase e para a reparação de traumas.

Contudo, nos casos de defeitos estruturais graves e processos de não-união óssea, os reparos por meio da remodelação fisiológica podem estar limitados (Monteiro et al. 2008). Considera-se como alternativa terapêutica para as enfermidades ósseas, o tratamento com terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais, pela habilidade de produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos e condroblastos, fornecendo perspectivas terapêuticas promissoras (Pittenger et al. 1999).

A terapia celular é uma ferramenta da medicina regenerativa que envolve o conjunto de métodos e abordagens tecnológicas com a utilização de células-tronco no tratamento de diversas doenças e tem despertado maior interesse na comunidade científica (Souza 2012), devido à sua capacidade de auto-renovação e de diferenciar-se em múltiplas linhagens celulares (Morad et al. 2013). A utilização de células-tronco na reconstituição de tecidos tem direcionado as pesquisas para o seu isolamento, purificação e concentração, com o objetivo de reparar e substituir tecidos lesionados ou degenerados (Oliveira et al. 2014).

A terapia celular xenogênica torna-se uma opção terapêutica inovadora, por tratar-se da utilização de células-tronco de um indivíduo para outro de espécies diferentes, e pode ser utilizada de diversas fontes e situações, como regenerações osteocondrais, por demonstrar potencial eficácia e sucesso na técnica. Em estudos utilizando células-tronco humanas, já comprovou-se a segurança e a potencialidade das células-tronco xenogênicas em modelo de infarto do miocárdio em camundongos (Larocca et al. 2013).

As células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea são mais comumente utilizados para fins de regeneração óssea. No entanto, a procura por mais fontes acessíveis de células-tronco derivadas de outros tecidos, tais como tecido adiposo e os tecidos dentais e periodontais, também são avaliados para esta finalidade terapêutica (Huang et al. 2009). As células-tronco da polpa dentária são encontradas no núcleo do tecido pulpar dos dentes, sendo fontes desejáveis para engenharia de tecidos, além de ser de fácil acesso (Morad et al. 2013).

Diversos experimentos *in vitro* avaliaram o tecido polpa da dental como uma fonte potencial para engenharia de tecido ósseo. Estudos têm demonstrado que estas células são capazes de obter diferenciação osteogênica, dentinogênica, adipogênica, condrogênica, miogênica e neurogênica (Morito et al. 2009). Os tecidos da polpa dental fornecem fatores ósseos osteoindutivos (proteínas morfogênicas ósseas), e sua capacidade de produzir osteoblastos têm sido demonstrados em muitos estudos *in vitro* e *in vivo* (Li et al. 2011). Em pesquisa

avaliando-se a multipotencialidade das células de polpa dentária em comparação com células da medula óssea, observou-se várias similaridades entre as duas em muitas etapas, sendo a capacidade de proliferação, disponibilidade e abundância mostrou destaque nas células derivadas da polpa dentária (Maraldi et al. 2013).

Além do uso da terapia celular nas práticas ortopédicas, utiliza-se também o plasma rico em plaquetas (PRP), por ser descrito como um acelerador biomaterial da formação óssea, que contém proteínas do sangue e muitos liberadores de plaquetas de diferentes tipos e quantidades de fatores de crescimento com características osteoindutivas (Monteiro et al. 2012). Os fatores de crescimento derivados das plaquetas têm sido relacionados à atividade mitótica das células sanguíneas e de vários tecidos em culturas sero-dependentes e são conhecidos por iniciar a reparação espontânea dos tecidos conjuntivos, inclusive do osso, aumentando as mitoses para o reparo celular, a angiogênese para formação de novos vasos sanguíneos e a atividade macrofágica promovendo o processo de desbridamento (Carneiro et al. 2013).

O plasma rico em plaquetas é um produto com alta concentração de plaquetas, cujo preparado visa obter uma elevada concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma e obtido por centrifugação (Carneiro et al. 2013, Lenza et al. 2013). Ambos, plasma e concentrado de plaquetas, estimulam a cicatrização de tecidos moles e de osso numa variedade de situações, por conter fatores de crescimento que atuam na fase inicial da cicatrização e consolidação óssea (Lubowitz & Poehling 2010, Lenza et al. 2013).

O enxerto de osso autógeno obtêm-se tecido do próprio paciente e é considerado padrão ouro em tratamentos desta natureza, com bons resultados. Como alternativa ao enxerto com osso autógeno, tem-se os enxertos alógenos, obtidos de doadores da mesma espécie e indivíduos diferentes (Takamori et al. 2008). Diante dos inconvenientes apresentados tanto pelo enxerto autógeno quanto no enxerto alógeno, como limitação da quantidade e qualidade do tecido a ser removida e necessidade de um banco de ossos onde demanda de um grande custo, muitos cientistas pesquisam biomateriais alternativos e estratégias de tratamento, como a utilização dos biomateriais xenogênicos (Sicca et al. 2008).

O Hemospon é uma esponja hemostática de colágeno hidrolisado (gelatina) liofilizada, de origem porcina, sendo amplamente utilizado em cirurgia da cavidade oral, devido à sua alta capacidade hemostática e cicatrizante (Rocha et al. 2012). O colágeno é um material biocompatível e seguro devido a suas características biológicas como biodegradabilidade e fraca

antigenicidade, muito utilizado como carreador de medicamentos (Jaime et al. 2005, Oliveira et al. 2010). Sua estrutura porosa proporciona uma grande capacidade de absorção de fluidos, absorvendo 40 a 50 vezes o seu próprio peso (Berenguel 2006). Além disso, possui ainda um efeito hemostático, levando à hemostasia instantânea quando implantado em defeitos ósseos (Jaime et al. 2005).

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito clínico do xenotransplante de células tronco mesenquimais da polpa dentária de cutia (*Dasyprocta primnolopha*) comparado ao do plasma rico em plaquetas equino, como fonte primária de fatores de crescimento, veiculados em esponja hemostática porcina de colágeno hidrolisado, em falhas osteocondrais tibiais do joelho de caprinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Declaração de ética.** A metodologia utilizada neste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), de acordo com a declaração nº 120/2015, com as normas do Colegiado Brasileiro de Experiência Animal COBEA).

**Animais.** Utilizou-se cinco caprinos fêmeas nativas (*Capra hircus*), sem raça definida, pluríparas, com três anos de idade e peso médio de  $35,5 \pm 1,5$  kg de peso corporal, adquiridas do setor de Caprinocultura da Universidade Federal do Piauí. Foram selecionados caprinos clinicamente saudáveis (normofagia, normoquezia, normodipsia e normoúria), sem alterações dignas de nota nas avaliações hematológica, bioquímica (uréia e creatinina), endoparasitária (contagem de ovos por gramas de fezes - OPG) para a espécie (Daramola et al. 2005, Cardoso et al. 2010) e nas avaliações ortopédica e radiográfica simples da região fêmuro-tíbio-patelar bilateral. Todos os animais foram avaliados ultrassonograficamente para exclusão de indivíduos gestantes. Os caprinos selecionados foram mantidos em um período de aclimação de 10 dias, desvermifugados e mantidos em sistema de confinamento em baias (2,0x1,5m), onde permaneceram durante os 60 dias de experimento. As baias foram alojadas em galpão coberto de 9,0x2,0m de área, protegidas da incidência solar direta e com ventilação lateral, onde a temperatura média foi mantida em 29°C com umidade média relativa do ar em 40%, aferidas por termômetro e higrômetro digital, e fotoperíodo natural, coincidente com a luminosidade regional

(Teresina, Brasil, latitude: 05° 05' 21" S, longitude: 42° 48' 07" W, altitude 72m), no setor de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em piso com palha de arroz trocados periodicamente, para manter um ambiente confortável e evitar riscos de quedas após o procedimento cirúrgico. Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada para caprinos<sup>IV</sup>, oferecida duas vezes ao dia, na quantidade de 1% por kg de peso vivo, além de volumoso à vontade com fornecimento de forrageira capim braquiária e/ou leguminosa leucena, sal mineral e água *ad libitum*.

**Obtenção das células-tronco mesenquimais xenogênicas.** As células-tronco mesenquimais (CTM) foram doadas pelo Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCelt/UFPI). As células foram previamente isoladas da poupa dentária de cutias (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831) clinicamente saudáveis, vindas do Centro de Estudos e Preservação de Animais Selvagens (NEPAS), do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí. Após o isolamento, foram expandidas *in vitro* e alíquotadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL para uso imediato conforme metodologias descritas previamente por Argôlo Neto et al. (2012), Carvalho et al. (2015) Argôlo Neto et al. (2016). A alíquota de CTM de polpa dentária de cutia foi infundida em esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado, e imediatamente transplantada para a lesão osteocondral cirurgicamente induzida na tróclea femoral dos caprinos.

**Avaliação microscópica da interação entre células-tronco mesenquimais e esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado.** Três alíquotas de  $1 \times 10^4$  CTM/mL foram mantidas em meio DMEM F12 completo<sup>V</sup>, juntamente com uma amostra de aproximadamente 3 mm de uma esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado<sup>VI</sup>, em placa de cultivo seis poços<sup>VII</sup>, incubadas<sup>VIII</sup> à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade (Argôlo Neto et al. 2012). Após obtenção de confluência de 80%, o meio de cultivo foi descartado, o poço lavado com solução fosfato tamponante<sup>IX</sup> e o fragmento de esponja hemostática cuidadosamente retirado com o auxílio de

---

<sup>IV</sup> Ração Cabras leite 24, Agromix®, Jaboticabal, SP. PB 240g/Kg, Fibras 100g/Kg, Cálcio 16g/Kg, Fósforo 6g/Kg  
<sup>V</sup> Invitrogen Corporation® N° 10565-018, contendo 3,7 g/l de bicarbonato de sódio e 10-15 mM HEPES (Invitrogen Corporation® N° 15630080) pH 7,5, suplementado com 15% de soro fetal bovino, 3% de solução de penicilina-estreptomicina (Gibco®, penicillin-Streptomycin N° 15140-122, 100mL), 1% de L-glutamina 200mM (Invitrogen Corporation® N° 25030081, 100mL) e 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma® N° M7145).

<sup>VI</sup> Hemospon®. Technew comércio e indústria LTDA. Quintino – Rio de Janeiro – Brasil.

<sup>VII</sup> Placa de seis poços TPP®, Switzerland.

<sup>VIII</sup> Estufa incubadora Series II 3110 water-jacket CO2 incubator. Thermofisher®, USA

<sup>IX</sup> Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4 Osmolality 280 - 315 mOsm/kg, GIBCO®, N° 10010023, USA.

uma agulha de insulina estéril. As CTM foram tripsinizadas e avaliadas quanto à viabilidade celular conforme descrito por Argôlo Neto et al. (2016).

Os fragmentos da esponja hemostática foram então fixadas isoladamente em formol 5%<sup>X</sup> por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool<sup>XI</sup> (30%, 55%, 70%, 88%, 96%), diafanizadas em xilol<sup>XII</sup>, incluídas em parafina histológica<sup>XIII</sup> e seccionadas em micrótomo rotativo<sup>XIV</sup>, ajustado para 4µm de espessura. Os cortes foram fixados em lâmina de vidro, corados pela Hematoxilina & Eosina e analisados em microscópio óptico binocular<sup>XV</sup> em objetivas de 10x e 20x.

**Obtenção do plasma rico em plaquetas xenogênico.** O plasma rico em plaquetas foi adquirido utilizando-se sangue de um equino clinicamente saudável, desvermifugado, com valores hematimétricos dentro do padrão de normalidade determinado para a espécie (Cunha et al. 2008) e contagem total de plaquetas igual ou superior a  $200 \times 10^3/\text{mm}^3$ , por meio da cateterização asséptica da veia jugular com cateter 20 G. O sangue foi imediatamente processado conforme metodologia descrita por Del Carlo et al. (2009) e Argôlo Neto et al. (2012). O PRP foi preparado imediatamente antes da aplicação, infundido em esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado.

**Delineamento experimental.** Adotou-se um delineamento experimental com período de observação de 60 dias. Os animais foram submetidos às lesões osteocondrais na região da tróclea femoral e imediato tratamento, uma única vez, de cada falha osteocondral, no trans cirúrgico. Os tratamentos foram arbitrariamente definidos como Lesão 1 - Grupo CTM (Grupo I, tratado com  $10^6$  células-tronco mesenquimais provenientes de poupa dentária de cutia em esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado); Lesão II - Grupo PRP (Grupo II, tratada com plasma rico em plaquetas em esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado); Lesão III - Grupo CTL (Grupo III, esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado), de acordo com a figura 1.

---

<sup>X</sup> Formol 5%. Indalabor Indaiá Laboratório Farmacêutico LTDA. Dores de Indaiá – Minas Gerais – Brasil.

<sup>XI</sup> Álcool etílico. Indalabor Indaiá Laboratório Farmacêutico LTDA. Dores de Indaiá – Minas Gerais – Brasil.

<sup>XII</sup> Xilol. Quimesp Química. Guarulhos – São Paulo – Brasil.

<sup>XIII</sup> Parafina histológica (56-58C). Única Científica. São Caetano do Sul – São Paulo – Brasil.

<sup>XIV</sup> Micrótomo rotativo automático RM2255. Leica Biosystems®. São Paulo – São Paulo – Brasil.

<sup>XV</sup> Microscópio óptico Olympus AX-70. Olympus Optical do Brasil LTDA. São Paulo – São Paulo – Brasil.



Figura 1: (A) Realização das três lesões osteocondrais de 4 mm de diâmetro em joelho de caprinos, dois defeitos na parte distal da tróclea femoral e um defeito na parte proximal. (B) Delimitação dos tratamentos propostos para cada falha osteocondral. Grupo I - células-tronco mesenquimais xenogênicas (CTM) em esponja de colágeno (EH); GRUPO II - Plasma de rico em plaquetas (PRP) em EH Grupo III – (controle) esponja estéril de colágeno hidrolisado.

**Indução das lesões osteocondrais.** Todos os animais foram submetidos à antibioticoterapia profilática com enrofloxacino<sup>XVI</sup> (2,5 mg/kg) por via subcutânea. Após jejum hídrico de 12 horas e alimentar de 24 horas, os animais foram sedados com xilazina<sup>XVII</sup> 2% (0,1 mg/kg) por via intramuscular. Após 20 minutos, o animal foi posicionado na mesa em decúbito esternal com os membros pélvicos inclinados para baixo, para a realização da anestesia local do tipo raquidiana no espaço L7-S1 com auxílio de cateter<sup>XVIII</sup> 20G, realizando-se a associação de morfina (0,1 mg/kg) e bupivacaína isobárica<sup>XIX</sup> a 0,5 % no volume de 0,2 ml/kg. Antes da administração do anestésico local do tipo raquidiana, foi feito um botão anestésico com 0,2 ml de bupivacaína no local onde seria introduzido o cateter. Após isso, realizou-se o acesso venoso da veia jugular, utilizando Ringer com lactato<sup>XX</sup> através de cateter 20 G, em seguida, foi feita indução anestésica com Propofol<sup>XXI</sup> (5 mg/kg) por via endovenosa. Depois da indução,

<sup>XVI</sup> Chemitril® 10% injetável 10g/100mL. Chemitec Agro-veterinária LTDA. Ipiranga – São Paulo – Brasil.

<sup>XVII</sup> Anasedan®2% injetável. Ceva Saúde Animal. Paulínia- São Paulo- Brasil.

<sup>XVIII</sup> Cateter periférico 20 G. Descarpack Descartáveis do Nordeste LTDA. Cabo de Santo Agostinho- Pernambuco- Brasil.

<sup>XIX</sup> Neocaína® 0,5% injetável. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. Itapira - São Paulo – Brasil.

<sup>XX</sup> Solução Ringer com Lactato. Eurofarma Laboratórios SA. São Paulo- SP-Brasil.

<sup>XXI</sup> Propovan® 10mg/mL injetável. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. Itapira - São Paulo – Brasil.

procedeu-se à intubação<sup>XXII</sup> orotraqueal, acoplando-se a sonda ao circuito semi-fechado, mantido com Isoflurano<sup>XXIII</sup> diluído em 100% de oxigênio para manutenção de plano anestésico. Todos os animais foram monitorados quanto ao perfil cardiorespiratório durante todo o procedimento cirúrgico. O campo cirúrgico foi delimitado por dois campos cirúrgicos sobre a articulação fêmuro-tíbio-patelar. Realizou-se artrotomia da região parapatelar medial com incisão na pele, utilizando-se bisturi<sup>XXIV</sup> n. 4 com lâmina<sup>XXV</sup> n. 24 para acesso à articulação fêmoro-tíbio-patelar. O tecido subcutâneo foi incisado para se ter acesso à patela, onde foi deslocada lateralmente por compressão manual para exposição da tróclea femoral. Em seguida, com auxílio de uma furadeira ortopédica<sup>XXVI</sup> equipada com broca de aço 4 mm<sup>XXVII</sup>, foram delineadas três lesões osteocondrais de 4 mm de diâmetro e 6mm de profundidade, sendo dois defeitos na parte distal da tróclea femoral e um defeito na parte proximal (Fig. 1). Após o imediato tratamento das falhas osteocondrais, a cápsula articular foi fechada com sutura simples interrompido com fio monofilamentar de nylon 2-0<sup>XXVIII</sup>. A oclusão da musculatura divulsionada e aproximação do tecido subcutâneo foi feita em plano de sutura Sultan interrompido e a pele com simples interrompido, ambas utilizando-se fio monofilamentar de nylon 2-0. Para analgesia após a cirurgia, os animais receberam cloridrato de Tramadol<sup>XXIX</sup> (2 mg/kg IM), sendo mantida duas vezes ao dia por mais 5 dias. Foi realizada antibioticoterapia pós-operatória com enrofloxacino (2,5 mg/kg SC) uma vez ao dia durante 10 dias e como antiinflamatório foi administrado o meloxicam<sup>XXX</sup> (0,2 mg/kg IM) uma vez ao dia durante 5 dias. As feridas cirúrgicas foram limpas diariamente com solução fisiológica estéril e aplicação tópica de pomada à base de alantoína e clorexidine<sup>XXXI</sup>.

---

<sup>XXII</sup> Sonda endotraqueal número 8. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil.

<sup>XXIII</sup> Forane® Isoflurano. Abbott laboratórios do Brasil. São Paulo – São Paulo – Brasil.

<sup>XXIV</sup> Cabo de bisturi n. 4. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil.

<sup>XXV</sup> Lâmina de bisturi n.24. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil

<sup>XXVI</sup> Furadeira ortopédica autoclavável. BrasMed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA. Paulínia – São Paulo – Brasil.

<sup>XXVII</sup> Broca de aço Vonder®. Grupo OVD. Barbalha – Ceará – Brasil.

<sup>XXVIII</sup> Fio de sutura mononylon 2-0 ag1,5cm. Ethicon. São Paulo – São Paulo – Brasil.

<sup>XXIX</sup> Tramadon® injetável 50 mg/mL. Hipolabor Farmacêutica LTDA. Eynard- Minas Gerais- Brasil.

<sup>XXX</sup> Maxicam® 2% injetável. Ouro Fino Saúde Animal. Cravinhos- São Paulo- Brasil.

<sup>XXXI</sup> Alantol® pomada. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira – São Paulo – Brasil.

**Realização dos tratamentos.** As lesões osteocondrais foram tratadas imediatamente, de acordo com o grupo experimental a que pertenciam. Todos os tratamentos foram realizados utilizando fragmentos de aproximadamente 3 mm de esponja hemostática de colágeno hidrolisado estéril (EH), como suporte estrutural (*scaffold*) para as CTM ou PRP, introduzidas nas lesões. O grupo CTM foi tratado com  $1 \times 10^6$  células sobre EH, o grupo PRP com plasma rico em plaquetas sobre EH, e grupo CTR apenas com EH embebida em solução fisiológica estéril. (Fig.2)

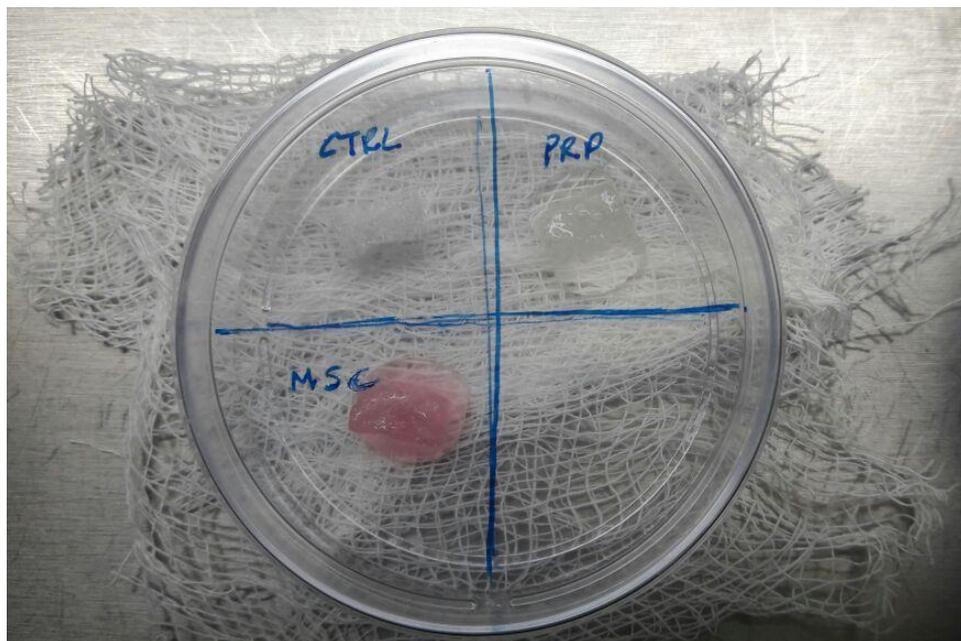


Figura 2. Placa de *petri* contendo quatro fragmentos de esponja hemostática de colágeno hidrolisado estéril, embebidas em solução de  $1 \times 10^6$  CTM,  $1 \times 10^6$  PRP, solução fisiológica estéril e associação entre CTM e PRP, respectivamente. \*MSC = CTM

**Procedimentos histológicos.** Após 60 dias da realização dos tratamentos, os animais foram identificados, pesados e foram submetidos à eutanásia. Para isso, foi induzida sedação com quetamina<sup>xxxii</sup> (30 mg /kg) por via endovenosa. Após a confirmação da inconsciência e perda do reflexo corneal, aplicou-se lidocaína na cisterna magna, seguido de aplicação de cloreto de potássio<sup>xxxiii</sup> por via endovenosa. Constatado o óbito, realizou-se cortes com auxílio de serra manual, no fêmur e tíbia esquerdos, separando-se a porção da articulação fêmoro-tíbio-patelar esquerda. Após a remoção da musculatura e da patela, as amostras foram identificadas e

<sup>xxxii</sup> Quetamina injetável 10g/100mL. Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira – São Paulo – Brasil.

<sup>xxxiii</sup> Cloreto de Potássio 10%. Halexistar Indústria Farmacêutica. Goiânia-Goiás-Brasil.

conservadas individualmente em formol a 10% tamponado para posterior processamento histológico. O processo de descalcificação ocorreu durante 15 dias, sendo 10 dias em solução a 20% (80% de água destilada e 20% de ácido clorídrico<sup>xxxiv</sup>) e 5 dias em solução a 5% (95% de água destilada e 5% de ácido clorídrico), posteriormente colocado imerso em água corrente por mais 5 dias. Posteriormente, os fragmentos descalcificados processados histologicamente de forma convencional (Argôlo Neto et al. 2016). Incluiu-se os cortes em parafina histológica, seccionando-os em micrótomo rotativo, ajustado para 5µm de espessura. Os cortes foram fixados em lâmina de vidro, corados pela Hematoxilina & Eosina e analisados em microscópio óptico binocular<sup>xxxv</sup> em objetivas de 4x e 10x.

**Avaliação macroscópica.** Após o corte da porção da articulação fêmoro-tíbio-patelar, foi realizada a avaliação macroscópica dos defeitos osteocondrais. Adotaram-se os critérios de avaliação macroscópica empregado previamente em estudo com defeitos osteocondrais produzidos nos joelhos de caprinos (Ribeiro et al. 2004, Albuquerque et al. 2011). Foram utilizados os seguintes parâmetros qualitativos: Superfície do defeito: 1-plana, desnivelada ou irregular, 2-Coloração: translúcida, opaca ou descolorada, 3-Continuidade: total, parcial ou nenhuma integração com o defeito, 4-Cicatrização do defeito: total, 75-%, 50% e 25%. Para a inspeção, foram utilizados dois avaliadores simultâneos, em formato de estudo cego, que desconheciam a metodologia e sequencia das falhas osteocondrais, conforme proposto por Albuquerque et al. (2011).

**Avaliação histológica.** Utilizou-se a escala qualitativa de avaliação de defeitos osteocondrais induzidos, proposto anteriormente por Ribeiro et al. (2004) e Cardoso et al. (2016). Foram adotados os seguintes critérios: 1-Tipo de tecido que recobria a superfície cartilaginosa: cartilagem hialina ou fibrocartilagem. 2-Estado da superfície cartilaginosa: lisa, com depressão ou irregular. 3-Padrão do osso subcondral: regenerado ou desorganizado.

**Análise estatística.** A análise estatística foi realizada com auxílio do software Bioestat® v. 5.9 (UFPA, 2007), aplicando-se o teste não paramétrico de análise de amostras independentes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação da mediana dos postos de Dunn, adotando-se um nível de rejeição da hipótese de nulidade de 1% ( $p \leq 0,01$ ) para ambas as análises.

---

<sup>xxxiv</sup> Ácido Clorídrico 20%

<sup>xxxv</sup> Microscópio binocular NIKON E200. Nikon Corporation. Tóquio-Japão.

## RESULTADO

Os animais permaneceram clinicamente saudáveis após a realização da intervenção cirúrgica, sem evidências clínicas de anorexia, febre e/ou apatia. Todos os animais foram negativos ao teste de Goudet na região do joelho submetido à artrocopia, 24, 72 e 96 horas após a recuperação anestésica. Identificou-se claudicação evidente na articulação afetada, de intensidade moderada, sem alteração significativa da frequência cardiorrespiratória, de acordo com os padrões fisiológicos para a espécie (Daramola et al. 2005, Cardoso et al. 2010), durante a avaliação.

Obteve-se um plasma equino de concentração plaquetária elevado e em volume menor que do sangue total. À medida que a amostra foi sequencialmente centrifugada e retiradas as frações hematológica e superficial do plasma, obteve-se um produto exclusivamente composto de plaquetas concentradas com 82% da concentração do volume plaquetário inicial, mas num volume 10 vezes menor que o inicial (Fig. 3).

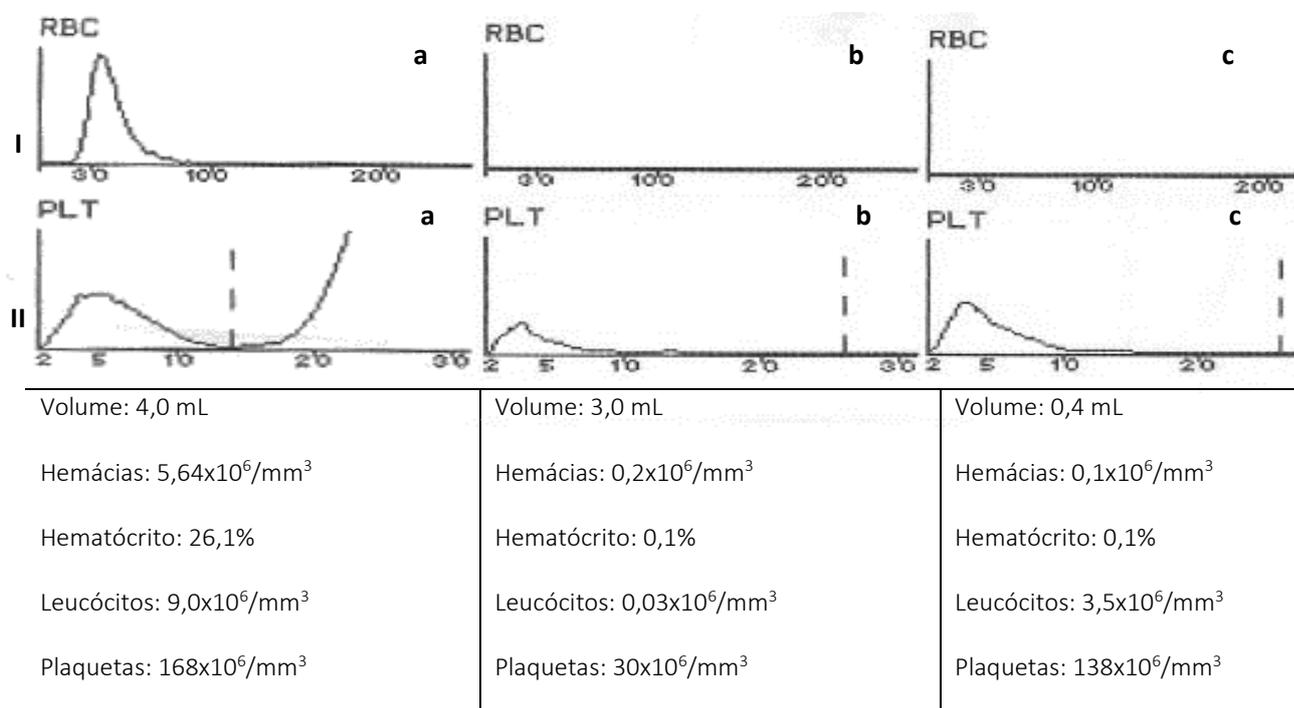


Figura 3. Variação de alguns índices hematológicos em amostra de sangue equino submetida à concentração plasmática de plaquetas. I: Variação dos índices de hemácias e hematócrito no sangue total (a), no plasma pobre em plaquetas (b) e no plasma rico em plaquetas (c). II: Variação nos índices de leucócitos e plaquetas no sangue total (a), no plasma pobre em plaquetas (b) e no plasma rico em plaquetas (c). Em II a há variação anormal da curva pela presença de agregados plaquetários.

\*RBC = Hemácias. PLT = plaquetas

O cultivo de CTM com fragmento de esponja estéril de colágeno hidrolisado identificou que as células aderiram à matriz da esponja após 10 dias de incubação (Fig. 4) e a avaliação da viabilidade celular média identificada após a retirada do fragmento foi de 95%.

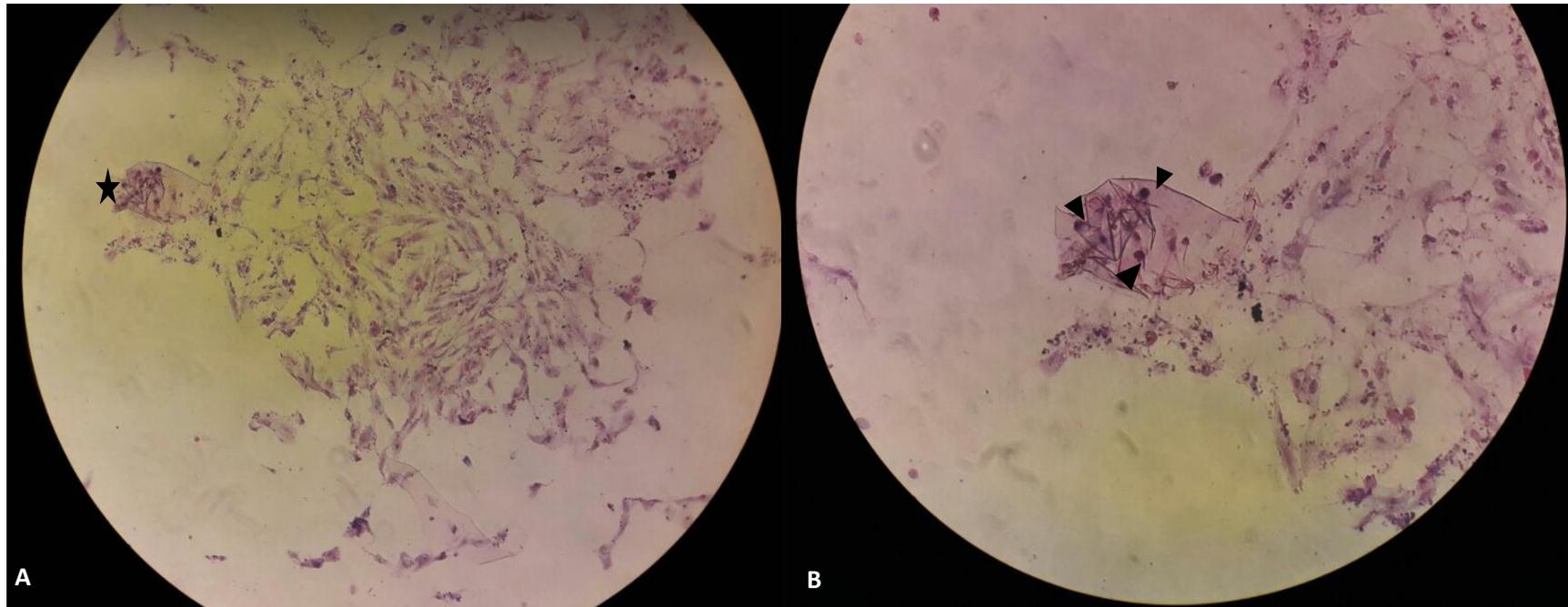


Figura 4. Células-tronco mesenquimais medulares de coelho após 10 dias de cultivo com fragmento estéril de esponja hemostática de colágeno hidrolisada, fixada com paraformaldeído tamponado a 10% e coradas com May-Grunwald Giemsa. A: Colônia uniforme de células de morfologia fibroblastóide, com núcleo central, margeando o fragmento da esponja (★) (20x). B: Maior aumento da imagem anterior. Presença de células mononucleares (▼) sobre o fragmento de esponja (40x).

A avaliação histológica do mesmo fragmento de esponja identificou a presença de células mononucleares aderidas ao substrato do mesmo, com núcleo íntegro e cromatina frouxamente condensada (Fig. 5).

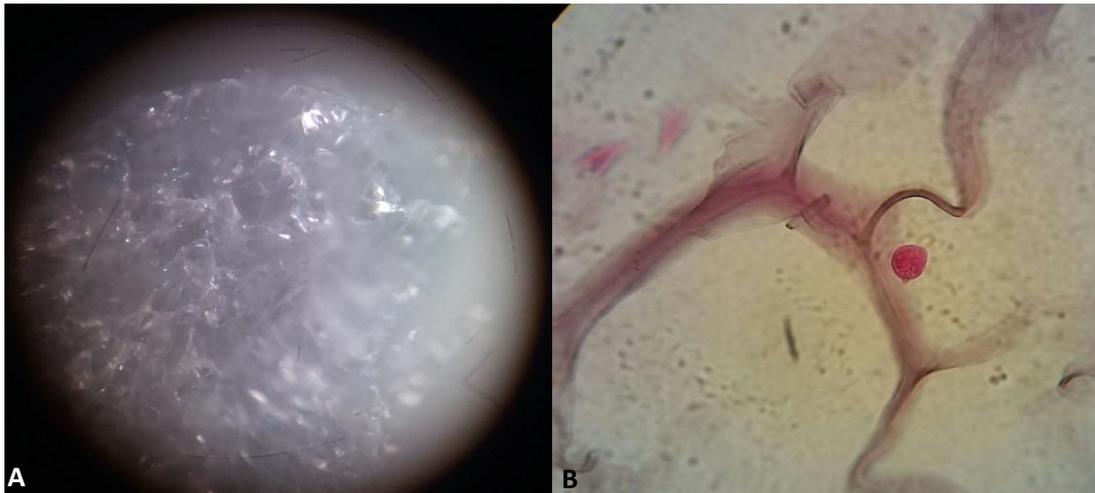


Figura 5. Fotomicrografia de fragmento de esponja hemostática de colágeno hidrolisado. (A) Esponja sem tratamento, evidenciando a porosidade e hialinização do material. (B) Corte histológico da esponja após 10 dias de incubação em cultura com células-tronco mesenquimais medulares de coelho. Identifica-se presença de célula mononuclear, de cromatina frouxa, aderida às circunvoluções da matriz da esponja (40x).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas a 5% entre os tratamentos avaliados. Contudo, macroscopicamente, após 60 dias de tratamento, foi observado que os grupos CTL e CTM apresentaram resultados semelhantes, com predomínio da formação de tecido de reparação firme, coloração opaca, integração com a cartilagem adjacente e preenchimento do defeito quase na sua totalidade. Em todos os defeitos tratados com PRP, houve integração parcial do defeito com a cartilagem adjacente, com preenchimento de 75% do total da lesão, superfície articular desnivelada e de coloração variando de avermelhado para uma tonalidade mais escurecida, considerada uma cor não natural da cartilagem normal. (Fig. 6) (Tabela 1)

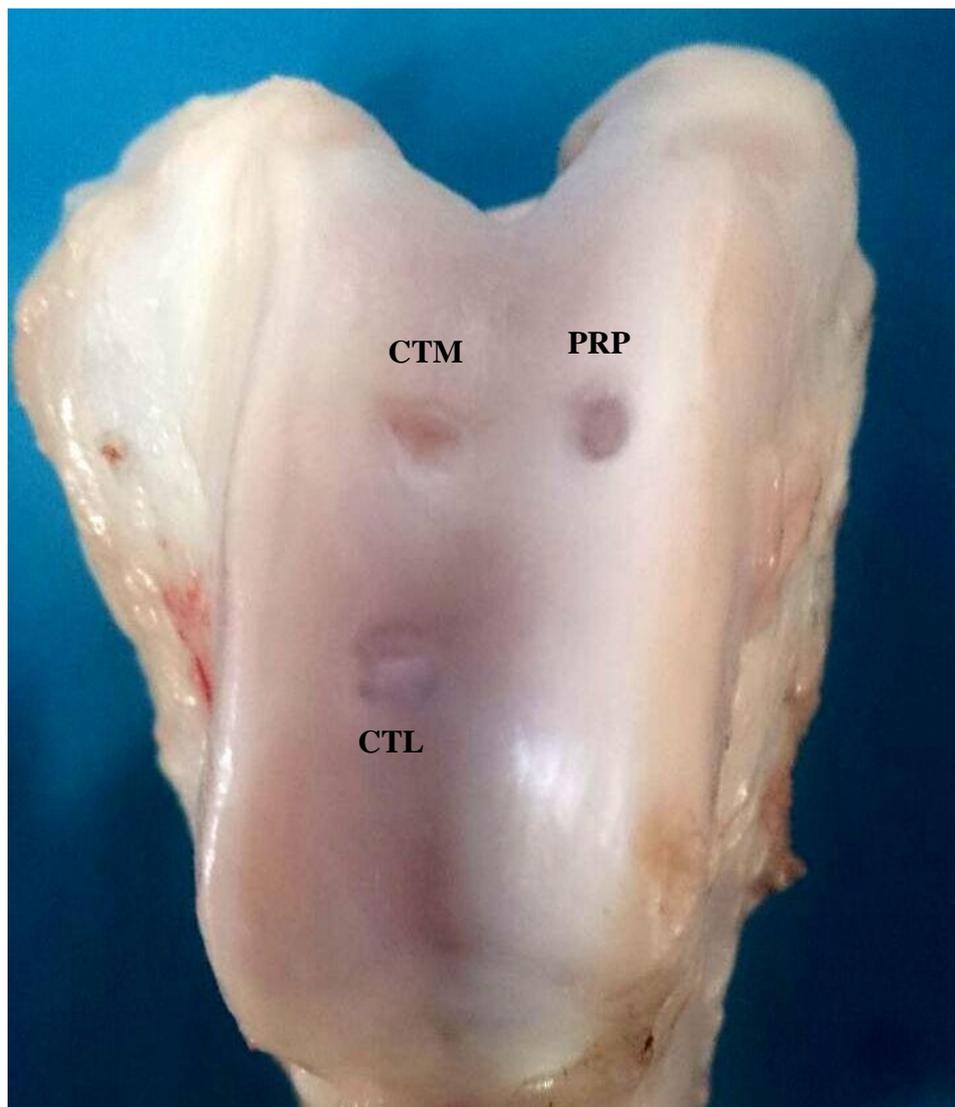


Figura 6: Lesões osteocondrais em tróclea femoral de caprinos após 60 dias. As lesões tratadas com CTL e CTM apresentaram o preenchimento do defeito quase na sua totalidade e coloração opaca. No grupo tratado com PRP, a superfície articular encontra-se mais desnivelada, com coloração mais escurecida, considerada uma cor não natural da cartilagem normal.

**Tabela 1 – Aspectos macroscópicos em lesões osteocondrais de caprinos com 60 dias**

Animais	Grupos	Continuidade com cartilagem adjacente	Preenchimento do defeito	Coloração	Superfície da articulação
Cabra 1	CTL	Parcial	75%	Opaca	Desnivelada
Cabra 1	CTM	Parcial	75%	Opaca	Desnivelada
Cabra 1	PRP	Parcial	75%	Descolorado	Desnivelada
Cabra 2	CTL	Total	100%	Translúcida	Plana
Cabra 2	CTM	Parcial	75%	Opaca	Desnivelada
Cabra 2	PRP	Parcial	75%	Descolorada	Irregular
Cabra 3	CTL	Total	100%	Descolorada	Plana
Cabra 3	CTM	Total	100%	Opaco	Plana
Cabra 3	PRP	Parcial	75%	Opaco	Desnivelada
Cabra 4	CTL	Total	100%	Translúcida	Plana
Cabra 4	CTM	Total	100%	Translúcida	Plana
Cabra 4	PRP	Parcial	75%	Descolorado	Desnivelada
Cabra 5	CTL	Parcial	75%	Opaco	Desnivelada
Cabra 5	CTM	Total	100%	Opaco	Plano
Cabra 5	PRP	Parcial	75%	Opaco	Desnivelado

\*CTL (controle), CTM (células-tronco mesenquimais xenogênicas), PRP (plasma rico em plaquetas xenogênico)

Após 60 dias da realização dos tratamentos, identificou-se diferenças histopatológicas na remodelação das lesões entre os grupos tratados (Fig. 7). Observou-se que nos defeitos tratados com CTM, houve predominância da presença de cartilagem hialina em todos os animais tratados e superfície cartilágnea lisa em quase sua totalidade, em quatro animais. Na parte profunda da lesão, foi observado em um animal, a presença de tecido adiposo ao invés da formação de tecido osteocartilágneo, mas com superfície cartilágnea normal e lisa. No grupo PRP, foi observada na maioria dos animais, a predominância da fibrocartilagem em relação à cartilagem hialina na superfície articular, evidenciando fibrocartilagem em três animais e cartilagem hialina em dois; sendo a superfície cartilágnea lisa encontrada em todas amostras visualizadas. No grupo tratado com esponja hemostática de colágeno hidrolisado (CTL), a superfície articular apresentou formação de cartilagem hialina em quatro animais. Em dois animais que apresentaram cartilagem hialina, observou-se tecido osteocartilágneo na parte profunda da lesão com superfície articular irregular (Tabela 2).

**Tabela 2 – Aspectos histológicos em lesões osteocondrais de caprinos com 60 dias**

Animais	Grupos	Osso subcondral	Superfície cartilaginosa	Estado da superfície
Cabra 1	CTL	Regenerado	Hialina	Lisa
Cabra 1	CTM	Regenerado	Hialina	Lisa
Cabra 1	PRP	Regenerado	Hialina	Lisa
Cabra 2	CTL	Regenerado	Hialina	Lisa
Cabra 2	CTM	Regenerado	Hialina	Lisa
Cabra 2	PRP	Regenerado	Hialina	Lisa
Cabra 3	CTL	Regenerado	Fibrocartilagem	Lisa
Cabra 3	CTM	Regenerado	Hialina	Irregular
Cabra 3	PRP	Regenerado	Fibrocartilagem	Lisa
Cabra 4	CTL	Regenerado	Hialina	Irregular
Cabra 4	CTM	Regenerado	Hialina	Lisa
Cabra 4	PRP	Regenerado	Fibrocartilagem	Lisa
Cabra 5	CTL	Regenerado	Hialina	Irregular
Cabra 5	CTM	Regenerado	Hialina	Lisa
Cabra 5	PRP	Regenerado	Fibrocartilagem	Lisa

*\*CTL (controle), CTM (células-tronco mesenquimais xenogênicas), PRP (plasma rico em plaquetas xenogênico)*

Todas as lesões osteocondrais de todos os grupos evidenciaram osso subcondral regenerado, caracterizado pela presença de osso lamelar maduro, composto de osteócitos e organização de tecido ósseo trabecular sem presença de osteoblastos, demonstrando que houve a reparação satisfatória da parte profunda da lesão osteocondral frente aos tratamentos utilizados. Além disso, não foram identificadas características histopatológicas de atividade inflamatória e necrose em nenhuma das falhas osteocondrais tratadas.

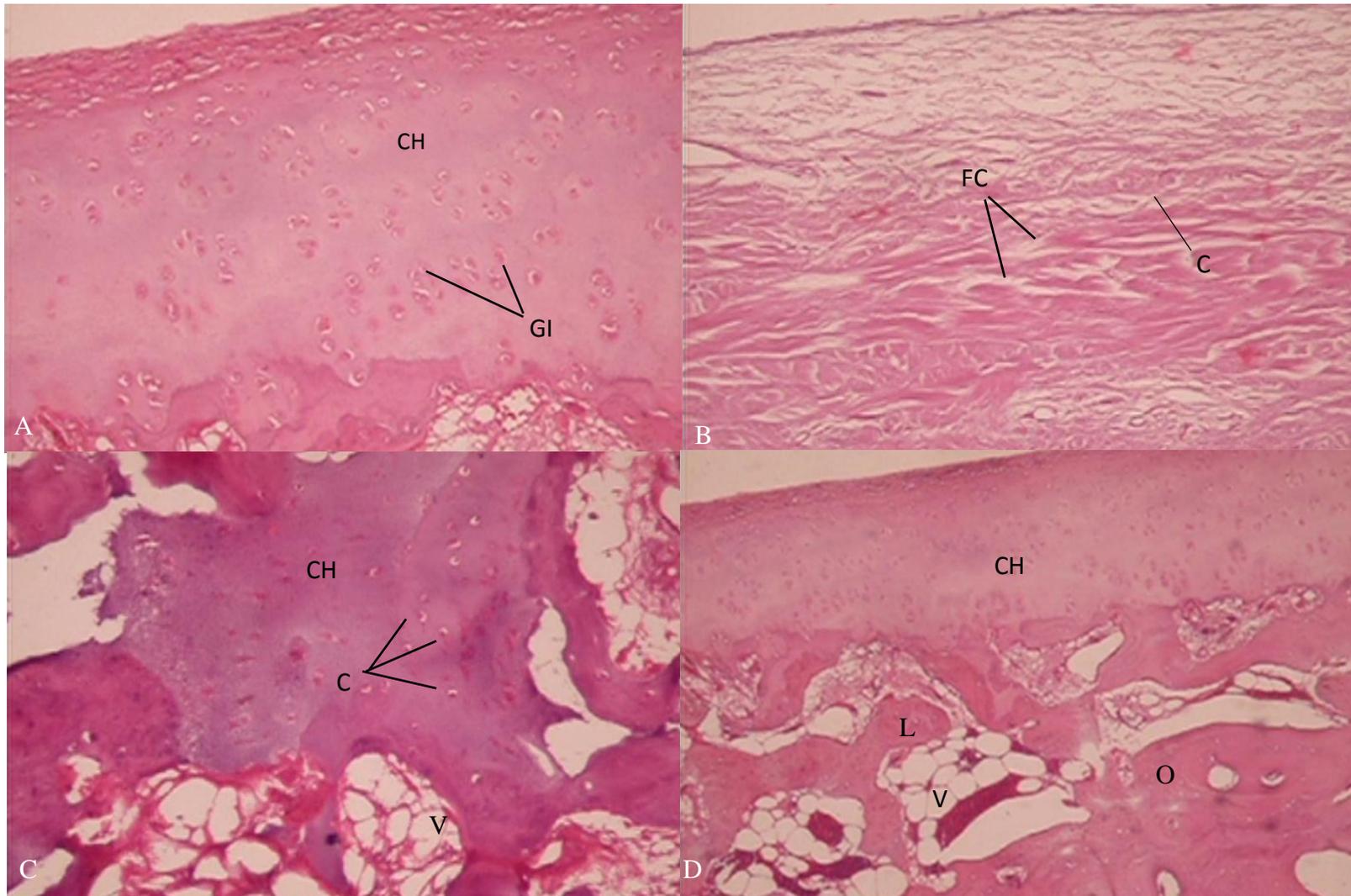


Figura 7: Fotomicrografia das lesões osteocondrais em joelho de caprino após 60 dias de tratamento com esponja estéril de colágeno hidrolisado (CTL), células-tronco mesenquimais xenogênicas (CTM) em esponja de colágeno (EH), plasma de rico em plaquetas em EH (PRP). A: Superfície articular com presença de cartilagem hialina (CH) no grupo tratado com CTM, caracterizado pela presença de condrócitos dispostos em grupos isógenos (GI) na matriz cartilaginosa. (10x) B: Superfície articular com presença de fibrocartilagem no grupo tratado com PRP, caracterizado por fibras colágenas (FC) espessas entre as fileiras de condrócitos (C). (10x) C: Grupo tratado com a esponja de colágeno (CTL), apresentando superfície articular com presença de cartilagem hialina disposta em formato irregular e cercada por tecido ósseo. (10x) D: Osso subcondral maduro (O). São notados lamelas (L) e vasos sanguíneos (V). (4x). Hematoxilina-eosina.

## DISCUSSÃO

A escolha do caprino como modelo animal para o presente estudo deve-se às dimensões anatômicas do joelho, similar à dimensão do joelho humano (Brehm et al. 2006), permitindo adequada exposição da superfície articular, favorecendo a manipulação cirúrgica.

Os animais retomaram a deambulação espontânea e demonstraram apetite logo após a recuperação anestésica. Resultados similares foram descritos por Carneiro et al. (2013), utilizando protocolo anestésico equivalente, reiterando a efetividade do manejo terapêutico da dor adotado neste estudo. A associação entre anestesia local raquidiana associado à morfina, provavelmente contribuiu com um pós-operatório sem complicações clínicas, associado com uso de analgésico, antibiótico e antiinflamatório, conforme proposto anteriormente por Saw et al. (2009).

O diâmetro escolhido para as lesões osteocondrais neste experimento foi de 4 mm de diâmetro, como recomendado por Jackson et al. (2001) e Saw et al. (2009), onde afirma-se que, lesões inferiores a 3 mm, podem predispor a reparação espontânea por tecido fibrocartilaginoso. O diâmetro de 4 mm, neste estudo, contribuiu positivamente para a exequibilidade da técnica cirúrgica adotada, facilitando a criação das lesões, na identificação visual para análise macroscópica e na separação das falhas osteocondrais para processamento histológico.

O uso de esponjas hemostáticas como *scaffold* para estudos com reparação de falhas ósseas já havia sido descrito em pesquisas anteriores, tanto em humanos quanto em animais, corroborando para justificar a escolha deste substrato para o modelo ora apresentado (Berenguel 2006, Gabrielli et al. 2009). Além disso, é utilizada amplamente utilizada em seres humanos, possuindo autorizações de agências governamentais de vigilância para comercialização (Rocha et al. 2012), sendo então adotada como padrão ouro.

O Hemospon<sup>®</sup>, é indicada inicialmente para uso em cirurgias buco-maxilares em seres humanos, como agente hemostático e cicatrizante. Este agente foi escolhido como tratamento padrão para fins de comparação, além de carreador das células-tronco mesenquimais obtidas da poupa dentária de cutia e do plasma rico em plaquetas obtido de equinos.

O ensaio *in vitro* de biocompatibilidade entre CTM e um fragmento da esponja demonstrou que não houve efeito citotóxico aparente da mesma sobre as células, visto que identificou-se CTM em cultivo aderidas ao fragmento, com manutenção da viabilidade celular em 95% (Fig. 4). Analogamente, identificou-se células aderidas ao substrato do fragmento após processamento histológico, denotando que a matriz do substrato proporciona ambiente favorável à aderência celular (Fig. 5).

No estudo *in vitro* de biocompatibilidade, evidenciou-se alteração na morfologia celular das CTM. Tal efeito era esperado, visto as CTM são células mononucleares aderentes que assumem morfologia fibroblastóide ou fusiforme apenas quando em superfície regular de cultivo, como as condições de incubação controlada (Argôlo Neto et al. 2016). Sendo a superfície porosa da esponja hemostática irregular (Fig. 5), a CTM foi visualizada sob forma mononuclear oval

Após 60 dias de observação, não foram evidenciados vestígios macro ou microscópicos da esponja hemostática no interior das falhas osteocondrais avaliadas, corroborando com os relatos prévios de biocompatibilidade e reabsorção *in vivo* (Oliveira et al. 2010).

Não foi observada evidência macroscópica e histopatológica de processo inflamatório na superfície e na porção interna das lesões osteocondrais analisadas neste estudo. Tais observações são de grande importância, dado que a síndrome da doença do enxerto contra o hospedeiro é uma condição aguda ou hiperaguda, responsável pela baixa eficácia terapêutica com transplante de células ou enxertos em seres humanos (Soares et al. 2007). Segundo estes autores, cerca de 40 a 50% dos pacientes humanos submetidos a transplante de medula óssea, desenvolvem tal condição clínica (Krenger et al. 1997).

Esperava-se ausência de resposta macro e histopatológica de rejeição nas falhas osteocondrais tratadas com esponja de colágeno hidrolisado de origem porcina, visto a mesma já ser comercialmente utilizada em seres humanos, conforme observado em estudos contemporâneos (Rocha et al. 2012).

Contudo, a inexistência de evidências teciduais de rejeição nas falhas osteocondrais tratadas com PRP e CTM, é considerado um dado preliminar positivo, embora não se possa inferir que tal resultado reproduza-se em outros animais, em outras condições metodológicas de estudo.

As falhas osteocondrais tratadas apenas com esponja hemostática, exibiram, em sua maioria, presença de cartilagem hialina como tecido regenerado na superfície do defeito. Em estudo realizado por Carneiro et al. (2013), onde foram produzidos defeitos osteocondrais no sulco troclear de ovelhas, em um dos defeitos osteocondrais, o autor optou por não colocar nenhum tratamento na lesão para promover cicatrização espontânea. Na análise com 90 dias, não foi constatada presença da cartilagem hialina na superfície articular do defeito sem tratamento, havendo formação de fibrocartilagem, considerada uma reparação cartilaginosa inadequada. A esponja de gelatina liofilizada em lesão osteocondral possui propriedades que promovem uma melhor resposta tecidual da superfície da lesão para uma cartilagem mais próxima do normal, como também melhor estado da superfície cartilaginosa, quando comparado com lesões osteocondrais cicatrizadas espontaneamente.

O PRP é utilizado há cerca de 20 anos com o objetivo de acelerar a cicatrização e a regeneração óssea resultantes de procedimentos cirúrgicos em seres humanos. O plasma possui alta concentração de plaquetas em um reduzido volume plasmático, além de fatores de crescimento que comportam-se como moléculas de adesão celular nos processos de migração epitelial, osteoindução e na formação de matriz óssea no tecido conjuntivo. Devido à alta concentração de fatores de crescimento que estimulam a migração celular e remodelação tecidual, acredita-se que esta substância poderá, sob determinadas circunstâncias, estimular a apresentação de antígeno e resposta imunológica inata em pacientes tratados com formas não autógenas de PRP (Moshiri & Oryan 2013, Yamada et al. 2016).

Uma das principais limitações ao uso clínico do PRP é o baixo rendimento quando comparado ao volume da amostra de plasma inicial (Argôlo Neto et al. 2016), sobretudo para infusão em áreas teciduais extensas. Desta forma, faz-se mister estudos com fontes xenogênicas de PRP que permitam coleta de maiores volumes de sangue e, conseqüentemente, maior volume de PRP obtido.

O processamento do PRP identificou relação inversa entre contagem de hemácias e plaquetas, embora tenha identificado relação proporcionalmente direta entre contagem de leucócitos e plaquetas (Fig. 3). Tal relação já foi previamente descrita em estudos anteriores, utilizando plasmas humanos e animais como amostra (Del Carlo et al. 2009, Yamada et al. 2016). Segundo estes autores, durante o processo de centrifugação, as plaquetas são depositadas juntamente com os leucócitos sobre as hemácias, formando um halo esbranquiçado. Desta forma, quanto mais eficaz a técnica de pipetagem do halo formado, menor percentual de hemácias e

maior percentual de leucócitos são identificados. Este resultado pode ser utilizado como uma variante de exclusão para determinação da qualidade do PRP produzido e reitera a eficácia da metodologia adotada no presente estudo para tal.

No presente estudo, as falhas osteocondrais tratadas com PRP induziram formação de cartilagem fibrocartilaginosa, sem evidência macro e microscópica de degeneração ou necrose. A estimulação do osso subcondral promove uma cascata de eventos, onde ocorre formação de coágulo sanguíneo, resposta inflamatória, liberação local de fatores de crescimento, resultando em tecido de granulação que se origina da profundidade, sendo substituído progressivamente por tecido ósseo maduro (Barbosa et al. 2014). No estudo, foi evidenciado a presença de osso subcondral maduro em todos os tratamentos realizados, demonstrando que houve a reparação satisfatória da parte profunda da lesão osteocondral frente ao tratamento utilizado, sem evidência de efeito deletério na superfície cartilaginosa.

Ao contrário dos demais tratamentos, as falhas tratadas com PRP exibiram predominância da cartilagem fibrocartilaginosa em relação à cartilagem hialina, resultado semelhante ao estudo realizado por Carneiro et al. (2013), onde na utilização de PRP em lesão osteocondral em joelho de ovelhas, também houve predominância de fibrocartilagem na superfície articular. Fatores parácrinos do microambiente local do defeito osteocondral são possivelmente responsáveis pela formação de tecido fibrocartilaginoso ou pela inibição da formação da cartilagem normal (Saw et al. 2009). A ocorrência maior da superfície fibrocartilaginosa no grupo PRP, contribuiu para o comprometimento no preenchimento da lesão, observado na avaliação macroscópica, onde constatou-se que houve 75% do total de tecido preenchido na lesão, resultado inferior ao observado nos demais grupos, onde obtiveram preenchimento tecidual de forma mais satisfatória nos animais analisados.

O efeito das CTM na reparação tecidual óssea já havia sido descrito em estudos contemporâneos (Argôlo Neto et al. 2012, Monteiro et al. 2012). Segundo estes autores, as CTM são células progenitoras somáticas multipotentes, capazes de originar tecidos mesodermis e não mesodermis. A diferenciação destas células *in vitro* em osteoblastos, foi induzida em diversas pesquisas anteriores (Carvalho et al. 2015, Argôlo Neto et al. 2016). No presente estudo, amostras das CTM utilizadas apresentaram resposta positiva ao ensaio *in vitro* de diferenciação osteogênica realizado previamente pela equipe do NUPCelt/UFPI, reiterando a plasticidade das mesmas para o tecido ósseo.

As falhas osteocondrais tratadas com CTM xenogênicas veiculadas em esponja hemostática, apresentou não apenas ausência de evidências macro e histopatológicas de degeneração, inflamação e/ou necrose tissular, como também exibiram maior formação de cartilagem hialina.

As CTM não expressam complexo de histocompatibilidade de classe II e não apresentam moléculas co-estimulatórias, como B7-1 e B7-2, não podendo atuar portanto, como células apresentadoras de antígeno (Souza et al. 2010). Contudo, estas células expressam MHC classe I e algumas populações de células-tronco expressam moléculas de CD40 e CD40 ligante, as quais, podem, em algumas circunstâncias, serem identificados por *Toll Like Receptors* os quais, por sua vez, poderiam induzir ativação imunogênica. Não foi objetivo do presente estudo, avaliar imunologicamente a interação entre CTM e sistema imune local, tampouco realizou-se ensaios *in vitro* de indução de apoptose e demais testes que aferem a capacidade celular de induzir resposta de rejeição. Buscou-se avaliar a resposta clínica e histopatológica do tratamento das falhas osteocondrais tratadas com CTM, sendo considerada muito satisfatória a manutenção da integridade da superfície articular e formação de cartilagem hialina neoformada.

Nas falhas tratadas com CTM xenogênicas foi observada histopatologicamente a presença de superfície cartilágnea lisa e na parte profunda da falha observada a presença de tecido adiposo ao invés da formação de tecido osteocartilágneo. Na reparação de lesões osteocondrais espera-se que não haja recrutamento significativo de tecido osteocartilágneo na parte profunda da lesão, de forma a não induzir formação de fibrocartilagem, o que poderia comprometer a função articular.

Contudo, apesar dos resultados obtidos indicarem tendência histopatológica de formação de cartilagem hialina no preenchimento das falhas tratadas com CTM, quando comparadas às falhas tratadas com PRP e esponja hemostática, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas a 5%. Como nenhuma falha osteocondral de nenhum animal apresentou preenchimento com tecido neoformado superior a 80% da falha, supõe-se que o curto período de experimento (60 dias) tenha contribuído negativamente para os dados obtidos. Sugere-se que o modelo adotado seja repetido em período maior de observação (90 e 120 dias), além da avaliação histopatológica das taxas de apoptose. Apesar de tal condição, o presente estudo propicia a abertura de relevante opção de investigação científica ao uso de CTM e PRP xenogênicos em terapia celular.

## CONCLUSÕES

Não foram identificadas diferenças estatísticas significativas a 5% entre os tratamentos propostos. O osso subcondral apresentou-se com padrão lamelar maduro em todos os animais, independente do tratamento adotado.

A esponja hemostática estéril de colágeno hidrolisado apresentou biocompatibilidade com as CTM xenogênicas, permitindo a adesão das mesmas e preservando sua viabilidade. Além disso, demonstrou ter contribuído a formação de cartilagem hialina nas falhas tratadas.

Os tratamentos das falhas osteocondrais com CTM xenogênicas da polpa dentária de cutia induziu, histopatologicamente, formação de cartilagem hialina na superfície do defeito, sem evidência de resposta inflamatória.

O tratamento com PRP induziu maior formação de superfície cartilágnea fibrocartilaginosa nas falhas osteocondrais. Macroscopicamente, evidenciou-se preenchimento da lesão inferior aos demais tratamentos e coloração discrepante da cartilagem normal.

## REFERÊNCIAS

Albuquerque P.C.V.C., Santos S.M., Aguiar J.L.A., Filho N.P., Mello R.J.V., Costa M.L.C.R., Olbertz C.M.C.A., Almeida T.M.S., Santos A.H.S. & Silva J.C. 2011. Estudo comparativo macroscópico dos defeitos osteocondrais produzidos em fêmures de coelhos preenchidos com gel de biopolímero da cana-de-açúcar. *Rev. Bras. Ortop.* 46 (5):577-84.

Argôlo Neto N.M., Del Carlo R.J., Monteiro B.S., Nardi N.B., Chagastelles P.C., Brito A.F.S. & Reis A.M.S. 2012. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. *Clin. Exp. Dermatol.* 37 (5): 544-553.

Argôlo Neto N.M., Feitosa M.L.T., Sousa S.S., Fernandes P.B., Pessoa G.T., Bezerra D.O., Almeida H.M., Carvalho Y.K.P., Rocha A.R., Silva L.M.C. & Carvalho M.A.M. 2016. Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Sci. Vet.* 44: 1-11.

Barbosa A.L.T., Schossler J.E.W., Raiser A.G., Serafini G.M.C., Treichel T.L.E., Libardoni R.N., Marconato F., Silveira M.C., Graça D.L., Martins D.B., Zanetti R.M. & Lopes S.T.A. 2014. Mononuclear stem cells associated with platelet-rich plasma in the consolidation of bone defects in dogs. A pilot study. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66 (6): 1718-1726.

Batista N.A., Rodrigues A.A., Bavaresco V.P., Mariolani J.R.L, Cunha M.R., Jr A.R.S. & Belangero W.D. 2012. Polyvinyl alcohol hydrogel (PVA) to repair osteochondral defects: histological evaluation, morphometric and x-ray fluorescence. *Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*.

Berenguel I.A. 2006. Implantes das esponjas hemostáticas Gelfoam e Hemospon em alvéolos dentais em ratos após exodontia. Estudo histológico e histométrico comparativo. Dissertação de Mestrado. Disponível em <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp053900.pdf>. Acesso em 02 fev. 2017.

Brehm W., Aklin B., Yamashita T., Rieser F., Trüb T., Jakob R.P. & Mainil-Varlet P. 2006. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthr. Cartil.* 14 (12): 1214-26.

Cardoso E.C., Oliveira D.R., Dourado A.P., Araújo C.V., Ortalani E. L. & Brandão F.Z. 2010. Peso e condição corporal, contagem de OPG e perfil metabólico sanguíneo de ovelhas da raça Santa Inês no periparto, criadas na região da Baixada Litorânea do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Ciênc. Veter.* 17 (2): 77-82.

Cardoso T.P., Ursolino A.P.S., Casagrande P.M., Caetano E.B., Mistura D.V. & Duek E.A.R. 2016. Avaliação do desempenho in vivo de pinos porosos de hidrogel para preenchimento de defeito osteocondral em coelhos. *Rev. Bras. Ortop.* 52 (1): 95-102.

Carneiro M. O., Barbieri C.H. & Barbieri Neto, J. 2013. Platelet-rich plasma gel promotes regeneration of articular cartilage in knees of sheeps. *Acta Ortop. Bras.* 21 (2): 80-86.

- Carvalho Y.K.P., Argôlo Neto N.M., Ambrósio C.E., Oliveira L.J., Rocha A.R., Silva J.B., Carvalho A.A.M. & Alves F.R. 2015. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). *Pesq. Vet. Bras.* 35 (6): 590-598.
- Cunha A.P., Bello A.C.P.P., Leite R.C., Melo M.M., Braz G.F., Ribeiro A.C.C.L. & Oliveira P.R. 2008. Avaliação de parâmetros clínicos e hematológicos de equinos submetidos a um programa de controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60 (1): 113-120.
- Daramola, J.O., Adeloye A.A.A., Fatoba T.A. & Soladoye A.O. 2005. Haematological and biochemical parameters of West African Dwarf goats. *Livestock Res. Rural Develop.* 17 (8): 3.
- Del Carlo R.J., Monteiro B.S., Silva P.S.A., Argôlo Neto N.M., Serakides R. 2009. Aspectos microscópicos da reparação mediada por plasma rico em plaquetas e autoenxerto esponjoso em falhas ósseas experimentais no crânio de coelhos. *Vet. Zootec.* 16(1): 152-160.
- Fellet A., Fellet A.J. & Fellet L. 2007. Osteoartrose: uma revisão. *Rev. Bras. Medic.* 64: 55-61.
- Felson D.T. 2004. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol. Clin. North Am.* 42 (1): 1-9.
- Filgueiras R.R., Del Carlo R.J., Alves N.P. & Filgueiras F.P.F. 2009. A terapia celular no reparo de lesões osteocondrais. *Rev. Cient. Medic. Veter.* 7(23); 487-492.
- Gabrielli M.A.C., Hochuli-Vieira E., Paleari A.G., Cerri P.S. & Klüppel, L.E. 2009. Avaliação histológica de agentes hemostáticos implantados em mandíbulas de coelhos. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-maxilo-fac.* 9 (2): 97-106.
- Huang G.T., Gronthos S. & Shi S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 88 (9): 792–806.
- Jackson D.W., Lalor P.A., Aberman H.M. & Simon T.M. 2001. Spontaneous repair of fullthickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J. Bone Joint Surg Am.* 83 (1): 53-64.
- Jaime A.P.G., Anbinder A.L., Lima A.P., Prado F. A., Balducci I. & Rocha R.F. 2005. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. *Ciênc. Odontol. Bras.* 8 (2): 70-79.
- Júnior, O.V.L. & Inácio A.M. 2013. Uso de glucosamina e condroitina no tratamento da osteoartrose: uma revisão da literatura. *Rev. Bras. de Ortopedia.* 48 (4): 300-306.
- Krenger W., Hill G.R. & Ferrara J.L.M. 1997. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease1. *Transplant.* 64 (4): 553-558.
- Larocca T.F., Souza B.S.F., Silva C.A., Kaneto C.M., Alcantara A.C., Azevedo C.M., Castro M.F., Macambira S.G., Soares M.B.P & Ribeiro-Dos-Santos R. 2013. Transplante de

células mesenquimais de tecido adiposo na cardiopatia chagásica crônica experimental. *Arq. Bras. Cardiol.* 100 (5): 460-468.

Lenza M., Ferraz S.B., Viola D.C.M., Santos O.F.P., Neto M.C. & Ferretti M. 2013. Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. *Rev. Einstein.* 11 (1):122-127.

Li J.H., Liu D.Y., Zhang F.M., Wang F., Zhang W.K. & Zhang Z.T. 2011. Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chin. Med. J.* 124 (23): 4022-8.

Lubowitz J. H. & Poehling G. G. 2010. Shoulder, hip, knee, and PRP. *Arthroscopy: The Journ. Arthroscopic & Related Surgery.* 26 (2): 141-142.

Maraldi T., Riccio M., Pisciotta A., Zavatti M., Carnevale G. & Beretti F. 2013. Human amniotic fluid-derived and dental pulp derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. *Stem Cell Res. Ther.* 4:53.

Monteiro B.S., Argôlo Neto N.M. & Del Carlo R.J. 2008 Terapia celular em reparação óssea—aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. *Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária.* Recife.

Monteiro B.S., Del Carlo R.J., Argôlo Neto N.M., Nardi N.B., Carvalho P.H., Bonfá L.P., Chagastelles P.C., Moreira H.N., Vitoria M.I.V. & Santos B.S. 2012. Association of mesenchymal stem cells with platelet rich plasma on the repair of critical calvarial defects in mice. *Acta Cir. Bras.* 27(3): 201-209.

Morad G. Kheiri L. & Khojasteh A. 2013. Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: A systematic review of literature. *Arch. Oral Biol.* 58 (12): 1818-1827.

Morito A., Kida Y., Suzuki K., Inoue K., Kuroda N. & Gomi K. 2009. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Arch. Histol. Cytol.* 72 (1): 51-64.

Moshiri A. & Oryan A. 2013. Role of platelet rich plasma in soft and hard connective tissue healing: an evidence based review from basic to clinical application. *Hard Tissue.* 2 (1): 6.

Oliveira G.K., Raiser A.G., Olsson D., Pippi N.L., Tognoli G.K, Trindade L.B., Santos Júnior E.B., Dezengrine R., Martins D.B., Salbego F.Z., Rappeti J. & Sausen L. 2010. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. *Arq. Bras. Medic. Veter. Zootec.* 62 (1): 72-79.

Oliveira P.G.G., Carvalho A.M., Yamada A.I.M., Maia L., Freitas N.P.P., Watanabe M.J., Landim-Alvarenga F.C. & Alves A.I.G. 2014. Avaliação da migração das células progenitoras após terapia da tendinite equina. *Arq. Bras. Medic. Veter. Zootec.* 66 (4): 1033-1038.

Pittenger M.F., Mackay A.M. & Beck S.C. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Sci.* 284: 143-147.

Ribeiro J.L., Camanho G.L. & Takita L.C. 2004. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. *Acta Ortop. Bras.* 12 (1): 16-21.

Rocha A.L., Shirasu B.K., Hayacibara R.M., Magro-Filho O., Zanoni J.N. & Araújo M.G. 2012. Clinical and histological evaluation of subepithelial connective tissue after collagen sponge implantation in the human palate. *Journ. Periodontal Res.* 47 (6): 758-765.

Saw K.Y., Hussin P., Loke S.C., Azam M., Chen H.C. & Tay Y.G. 2009. Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic acid: an experimental study in a goat model. *Arthroscopy.* 25 (12): 1391-400.

Sicca C.M., Corotti M.V., Sgarbosa S.H.P.V., Cestari T.M., Cavalcanti, M.G.P., Ferreira, P.M., Taga R. & Granjeiro J.M. 2008. Comparative histomorphometric and tomographic analysis of maxillary sinus floor augmentation in rabbits using autografts and xenografts. *Journ. Biom. Materials Res. Part B: Applied Biomaterials.* 86 (1): 188-196.

Soares D.S., Freitas K., Barbosa G.M. & Araújo M.C.S. 2007. Doença enxerto contra hospedeiro: relato de caso. *Disciplinarum Scientia.* 8 (1): 91-113.

Souza C.F., Napoli P., Han S.W., Lima V.C. & Carvalho A.C.C. 2010. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? *Rev. Bras. Cardiol.* 18 (3): 344-353.

Souza, B.S.F. 2012. Terapia com células da medula óssea em modelo experimental de insuficiência hepática aguda induzida por acetaminofen. Tese de Doutorado. Disponível em <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7642>. Acesso em 02 fev. 2017.

Takamori, E.R. 2008. Avaliação de matrizes tridimensionais colagênicas como carreadores celulares para a bioengenharia óssea. Tese de Doutorado. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25142/tde-16102008-105103/en.php>. Acesso em 02 fev. 2017.

Tanya J.L., Ashwanth R., Robert T.B., Pieter A.J.B., Clodagh K., John P.G. & Fergal J.O'B. 2016. Cell-free multi-layered collagen-based scaffolds demonstrate layer specific regeneration of functional osteochondral tissue in caprine joints. *Biomaterials.* 87: 69-81.

Yamada A.L.M., Alvarenga M.L., Brandão J.S., Watanabe M.J., Rodrigues C.A., Hussni C.A. & Alves A.L. 2016. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino. *Pesq. Vet. Bras.* 36 (6): 461-467.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que CTM e PRP em concentrações de  $10^6$  células/mL não induziram degeneração, necrose ou resposta inflamatória, com evidência histopatológica, nas falhas osteocondrais tratadas. Tal resultado contribui para ampliar o cenário de possibilidades de pesquisa com CTM em modelos animais, utilizando amostras xenogênicas. Os resultados obtidos representam dados pontuais para o modelo adotado, não devendo ser utilizado como inferências abrangentes, mas contribuem para corroborar, clinicamente, a ação imunossupressora das CTM.

O PRP induziu formação de tecido fibrocartilaginoso nas falhas tratadas, o que poderia interferir negativamente com a função articular, ao contrário do tratamento com CTM que induziu formação de cartilagem hialina.

O desenvolvimento do presente estudo propiciou maior compreensão da utilização clínica das CTM na terapia celular em medicina veterinária.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Paulo Cezar Vidal Carneiro de; *et al.* Estudo comparativo macroscópico dos defeitos osteocondrais produzidos em fêmures de coelhos preenchidos com gel de biopolímero da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 5, p. 577-84, 2011.
- ARGÔLO NETO, Napoleão Martins; *et al.* Role of the autologous mesenchymal stem cells compared with platelet rich plasma on cicatrization of cutaneous wounds in diabetic mice. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 617-624, 2016.
- BAI, Meng-Yi; *et al.* Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. **Clinics**, v. 72, n. 2, p. 116-124, 2017.
- BARRETO, Sara; *et al.* Identification of the mechanisms by which age alters the mechanosensitivity of mesenchymal stromal cells on substrates of differing stiffness: Implications for osteogenesis and angiogenesis. **Acta Biomaterialia**, p.1-23, 2017.
- BARRY, Frank P.; MURPHY, J. Mary. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.36, n.4, p.568-584, 2004.
- BERENGUEL, Igor Alexander. **Implantes das esponjas hemostáticas Gelfoam e Hemospon em alvéolos dentais em ratos após exodontia. Estudo histológico e histométrico comparativo**. Marília, São Paulo: 2006, 108p. (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica, Faculdade De Odontologia De Marília.
- BOELONI, J. N.; *et al.* Dose-dependent effects of bone marrow mesenchymal stem cells in female rats. **Hormone Research**, v. 72, n. 2, p. 88-97, 2009.
- BRUDER, Scott P.; *et al.* Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n. 355, p. 247- 256, 1998.
- CARNEIRO, Márcio de Oliveira; *et al.* Platelet-rich plasma gel promotes regeneration of articular cartilage in knees of sheeps. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80-86, 2013.

CARVALHO, Yulla Klinger Pereira; *et al.* Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 590-598, 2015.

COSTA, Clautina Ribeiro. M.; *et al.* Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, p. 1-8, 2016.

CSAKI, C.; *et al.* Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 128, n. 6, p. 507-520, 2007.

MEIRELLES, L.S.; BELLAGAMBA B.C.; CAMASSOLA M.; NARDI N.B. Mesenchymal stem cells and their relationship to pericytes. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 21, n.1, p. 130-156, 2016.

DOUAT, Estela Sant'ana Vieira. **Estudo comparativo do efeito do ultra-som terapêutico de 1 MHz com frequência de repetição de pulso a 100 Hz e 16 Hz no reparo de osteotomia por escareação em tibia de rato**. 2004. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

FERNANDO, Aldo José; *et al.* O uso da matriz óssea desmineralizada na reparação de lesões osteocondrais. estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 27-38, 2001.

FILHO, Saulo Tadeu Lemos Pinto; *et al.* Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 49-59, 2013.

GOLDBERG, Andy; *et al.* The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 12, n. 1, p. 1-30, 2017.

GOTE, S. V; *et al.* Correction of chronic liver failure by transplantation of liver cells suspension and cell-engineering designs (experimental investigation). **Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk**, n. 4, p. 44-51, 2013.

HETTE, Khadije. **Ovinos como modelo experimental: Estudo do joelho e mensuração dos ângulos tibiais**. Botucatu, São Paulo: 2008, 66p. (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

JAIME, Ana Paula Gumieiro; *et al.* Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 70-79, 2005.

JESUS, Alan Araújo de; *et al.* Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 16, n. 6, p. 111-8, 2011.

JOSHI JUBERT, Nayana; *et al.* Platelet-rich plasma injections for advanced knee osteoarthritis: a prospective, randomized, double-blinded clinical trial. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2017.

KAM, Zacaron; *et al.* Nível de atividade física, dor e edema e suas relações com a disfunção muscular do joelho de idosos com osteoartrite. **Revista Brasileira De Fisioterapia**, v. 10, n.3, p. 279-284, 2006.

KANG, Ee-Seul; *et al.* Guiding osteogenesis of mesenchymal stem cells using carbon-based nanomaterials. **Nano Convergence**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2017.

KRAMPERA, Mauro; *et al.* Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. **Blood Transfusion**. v. 5, n. 3, p. 120–129, 2007.

LENZA, Mário; *et al.* Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos. **Revista Einstein**, v. 11, n. 4, 2013.

LEVINGSTONE, Tanya J.; *et al.* Cell-free multi-layered collagen-based scaffolds demonstrate layer specific regeneration of functional osteochondral tissue in caprine joints. **Biomaterials**, v. 87, p. 69-81, 2016.

LIU, Shuyun; *et al.* Repair of osteochondral defects using human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. **BioMed Research Internationa**, p. 1-12, 2017.

- LUBOWITZ, James H.; POEHLING, Gary G. Shoulder, hip, knee, and PRP. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 26, n. 2, p. 141-142, 2010.
- MAIA, Leandro; SOUZA, Maria Verônica. Components rich in platelets used in wound healing tendon, ligaments and osteo-articular diseases of animals. **Ciência Rural**. v.39, n.4, p. 1279-1286, 2009.
- MATSIKO, Amos; *et al.* Advanced strategies for articular cartilage defect repair. **Materials**, v. 6, n. 2, p. 637-668, 2013.
- MONTEIRO, B. G.; *et al.* Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. **Cell proliferation**, v. 42, n. 5, p. 587-594, 2009.
- NOLAN, Katherine; *et al.* Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. **Cell Transplant**, v. 16, n. 3, p. 241-243, 2008.
- OLIVEIRA, G. K.; *et al.* Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.72-79, 2010.
- OLIVEIRA, P. G. G.; *et al.* Avaliação da migração das células progenitoras após terapia da tendinite equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.4, p. 1033-1038, 2014.
- QIAO, Jing; AN, Na; OUYANG, Xiangying. Quantification of growth factors in different platelet concentrates. **Platelets**, p. 1-5, 2017.
- RIBEIRO, José Leão; *et al.* Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 16-21, 2004.
- ROCHA JUNIOR, Sérgio S.; *et al.* Macroscopic and histological evaluations of equine joint cartilage repair treated with microperforation of the subchondral bone associated or not with intra-articular kartogenin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 272-278, 2016.
- ROCHA, A. L.; *et al.* Clinical and histological evaluation of subepithelial connective tissue after collagen sponge implantation in the human palate. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 6, p. 758-765, 2012.
- RUBESSA, Marcello; *et al.* Use of pig as a model for mesenchymal stem cell therapies for bone regeneration. **Animal Biotechnology**, p. 1-13, 2017.

SOUZA, Cristiano Freitas; *et al.* Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 18, n.3, p. 344-353, 2010.

SHIRJANG, Solmaz; *et al.* Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: an up-to-date review. **Cellular Immunology**, 2016.

SHOU, Kangquan; *et al.* Enhancement of bone marrow-derived mesenchymal stem cell angiogenic capacity by NPWT for a combinatorial therapy to promote wound healing with large defect. **BioMed Research International**, p. 1-13, 2017.

WILSON, Elisabete Mitiko Kobaiashi; *et al.* Bone healing stimulation by platelet-rich autogenous plasma: an experimental study in rabbits. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 14, n. 4, p. 208-212, 2006.

## APÊNDICE

### Artigos publicados em 2016

Napoleão M. Argôlo Neto, Matheus L.T. Feitosa, Simony S. Sousa, Pablo B. Fernandes, Gérson T. Pessoa, Dayseanny O. Bezerra, Hatawa M. Almeida, Yulla K.P. Carvalho, Andressa R. Rocha, **Laís M.C. Silva** & Maria A.M. Carvalho. Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Scientiae Veterinariae*, v.44, p. 1-11, 2016.

Napoleão M. Argôlo Neto, Ricardo J. Del Carlo, Betânia S. Monteiro, Nance B. Nardi, Pedro C. Chagastelles, Ana Flora S. Brito, Amanda M.S. Reis, **Laís M.C. Silva**. Role of the autologous mesenchymal stem cells compared with platelet rich plasma on cicatrization of cutaneous wounds in diabetic mice. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, p. 617-624, 2016.

Clautina R.M. Costa, Matheus L.T. Feitosa, Dayseanny O. Bezerra, Yulla K.P. Carvalho, Rodrigo F.G. Olivindo, Pablo B. Fernando, Gustavo C. Silva, Mirna L.G. Silva, Carlos E. Ambrósio, Airton M. Conde Júnior, Napoleão M. Argôlo Neto, **Laís M. C. Silva**, Maria A.M. Carvalho. Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, p. 1-8, 2016.

