

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

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

**Benito Juarez Nunes Alves de Oliveira
Médico Veterinário**

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL

2008

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

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

Benito Juarez Nunes Alves de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Duvaldo Eurides

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária - UFU, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Ciências Veterinárias.

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- O48e Oliveira, Benito Juarez Nunes Alves de, 1966-
Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos / Benito Juarez Nunes Alves de Oliveira. - 2008.
53 f. : il.
Orientador: Duvaldo Eurides.
Co-orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Cirurgia veterinária - Teses. I. Eurides, Duvaldo. II. Beletti, Marcelo Emílio. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619:617

EPÍGRAFE

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

DEDICATÓRIA

*Aos meus avós **Altamiro Oliveira e Maria Itália Freddo** (in memorian) que ao lado de **Deus**, me enviam a bênção dos céus.*

*À minha mãe **Luris**, meu anjo protetor e inspiradora. Nos momentos mais difíceis sempre foi o meu suporte. Minha vitória é dedicada principalmente a você, pois sou reflexo da sua persistência, dedicação e compaixão. Eu te amo!!!*

*Ao meu pai **Clóvis** que sempre acreditou na capacidade de seus filhos, tornando-nos fortes para enfrentar o mundo.*

*As minhas irmãs **Andrea, Anai e Lílian** que mesmo distantes estiveram tão próximas, transmitindo sempre seus bons ensinamentos. Amo vocês manas!*

*A minha namorada **Carol**, companheira de todas as horas, pelo incentivo, carinho, compreensão e, principalmente, seu amor. Obrigado paixão!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me permitir viver e continuar batalhando pelos meus objetivos. “Quem acredita Nele, tudo acontece”.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Duvaldo Eurides**, que além de um grande amigo, foi como um pai, sempre nos direcionando a tomar as melhores decisões, tornando-nos vitoriosos, á sua semelhança.

Ao amigo de profissão e de vida **Luiz Augusto de Souza**, o “doido”. Sempre prestativo e guerreiro, é um belo exemplo de que a parceria entre pessoas que querem chegar ao topo é possível. Valeu gambá, obrigado por tudo e pela amizade!!! É nós no doutorado.

A **Prof^a. Dr^a. Deise Aparecida de Oliveira Silva** e a doutoranda **Ana Cláudia Pajuaba**, do Instituto de Ciências Biomédicas, pela paciência e ensinamentos no isolamento das células. Muito obrigado!

Ao co-orientador **Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti** pelo auxílio e presença fundamental no desenvolvimento do projeto.

Ao **Prof. Dr. Carlos Gomes Ferreira**. Seu conhecimento transmitido na área de neurologia e ortopedia contribuiu e muito para minha vida.

Aos amigos de projeto **Ana Flávia, Evelyn, Lorena, Matheus e Roberta**, pelos cuidados com os coelhos e pela amizade demonstrada.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Hospital Veterinário: **Amado, João Batista, Zé Maria, Rondino, Antônio, Beth, Marquinhos, Adélia, Helena**.

A **CAPES** e **CNPq** por contribuírem financeiramente com a bolsa de mestrado e com o fomento do projeto.

Ao **Laboratório Vallée** de Uberlândia pela doação dos coelhos do experimento.

E aos **nossos coelhos**, que involuntariamente contribuíram para o desenvolvimento da ciência.

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	2
II.a. Células-tronco mesenquimais na reparação óssea e cartilaginosa..	2
II.b. Proteínas morfogenéticas ósseas	6
II.c. Enxertos osteocondrais alógenos	8
III. MATERIAL E MÉTODOS	10
III.a. Obtenção e conservação dos enxertos alógenos	10
III.b. Animais	10
III.c. Grupos experimentais	11
III.d. Pré-operatório	11
III.e. Coleta da amostra da medula óssea	12
III.f. Isolamento, rendimento e viabilidade das células mononucleares	12
III.g. Diluição do sedimento celular inoculado	14
III.h. Processamento da proteína morfogenética óssea (rhBMP-2)	14
III.i. Procedimento cirúrgico	15
III.j. Pós-operatório	17
III.k. Avaliação do rendimento e viabilidade celular	17
III.l. Avaliação macroscópica	17
III.m. Avaliação microscópica	18

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
V. CONCLUSÕES	35
VI. REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE	52
A. Fontes de aquisição dos materiais da pesquisa	52

ABREVIATURAS

CTM – células-tronco mesenquimais

CFU-F – Unidades formadoras de colônias fibroblásticas

BMPs – proteínas morfogenéticas ósseas

BMP – proteína morfogenética óssea

TGF- β – fatores de crescimento de transformação beta

rhBMP-2 – proteína morfogenética óssea recombinante humana dois

CEUA – Comitê de Ética de Utilização de Animais

GL – Gay-Lussac

G – Gauge

UI/mL – Unidades internacionais por mililitro

v/v – volume a volume

DPBS – solução salina tamponada de Dulbecco

g – força gravitacional

M – Molar

pH – potencial hidrogeniônico

DMEM – meio de cultivo modificado de Dulbecco

mM – milimolar

HE – hematoxilina-eosina

TM – tricômio de Mallory

PO – pós-operatório

MO – medula óssea

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Coleta de amostra da medula óssea do úmero de coelhos (A) . Inserção da agulha de Rosenthal no tubérculo umeral e em (B) , aspiração de 2,0 mL de medula óssea.....	12
FIGURA 2. Remoção de um segmento osteocondral no sulco troclear femoral de coelho. Luxação medial da patela para exposição do sulco troclear (A) . Mensuração com paquímetro de uma área de 0,4 x 1,0 cm (B) , demarcada com lâmina de bisturi (C, D) . Retirada do fragmento ósseo com disco de diamante, até a exposição do osso subcondral (E) e extraído por dissecação com bisturi (F)	16
FIGURA 3. (A). Amostra de aspirado de medula óssea de coelho após separação por gradiente de densidade Ficoll-paque. Nota-se o anel celular (seta azul) situado entre o plasma (a) e o gradiente (b) e sedimento de eritrócitos e polimorfonucleares (c) . (B). Identificação da viabilidade de células mononucleares da medula óssea em câmara de Neubauer. Células viáveis (setas verdes) e inviáveis com citoplasma corado com azul de tripan (seta amarela).....	20
FIGURA 4. Aspecto do sulco troclear de coelhos do grupo controle. (A). As áreas circundadas em verde representam o crescimento de tecido esbranquiçado, localizados sob o implante alógeno (GI-45). (B). Deposição tecidual recobrimdo a borda caudo-ventral do implante (seta azul) e sob as bordas trocleares (setas amarelas), (GI-90)	24
FIGURA 5. Aspecto do sulco troclear de coelhos do grupo tratado com células mononucleares da MO e rhBMP-2. (A). Notar aos 45 dias de PO, formação de tecido esbranquiçado entre as bordas do implante (IM) e do leito receptor (setas azuis) e em (B) a mesma alteração foi constatada aos 90 dias (setas verdes). Notar, em ambas as imagens, a ausência da formação de osteófitos marginais.....	26

- FIGURA 6.** Fotomicrografia do implante osteocondral de coelho do GI-45 dias PO. Processo de reabsorção do implante alógeno, sendo substituído por tecido conjuntivo fibroso (seta). TM. (Barra = 100µm)..... 27
- FIGURA 7.** Fotomicrografia da área de transição entre o implante (IM) e o leito receptor de coelho (LR) de um coelho do GI-45 dias PO. Observar a intensa formação de tecido conjuntivo fibroso (TF) com lacunas subcondrais. HE. (Barra = 200µm)..... 29
- FIGURA 8.** Fotomicrografia da área de transição em um coelho do GI-90 dias PO. Proliferação da cartilagem do leito receptor (LR) sob o implante alógeno (IM), com ampla densidade óssea subcondral.TM. No aumento da área, observar redução do número de condrócitos da cartilagem do implante. HE. (Barra: 100µm)..... 30
- FIGURA 9.** Fotomicrografia da área de transição em um animal do GI-90 dias PO. Formação de fibrocartilagem (FC) separando o implante alógeno (IM) do leito receptor (LR). No aumento, observar a fibrocartilagem em fase de união à cartilagem hialina do leito receptor. HE. (Barra: 100µm)..... 30
- FIGURA 10.** Fotomicrografia da área de transição de um coelho do GII-45 dias PO. Observar a ausência de formação de tecido reparador entre o leito receptor (LR) e o implante (IM), o qual apresentava leve depressão. HE. (Barra: 200µm).. 32
- FIGURA 11.** Fotomicrografias do implante alógeno (IM), demonstrando crescimento de cartilagem hialina (CH) em coelhos do GII-45, ultrapassando os limites da superfície da cartilagem **(A)**. Formação cartilaginosa exacerbada na área de transição com o osso subcondral. HE. (Barra = 200 µm). **(B)**. Área preenchida por cartilagem de formato irregular e descontinuidade do implante com o leito receptor (LR). TM. (Barra = 100µm)..... 34
- FIGURA 12.** Fotomicrografias da área de transição cartilaginosa de coelhos do grupo tratado (GII). **(A)**. Animal do GII-45 dias PO. Notar a presença de condrócitos na cartilagem do implante (setas azuis) e proliferação em direção ao leito receptor (colchetes). HE. (Barra = 200µm). **(B)**. Animal do GII-90 dias PO. A área em vermelho na cartilagem indica processo de ossificação (seta amarela). TM. (Barra = 100µm)..... 35

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Resultados individuais de rendimento e viabilidade de células mononucleares isoladas da medula óssea dos coelhos do grupo tratado (GII).....	20
TABELA 2. Representação do número de animais do GI e GII e seus subgrupos, conforme o aspecto do tecido predominante na zona de transição cartilaginosa do implante-leito receptor.....	33

LISTA DE GRÁFICOS**Página**

GRÁFICO 1. Rendimento (vermelho) e viabilidade (verde) de células mononucleares da medula óssea dos coelhos do GII (n = 12) isoladas por gradiente de densidade Ficoll-paque (1,077 g/mL) a partir de um volume de 2,0 mL de aspirados de medula óssea. As barras sobre os retângulos indicam os valores máximos obtidos.....	21
--	----

**ENXERTO OSTEOCONDRAIS ALÓGENO, ASSOCIADO À INOCULAÇÃO DE
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA E PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSSEA NO REPARO DO
SULCO TROCLEAR DE COELHOS**

RESUMO

Vinte e quatro coelhos da raça Nova Zelândia, adultos, machos foram separados em dois grupos de igual número (GI - controle e GII - tratado), e subdivididos em GI-45, GI-90, GII-45 E GII-90. Os animais do GI e GII foram submetidos ao enxerto osteocondral alógeno do sulco troclear, preservado em glicerina a 98%. Os do grupo tratado receberam injeção intra-articular contendo 2×10^6 células mononucleares e 1 μg de proteína morfogenética óssea recobinante humana 2 (rhBMP-2). O isolamento das células foi realizado com gradiente de densidade ficoll-paque com rendimento médio de $6,25 \times 10^6$ células/mL e a viabilidade média de 93,56%. Evidenciou-se, em ambos os grupos, osteófitos periarticulares e tecido esbranquiçado sob o implante. A osteointegração do enxerto foi observada em dez animais do GII (83,33%), e três no GI (33,33%). Os coelhos do GII-45 dias de PO apresentaram melhores resultados quanto à formação de cartilagem hialina entre o implante e o leito receptor, porém de formato irregular. A inoculação de células mononucleares da medula óssea de coelhos em associação a rhBMP-2, estimulou a osteointegração do enxerto osteocondral alógeno, porém, a regeneração da cartilagem não foi completa.

Palavras-chave: osso, rhBMP-2, isolamento, medula óssea

**OSTEOCHONDRAL ALLOGRAFT ASSOCIATED WITH BONE MARROW
MONONUCLEAR CELLS AND BONE MORPHOGENETIC PROTEIN
TRANSPLANTATION IN THE REPAIR OF
TROCHLEAR GROOVE IN RABBITS**

ABSTRACT

Twenty-four adult, male New Zealand rabbits were separated in two groups of equal number (GI – control and GII – treated), and subdivided in GI-45, GI-90, GII-45 E GII-90. The animals of GI and GII were submitted to the osteochondral allograft of the trochlear groove preserved in 98% glycerin. The treated group received an intra-articular injection with 2×10^6 mononuclear cells and $1 \mu\text{g}$ of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). The cells isolation went through with ficoll-paque gradient density, with the mean yield of $6,25 \times 10^6$ cells/mL and 93,56% cellular viability. Was displayed in both groups periarticular osteophytes and white tissue covered the implant. The graft osteointegration was seen in ten rabbits of GI (83,33%) and three of GII (33,33%). The GII-45 rabbits showed better results in the formation of hyaline cartilage between the implant and the donor site, however, with irregular shape. The inoculation of bone marrow mononuclear cells of rabbits associated with rhBMP-2 promote the osteointegration of osteochondral allograft, however, the regeneration of cartilage was incompletely.

Key words: bone, rhBMP-2, isolation, bone marrow

I. INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais da medula óssea têm a capacidade de renovação e diferenciação em várias linhagens de tecidos como conjuntivo, ósseo, cartilaginoso, adiposo, tendinoso e muscular (CAMPAGNOLI et al., 2001). Demonstra ser uma atrativa fonte celular para reparação tecidual, devido à facilidade de isolamento e expansão de aspirados de medula óssea em adultos, além da versatilidade na diferenciação pluripotente em tecidos mesenquimais (MAUNEY, VOLLOCH, KAPLAN, 2005).

Os aspirados da medula contêm células mesenquimais e células diferenciadas em linhagens condrogênicas e osteogênicas, bem como algumas proteínas bioativas que estimulam a regeneração óssea (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006). As células mesenquimais têm sido isoladas da medula óssea de roedores (FRIEDENSTEIN et al., 1974; SIMMONS et al., 1991, BITTENCOURT et al., 2006), humanos (PITTENGER et al., 1999), gatos (MARTIN et al., 2002), cães (HUSS, HOY, DEEG, 1995) e suínos (RINGE et al., 2002).

Muitas abordagens experimentais vêm sendo realizadas na tentativa de elucidar a formação e reparação óssea em defeitos osteocondrais. Essas incluem a utilização de esqueletos de matriz extracelular osteocondutiva e a implantação de proteínas morfogenéticas ósseas em diferentes matrizes (BRUDER et al., 1998).

Estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que a proteína morfogenética óssea 2 (rhBMP-2) pode ser utilizada como fator estimulante em várias intervenções terapêuticas, como em defeitos ósseos amplos, não-união de fraturas, fusões vertebrais, osteoporose e cirurgias do canal vertebral (CHEN, ZHAO, MUNDY, 2004).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a eficácia do reparo ósseo e cartilaginoso do sulco troclear de coelhos, submetidos à implantação de enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98%, em associação à inoculação de células mononucleares autógenas isoladas da medula óssea e rhBMP-2.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.a. Células-tronco mesenquimais na reparação óssea e cartilaginosa

A medula óssea é um tecido complexo que se divide em dois sistemas troncos distintos, o hematopoiético e o mesenquimal (SHORT et al., 2003). No interior do estroma medular, existe uma rede organizada de células mesenquimais e matriz extracelular, as quais fornecem suporte estrutural e funcional para a hematopoiese (HANADA, DENNIS, CAPLAN, 1997).

As células derivadas da medula óssea são conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTM), (CAPLAN, 1991) devido a sua alta capacidade de replicação e diferenciação em diversas linhagens celulares, como osteogênica, condrogênica, adipogênica, tenogênica e miogênica (BRUDER et al., 1998). Estas células progenitoras apresentam capacidade de auto-renovação e diferenciação em um ou mais tipos celulares especializados (BIANCO, ROBEY, 2001), sendo atribuída a elas uma atividade multipotencial (JIANG et al., 2002).

Culturas de células progenitoras mesenquimais da medula óssea se apresentam em camada única de células fibroblásticas, e são derivadas de células clonogênicas individuais, designadas unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F), (PITTENGER et al., 1999). As CFU-F da medula óssea além de possuírem aparência fibroblástica, apresentam nucléolos proeminentes e característicos e estão em uma frequência estimada de uma célula para cada 10^4 - 10^5 células mononucleares (JONES et al., 2002).

Distinção deve ser feita entre as células-tronco dos muitos tipos de progenitores, de forma que as primeiras se auto-renovam por toda a existência de um organismo, enquanto que as progenitoras possuem auto-renovação e potencialidade limitadas (SCHWINDT, BARNABÉ, MELLO, 2005).

Células com potencial osteoblástico têm sido isoladas de uma variedade de espécies, incluindo humanos (PITTENGER et al., 1999), ratos (NISHIMORI et al., 2006), coelhos (IM et al., 2001; YANAI et al., 2005) e cães (BRUDER et al., 1998). Friedenstein, Piatetzky-Shapiro, Petrakova (1966), inicialmente, desenvolveram os primeiros trabalhos de caracterização “*in vitro*” e “*in vivo*” das células mesenquimais

da medula óssea. Subsequentemente, outros pesquisadores estabeleceram e aprimoraram os protocolos de isolamento e caracterização dessas células. (PHINNEY, PROCKOP, 2007). Os aspirados de medula óssea foram considerados por serem mais acessíveis e proporcionarem fontes ricas em CTM. Atualmente, essas células vêm sendo isoladas de vários locais, incluindo cartilagem, periósteo, líquido sinovial, músculos, tendões, tecidos fetais, placenta, vasos e sangue umbilical (HU et al., 2003).

Um dos princípios utilizados para terapia óssea é baseado na grande quantidade de células-tronco obtidas de aspirados, para que esse concentrado provoque efeitos terapêuticos benéficos, sem necessitar de cultura celular (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006). Em contrapartida, a quantidade de CTM representa uma fração pequena, em torno de 0,001% a 0,01% da população total das células mononucleares da medula (PITTENGER et al., 1999). Apesar do número dessas células serem limitadas na medula óssea, a proliferação e expansão das mesmas, sob condições adequadas, são facilmente obtidas “*in vitro*” (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006). As técnicas de isolamento geralmente são baseadas nas propriedades aderentes das CTM (CAPLAN, 1991), sendo a centrifugação por gradiente de densidade aplicada inicialmente para separar as células mononucleares (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006).

A habilidade da medula óssea em formar osso foi sugerida por Goujon, em meados de 1869. Estudos subsequentes com animais demonstraram que a medula óssea autóloga contém células progenitoras osteogênicas, os quais contribuem para a produção de osso (CONNOLLY et al., 1989) e cartilagem (TOH et al., 2005).

Segundo Bruder et al. (1998), para formação e reparo ósseo é requerido uma quantidade de CTM pluripotentes capazes de se diferenciar em osteoblastos e fatores de crescimento de diferenciação, que direcionam essas células a migrar para o defeito ósseo. Assim como uma matriz reabsorvível, ou um esqueleto, para auxiliar a fixação e migração dessas células e uma angiogênese, através da formação de uma rede vascular de suporte ao novo tecido ósseo formado. São etapas conhecidas como osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteopromoção, respectivamente (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006).

A capacidade de reparação da cartilagem articular é limitada e injúrias que não penetram no osso subcondral possuem difícil reparação. Geralmente progridem para a degeneração da superfície articular, apresentando uma resposta tecidual branda (WAKITANI et al., 1994). Lesões que penetram no osso subcondral sofrem reparação pela formação de tecido fibroso, fibrocartilaginoso, ou semelhante à cartilagem hialina, e dependem da espécie, da idade do animal e da localização e tamanho do defeito (SALTER et al., 1980). Entretanto, esses tecidos reparativos, até mesmo os semelhantes histologicamente à cartilagem hialina, diferem bioquímica e biomecanicamente da cartilagem normal, sendo encontradas extensas alterações degenerativas nesses defeitos (FURUKAWA et al., 1980). Essas lesões se apresentam com crescimento de tecido de granulação ativo e exuberante, de desenvolvimento rápido, dificultando a proliferação de tecido osteocartilaginoso (INOUE et al., 2002).

Experiências vêm sendo realizadas na tentativa de desenvolver procedimentos eficazes para reparação de defeitos osteocondrais em coelhos (WAKITANI et al., 1994; IM et al., 2001; YANAI et al., 2005), cães (BRUDER et al., 1998) e ratos (NISHIMORI et al., 2006). São métodos que estimulam a medula óssea do osso subcondral como a drilagem, abrasão e microfraturas (GOBBI, NUNAG, MALINOWSKI, 2005). A implantação de condrócitos autólogos ou mosaicoplastia osteocondral autóloga são realizadas na reparação de lesões condrais e osteocondrais (OCHI et al., 2001; OCHI et al., 2002). Porém, essas técnicas não são favoráveis em lesões osteocondrais mais extensas (NISHIMORI et al., 2006). Essas abordagens promovem a condrogênese pela indução e estimulação das CTM da medula óssea, provenientes do osso subcondral. Entretanto, têm-se observado a formação de tecido fibrocartilaginoso (FRISBIE et al., 1999).

Existem fatores que podem interferir nos procedimentos cirúrgicos de estimulação da medula óssea na reparação da cartilagem articular. Uma é a fragilidade dos tecidos reparados, que podem ser lesionados por sobrecarga em um estágio precoce, após microfraturas ou drilagem. Outra, é que o número de CTM da medula não é suficiente para reparar a lesão. A adição de culturas de CTM provenientes da medula pode acelerar a regeneração da cartilagem no defeito,

quanto comparado ao uso isolado dos procedimentos de estimulação (NISHIMORI et al., 2006).

Sabe-se que as células mesenquimais, quando transplantadas por via intravenosa, são capazes de migrar especificamente ao local de injúria (BARRY, MURPHY, 2004). A migração celular tem sido demonstrada em casos de fraturas ósseas, infarto do miocárdio (SHAKE et al., 2002) e isquemia cerebral (WANG et al., 2002). Quando as CTM são transferidas em suspensão através de injeção intra-articular no joelho, após lesões traumáticas, elas são capazes de reparar cartilagens e meniscos lesados (MURPHY et al., 2003).

Diversos biomateriais osteocondutivos fornecem estruturas para a migração e proliferação das células-tronco (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006). Estes materiais têm sido utilizados associados com CTM da medula óssea, como o gel de colágeno (WAKITANI et al., 1994; YANAI et al., 2004), implantes porosos de hidroxapatita e fosfato tricálcico (BRUDER et al., 1998), polímeros biodegradáveis como o ácido poliglicólico e poliláctico isolados (ISHAUG et al., 1997; FIALKOV et al., 2003) ou em associação com ácido hialurônico (FRENKEL et al., 2005).

Os polímeros geralmente apresentam formato tridimensional, oferecendo uma apropriada estrutura e características superficiais para adesão das CTM, osteoblastos, osteócitos, condroblastos e condrócitos (ISHAUG et al., 1997; BUCHOLZ, 2002), bem como porosidade interconectiva, que permite a proliferação celular e o crescimento vascular (ISHAUG et al., 1997). Ponticiello et al. (2000) demonstraram que esponjas de gelatina bioabsorvíveis preenchidas com CTM isoladas da medula óssea, quando implantadas em lesões osteocondrais do côndilo femoral medial de humanos, originaram células ósseas e cartilaginosas.

Defeitos ósseos são geralmente reparados com enxertos autógenos e alógenos. As CTM podem facilitar a osteogênese, as quais são coletadas do indivíduo e transplantadas, no intuito de preencher os defeitos existentes (POUNTOS, GIANNOUDIS, 2005). O uso de autoenxertos ósseos esponjosos possui limitações como a quantidade a ser obtida, maior tempo operatório e trauma adicional ao local doador. Quanto aos aloenxertos, ocorre o risco de transmissão de doenças, reações imunológicas e necessidade de manutenção de um banco de ossos (BURCHARDT, 1983; BOERO et al., 1989; KIRKER-HEAD, 1995).

II.b. Proteínas morfogenéticas ósseas

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são fatores de crescimento multifuncionais pertencentes à superfamília dos fatores de crescimento de transformação beta (TGF- β), (CHEN et al., 2004). Atualmente, 14 tipos de BMPs já foram identificadas (HE, 2002), entretanto, a BMP-2, BMP-4 e a BMP-7, também conhecidas como proteínas osteogênicas 1, vêm sendo utilizadas no reparo de defeitos ósseos (BALTZER et al., 2000). Essas estão envolvidas no processo de cura óssea, bem como no metabolismo da cartilagem em adultos (JORGENSEN et al., 2001).

Aspectos clínicos sobre a função moduladora dos membros da família dos TGF- β têm sido avaliados, como o ganho de tecido muscular para o tratamento da distrofia muscular, prevenção da perda de osso na osteoporose, estimulação da formação óssea em fraturas não consolidadas e na indução da formação de cartilagem em pacientes com artrite (ROELEN, DIJKE, 2003).

Uma variedade de funções têm sido designadas para as BMPs, dentre elas a formação de osso e cartilagem (CHEN et al., 2004), demonstrada com sucesso em modelos experimentais com ratos, coelhos, cães, ovelhas e primatas (MURAKAMI et al., 2002). Algumas delas, como as BMPs 2, 4 e 7 atuam na ausência de outras proteínas morfogenéticas (BOSTROM et al., 1996). Estão presentes na matriz óssea em pequenas quantidades e provavelmente agem em sinergismo. Ainda, a rhBMP-2 e a medula óssea quando combinadas com substâncias carreadoras inertes, é observado um efeito sinérgico direcionado a formação óssea.

A formação de novo osso se deve pelo recrutamento de CTM da medula óssea, induzidas por propriedades quimiotáticas da proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (rhBMP-2), que promovem a proliferação e diferenciação de osteócitos (ALDEN et al., 1999). Durante a formação óssea a BMP cria um ambiente adequado, que é conduzido ao desenvolvimento da medula óssea funcional (CHEN et al., 2004). Sabe-se que o microambiente no qual essas células serão transplantadas emite sinais endógenos que direcionam as células-tronco a se proliferar e diferenciar em linhagens fenotípicas específicas. Caso esse

microambiente não seja propício ao desenvolvimento celular, a terapia pode se tornar ineficaz (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006).

Foi sugerido por Lynch et al. (1991) que uma série de fatores, como quantidade da BMP administrada, o local da implantação, respostas das células no local do implante, vascularização e natureza do material carreador, seriam responsáveis pela determinação do tipo de ossificação. A rhBMP-2 pode regular marcadores fenotípicos de osteoblastos maduros, como a atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno e a expressão da osteocalcina. Em adição, aumentam a expressão de indicadores de osteoblastos em culturas de CTM pluripotentes, o que sugere que a rhBMP-2 regula o acesso de células indiferenciadas para as vias de diferenciação específicas (HANADA, DENNIS, CAPLAN, 1997).

Segundo Ghosh-Choudhury et al. (2001), a rhBMP-2 regula a expressão do RNA mensageiro da BMP-2 e da BMP-4 nas células osteoblásticas primárias, sugerindo que ela atua em fatores autócrinos e parácrinos durante a diferenciação de osteoblastos. A rhBMP-2 induz a síntese de matriz extracelular pelos condrócitos e, conseqüentemente o crescimento de cartilagem. Além disso, a administração da rhBMP-2 em articulações estimula a formação de colágeno tipo II e proteoglicanos pelas células cartilaginosas. Dependendo da dose, a síntese de proteoglicanos pode ser até três vezes maior que a quantidade fisiológica (JORGENSEN et al., 2001). Comparada com a TGF- β 1, a rhBMP-2 estimula a síntese de proteoglicanos com maior eficiência, mas seu efeito biológico é restrita ao tempo de aplicação (VAN BEUNINGEN et al., 2000). Quanto mais longa a interação das células mesenquimais com a rhBMP-2, mais extensa a quantidade de mineral depositado e melhor o conteúdo total de matriz mineral (PULEO, 1997).

O processo de reparação de tecido ósseo e cartilaginoso a partir de células indiferenciadas vem sendo intensamente pesquisado, principalmente com emprego de proteínas indutoras de tecido ósseo e outros fatores de crescimento, os quais poderão ainda ser associados aos enxertos ósseos através da administração local ou sistêmica (KIRKER-HEAD, 1995). Lesões causadas por trauma podem ser tratadas por transplante de cartilagem alógena ou implantação de condrócitos diferenciados no defeito cartilaginoso (JORGENSEN et al, 2001).

Para otimizar a osteoindução das BMPs, elas devem estar associadas a uma substância carreadora apropriada, a qual parece possuir efeito sobre a farmacocinética e ação destas proteínas (LINDHOLM, GAO, 1993). Muitos carreadores já foram testados experimentalmente, mas o material ideal para carrear as BMPs ainda não foi definido, dependendo provavelmente, da indicação clínica para o uso da proteína morfogenética a ser empregada (WOZNEY, ROSEN, 1998). Para o reparo de uma fratura, uma estrutura parecida com a do osso esponjoso com excelente propriedade osteocondutiva, pode ser desejável. Na reconstrução de um defeito ósseo de grande extensão, um material mais rígido deve ser preferido (KIRKER-HEAD, 1995).

Um carreador ideal deve aumentar a exposição dos tecidos do hospedeiro à substância de crescimento e assegurar uma distribuição uniforme, sem permitir que o material implantado ultrapasse os limites do leito. O carreador deve ser absorvido à medida que for ocorrendo à formação óssea. Além disso, deve ser seguro, biodegradável, biocompatível e formulado para permitir tamanhos e formas adequados para o enxerto (TORIUMI, ROBERTSON, 1993).

II.c. Enxertos osteocondrais alógenos

De maneira geral, o uso de tecidos biológicos tem por finalidade atuar como arcabouço para o desenvolvimento de novo tecido, restabelecendo a integridade do órgão afetado (DALECK, 1999). O baixo custo, a facilidade de obtenção, modelagem, esterilização e conservação têm sido citadas como principais vantagens (RABELO et al., 2002).

Os transplantes realizados entre indivíduos diferentes, porém da mesma espécie, são denominados de enxertos alógenos ou aloenxertos (PARKER, 1993). O principal impedimento para a realização das técnicas de enxertia são as respostas imunes que podem ocorrer pelo receptor. Os enxertos alógenos, todavia, envolvem diferença entre códigos genéticos do doador e do receptor, de forma que respostas imunes de reabsorção são esperadas (JANEWAY et al., 2002). Para o reparo de lesões osteocondrais, os enxertos de cartilagem hialina são teoricamente

alternativas atraentes, pois restabelecem a superfície articular normal e são relativamente resistentes a rejeição imunológica (LANE et al., 1977).

O principal objetivo esperado no uso dos enxertos ósseos é a capacidade de induzir seletivamente os eventos primordiais do processo de integração, ou seja, osteoindução, osteocondução e osteogênese (LINDHE, KARRING, LANG, 1997).

Segundo Thies et al. (1992), a osteointegração de enxertos acontece após uma seleção de células primordiais, que são diferenciadas em osteoblastos sob a influência de fatores osteogênicos. Para que haja a incorporação ao leito receptor, obrigatoriamente deve ocorrer a sua revascularização. Quando esse processo não ocorre, a área de reparo perde o equilíbrio na reabsorção e eventualmente o enxerto sofre fraturas por fadiga. Os enxertos esponjosos são consolidados mais rapidamente (TOMFORD, MANKIN, 1999).

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas no intuito de conservar os tecidos ósseos por longos períodos de tempo. Dentre estas, a conservação em glicerina tem se destacado por ser acessível economicamente e não empregar a autoclavagem ou o congelamento, técnicas que causam danos ao tecido ósseo e prejudicam a formação de calo ósseo no pós-cirúrgico (AMENDOLA, 2007). Além disso, não foi observada diferença considerável quanto ao crescimento de microorganismos na glicerina a 98% autoclavada e *in natura*, num período igual ou menor há 24 meses, tampouco rejeição do organismo ao meio conservante na evolução pós-operatória (ROE, PIJANOWSKI, JOHNSON, 1988).

A glicerina como meio conservante de tecidos biológicos atua na redução da antigenicidade e como agente anti-séptico (PINTO JÚNIOR, ALVARENGA, IWASAKI, 1996). Os ossos conservados em glicerina tornam-se mais frágeis e quebradiços, porém a diminuição da resistência é um problema encontrado em todos os métodos de conservação (COSTA, 1996). Apesar de promover a desidratação tecidual, mantém a integridade das células e a concentração iônica. Os tecidos biológicos devem ser conservados em glicerina por um período mínimo de 30 dias, e previamente hidratados durante 30 minutos (DALECK et al., 1992) antes da sua implantação.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.a. Obtenção e conservação dos enxertos alógenos

Foram utilizados 12 cadáveres de coelhos da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, adultos, com peso médio de 3,47kg, após serem abatidos na Escola Agrotécnica Federal de Uberlândia, Minas Gerais, fiscalizado pelo serviço de inspeção municipal.

As articulações fêmuro-tíbio-fíbulo-patelares direita e esquerda de cada animal foram coletadas, no intuito de se obter 24 amostras de enxertos em cunha do sulco troclear. A colheita se procedeu de forma limpa, através de tricotomia e anti-sepsia com iodo degermante da região. Após posicionamento do campo cirúrgico, foi realizada uma incisão parapatelar lateral na pele, divulsão do tecido subcutâneo e incisão no retináculo lateral e cápsula articular. A patela foi deslocada medialmente para exposição do sulco troclear. Utilizando um paquímetro graduado¹, mensurou-se uma área no sulco de 0,4 cm largura x 1,0 cm comprimento, sendo demarcadas com lâmina de bisturi nº 10².

Com um disco de diamante acoplado á uma perfuratriz elétrica³, foram delimitadas as bordas do enxerto em cunha, sendo posteriormente removidos por dissecação com lâmina de bisturi. Os enxertos, compostos de cartilagem articular e osso subcondral, foram higienizados repetidas vezes com solução fisiológica⁴ a 0,9% e armazenados em frascos plásticos contendo glicerina⁵ á 98%. As amostras permaneceram imersas no meio conservante por um período mínimo de 30 dias, a temperatura ambiente, até a sua utilização.

III.b. Animais

Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, adultos, com peso variando entre $3,06 \pm 0,24$ kg, provenientes do Laboratório Vallée de Uberlândia. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam ração comercial uma vez ao dia e água “*ad libitum*”. Posteriormente, foi administrado

ivermectina⁶ a 1% (0,1mg/kg, SC) em dose única, para combate de endo e ectoparasitas. Respeitou-se um período de 15 dias para adaptação dos animais ao ambiente e socialização com os pesquisadores. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 060/08.

III.c. Grupos Experimentais

Os coelhos foram separados aleatoriamente em dois grupos, ambos com doze animais. O grupo controle (GI), onde foram submetidos ao enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98%; e tratado (GII), ao enxerto alógeno conservado associado ao transplante de células mononucleares autógenas da medula óssea e proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (rhBMP-2). A articulação fêmuro-tíbio-fíbulo-patelar esquerda foi selecionada aleatoriamente para a realização dos procedimentos de enxertia e transplante. Os dois grupos foram subdivididos em GI-45, GI-90, GII-45 e GII-90, cada qual com seis animais, de acordo com os períodos pré-estipulados de avaliação pós-operatória (PO), macroscópica e histológica.

III.d. Pré-operatório

Os coelhos permaneceram em jejum hídrico e alimentar por um período de quatro a oito horas, respectivamente, e receberam como medicação anestésica a cetamina⁷ (30mg/kg, IM) e a xilazina⁸ (5mg/kg, IM). O mesmo protocolo foi realizado na coleta das amostras da medula óssea. Foram administrados o cloridrato de tramadol⁹ (2,0mg/kg, SC), o flunixin meglumine¹⁰ (1,0mg/kg, IM) e antibioticoterapia profilática com cefazolina sódica¹¹ (30mg/Kg, IM), 30 minutos antes do procedimento cirúrgico.

III.e. Coleta da amostra da medula óssea

A coleta da medula óssea foi realizada no mesmo animal submetido à inoculação das células, caracterizando um transplante autólogo. A pele da região da articulação escápulo-umeral foi submetida à tricotomia e anti-sepsia com iodo degermante¹² a 1%, álcool¹³ 70° GL e iodopovidona¹⁴ a 1%¹¹, para coleta da medula óssea do úmero. Uma agulha metálica¹⁵ de Rosenthal de 1,6 x 50 mm (16G) foi previamente heparinizada e introduzida através de movimentos rotacionais na epífise proximal do tubérculo umeral (Figura 1-A). Foram aspirados 2,0 mL de medula óssea com uma seringa de 10 mL contendo 0,1 mL de solução estéril heparinizada¹⁶ (5000 UI/mL) (Figura 1-B). As amostras da medula foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, para isolamento e determinação do rendimento e viabilidade das células mononucleares.

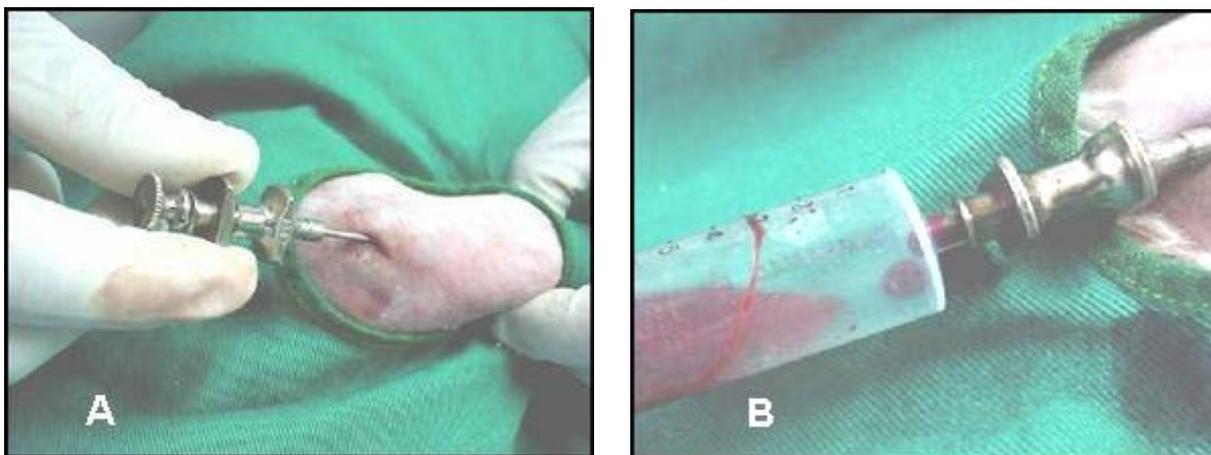


FIGURA 1. Coleta de amostra da medula óssea do úmero de coelhos (A). Inserção da agulha de Rosenthal no tubérculo umeral e em (B), aspiração de 2,0 mL de medula óssea.

III.f. Isolamento, rendimento e viabilidade das células mononucleares

A manipulação das células se procedeu em capela de fluxo laminar¹⁷, desinfetada freqüentemente com álcool 70° GL e luz germicida. Os aspirados de

medula óssea foram acondicionados individualmente em tubos Falcon¹⁸ de 15 mL e diluídos (v/v) em solução salina tamponada de Dulbecco¹⁹ (DPBS). A seguir, foram depositados lentamente sobre o gradiente de densidade para separação das células Ficoll-paque²⁰ na densidade 1,077g/mL, na proporção de 2:1, segundo a técnica de Boyüm (1968). Em centrífuga refrigerada²¹ realizou-se o processamento a 495 g durante 30 minutos a 15°C, separando as amostras em quatro porções. O plasma foi removido e o anel celular sobre a solução de Ficoll-paque foi coletado com pipeta Pasteur, e transferida para outro tubo de 15 mL. O sedimento celular foi lavado duas vezes com 10 mL de DPBS a 495 g durante 10 minutos a 4°C.

Após desprezar o sobrenadante, a suspensão celular foi tratada com 1,0 mL de tampão de lise de eritrócitos, contendo cloreto de amônio 0,16 M e tris base 0,17 M, com pH 7,6, durante cinco minutos à temperatura ambiente. Uma terceira lavagem foi realizada com a adição de 10 mL de DMEM²² (meio de cultivo modificado de Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino²³. A suspensão celular foi mantida em banho de gelo até a contagem e análise da viabilidade celular.

Adicionou-se ao sedimento celular a quantidade necessária do meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, até que a amostra atingisse o volume total de 500µl. Deste volume, uma alíquota de 10 µl da suspensão foi adicionada a 10 µl do corante azul de tripan²⁴, sendo homogeneizadas e transferidas para a câmara hemocitométrica de Neubauer²⁵. A contagem de células viáveis e não viáveis foi realizada sob microscopia de luz, e o cálculo do número de células por mililitro foi determinado pela fórmula: $V \times FN \times FT / \#Q$, onde V = número de células viáveis contadas; FN = fator da câmara (10^4); FT = fator de diluição do azul de tripan (2) e #Q = número de quadrantes da câmara utilizados para a contagem.

A viabilidade foi averiguada pela técnica de exclusão vital, das células não coradas por azul de tripan, como descrito por Fresney, (2001) e Bittencourt et al., (2006). A viabilidade celular foi determinada em porcentagem, aplicando-se a equação matemática $V = 100/NT$, onde NT = número total de células viáveis e não viáveis contadas na câmara.

III.g. Diluição do sedimento celular inoculado

Para padronizar a quantidade e o volume de células inoculadas, foi obtido o cálculo do fator de diluição de cada amostra, através da equação matemática $FD = QT / CT$, onde QT = quantidade de células viáveis presente em 500 μ l do sedimento celular; e CT = quantidade de células a serem transplantadas (2×10^6). O volume final foi calculado pela fórmula: $VF = VI / FD$, onde VI = volume inicial do inoculado (500 μ l); e FD = fator de diluição. Os volumes finais da fração de células mononucleares foram ajustados, sendo armazenados em tubos de Eppendorff²⁶ (solução 1) para posterior diluição em 1 μ g de rhBMP-2²⁷ (solução 2). Portanto, a fração celular contendo 2×10^6 células mononucleares diluídas em DMEM (solução 1) e em 1 μ g (10 μ l) de rhBMP-2 (solução 2) resultou na solução final a ser inoculada na articulação fêmuro-tíbio-fíbulo-patelar submetida ao procedimento cirúrgico.

III.h. Processamento da proteína morfogenética óssea (rhBMP-2)

O frasco contendo 10 μ g da rhBMP-2 liofilizada foi estocado em refrigerador a -20°C e, previamente a utilização, descongelado a temperatura ambiente por dez minutos. Para homogeneização foi centrifugado á 2000 rpm durante um minuto. Em seguida, realizou-se a diluição em 100 μ l de solução com ácido acético²⁸ a 20mM, ficando a uma concentração de 0,1 μ g/ μ l de rhBMP-2. Alíquotas de 10 μ l (1 μ g de rhBMP-2) foram acondicionadas em tubos de Eppendorff, sendo posteriormente congeladas a -20°C (solução 2). Essa solução, previamente á diluição com a fração celular (solução 1), foi novamente descongelada a temperatura ambiente durante dez minutos. A porção a ser inoculada foi aspirada em seringa de 1,0 mL e transportada em gelo até a sala de Cirurgia Experimental do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

III.i. Procedimento cirúrgico

Aproximadamente 20 minutos antes do término do isolamento das células mononucleares, iniciaram-se os preparativos para a intervenção cirúrgica de enxertia e transplante celular autógeno. Com o animal em decúbito dorsal, realizou-se uma incisão de pele de aproximadamente 4,0cm na região parapatelar lateral esquerda, seguida de divulsão do tecido subcutâneo e exérese do retináculo lateral. A cápsula articular foi incisada e a patela luxada medialmente para a exposição do sulco troclear (Figura 2-A). Com o paquímetro mensurou-se uma área de 0,4cm de largura x 1,0cm de comprimento no sulco (Figura 2-B), que foi demarcada por incisões na cartilagem com lâmina de bisturi nº10 (Figura 2-C, D). Na remoção do sulco troclear, utilizou-se um disco de diamante acoplado a uma perfuratriz elétrica. O disco foi angulado em torno de 30° no intuito de remover o sulco troclear em forma de cunha, sendo constantemente irrigado com solução fisiológica a 0,9% (Figura 2-E).

Efetou-se dissecação do osso subcondral utilizando lâmina de bisturi nº10, evitando danificar as bordas trocleares e a cartilagem articular adjacente (Figura 2-F). Os enxertos osteocondrais alógenos preservados em glicerina a 98%, foram previamente lavados e hidratados com solução fisiológica a 0,9% durante 30 minutos. A drilagem das bordas dos enxertos se fez necessária, para promover o encaixe e evitar depressões entre as superfícies cartilaginosas do implante-leito receptor.

Após o posicionamento do implante, a articulação foi lavada com solução fisiológica para remover os fragmentos ósseos. A patela foi colocada sob o sulco do implante e a cápsula articular aproximada com poliglactina 910²⁹ nº 4-0, com pontos simples isolados. Na redução do espaço subcutâneo utilizou-se poliglactina 910 nº 4-0 em sutura ziguezague, e a síntese da pele com pontos simples isolados com náilon³⁰ nº 3-0.

Nos animais do grupo controle (GI) realizou-se apenas a implantação osteocondral alógena. Nos do grupo tratado (GII), após posicionamento do implante e sutura da cápsula articular, foi inoculada a fração celular de 2×10^6 células mononucleares autógenas, associadas a $1 \mu\text{g}$ rhBMP-2, ambas diluídas em DMEM.

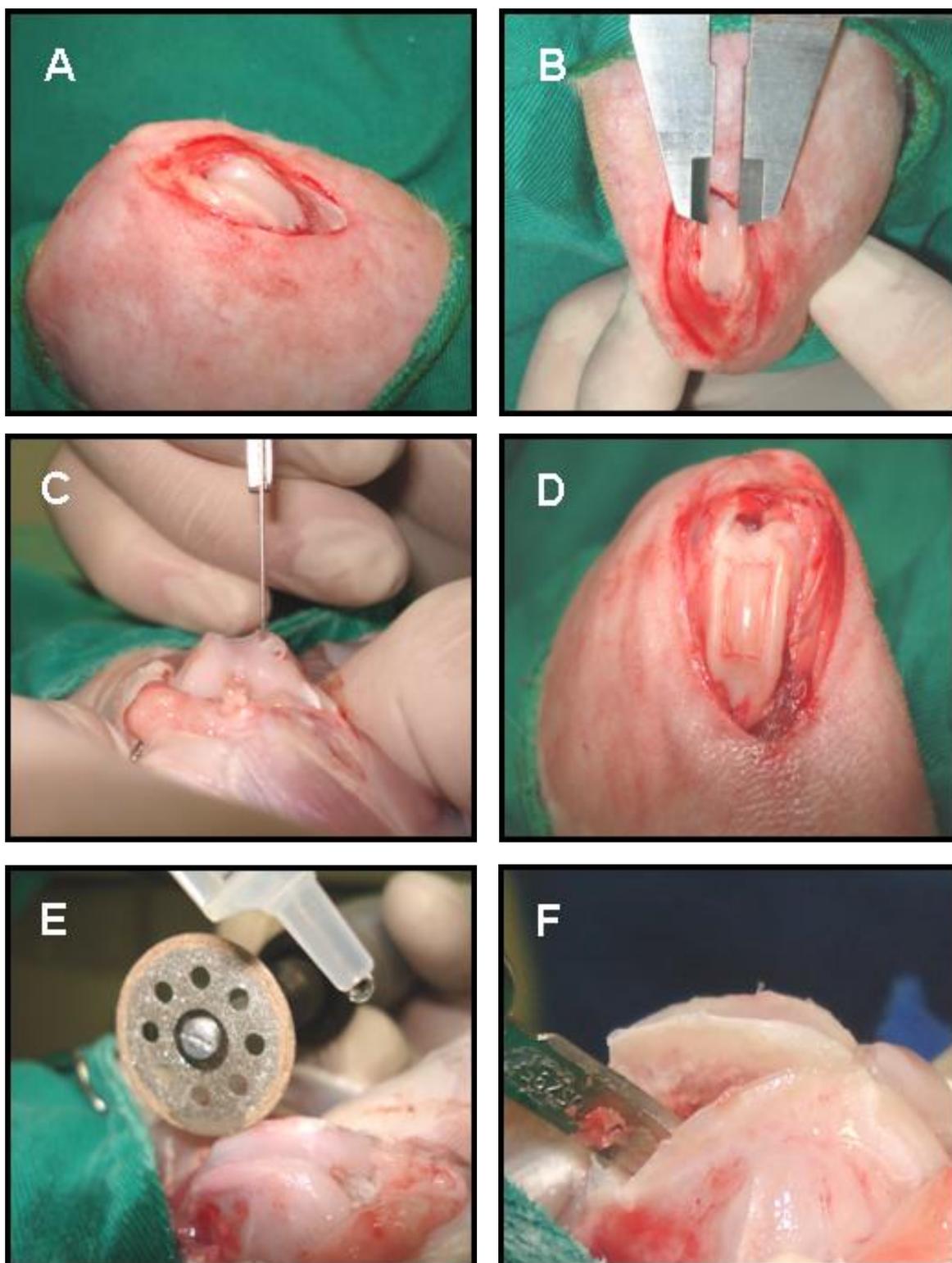


FIGURA 2. Remoção de um segmento osteocondral no sulco troclear femoral de coelho. Luxação medial da patela para exposição do sulco troclear (A). Mensuração com paquímetro de uma área de 0,4 x 1,0 cm (B), demarcada com lâmina de bisturi (C, D). Retirada do fragmento ósseo com disco de diamante, até a exposição do osso subcondral (E) e extraído por dissecação com bisturi (F).

III.j. Pós-operatório

As feridas cirúrgicas foram higienizadas duas vezes ao dia com gazes embebidas em solução fisiológica a 0,9%, e posterior aplicação tópica de rifamicina³¹ por um período de sete dias. Os animais foram mantidos com colar elizabetano até a remoção dos pontos de pele. Foi administrado o cloridrato de tramadol (2mg/kg, SC), de oito em oito horas durante três dias, o flunixin meglumine (1mg/kg, SC), a cada 24 horas, por três dias e cefazolina sódica (30 mg/kg, IM), de 12 em 12 horas, durante sete dias (páginas 13 e 14).

III.k. Avaliação do rendimento e viabilidade celular

As médias do rendimento e viabilidade das células mononucleares do grupo tratado foram determinadas a partir de uma amostra de 2,0 mL de medula óssea, através de contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer, nas formulações anteriormente descritas.

III.l. Avaliação macroscópica

Nos períodos pré-estabelecidos de 45 e 90 dias de pós-operatório, foram avaliados seis animais de cada grupo para descrição das alterações macroscópicas e colheita de amostras para análise histológica. A eutanásia foi realizada pela aplicação de altas dosagens de tiopental sódico³² a 2,5% e cloreto de potássio³³ á 10%, seguindo as normas recomendadas para o uso de animais em pesquisas científicas (CRMV-MG, 2002).

As articulações foram avaliadas quanto á cicatrização das feridas cirúrgicas, presença de transudato e/ou exsudato e reações teciduais anormais. Na inspeção foram observadas as alterações como coloração, volume e viscosidade do líquido sinovial, espessura da cápsula articular, posicionamento da patela, aderências e crescimento tecidual. Avaliou-se os enxertos osteocondrais alógenos quanto á

coloração, proliferação de tecidos sob a superfície cartilaginosa, contato com as bordas trocleares e a integração do enxerto ao sítio receptor.

III.m. Avaliação microscópica

Nos períodos pré-estabelecidos de PO, foram coletadas as epífises distais do fêmur e armazenadas em frascos individuais contendo formol³⁴ a 10% por um período mínimo de 24 horas, á temperatura ambiente. A descalcificação se procedeu em ácido nítrico³⁵ a 5% durante dois dias, sendo realizada a troca do fluido descalcificador de duas em duas horas. As amostras foram lavadas em água corrente por 12 horas. No processo de desidratação utilizou-se álcool absoluto, sendo feita trocas a cada hora, no total de quatro passagens. O xilol³⁶ foi utilizado para a diafanização e, previamente a inclusão em blocos, as amostras permaneceram imersas em parafina líquida em estufa a 70°C, durante duas horas. Foram realizados cortes transversais de 0,5 µm na região do implante-leito receptor para serem corados com hematoxilina-eosina³⁷ (HE) e tricrômio de Mallory³⁸ (TM). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Polyvar³⁹ para verificar as principais alterações histológicas encontradas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso terapêutico das células-tronco mesenquimais da medula óssea tem sido freqüentemente relatado, e apresenta um amplo espectro para a sua indicação, incluindo distúrbios cardiovasculares, tratamento de fibrose pulmonar, injúrias da medula espinhal e na regeneração de ossos e cartilagens (BARRY, MURPHY, 2004). Diferenças nos protocolos de isolamento celular e o número de células inoculadas são importantes na eficácia da terapia (LUNDE et al., 2006). Neste estudo, o gradiente Ficoll-paque utilizado na proporção de 2:1 e centrifugação a 495 g durante 30 minutos a 15° C, demonstrou eficácia no isolamento das células

mononucleares a partir de um volume de 2,0 mL de aspirados da medula óssea de coelhos, observado pela visualização do anel celular (Figura 3-A).

O número médio de células quantificadas nas amostras foi de $6,25 \times 10^6$ células/mL, variando entre $3,84 \times 10^6$ e $9,92 \times 10^6$. A viabilidade celular analisada pelo método de exclusão de células não viáveis variou entre 80,50% e 99%, encontrando-se uma viabilidade média de 93,56%. Os resultados individuais de rendimento e viabilidade celular estão expressos na (Tabela 1), bem como as médias e o limites superiores (Gráfico 1). A determinação do rendimento e da viabilidade celular foi facilitada pela utilização prévia de tampão de lise de eritrócitos, favorecendo a identificação de células viáveis e inviáveis (citoplasma corado pelo azul de tripan) e avaliação das características morfológicas das células presentes nas amostras (Figura 3-B).

Connolly et al., (1989) coletaram de 7 a 10 mL em aspirados de medula óssea de coelhos, e utilizaram diferentes métodos de isolamento das células mononucleares. Na centrifugação com o gradiente ficoll a 400 g por 35 minutos, na proporção 1:2, atingiram uma média de 8×10^6 células/mL. Verificaram que os protocolos de centrifugação simples e utilização do gradiente de densidade concentraram a população de células isoladas, que foram utilizadas em experimentos para avaliação de osteogênese. Em nosso experimento, com o método de centrifugação por gradiente de densidade na proporção de 2:1 a 495 g durante 30 minutos foi obtido uma média celular de $6,25 \times 10^6$ células/mL. Resultado inferior aos de Connolly et al. (1989) foram verificados, possivelmente por esses terem coletado maior volume de medula óssea. Entretanto, deve ser ressaltado que uma quantidade suficiente de CTM com propósitos de terapia celular pode ser obtida a partir de menores volumes de aspirados de medula óssea, minimizando possíveis efeitos deletérios ao animal doador.

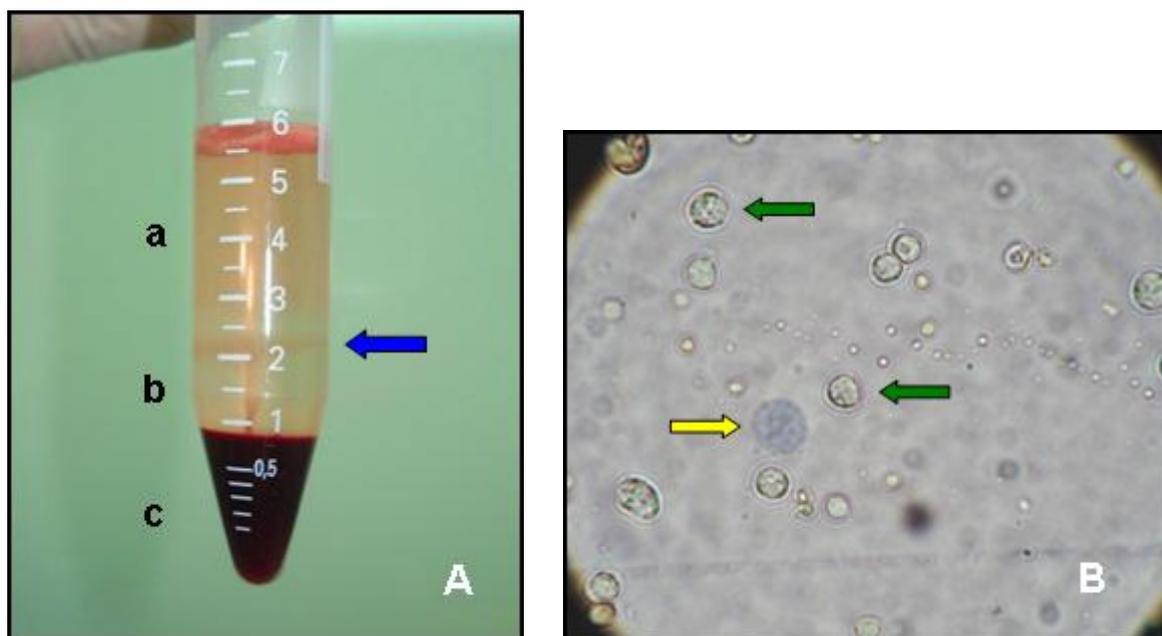


FIGURA 3. (A). Amostra de aspirado de medula óssea de coelho após separação por gradiente de densidade Ficoll-paque. Nota-se o anel celular (seta azul) situado entre o plasma **(a)** e o gradiente **(b)** e sedimento de eritrócitos e polimorfonucleares **(c)**. **(B).** Identificação da viabilidade de células mononucleares da medula óssea em câmara de Neubauer. Células viáveis (setas verdes) e inviáveis com citoplasma corado com azul de tripan (seta amarela).

TABELA 1. Resultados individuais de rendimento e viabilidade de células mononucleares isoladas da medula óssea dos coelhos do grupo tratado (GII).

	CÉLULAS (x 10⁶)	VIABILIDADE (%)
1	3,84	93,20
2	6,80	80,50
3	7,92	92,00
4	5,40	93,83
5	4,16	95,40
6	6,00	94,93
7	5,98	92,56
8	5,90	93,05
9	6,50	95,30
10	5,94	99,00
11	6,64	97,36
12	9,92	95,56

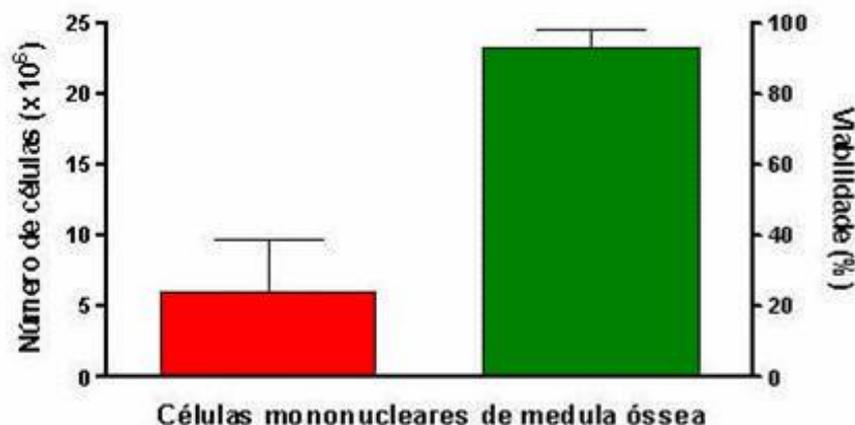


GRÁFICO 1. Rendimento (vermelho) e viabilidade (verde) de células mononucleares da medula óssea dos coelhos do GII ($n = 12$) isoladas por gradiente de densidade Ficoll-paque (1,077 g/mL) a partir de um volume de 2,0 mL de aspirados de medula óssea. As barras sobre os retângulos indicam os valores máximos obtidos.

No reparo de defeitos amplos da superfície articular de coelhos, Yanai et al. (2005) obtiveram uma média de 5×10^6 células/mL, coletando-se uma amostra de 2,0 mL de aspirados de medula óssea do fêmur. Portanto, a média celular encontrada foi ligeiramente superior à constatada por Yanai et al. (2005), mas bem maior que aquela relatada por Im et al. (2001) que encontraram um número médio de $3,4 \pm 1,5 \times 10^6$ células/mL isoladas da medula óssea de coelhos. Portanto, presume-se que diferenças nos protocolos de isolamento podem interferir no rendimento celular final, além do que a quantidade de células obtidas por aspirados podem variar de acordo com o indivíduo, como verificado em nosso estudo.

Tognoli et al. (2007) e Bittencourt et al. (2006) verificaram resultados de viabilidade superiores a 90 e 95%, respectivamente, utilizando o mesmo método de exclusão. A média da viabilidade celular relatada por esses autores foi semelhante à verificada neste experimento, o que confirma a eficácia do protocolo de isolamento adotado. Segundo Olsson et al. (2009), o maior desafio da manipulação celular é a preservação das características funcionais e a manutenção da viabilidade das células. Os bons resultados de viabilidade nesse estudo se devem, principalmente,

ao manuseio cuidadoso das células e ao uso de materiais apropriados durante o processo de isolamento. O meio de cultivo DMEM em adição ao soro fetal bovino a 10% demonstrou ser excelente fonte energética e protéica para a manutenção das células, intervindo positivamente na viabilidade celular.

Uma das estratégias utilizadas para terapia celular é baseada no princípio que uma quantidade numerosa de células-tronco esteja presente nos aspirados de medula óssea, para que o concentrado provoque efeitos terapêuticos benéficos, sem necessitar de cultura celular (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006). Em contrapartida, a quantidade de CTM representa uma fração muito pequena, em torno de 0,001-0,01% da população total das células mononucleares da medula (PITTENGER et al., 1999). Portanto, o número de células mononucleares é proporcional ao volume de medula óssea colhida e, no presente estudo, mesmo coletando um volume de 2,0 mL da medula óssea, foi obtido um rendimento expressivo de células.

Os animais do GI e GII apresentaram boa cicatrização da ferida de pele. Durante a análise macroscópica dos grupos, foi constatada em apenas um animal (4,17%) do GI-45 dias de PO, exsudação sero-sangüinolento extra-capsular, bem como mobilidade do implante no interior do leito receptor. Os enxertos osteocondrais permaneceram no leito receptor decorrente da pressão dorsal exercida pela patela, e delimitadas pelas bordas trocleares. O processo de vascularização de uma lesão óssea é dependente da estabilidade local e, caso haja movimento excessivo, pode ocorrer à ruptura de capilares sanguíneos. Neste caso, uma mobilidade exacerbada da patela possivelmente dificultou a neovascularização do implante, impedindo a sua adesão ao leito.

Em dois coelhos (8,33%), um do GI-45 e outro do GII-90, foi notado luxação patelar medial de grau 4, porém, ambos com formação de tecido cicatricial no local da incisão da cápsula. Apresentavam alterações articulares extensas como espessamento da cápsula articular e aderência ao enxerto, e crescimento tecidual exacerbado sob o enxerto e bordas trocleares. Nos do GI e GII, aderências da cápsula articular foram constatadas em 16,67% dos animais, sendo três (75%) no GI-45. O implante osteocondral alógeno e os côndilos femorais laterais foram as principais estruturas envolvidas na adesão capsular. O processo de aderência entre

o tecido sinovial e a superfície articular constatada neste estudo pode ser definida como artrofibrose, sendo observada deposição de fibrina nas estruturas envolvidas. Foi desenvolvida devido a uma lesão cartilaginosa pré-existente, iniciada por um episódio inflamatório e/ou traumático da articulação (VELLOSO, 2005). A injúria causada na membrana sinovial, leva a uma liberação de enzimas lisossomais pelas células inflamatórias; a uma liberação de prostaglandinas e, a produção de radicais livres e liberação de citocinas, principalmente a interleucina 1 (IL-1) as quais são secretadas junto com o fluido sinovial (LESCHONSKI, 1999). Os dois animais acometidos de luxação patelar apresentavam aderências da cápsula sob o enxerto. Esse fato ocorreu, possivelmente, pelo contato entre essas estruturas, e o processo inflamatório pós-cirúrgico favoreceu o aparecimento de aderências.

Das 24 articulações avaliadas, verificou-se em 95,83% produção de líquido sinovial, os quais exibiam consistência viscosa e coloração levemente amarelada em quatro animais (16,67%) do GI-45, um (4,17%) do GI-90, um do GII-45 e um do GII-90. Houve redução da viscosidade do líquido sinovial em quatro (16,67%) casos do GI-90, provavelmente pela liberação da enzima hialuronidase, que degrada o ácido hialurônico. Em inflamações agudas e/ou persistentes, ocorre redução das concentrações de hialuronato, ocasionando diluição do líquido sinovial ou alteração na sua síntese (TULAMO et al., 1996).

Verificou-se em seis (100%) animais GI-45 espessamento moderado a intenso da cápsula articular fibrosa, enquanto que no GI-90 em apenas três coelhos (50%). Espessamento leve a moderado foi encontrado em sete espécimes (58,33%) do GII, sendo três (42,86%) no GII-45 e quatro (57,14%) no GII-90. A hipertrofia da cápsula também foi observada por Yanai et al. (2005) em um número expressivo de coelhos. O espessamento da cápsula fibrosa verificado neste trabalho se deve a osteoartrite, pela deposição do tecido conjuntivo fibroso presente em reações inflamatórias crônicas (OSBORNE et al., 1995).

Neoformação tecidual articular foi observada em 23 animais (95,83%), estando localizada principalmente nos côndilos femorais, bordas trocleares, e sob o implante. No GI-45, em cinco coelhos (83,33%) houve deposição tecidual nas bordas trocleares e sob o enxerto (Figura 5-A), e quatro (66,66%) nos côndilos femorais. Nos do GI-90 observou-se em um (16,67%), dois (33,33%) e três (50%) animais do

grupo, localizados nos côndilos femorais, bordas trocleares e sob o implante alógeno, respectivamente (Figura 5-B).

Em estudo morfológico de defeitos osteocondrais da articulação de coelhos, utilizando diferentes técnicas cirúrgicas de reparação, Inouye et al., (2002) observaram a formação de osteófitos em 63 de 80 joelhos operados no grupo controle, os quais variaram entre 5 a 10 mm em seus maiores diâmetros. Os osteófitos na zona marginal referem-se  resposta para limitar e controlar as alterações patológicas iniciais, estendendo a área superficial da cartilagem articular. O trauma direto e a instabilidade podem estar envolvidos na patogenia dos osteófitos marginais (STASHAK, 1994). Portanto, os osteófitos pericondrais observados em nosso trabalho indica um processo destrutivo progressivo da cartilagem, em reflexo  atividade anormal da articulação. Embora esteja presente, tal fato não significa um sinal patonogmonico de osteoartrose (LIPOWITZ, NEWTON, 1985).

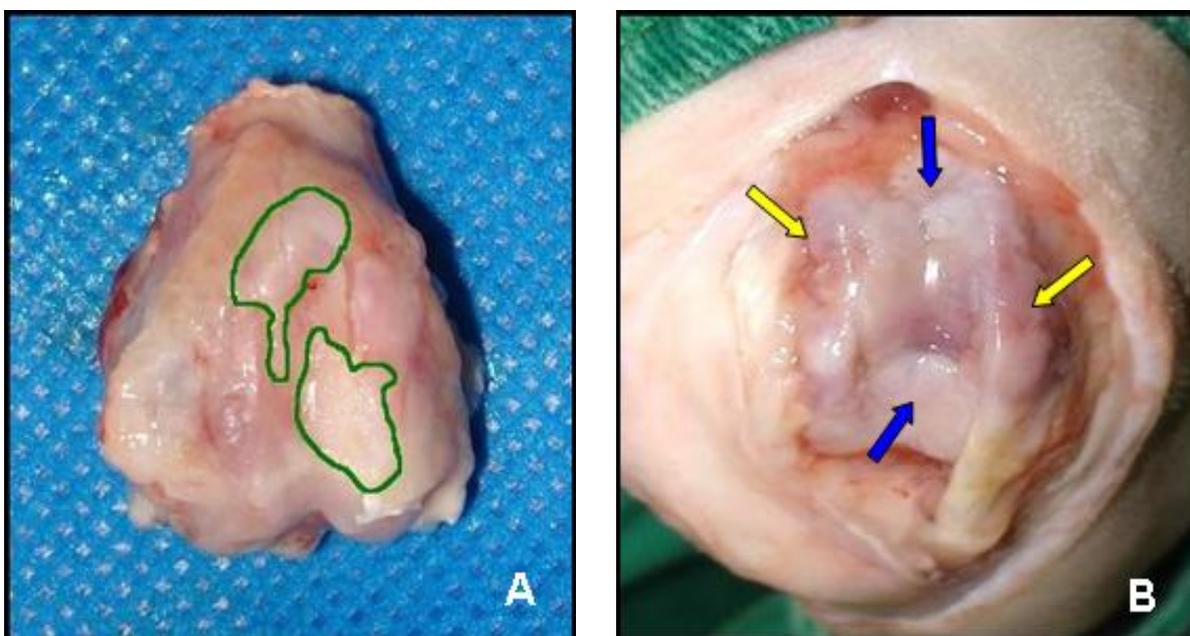


FIGURA 4. Aspecto do sulco troclear de coelhos do grupo controle. **(A).** As áreas circundadas em verde representam o crescimento de tecido esbranquiçado, localizados sob o implante alógeno (GI-45). **(B).** Deposição tecidual recobrimdo a borda caudo-ventral do implante (seta azul) e sob as bordas trocleares (setas amarelas), (GI-90).

Dos 24 animais avaliados, constatou-se depressão do implante osteocondral em cinco casos (20,83%), sendo três (60%) do GI e dois (40%) do GII. Além disso, notou-se crescimento tecidual exacerbado no local da depressão, que se direcionava sob o implante alógeno. Resultados semelhantes foram encontrados por Nishimori et al., (2006) que, além da depressão na área da lesão, estavam recobertas por um tecido branco semitransparente. Entretanto, em 23 articulações (95,83%), os implantes estavam completamente aderidos ao osso subcondral, sem sinais de rejeição e/ou mobilidade. A incorporação de um enxerto ósseo não vascularizado é um processo complexo, que depende não apenas das propriedades biológicas do enxerto e da resposta do leito receptor, mas também da estabilidade da fixação e da resistência mecânica do enxerto (STEVENSON, HOROWITZ, 1992; BAUER, MUSCHLER, 2000). Contudo, presume-se que, nesse estudo, a estabilidade no local de enxertia foi imprescindível para a incorporação. Além disso, pelo enxerto osteocondral apresentar formato tridimensional e conformação trabecular, serviu de arcabouço para a revascularização do implante, agindo de forma osteocondutora.

A permanência das bordas de delimitação do implante foi observada em 22 animais (91,67%), sendo constatado neoformação tecidual lisa, brilhante e de coloração esbranquiçada, localizada entre as bordas do leito receptor-enxerto (Figuras 5 e 6). Porém nos coelhos do GII, o crescimento foi menos proeminente quando comparado aos do GI (Figura 5). Tecido semelhante foi observado por outros autores no reparo de lesões osteocondrais (WAKITANI et al., 1994; IM et al., 2001; RIBEIRO, CAMANHO, TAKITA, 2004; NISHIMORI et al., 2006). Nishimori et al., (2006) avaliaram o uso de células-tronco mesenquimais no reparo de lesões osteocondrais experimentalmente induzidas e constataram a presença das bordas limitantes dos defeitos até a 12^a semana. Neste experimento, em ambos os grupos e períodos de avaliação, o tecido assemelhava-se a fibrocartilagem. Porém, por ser um critério macroscópico de avaliação, não se pode estabelecer uma correlação exata com as características histológicas, bioquímicas ou biomecânicas do reparo (RIBEIRO, CAMANHO, TAKITA, 2004).

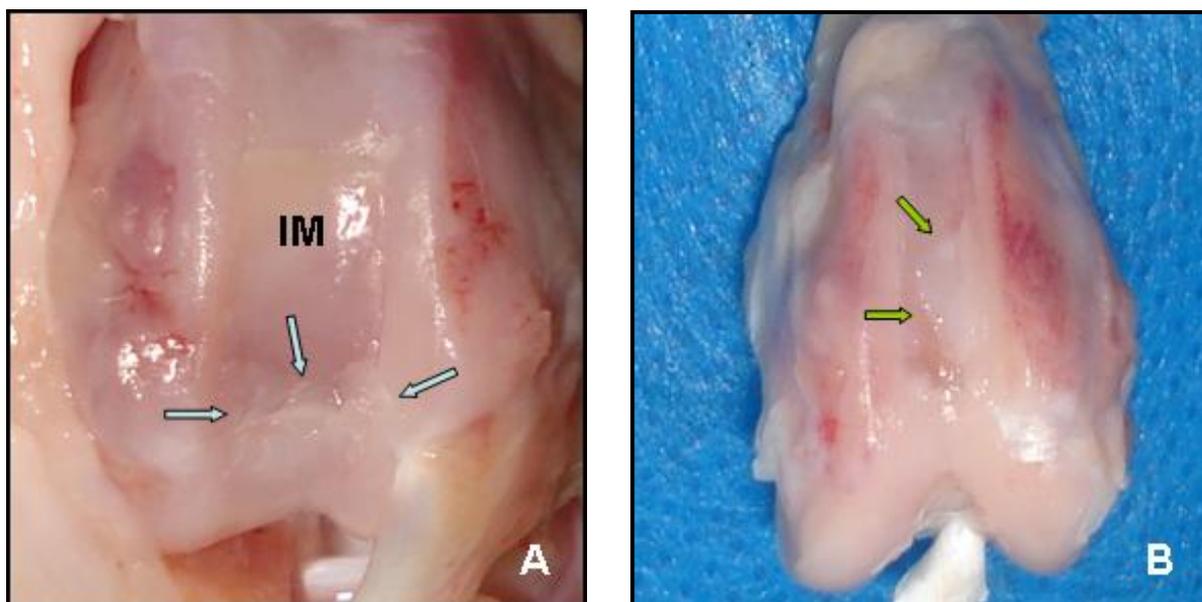


FIGURA 5. Aspecto do sulco troclear de coelhos do grupo tratado com células mononucleares da MO e rhBMP-2. **(A)**. Notar aos 45 dias de PO, formação de tecido esbranquiçado entre as bordas do implante (IM) e do leito receptor (setas azuis) e em **(B)**, a mesma alteração foi constatada aos 90 dias (setas verdes). Notar, em ambas as imagens, a ausência da formação de osteófitos marginais.

Verificou-se a erosão cartilaginosa na borda ventro-lateral do implante em um animal (16,67%) do GI-90, e na região central em um (16,67%) do GII-90. A erosão representa a perda da espessura da cartilagem (STASHAK, 1994). Pode ter ocorrido pelo aumento da sobrecarga no osso subcondral e perda da sua capacidade elástica, caracterizando uma esclerose óssea subcondral. Conseqüentemente, maior força foi transferida á cartilagem, resultando em ulceração ou erosão progressiva (ANASTASIOU et al, 2003).

Na avaliação microscópica do GI pelas colorações com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Mallory (TM), constataram-se em sete coelhos (58,33%) processos degenerativos da cartilagem do enxerto, sendo dois (16,67%) do GI-45 e cinco (41,67%) do GI-90. Em um caso do GI-45, pode-se observar necrose focal da cartilagem do implante, do osso subcondral e hemorragia. Segundo Mcilwraith e Trotter (1996), a degeneração da cartilagem se origina da instabilidade articular, a qual ocasiona uma carga excessiva sobre sua superfície. Em conseqüência disso, pode haver ruptura dos arranjos de proteoglicanos, aumento da hidratação da

cartilagem e exposição das fibrilas de colágeno. O processo de fibrilação pode estar associado à esclerose óssea subcondral, lesões císticas, osteonecrose focal e formação de osteófitos periarticulares.

Em dois animais do GI-45 (16,67%) e um do GI-90 (8,33%), foram identificados processos de reabsorção dos implantes osteocondrais, caracterizados por fragmentação da cartilagem, descontinuidade do implante-leito receptor e desintegração do osso subcondral, sendo substituído por tecido fibroso (Figura 6). Outros estudos têm relatado a reabsorção do enxerto (FRAZILIO et al., 2006), bem como fibrilação e descontinuidade dos implantes (FRENKEL et al., 2005) na reparação de defeitos osteocondrais. Histologicamente, rejeição tem sido inferida quando ocorre reabsorção do enxerto ósseo ou apresenta falha mecânica prematura (STEVENSON, HOROWITZ, 1992). Com isso, tecido de granulação e fibrose se formam na interface implante-receptor impedindo a incorporação, como observado nesse experimento.



FIGURA 6. Fotomicrografia do implante osteocondral de coelho do GI-45 dias PO. Processo de reabsorção do implante alógeno, sendo substituído por tecido conjuntivo fibroso (seta). TM. (Barra = 100 μ m).

A osteointegração entre o implante e o leito receptor ocorreu em apenas quatro casos (33,33%), sendo um (25%) do GI-45 e três (75%) GI-90. Comparando aos outros animais do grupo, notou-se boa densidade óssea e áreas de ossificação

endocondral localizadas na região trabecular do implante alógeno. Del Carlo et al. (2007) também verificaram falhas na implantação de aloenxertos ósseos no grupo controle, quando associados ou não a células da medula óssea, proteínas morfogenéticas ósseas e autoenxertos esponjosos em cães. Afirmaram que o processo de reabsorção óssea foi maior que a deposição e, segundo Piermattei, Flo (1999), pode estar relacionado á instabilidade e perda da justaposição dos defeitos.

A bioabsorção e a osteocondução são variáveis entre os materiais e, por causa da sua passiva função na regeneração óssea, apresentam utilidade limitada quando em uso isolado. Apesar da capacidade do osso infiltrar e geralmente substituir muitos desses materiais, eles apresentam deficiência de propriedades osteogênicas e osteoindutivas (KRAUS, KIRKER-HEAD, 2006). Nesse estudo, ocorreu um número variável de osteointegração entre o implante-leito receptor. Porém, não foi atribuído à falha na adesão a osteocondutividade do material, e sim á instabilidade local durante a fase de reparação. Também observou-se que, na avaliação histológica do GI, a falha na adesão foi superior ao revelado na macroscopia, não podendo esses achados serem exatamente correlacionados (RIBEIRO, CAMANHO, TAKITA, 2004).

Verificou-se em quatro animais (66,67%) do GI-45 a presença de tecido conjuntivo fibroso variando quanto à localização. Em três espécimes (75%), o tecido ocupava a área de transição cartilaginosa (Figura 7) e, em outro (25%), recobrando a superfície da cartilagem do implante. Wakitani et al. (1994), em estudo do reparo de lesões osteocondrais da cartilagem de coelhos com CTM isoladas da medula óssea e do perióstio, observaram a formação de tecido fibroso no grupo controle aos 30 dias, localizado nas áreas de transição e recobrando as margens dos defeitos induzidos. Em nosso experimento, a redução nos níveis de oxigênio pode ter alterado o código genético em direção ao tecido fibroso ou fibrocartilagem, em decorrência da falta de suprimento sanguíneo e instabilidade mecânica (WEI et al., 1999).

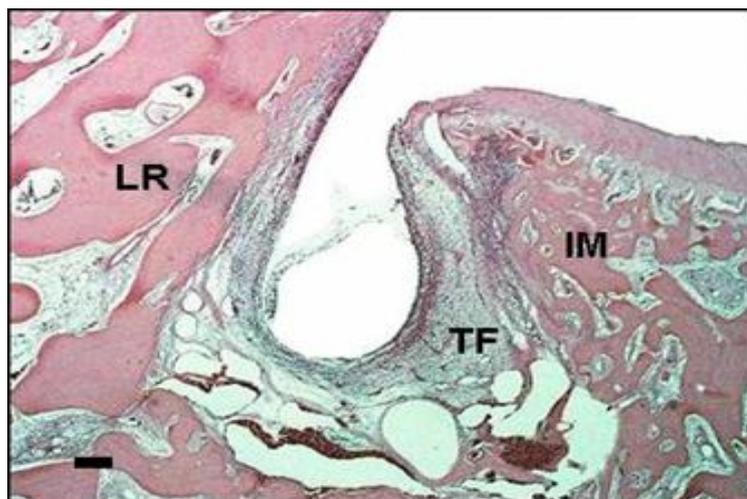


FIGURA 7. Fotomicrografia da área de transição entre o implante (IM) e o leito receptor de coelho (LR) de um coelho do GI-45 dias PO. Observar a intensa formação de tecido conjuntivo fibroso (TF) com lacunas subcondrais. HE. (Barra = 200 μ m).

A rarefação óssea se fez presente em quatro casos do GI (33,33%), sendo três (75%) nos coelhos do GI-90. Nesses últimos, notou-se que, além da instalação de um processo de degeneração da cartilagem, ocorreu proliferação de tecido cartilaginoso das bordas do leito receptor sob a cartilagem do implante, na qual se constatou número de condrócitos reduzidos (Figura 8). Estudos têm reportado com sucesso o reparo de lesões amplas da cartilagem, principalmente no instante onde os componentes do osso subcondral se encontram regenerados, ou seja, com sua estrutura arquitetônica organizada (CHU et al., 1997; SELLERS et al., 2000). Essas observações sugerem que a qualidade do osso subcondral subjacente pode afetar a regeneração e a longevidade do reparo tecidual da cartilagem articular.

No grupo GI-90, foi evidenciado em dois coelhos (33,33%) que a fibrocartilagem preencheu a área de transição cartilaginosa (Figura 9) e, em outros dois (33,33%) houve formação de cartilagem hialina. A fibrocartilagem ou cartilagem fibrosa é um tecido de transição sem pericôndrio e apresenta propriedades, funcional e estrutural entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem hialina. Essa é composta de 90 a 95% de colágeno tipo II, que confere propriedades elásticas, favorecendo a absorção de forças tênsil. A fibrocartilagem é resistente a tensões e

se caracteriza pela presença de colágeno I (GHIVIZZANI et al., 2000; HYMAN, RODEO, 2000). Portanto, a formação de fibrocartilagem observada é indesejada, por alterar as propriedades estruturais e biomecânicas da articulação.

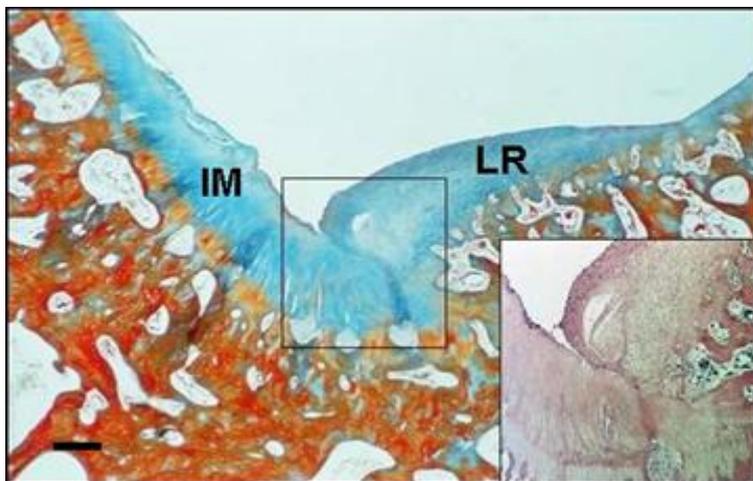


FIGURA 8. Fotomicrografia da área de transição em um coelho do GI-90 dias PO. Proliferação da cartilagem do leito receptor (LR) sob o implante alógeno (IM), com reduzida densidade óssea subcondral. TM. No aumento da área, observar redução do número de condrócitos da cartilagem do implante. HE. (Barra: 100µm).

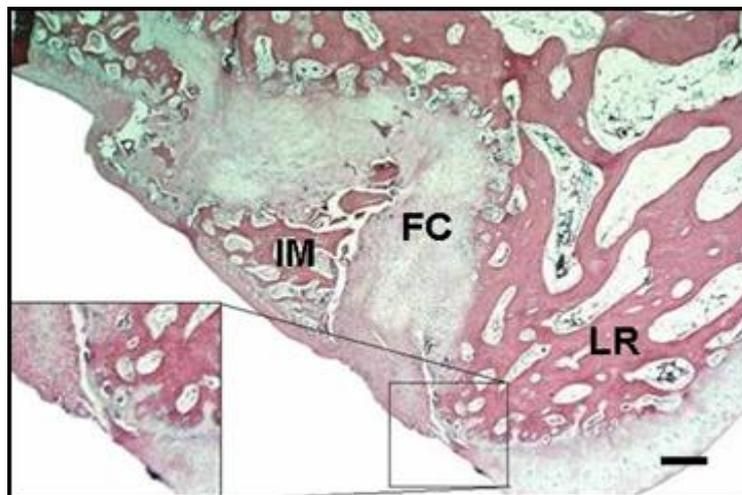


FIGURA 9. Fotomicrografia da área de transição em um animal do GI-90 dias PO. Formação de fibrocartilagem (FC) separando o implante alógeno (IM) do leito receptor (LR). No aumento, observar a fibrocartilagem em fase de união à cartilagem hialina do leito receptor. HE. (Barra: 100µm).

Em ambos os períodos de avaliação dos animais do GI, constatou-se o aparecimento de infiltrados inflamatórios polimorfonucleares (25%) e mononucleares (16,67%). Piócitos foram encontrados nas trabéculas ósseas em apenas um animal (8,33%), caracterizando osteomielite. Nos do GI-45 apenas um coelho demonstrou concomitantemente, infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares com predominância de células mononucleares (plasmócitos). Sabe-se que a glicerina como meio de conservação de enxertos e membranas biológicas reduz a antigenicidade, além de propriedades antibacteriana e antifúngica (DALECK, 1992). Porém, MELO et al., (1998) avaliaram de forma bacteriológica aloenxertos ósseos conservados em glicerina e observaram o crescimento de *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus* spp. em 21,4% amostras de segmentos ósseos. O resultado sugere que a glicerina não permitiu o crescimento, mas também não eliminou as bactérias presentes nos ossos. Portanto, pelo baixo índice de infecção constatado em nosso estudo, atribuímos o aparecimento da osteomielite ao procedimento cirúrgico.

Nos animais do grupo GII, comparado aos do GI, foram observadas poucas alterações degenerativas no local de enxertia. Nos do GII-90, notou-se dois casos com descamação (33,33%) e um (16,67%) com necrose da cartilagem do implante. Porém, este último apresentava áreas de regeneração preenchidas por tecido conjuntivo fibroso. Constatou-se hemorragia focal na área de transição em apenas um animal do GII-45. Acredita-se que o aumento da pressão na lesão impede o fluxo sanguíneo pelos capilares sinoviais, ocasionando diminuição na tensão de oxigênio e injúria de reperfusão na cartilagem. Além disso, uma pressão intra-articular acentuada pela locomoção e efusão articular exercem sobrecarga ao osso subcondral, diminuindo o fluxo sanguíneo e causando área de necrose no local (MCILWRAITH, TROTTER, 1996).

Observou-se leve depressão do enxerto e exposição do osso subcondral em três animais (25%), sendo dois (16,67%) no GII-45 e um (8,33%) no GII-90. Nos do GII-45, um (8,33%) houve formação de cartilagem hialina na área de transição entre o implante-leito receptor, e no outro ausência de crescimento tecidual (Figura 10).



FIGURA 10. Fotomicrografia da área de transição de um coelho do GII-45 dias PO. Observar a ausência de formação de tecido reparador entre o leito receptor (LR) e o implante (IM), o qual apresentava leve depressão. HE. (Barra: 200 μ m).

Nos do GII-90, foram visualizadas pequenas áreas de ossificação endocondral e rompimento da cartilagem do implante, porém em fase de regeneração. O rompimento continuado da junção osteocondral com exposição do osso subcondral pode provocar hemorragias e necroses. Quando o desgaste articular é contínuo, o osso se torna esclerótico e com sulcos na sua superfície, sendo o reparo realizado através da formação de tecido fibrocartilagenoso de granulação (LIPOWITZ, NEWTON, 1985). Constatou-se que, apesar do aparecimento de áreas de depressão do implante e exposição do osso subcondral, a reparação de defeitos osteocondrais também pode ser realizada por cartilagem hialina (CHU et al., 1997; SELLERS et al., 2000), e a integridade do osso subcondral se tornou fundamental para o restabelecimento da proliferação cartilaginosa.

Na avaliação histológica, os coelhos do grupo tratado (GII) demonstraram melhores resultados no reparo ósseo e cartilagenoso quando comparado aos do grupo controle (GI). A osteointegração do implante com o leito receptor foi observada em dez (83,33%) animais do GII, com exceção de um (8,33%) do GII-45 e um (8,33%) do GII-90. Ambos exibiam reabsorção óssea e lacunas no osso subcondral, acompanhadas de crescimento de cartilagem hialina em processo de

ossificação. Um dos fatores que podem determinar o sucesso ou fracasso de enxertos ósseos indutores em cirurgias reconstrutivas é a eficiência do material carreador (TORIUMI, ROBERTSON, 1993). Em reparos ósseos em ratos, a implantação de medula óssea juntamente com carreadores de ácido poliláctico e poliglicólico, resultou em fusões ósseas inferiores a 50% na 12^a semana, enquanto que a associação da medula com a rhBMP-2 atingiu 100% de união, antes mesmo da 6^a semana (LANE et al., 1999). No grupo tratado, nesse experimento, o implante osteocondral alógeno demonstrou eficácia quanto à incorporação ao leito receptor. Deste modo, um enxerto ósseo combinado ao uso de células osteoprogenitoras, fatores osteoindutivos e uma matriz biodegradável, mostram sinergismo e superioridade em comparação ao uso isolado do enxerto.

No grupo GII não se observou formação de fibrocartilagem na zona de transição. Contudo, em quatro animais (66,67%) do GII-90, o crescimento de tecido conjuntivo fibroso foi predominante, localizados no espaço subcondral e nas bordas do implante-leito receptor. O tipo de tecido formado na zona de transição cartilaginosa nos grupos controle e tratado estão expressos na tabela 2.

TABELA 2. Representação do número de animais do GI e GII e seus subgrupos, conforme o aspecto do tecido predominante na zona de transição cartilaginosa do implante-leito receptor.

Área de transição	Grupo controle		Grupo tratado	
	GI – 45	GI – 90	GII – 45	GII – 90
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
Cartilagem hialina	0	2*	4**	2
Fibrocartilagem	0	2	0	0
Tecido conjuntivo fibroso	4	1	0	3
Ausente	0	0	1	0
Reabsorção implante	2	1	1	1
	n = 12		n = 12	

* Ausência de condrócitos na cartilagem do implante.

** Um animal com ausência de condrócitos no implante.

A cartilagem hialina esteve presente em quatro animais (66,67%) do GII-45 e dois (33,33%) do GII-90. Em três animais (50%), esta se apresentava de formato irregular e crescimento exacerbado, ultrapassando os limites do leito receptor (Figura 11). Entretanto, em dois (33,33%) do GII-45 e um (16,67%) do GII-90, as linhas de delimitação dos defeitos estavam pouco distinguíveis. Pode-se observar manutenção dos condrócitos do implante e proliferação em direção a cartilagem do leito receptor (Figura 12).

Pesquisas recentes demonstraram que os fatores de crescimento ósseo, além de induzir a condrogênese e a osteogênese pela diferenciação de células mesenquimais, influenciam e exacerbam a ação de osteoblastos e osteoclastos no tecido ósseo e condroblastos em tecidos cartilagosos (WAN, CAO, 2005). Devido aos resultados microscópicos de osteointegração do implante e formação de cartilagem hialina em alguns animais do grupo tratado (GII), acredita-se que a rhBMP-2 exógena atuou de forma osteoindutiva na reparação, através do recrutamento de células mesenquimais locais e as transplantadas da medula óssea, assim como na proliferação e diferenciação dessas em osteoblastos e condroblastos.

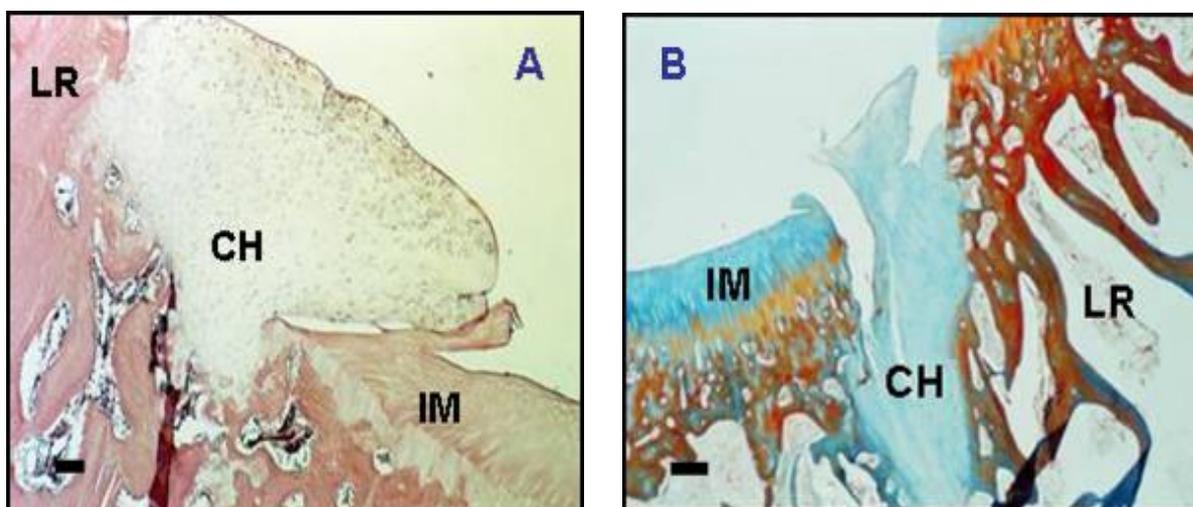


FIGURA 11. Fotomicrografias do implante alógeno (IM), demonstrando crescimento de cartilagem hialina (CH) em coelhos do GII-45, ultrapassando os limites da superfície da cartilagem **(A)**. Formação cartilaginosa exacerbada na área de transição com o osso subcondral. HE. (Barra = 200 μ m). **(B)**. Área preenchida por cartilagem de formato irregular e descontinuidade do implante com o leito receptor (LR). TM. (Barra = 100 μ m).

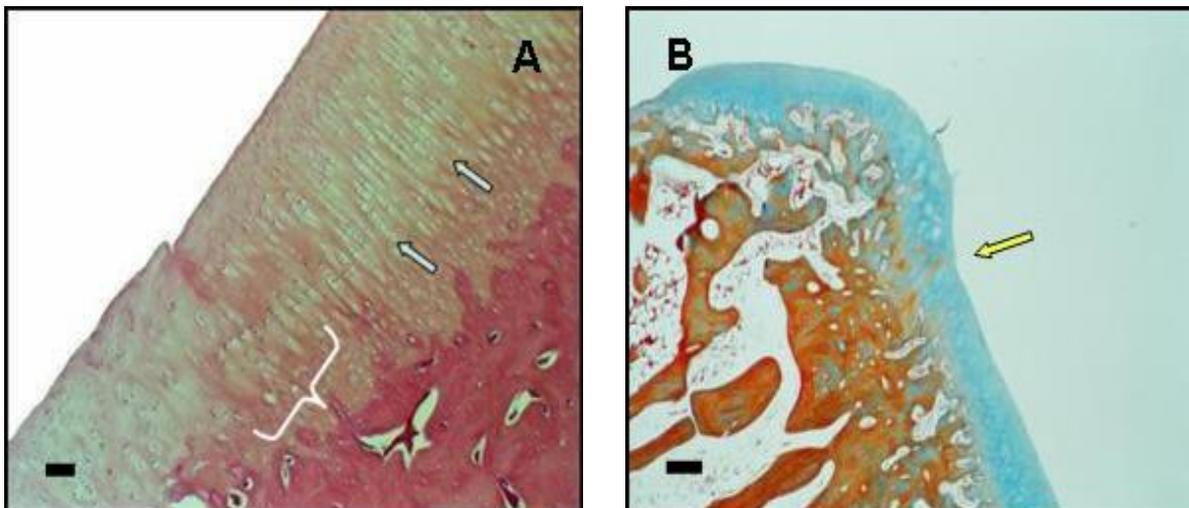


FIGURA 12. Fotomicrografias da área de transição cartilaginosa de coelhos do grupo tratado (GII). **(A).** Animal do GII-45 dias PO. Notar a presença de condrócitos na cartilagem do implante (setas azuis) e proliferação em direção ao leito receptor (colchetes). HE. (Barra = 200 μ m). **(B).** Animal do GII-90 dias PO. A área em vermelho na cartilagem indica processo de ossificação (seta amarela). TM. (Barra = 100 μ m).

V. CONCLUSÕES

O protocolo de isolamento com gradiente de densidade demonstrou eficiência na concentração das células mononucleares, obtendo significativos valores médios de $6,25 \times 10^6$ células/mL de rendimento e 93,56% de viabilidade celular.

A terapia por inoculação intra-articular de células mononucleares isoladas da medula óssea e rhBMP-2 exógena, evidenciou bons resultados na osteointegração de implantes alógenos conservados no reparo de lesões osteocondrais do sulco troclear em coelhos. O tratamento estimulou a formação de cartilagem hialina entre o enxerto e o leito receptor aos 45 e 90 dias de pós-operatório, porém, a regeneração não foi completa.

VI. REFERÊNCIAS

ALDEN, T.D.; PITTMAN, D.D.; HANKINS, G.R.; BERES, E.J.; ENGH, J.A.; DAS, S.; HUDSON, S.B.; KERNS, K.M.; KALLMES, D.F.; HELM, G.A. In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. **Human Gene Therapy**, Philadelphia, v.10, n.13, p.2245-2253, 1999.

AMENDOLA, G.F. **Aspectos biomecânicos, bacteriológicos e micológicos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou mel.** 2007. 100f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

ANASTASIOU, A.; SKIOLDEBRAND, E.; EKMAN, S., HALL, L.D. Ex vivo magnetic resonance imaging of the distal row of equine carpal bones. Assessment of bone sclerosis and cartilage damage. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, North Carolina, v.44, n.5, p.501-512, 2003.

BALTZER, A.W.; LATTERMANN, C.; WHALEN, J.D.; WOOLEY, P.; WEISS, K.; GRIMM, M.; GHIVIZZANI, S.C.; ROBBINS, P.D.; EVANS, C.H. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. **Gene Therapy**, California v.7, n.9, p.734-739, 2000.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Amsterdam, v.36, n.4, p.568-584, 2004.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone grafts materials: an overview of the basic science. **Clinical Orthopaedic and Related Research**, Philadelphia, n.371, p.10-27, 2000.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem cells in tissue engineering. **Nature**, New York, v. 414, n.6859, p.118-122, 2001.

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

BOERO, M.J.; SCHNEIDER, J.E.; MOSIER, J.E.; GUFFY, M.M.; BUTLER, H.C.; LEIPOLD, H.W. Evaluation of the tibia as a source of autogenous cancellous bone in the horse. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v.18, n.4, p.322-327, 1989.

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

BOYÜM, A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, New York, v.97, n.S97, p.31-50, 1968.

BROFMAN, P.R.; CARVALHO, K.A.; GUARITA-SOUZA, L.C.; REBELATTO, C.; HANSEN, P.; SENEGAGLIA, A.C.; MYAGUE, N.; FURUTA, M.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológico em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v.19, n.3, p.261-266, 2004.

BRUDER, S.P.; KRAUS, K.H.; GOLDBERG, V.M.; KADIYALA, S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.80-A, n.7, p.985-996, 1998.

BUCHOLZ, R.W. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.395, p.44-52, 2002.

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

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.174, p.28-42, 1983.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, A.G.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, Washington, v.98, n.8, p. 2396-2402, 2001.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, Illinois, v.9, n.5, p.641-650, 1991.

CHEN, D.; ZHAO, M.; HARRIS, S.E.; MI, Z. Signal transduction and biological function of bone morphogenetic proteins. **Frontiers in Bioscience**, New York, v.9, p.349-358, 2004.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G.R. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors**, London, v.22, n.4, p.233-241, 2004.

CHU, C.R.; DOUNCHIS, J.S.; YOSHIOKA, M.; SAH, M.; COUTTS, R.D.; AMIEL, D. Osteochondral repair using perichondral cells. A one-year study in rabbits. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.340, p.220-229, 1997.

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

COSTA, J.L. **Reconstrução de grande falha óssea com enxerto cortical alógeno conservado em glicerina, fixado com placas e parafusos de aço inoxidável da série 304 – Estudo experimental em cães**. 1996. 100f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

CRMV-MG. Eutanásia: resolução do CFMV institui normas e procedimentos para eutanásia em animais. **Veterinária e Zootecnia em Minas Gerais**, v.17, n.75, p.25, 2002.

DALECK, C.R.; DALECK, C.L.M.; PADILHA FILHO, J.G.; ALESSI, A.C.; COSTA NETO, J.M. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n. 2, p.179-183, 1992.

DALECK, C.R. **Reparação cirúrgica da “Pars Musculares” do diaphragma por ligamento nucal xenólogo conservado em glicerina a 98%**. Estudo experimental em cães (*Canis familiares-Linnaeus*, 1758), 1999. 91 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

DEL CARLO, R.J.; PINHEIRO, L.C.P.; MONTEIRO, B.S.; SILVA, P.S.A.; VIANA, V.W. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.14, n.2, p.204-215, 2007.

FIALKOV, J.A.; HOLY, C.E.; SHOICHET, M.S.; DAVIES, J.E. In vivo bone engineering in a rabbit femur. **The Journal of Craniofacial Surgery**, Florida, v.14, n.3, p.324,332, 2003.

FRAZILIO, F.O.; ROSSI, R.; NETO, J.M.N.; FACCOL, G.G.; OVANDO, T.M.; FIALHO, M.P.F. Utilização do poliuretano de mamona em técnica alternativa de correção cirúrgica da luxação medial de patela em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.21, n.4, p. 74-79, 2006.

FRENKEL, S.R.; BRADICA, G.; BREKKE, J.H.; GOLDMAN, S.M.; IESKA, K.; ISSACK, P.; BONG, M.R.; TIAN, H.; GOKHALE, J.; COUTTS, R.D.; KRONENGOLD, R.T. Regeneration of articular cartilage. Evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. **Osteoarthritis and Cartilage**, California, v.13, n.9, p.798-807, 2005.

FRESNEY, R.I. **Cultures of animal cells: a manual of basic technique**.3. ed. New-York: Wiley-Liss, 2001, 496p.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIO, I.I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, New York, v.16, n.3, p.381-90, 1966.

FRIEDENSTEIN, A.J.; DERIGLASOVA, U.F.; KULAGINA, N.N.; PANASUK, A.F.; RUDAKOWA, S.F.; LURIA, E.A.; RUADKOW, I.A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Experimental Hematology**, Washington, v.2, n.2, p.83-92, 1974.

FRISBIE, D.D.; TROTTER, G.W.; POWERS, B.E.; RODKEY, W.G.; STEADMAN, J.R.; HOWARD, R.D.; PARK, R.D.; MCILWRAITH, C.W. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v.28, n.4, p.242-255, 1999.

FURUKAWA, T.; EYRE, D.R.; KOIDE, S.; GLIMCHER, M.J. Biomechanical studies on repair cartilage resurgacing experimental defects in the rabbit knee. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.62-A, n.1, p.79-89, 1980.

GHIVIZZANI, S.C.; OLIGINO, T.J.; ROBBINS, P.D.; EVANS, C.H. Cartilage injury and repair. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, Missouri, v.11, n.2, p.289-307, 2000.

GHOSH-CHOUDHURY, N.; CHOUDHURY, G.G.; HARRIS, M.A.; WOZNEY, J.M.; MUNDY, G.R.; ABOUD, S.L.; HARRIS, S.E. Autoregulation of mouse BMP-2 gene transcription is directed by the proximal promoter element. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Florida, v.286, n.1, p.101-108, 2001.

GOBBI, A.; NUNAG, P.; MALINOWSKI, K. Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, Luxembourg, v.13, n.3, p.213-221, 2005.

HANADA, K; DENNIS, J.E.; CAPLAN, A.I. Stimulatory effect of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.12, n.10, p.1606-1614, 1997.

HE, T. The osteogenic activity of 14 types of bone morphogenic proteins implications in bone regeneration and spine fusion. **The Spine Journal**, London, v.2, n.5, p.87, 2002.

HU, Y.; LIAO, L.; WANG, Q.; MA, L.; MA, G.; JIANG, X.; ZHAO, R.C. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Milwaukee, v.141, n.5, p.342-349, 2003.

HUSS, R.; HOY, C.A.; DEEG, H.J. Contact- and growth factor-dependent survival in a canine marrow-derived stromal cell line. **Blood**, Washington, v.85, n.9, p.2414-2421, 1995.

HYMAN, J.; RODEO, S.A. Injury and repair of tendons and ligaments. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, Missouri, v.11, n.2, p.267-288, 2000.

IM, G.I.; KIM, D.Y., SHIN, J.H.; HYUN, C.W.; CHO, W.H. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.83-B, n.2, p.289-294, 2001.

INDRAWATTANA, N.; CHEN, G.; TADOKORO, M.; SHANN, L.H.; OHGUSHI, H.; TATEISHI, T.; TANAKA, J.; BUNYARATVEJ, A. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. **Biomechanical and Biophysical Research Communications**, Florida, v.320, n.3, p.914-919, 2004.

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

ISHAUG, S.L.; CRANE, G.M.; MILLER, M.J.; YASKO, A.W.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, Georgetown, v.36, n.1, p.17-28, 1997.

JANEWAY, C.A. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002, p.549-557.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C.D.; ORTIZ-GONZALES, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD,

M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W.C.; LARGAESPADA, D.A.; VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, New York, v. 418, n.6893, p.41-49, 2002.

JONES, E.A.; KINSEY, S.E.; ENGLISH, A.; JONES, R.A.; STRASZYNSKI, L.; MEREDITH, D.M.; MARKHAM, A.F.; JACK, A.; EMERY, P.; MCGONAGLE, D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. **Arthritis e Rheumatism**, New Jersey, v.46, n.12, p.3349-3360, 2002.

JORGENSEN, C.; NOEL, D.; APPARAILLY, F.; SANY, J. Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Stanford, v.60, n.4, p.305-309, 2001.

KIRKER-HEAD, C.A. Recombinant bone morphogenetic proteins: novel substances for enhancing bone healing. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v.24, n.5, p.408-419, 1995.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 35, n.3, p. 232-242, 2006.

LANE, J.M.; BRIGHTON, C.T.; OTTENS, H.R.; LIPTON, M. Joint resurfacing in the rabbit using an autologous osteochondral graft. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.59-A, n.2, p.218-222, 1977.

LANE, J.M.; YASKO, A.W.; TOMIN, E.; COLE, B.J.; WALLER, S.; BROWNE, M. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.361, p2245-2253, 1999.

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

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. Tratamento periodontal regenerativo. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p.428-462.

LINDHOLM, T.S.; GAO, T.G. Functional carriers for bone morphogenetic proteins. **Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Fenniae: Supplementum**, Helsinki, v.207, p.3-12, 1993.

LIPOWITZ, A.J.; NEWTON, C.D. Degenerative joint Disease and Traumatic Arthritis. **International Veterinary Information Service**, New York, 1985. Disponível em: www.ivis.org.

LUNDE, K.; SOLHEIM, S.; AUKHUS, S.; ARNESEN, H.; ABDELNOOR, M.; EGELAND, T.; ENDRESEN, K.; ILEBEKK, A.; MANGSCHAU, A.; FJELD, J.G.; SMITH, H.J.; TARALDSRUD, E.; GROFAARD, H.K.; BJORNERHEIN, R.; BREKKE, M.; MÜLLER, C.; HOPP, E.; RAGNARSSON, A.; BRINCHMANN, J.E.; FORFANG, K. Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts v.355, n.12, p.1199-1209, 2006.

MARTIN, D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**, Washington, v.30, n.8, p.879-886, 2002.

MAUNEY, J.R.; VOLLOCH, V.; KAPLAN, D.L. Role of Adult Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue-Engineering Applications: Current Status and Future Prospects. **Tissue Engineering**, New York, v.11, n.5/6, p.787-802, 2005.

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

MELO, E.G.; REZENDE, C.M.F.; BORGES, A.P.B.; NOBREGA NETO, P.I. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tíbia de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 4, p. 385-94, 1998.

MURAKAMI, N.; SAITO, N.; HORIUCHI, H.; OKADA, T.; NOZAKI, K.; TAKAOKA, K. Repair of segmental defects in rabbit humerus with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer. **Journal of Biomedical Materials Research**, Georgetown, v.62, n.2, p.169-174, 2002.

MURPHY, M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B.; BARRY, F.P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis Rheumatism**, New Jersey, v.48, n.12, p.1161-1166, 2003.

NISHIMORI, M.; DEIE, M.; KANAYA, A.; EXHAM, H.; ADACHI, N.; OCHI, M. Repair of chronic osteochondral defects in the rat. A bone marrow-stimulating procedure enhanced by culture allogenic bone marrow mesenchymal stromal cells. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.88B, n.9, p.1236-1244, 2006.

OCHI, M.; UCHIO, Y.; KAWASAKI, K.; WAKITANI, S.; IWASA, J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.84-B, p.571-578, 2002.

OCHI, M.; UCHIO, Y.; TOBITA, M.; KURIWAKA, M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. **Artificial Organs**, Milão, v.25, n.3, p.172-179, 2001.

OLSSON, D.C.; PIPPI, N.L.; MARTINS, D.B.; TOGNOLI, G.K.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; MULLER, D.C.; LOPES, S.T.A.; MARCONATO, F.; MÖRCHBÄCHER, P.D.;

TEIXEIRA, L.V. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células mononucleares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.141-147, 2009.

OSBORNE, A.C.; CARTER, S.D.; MAY, S.A., BENNETT, D. Anti-collagen antibodies and immune complexes in equine joint disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Missouri, v.45, n.1 p.19-30, 1995.

PARKER, R.B. Establishment of a bone bank. In:_____. BOJRAB, M.J. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p.685-688.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem Cells**, Ohio, v.25, n.11, p.2896-2902, 2007.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Enxertos ósseos. In:_____. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1999. p.139-145.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.

PINTO JÚNIOR, H.S.; ALVARENGA, J.; IWASAKI, M. Enxertos ósseos homólogos preservados em glicerina a 98%. Técnica de enxertia e avaliação clínico-cirúrgica. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n.92, p.72-76, 1996.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Pennsylvania, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.

PONTICIELLO, M.S.; SCHINAGL, R.M.; KADIYALA, S.; BARRY, F.P. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. **Journal of Biomedical Materials Research**, Georgetown, v.52, n.2, p.246-255, 2000.

POUNTOS, I; GIANNOUDIS, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury**, New York, v.36, n.3, p.S8-S12, 2005.

PULEO, D.A. Dependent of mesenchymal cell response on duration of exposure to bone morphogenetic protein-2 in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, California, v.173, n.1, p.93-101, 1997.

RABELO, R.E.; PAULO, N.M.; SILVA, L.A.F.; ROMANI, A.F.; VIANA FILHO, P.R.L.; VERÍSSIMO, A.C.C. Uso de centro frênico diafragmático na correção de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v.9, n.1, p.269-271, 2002.

RIBEIRO, J.L.; CAMANHO, G.L.; TAKITA, L.C. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.12, n.1, p.16-21, 2004.

RINGE, J.; KAPS, C.; SCHMITT, B.; BUSCHER, K.; BARTEL, J.; SMOLIAN, H., SCHULTZ, O.; BURMESTER, G.R.; HAUPL, T.; SITTINGER, M. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. **Cell and Tissue Research**, London, v.307, n.3, p.321-327, 2002.

ROE, S.C.; PIJANOWSKI, G.J.; JOHNSON, A.L. Biomechanical properties of canine cortical bone allografts: effects of preparation and storage. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.49, n.6, p.873-877, 1988.

ROELEN, B.A.J.; DIJKE, P.T. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members. **Journal of Orthopaedic Science**, Tokyo, v.8, n.5, p.740-748, 2003.

SALTER, R.B.; SIMMONDS, D.F.; MALCOLM, B.W.; RUMBLE, E.J.; MACMICHAEL, D.; CLEMENTS, N.D. The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.62-A, n.8, p.1232-1251, 1980.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar. Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.13-19, 2005.

SELLERS, R.S.; ZHANG, R.; GLASSON, S.S.; KIM, H.D.; PELUSO, D.; D'AUGUSTA, D.A.; BECKWITH, K.; MORRIS, E.A. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.82, n.2, p.151-160, 2000.

SHAKE, J.G.; GRUBER, P.J.; BAUMGARTNER, W.A.; SENECHAL, G.; MEYERS, J.; REDMOND, J.M.; PITTENGER, M.F.; MARTIN, B.J. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. **The Annals of Thoracic Surgery**, Boston, v.73, n.6, p.1919-1925, 2002.

SHORT, B.; BROUARD, N.; OCCHIODORO-SCOTT, T.; RAMAKRISHNAM, A.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells. **Archives of Medical Research**, New York, v. 34, n.6, p. 567-571, 2003.

SIMMONS, D.J.; SEITZ, P.; KIDDER, L; KLEIN, G.L.; WAELTZ, M.; GUNDBERG, C.M.; TABUCHI, C.; YANG, C.; ZHANG, R.W. Partial characterization of rat marrow stromal cells. **Calcified Tissue International**, New York, v.48, n.5, p.326-334, 1991.

STASHAK, T.S. **Claudicação em eqüinos segundo Adams**. 4 ed. São Paulo: Roca, 1994. 943p.

STEVENSON, S.; HOROWITZ, M. Current concepts review the response to bone allografts. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.74A, n.6, p.939-950, 1992.

THIES, R.S.; BAUDUY, M.; ASHTON, B.A.; KURTZBERG, L.; WOSNEY, J.N.; ROSEN, V. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in w-20-17 stromal cells. **Endocrinology**, v.130, n.3, p.1318-1324, 1992.

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

TOH, W.S.; LIU, H.; HENG, B.C.; RUFAlHAH, A.J.; YE, C.P.; CAO, T. Combined effects of TGF β 1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. **Growth Factors**, London, v. 23, n. 4, p. 313-321, 2005.

TOMFORD, W.W.; MANKIN, H.J. Bone banking: Update on methods and materials. **The Orthopedic Clinics of North America**, Philadelphia, v.30, n.4, p.565-570, 1999.

TORIUMI, D.M.; ROBERTSON, K. Bone inductive biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery. **Facial Plastic Surgery**, Chicago, v.9, n.1, p.29-36, 1993.

TSUMAKI, N.; YOSHIKAWA, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. **Citokynes & Growth Factor Reviews**, Montreal, v.16, n.3, p.279-285, 2005.

TULAMO, R.M.; HOUTTU, J.; TUPAMAÄKI, A.; SALONEN, M. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with varos arthrides. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.57, n.6, p.932-937, 1996.

VAN BEUNINGEN, H.M.; GLANSBEEK, H.L.; VANDER KRAAN, P.M.; VAN DEN BERG, W.B. Osteoarthritis like change in the murine knee joint resulting from intraarticular TGF β injections. **Osteoarthritis and Cartilage**, California, v.8, n.1, p.25-33, 2000.

VELLOSO, G.R. Rigidez articular. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasília, v.3, n.1, p.141-144, 2005.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.J.; YOUNG, R.G.; MANSOUR, J.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.76, n.4, p.579-592, 1994.

WAN, M.; CAO, X. BMP signaling in skeletal development. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, Florida, v.328, n.3, p.651-657, 2005.

WANG, L.; LI, Y.; CHEN, X.; CHEN, J.; GAUTAM, S.C.; XU, Y.; CHOPP, M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. **Hematology**, Amsterdam, v.7, n.2, p.113-117, 2002.

WEI, S.Y.; BORN, C.T.; ABENE, A.; ONG, A.; HAYDA, H.; DELONG, W.G. Diaphyseal forearm fractures treated with and without bone graft. **The Journal of Trauma**, Baltimore, v.46, n.6, p.1045-1048, 1999.

WOZNEY, J.M.; ROSEN, V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v.346, p.26-37, 1998.

YANAI, T.; ISHII, T.; CHANG, F.; OCHIAI, N. Repair of large full-thickness articular cartilage defects in the rabbit. The effects of joint distraction and autologous bone-marrow-derived mesenchymal cell transplantation. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Massachusetts, v.87B, n.5, p.721-729, 2005.

APÊNDICE

A. Fontes de aquisição dos materiais da pesquisa

- ¹ Paquímetro graduado. Produzido por Worker distribuído por FNCL. Brasil.
- ² Free-Bac[®]. Importado por Embramac Indústria de Comércio e Importação e Exportação. Itajaí, SC. Brasil.
- ³ Dremel[®] (EUA). Importado por Robert Bosch. Campinas, SP. Brasil.
- ⁴ Cloreto de Sódio 0,9%. Sanobiol. Pouso Alegre, MG. Brasil.
- ⁵ Glicerina 98%. Indústria Rioquímica, São José do Rio Preto, SP. Brasil.
- ⁶ Chemitec[®]. Chemitec Agro-Veterinária. São Paulo, SP. Brasil.
- ⁷ Cetamin[®]. Syntec. Patrocínio Paulista, SP. Brasil.
- ⁸ Kensol[®]. Kong. Santana de Parnaíba, SP. Brasil.
- ⁹ Tramal. União Química Farmacêutica Nacional. Pouso Alegre, MG. Brasil.
- ¹⁰ Banamine[®] Injetável. Schering-Plough Saúde Animal Indústria e Comércio. Cotia, SP. Brasil.
- ¹¹ Cezolin[®]. BioChimico. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ¹² Biotrat Iodopovidona solução degermante. LMFarma Indústria e Comércio. São José dos Campos, São Paulo, SP. Brasil.
- ¹³ Álcool 70°GL. Minasçúcar. Santa Rosa de Viterbo, São Paulo, SP. Brasil.
- ¹⁴ Riodine. Rioquímica Indústria Farmacêutica. São Jose do Rio Preto, SP. Brasil.
- ¹⁵ Agulha metálica de Rosenthal. Ecomed Comércio de Produtos Médicos. Catete, Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ¹⁶ Liquemine[®]. Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ¹⁷ Capela de fluxo laminar. Lupe Indústria e Comércio. São Paulo, SP. Brasil.
- ¹⁸ Tubo Falcon. CRAL artigos para laboratórios. Cotia, SP. Brasil.
- ¹⁹ Dulbecco's Phosphated Buffered Saline[®] (DPBS). Gibco[®] Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²⁰ Ficoll-Hypaque Plus[®]. Amersham Biosciences do Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²¹ Legend Mach 1.6R Sorvall. Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA. EUA.
- ²² Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Gibco[®]. Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²³ Fetal Bovine Serum. Gibco[®]. Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²⁴ Gibco BRL Life Technologies, Inc., Grand Island, Nova York, EUA.
- ²⁵ Câmara para contagem de células. Interlab distribuidora de produtos científicos. São

- Paulo, SP. Brasil.
- ²⁶ Eppendorf. CRAL artigos para laboratórios. Cotia, SP, Brasil.
- ²⁷ Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. Gibco®. Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²⁸ Ácido acético glacial P.A. Chemco Indústria e Comércio. Campinas, SP. Brasil.
- ²⁹ Vicryl 4-0. Ethicon. São Paulo, SP. Brasil.
- ³⁰ Nylon 3-0. Polysuture Indústria e Comércio. São Sebastião do Paraíso, MG. Brasil.
- ³¹ Rifocina spray. Hoechst Marion Roussel. Suzano, SP. Brasil.
- ³² Tiopental sódico 2,5%. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Campinas, SP. Brasil.
- ³³ Cloreto de potássio 10%. Darrow Laboratórios. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ³⁴ Formol 10%. Start Química. Uberlândia, MG. Brasil.
- ³⁵ Ácido nítrico. Chemco Indústria e Comércio. Campinas, SP. Brasil.
- ³⁶ Xilol. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ³⁷ Hematoxilina-Eosina. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ³⁸ Tricrômio Mallory. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ³⁹ Microscópio de luz Polyvar. Reichert Microscope Services. New York, EUA.