

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**LARISSA FERREIRA MAMEDE**

**MODELO EXPERIMENTAL PARA REPARAÇÃO DE CARTILAGEM  
ARTICULAR UTILIZANDO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

**UBERLÂNDIA**

**2022**

LARISSA FERREIRA MAMEDE

MODELO EXPERIMENTAL PARA REPARAÇÃO DE CARTILAGEM ARTICULAR  
UTILIZANDO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Geison Morel Nogueira

UBERLÂNDIA

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M264 2022	<p>Mamede, Larissa Ferreira, 1996- MODELO EXPERIMENTAL PARA REPARAÇÃO DE CARTILAGEM ARTICULAR UTILIZANDO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS [recurso eletrônico] / Larissa Ferreira Mamede. - 2022.</p> <p>Orientador: Geison Morel Nogueira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.268">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.268</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Nogueira, Geison Morel,2022-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE Mestrado Acadêmico nº PPGCVET/009/2022				
Data:	30 de maio de 2022	Hora de início:	13:15	Hora de encerramento:	16:25
Matrícula do Discente:	12012MEV008				
Nome do Discente:	<b>LARISSA FERREIRA MAMEDE</b>				
Título do Trabalho:	MODELO EXPERIMENTAL PARA REPARAÇÃO DE CARTILAGEM ARTICULAR UTILIZANDO GEL DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA, CIRURGIA E MORFOLOGIA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	TÉCNICAS ANESTÉSICAS, CIRÚRGICAS E DE REPARAÇÃO TECIDUAL NA MEDICINA VETERINÁRIA				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Francisco Cláudio Dantas Mota - UFU; Gregório Corrêa Guimarães - UFLA; Geison Morel Nogueira** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Geison Morel Nogueira apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Geison Morel Nogueira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/05/2022, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Claudio Dantas Mota, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/05/2022, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **GREGÓRIO CORREA GUIMARÃES, Usuário Externo**, em 31/05/2022, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3633488** e o código CRC **8FC36020**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelas bênçãos concedidas e por iluminar o meu caminho.

Agradeço aos meus pais Afonso de Oliveira Mamede Júnior e Angela Maria Ferreira Mamede, e à minha irmã Karina Ferreira Mamede, pelo apoio e motivação diária. Ao meu namorado Adriano Carlos de Oliveira Costa, que acompanhou toda minha trajetória e me incentivava nos momentos de dificuldades.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Geison Morel Nogueira, por todo acompanhamento e por estar sempre a postos, mesmo quando os prazos não estavam ao nosso favor.

Agradeço aos residentes do Hospital Veterinário da UFU, especialmente à Nayne Vieira da Silva que me ajudou diretamente na execução do experimento.

Agradeço também aos professores Dr. Marcelo Emilio Beletti, que colaborou com a avaliação histológica do trabalho; Dr. João Paulo Elsen Saut, pelos conselhos e ajuda no laboratório; Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota e Dr<sup>a</sup> Mônica Horr que também colaboraram com parte do experimento.

Agradeço ainda à Dr<sup>a</sup> Jéssica Regina, por toda disponibilidade e por ajudar a solucionar questões de execução desse estudo.

Por fim, agradeço a todos que não foram mencionados, mas que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse concretizado.

## RESUMO

A cartilagem hialina é um componente fundamental para o bom funcionamento das articulações sinoviais. Com arquitetura complexa e lento metabolismo, após ser lesionada, sua regeneração é desafiadora. O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é uma opção terapêutica muito usada nas enfermidades musculoesqueléticas, por estimular o reparo tecidual e se tratar de um produto autólogo de fácil preparação. Objetiva-se com este estudo avaliar uma proposta de modelo experimental para reparo da cartilagem articular. Para tanto, utilizou-se a articulação femoropatelar de ovinos e abordagem terapêutica por meio de protocolo adaptado de gel de PRP. Foram utilizados 9 ovinos, os quais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de artrotomia femoropatelar lateral do membro pélvico esquerdo, execução da falha articular e posterior avaliação histológica. Além do piloto, os animais foram divididos em 4 grupos, entre tratados e controle e de acordo com o tempo de avaliação pós-operatória (GC I – animal controle, avaliado aos 30 dias; GC II – animais controle, avaliados aos 120 dias; GT I – animal tratado com PRP e avaliado aos 30 dias e GT II – animais tratados com PRP e avaliados aos 120 dias). Durante o procedimento cirúrgico, foi possível confirmar visualmente que o gel de PRP se manteve no local da falha articular nos animais dos grupos tratados. Na leitura das lâminas, atribuiu-se escores (0 = totalmente reparado; 1 = intensamente reparado; 2 = parcialmente reparado; 3 = fracamente reparado; 4 = ausência de reparo) para os seguintes parâmetros: preenchimento do defeito, predominância de condrócitos, organização de condrócitos, fixação do tecido de reparo ao osso subcondral e à cartilagem perimétrica e fibrilação superficial do tecido de reparo. Constatou-se que houve completa integração do tecido de reparo com o osso subcondral e com a cartilagem perimétrica, em todos os animais do experimento. Em todos os parâmetros os grupos GT I e GT II, apresentaram escore 0 ou 1. Conclui-se que a realização da falha articular na face medial da tróclea do fêmur em carneiros, pode ser usada como modelo experimental para análise de reparo de cartilagem articular que o gel de PRP tem capacidade reparativa da cartilagem articular de ovinos.

**Palavras-chave:** cartilagem hialina, joelho, ovinos, PRP.

## ABSTRACT

Hyaline cartilage is a fundamental component for the proper functioning of synovial joints. With complex architecture and slow metabolism, after being injured, its regeneration is challenging. Platelet Rich Plasma (PRP) is a therapeutic option widely used in musculoskeletal disorders, as it stimulates tissue repair and is an autologous product that is easy to prepare. The objective of this study is to evaluate a proposal for an experimental model for articular cartilage repair. For that, the patellofemoral joint of sheep was used and a therapeutic approach was used through an adapted protocol of PRP gel. Nine sheep were used, which underwent the surgical procedure of lateral patellofemoral arthrotomy of the left pelvic limb, execution of joint failure and subsequent histological evaluation. In addition to the pilot, the animals were divided into 4 groups, between treated and control and according to the time of postoperative evaluation (GC I – control animal, evaluated at 30 days; GC II – control animals, evaluated at 120 days; GT I – animal treated with PRP and evaluated at 30 days and GT II – animals treated with PRP and evaluated at 120 days). During the surgical procedure, it was possible to visually confirm that the PRP gel remained at the site of joint failure in the animals of the treated groups. When reading the slides, scores were assigned (0 = fully repaired; 1 = intensely repaired; 2 = partially repaired; 3 = weakly repaired; 4 = no repair) for the following parameters: defect filling, chondrocyte predominance, organization of chondrocytes, fixation of the repair tissue to the subchondral bone and perimetric cartilage, and superficial fibrillation of the repair tissue. It was found that there was complete integration of the repair tissue with the subchondral bone and with the perimetric cartilage in all animals in the experiment. In all parameters, the GT I and GT II groups presented a score of 0 or 1. It is concluded that the realization of joint failure on the medial surface of the trochlea of the femur in rams can be used as an experimental model for analysis of articular cartilage repair that the PRP gel has the ability to repair sheep articular cartilage.

**Keywords:** hyaline cartilage, knee, sheep, PRP.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Divisão dos grupos experimentais, de acordo com o tempo de pós-operatório. ....	25
<b>Tabela 2:</b> Pontuação histológica usada, para reparo da cartilagem articular (0 = totalmente reparado; 1 = intensamente reparado; 2 = parcialmente reparado; 3 = fracamente reparado; 4 = ausência de reparo). .....	31
<b>Tabela 3:</b> Escores de cada parâmetro identificados por grupo. ....	32

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Artrotomia femoropatelar. **A)** Incisão cirúrgica. **B)** Confeção do molde da lesão, utilizando um punch dermatológico de 7,0 mm. **C)** Escariação da falha com fresa de 4,8 mm. **D)** Falha articular. **E)** Artrorrafia. **F)** Animal após recuperação anestésica do procedimento cirúrgico, com bandagem no membro operado. .... 27
- Figura 2:** Incorporação do gel de PRP no defeito induzido da articulação femorotibiopatelar do membro pélvico esquerdo de um ovino. **A)** Alinhamento do gel de PRP na falha cirúrgica. **B)** Gel de PRP posicionado na ferida cirúrgica. .... 28
- Figura 3:** Preparação do PRP. **A)** Coleta de sangue nos tubos a vácuo de 4,5 mL com citrato de sódio 3,2 %. **B)** Tubos Falcon após primeira centrifugação. **C)** Amostras em descanso, após segunda centrifugação. **D)** Descarte de 75% do plasma sobrenadante. **E)** Coleta do plasma restante. **F)** PRP após geleificação em banho- maria. .... 30
- Figura 4:** Tecido neoformado, do GTII. **A)** Possível observar falha completamente preenchida, com integração do tecido neoformado com o original e arquitetura superficial lisa, sem desnivelamento entre os tecidos, em aumento de 4x, corado com HE. **B)** Presença de condrócitos, grupos isógenos e grupo isógeno múltiplo (seta preta), matriz densa e organizada, em aumento de 20x, corado com HE. .... 33
- Figura 5:** Tecido neoformado, do GC II. **A)** Possível observar área pouco preenchida, com fibrilação moderada e integração do tecido neoformado com o original, em aumento de 4x, corado com HE. **B)** Presença de fibras colágenas desorganizadas, fibroblastos e alguns condrócitos), em aumento de 20x, corado com HE. .... 34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- FCDP – Fator de crescimento derivado de plaquetas
- FCE – Fator de crescimento epidérmico
- FCEV – Fator de crescimento endotelial vascular
- FCF – Fator de crescimento fibroblástico
- FCF-2 – Fator de crescimento fibroblástico 2
- FCI – Fator de crescimento semelhante à insulina
- FCI-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1
- FCT-β – Fator de crescimento transformador beta
- FN-kB – Fator nuclear kappa B
- FNT-α – Fator de necrose tumoral alfa
- HE – Hematoxilina-Eosina
- IL-1β – Interleucina 1 beta
- IL-1ar – Antagonista do receptor de interleucina 1
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-8 – Interleucina 8
- IL-10 – Interleucina 10
- MEC – Matriz extracelular
- M/mm<sup>3</sup> – Metro por milímetro cúbico
- NO – Óxido nítrico
- O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular
- PMOs – Proteínas morfogenéticas ósseas
- PMO-2 – Proteína morfogenética óssea 2
- PRP – Plasma Rico em Plaquetas
- RTT – Receptores do tipo Toll

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Articulações</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Cartilagem articular</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3 Lesões na cartilagem articular</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3.1 Resposta à lesão</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3.2 Diagnóstico</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3.3 Tratamentos</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3.3.1 Técnica de estimulação da medula óssea</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3.3.2 Enxerto osteocondral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3.3.3 Implantação de condrócitos ou tecido cartilaginoso</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3.3.4 Fatores de crescimento cartilágneo</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4.1 Obtenção e preparação</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5 Anatomia do joelho de ovinos</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6 Modelos de experimentação para reparo de cartilagem articular</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7 Histologia do tecido cartilágneo</b> .....	<b>24</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Animais e manejo</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Procedimento cirúrgico</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Preparação do PRP</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4 Coleta de material e preparação das lâminas histológicas</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5 Análise histológica</b> .....	<b>31</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cartilagem hialina é um componente essencial para o bom funcionamento das articulações sinoviais. As características das suas quatro camadas (zona superficial, intermediária, profunda e calcificada) permitem suportar o cisalhamento e as forças axiais que atuam nas juntas (ALFORD; COLE, 2005; HAYES JÚNIOR et al., 2001).

Diante de sua arquitetura complexa e do lento metabolismo, após ser lesionado, sua cicatrização ou regeneração é desafiadora (ALFORD; COLE, 2005; HAYES JÚNIOR et al., 2001; MITHOEFER et al., 2009).

As causas das lesões da cartilagem articular do joelho geralmente são multifatoriais, incluindo ação mecânica, seja de forma súbita ou insidiosa, por mecanismos degenerativos e através de doenças metabólicas, resultando em dor e inflamação na região (HAYES JÚNIOR et al., 2001; RATH et al., 2017).

Após sofrer injúria, a resposta celular cartilaginosa dependerá da gravidade e profundidade da área danificada (ALFORD; COLE, 2005). Em lesões superficiais, ocorrerá a proliferação dos condrócitos e estes aumentarão a síntese de macromoléculas da matriz na região, mas esta ação não é capaz de restaurar a superfície articular (MANKIN, 1982). Já em lesões mais profundas, ao atingir o osso subcondral, o suprimento sanguíneo deste, permitirá a migração de células pluripotentes e assim estimulará a formação de tecido fibrocartilaginoso, desta forma, pode ocorrer a cicatrização espontânea da cartilagem (HAYES JÚNIOR et al., 2001).

A fibrocartilagem é um tecido menos durável e apresenta superfície irregular, ou seja, de qualidade inferior à original (HAYES JÚNIOR et al., 2001). Além disso, caso não ocorra uma boa resposta celular da cartilagem lesionada, esta pode evoluir para uma condição de osteoartrite (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019).

Os tratamentos conservadores existentes amenizam os sintomas, no entanto, não são capazes de promover a regeneração da cartilagem articular (MCCORMICK et al., 2008). Desta forma, busca-se desenvolver constantemente técnicas cirúrgicas que sejam eficazes para reparar esta estrutura, de forma a suportar tensões articulares a longo prazo (MITHOEFER et al., 2009).

Dentre as principais opções cirúrgicas para o tratamento da lesão condral, encontram-se as técnicas de estimulação da medula óssea, as de enxerto osteocondral, as de reparo celular, a implantação de neocartilagem e o uso de fatores de crescimento (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019; MITHOEFER et al., 2009).

Os modelos animais são fundamentais para se testar técnicas de reparo da cartilagem articular. Várias espécies já foram utilizadas na experimentação, com execução de defeitos na cartilagem articular de estruturas como a tróclea ou côndilo femoral (LOTZ et al., 2021). Contudo, os resultados experimentais do reparo são afetados pela localização da lesão na articulação, em função das características biológicas e da biomecânica da região, que permite melhor fixação do implante (DWIVEDI et al., 2021; LOTZ et al., 2021).

O PRP é uma opção terapêutica de ação celular, muito usada nas enfermidades musculoesqueléticas, por sua alta concentração em plaquetas, que fornece fatores de crescimento para estimular o reparo tecidual (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; RUIZ-SANTIAGO; GARCÍA-ESPINOSA, 2018; WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016), e por se tratar de um produto autólogo de fácil preparação (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013).

O PRP, além de possuir ação regenerativa da cartilagem, também apresenta potencial anti-inflamatório, reduz os sintomas da osteoartrite e melhora a função da articulação como um todo (XIE; ZHANG; TUAN, 2014). No entanto, apesar das evidências científicas a favor do seu uso, ainda há achados controversos sobre os benefícios de sua aplicação, pois promove a formação de fibrocartilagem ao invés de cartilagem hialina (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013; FILARDO et al., 2015).

Assim, objetiva-se com este trabalho avaliar uma proposta de modelo experimental para reparo da cartilagem articular, utilizando-se a articulação femoropatelar de ovinos e abordagem terapêutica por meio de protocolo adaptado de gel de PRP.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Articulações**

As articulações podem ser classificadas de acordo com o meio de união ou tecido interposto em: fibrosas, cartilagueas ou sinoviais. Essas possuem a função de manter unidos os segmentos do esqueleto, enquanto permite a sua movimentação (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2014).

A articulação sinovial é a que possibilita maior amplitude de movimento (MOW; HUNG, 2003). É composta basicamente por cinco elementos essenciais: superfície articular formada por camadas de osso compacto nas epífises (osso cortical) e destinada ao contato com próximo segmento do esqueleto; cartilagem articular que reveste a superfície articular, sendo formada por cartilagem hialina, desnervada, avascular e com baixo coeficiente de

atrito; cápsula articular que envolve a articulação, mantendo unidas as extremidades ósseas que se articulam, sendo formada por uma membrana interna/sinovial e outra externa/fibrosa; cavidade articular que é o espaço delimitado pela cápsula articular; e por último pelo líquido sinovial que ocupa o espaço delimitado pela cápsula articular à semelhança da clara de ovo, razão pela qual recebe o nome de sinóvia (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2014). Além dos componentes essenciais, as articulações sinoviais apresentam elementos acessórios como os ligamentos, os discos e meniscos articulares, os coxins adiposos e os lábios ou cartilagens marginais.

## **2.2 Cartilagem articular**

A cartilagem hialina das articulações é uma fina camada de tecido conjuntivo, denso, branco e translúcido. Apresenta baixa celularidade, e é desprovida de inervação, de vasos sanguíneos e linfáticos (MOW; HUNG, 2003). Portanto, recebem os nutrientes dos capilares da membrana sinovial, através do líquido sinovial da cavidade articular, e por difusão do osso subcondral (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A cartilagem articular é formada por matriz extracelular (MEC) e condrócitos dispersos (ALFORD; COLE, 2005). Os condrócitos são células responsáveis por produzirem e secretarem os componentes da MEC (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A matriz corresponde a cerca de 95 % do volume tecidual, composta predominantemente por colágeno tipo II e quantidades menores de colágeno tipo V, VI, IX, X, XI, XII e XIV (ALFORD; COLE, 2005). Além dos componentes fibrosos, a MEC contém proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, sais inorgânicos, lipídios e água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Sua estrutura é especializada, moldada para suportar e distribuir as cargas em maior área e minimizar o atrito nas superfícies articulares, associadas a diferentes posições e atividades do corpo (ALFORD; COLE, 2005; MOW; HUNG, 2003). Isso ocorre por ter composição viscoelástica, que resulta em uma resposta fluido viscoso e sólido elástico (MOW; HUNG, 2003).

Esta cartilagem é dividida em quatro zonas, de acordo com sua composição e arquitetura, para desempenhar determinada função. A zona superficial é formada por uma camada de fibras colágenas compactadas (colágeno tipo IX, entre feixes do colágeno tipo II), sobre uma camada de condrócitos achatados, que promove resistência durante o cisalhamento e protege as camadas mais profundas. Além disso, acredita-se que tem a função de restringir a

passagem de moléculas do líquido sinovial para a cartilagem (ALFORD; COLE, 2005).

A zona intermediária é formada principalmente por condrócitos esféricos, proteoglicanos e fibras de colágeno apresentados de forma oblíqua, para resistir às cargas compressivas e colaborar com a zona superficial, contra o cisalhamento (ALFORD; COLE, 2005).

Já a zona profunda é composta também por fibras de colágeno e condrócitos, no entanto, orientadas de forma perpendicular a superfície articular, para suportar a compressão (ALFORD; COLE, 2005).

Por fim, a camada calcificada, promove adesão da cartilagem articular ao osso subcondral. Injúrias em qualquer porção da cartilagem articular podem prejudicar as propriedades biomecânicas, acarretando degeneração subsequente (ALFORD; COLE, 2005).

As ligações eletrostáticas entre os glicosaminoglicanos sulfatados e o colágeno, conferem rigidez à cartilagem, enquanto a água de solvatação das moléculas dos proteoglicanos funciona como um amortecedor da cartilagem articular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Desta forma, sob pressão mecânica a água extravasa para o líquido sinovial e propicia a repulsão eletrostática, entre os grupos carboxilas e sulfato dos glicosaminoglicanos, que apresentam carga elétrica negativa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Esta repulsão promove o distanciamento dos glicosaminoglicanos, formando espaços que serão preenchidos pela água, quando a pressão cessar. O retorno da água é essencial também para o transporte de nutrientes até a cartilagem e trocas gasosas (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) entre a cartilagem e o líquido sinovial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

### **2.3 Lesões na cartilagem articular**

As lesões na cartilagem articular podem ser causadas por mais de um fator, incluindo mecanismos traumáticos e degenerativos (RATH et al., 2017). Os traumas podem ocorrer por desgaste interfacial ou desgaste de fadiga. O primeiro trata-se de desgaste ocorrido pelo contato direto entre superfícies de apoio, enquanto o segundo se refere ao acúmulo de danos dentro do tecido de apoio sob estresse repetitivo (MOW; HUNG, 2003).

Além de traumas a longo prazo, a cartilagem articular também pode ser danificada por carga de impacto, ou seja, por uma rápida aplicação de alta carga (MOW; HUNG, 2003). Desta forma, essas lesões, resultam em degeneração da cartilagem articular saudável circundante e podem evoluir para uma osteoartrite. Por isso, há necessidade de tratamento



para reparar o tecido (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019; RATH et al., 2017).

### **2.3.1 Resposta à lesão**

A função e estrutura da cartilagem articular podem ser afetadas mesmo em lesões superficiais (ALFORD; COLE, 2005). Neste caso, ocorre intensa atividade mitótica na cartilagem adjacente, para síntese de condrócitos e componentes da matriz. Essa ação perdura apenas por alguns dias após a lesão, não sendo eficaz na reparação do tecido (MANKIN, 1982).

Quando a lesão envolve o osso subcondral, haverá formação de coágulo de fibrina, rico em glóbulos vermelhos e brancos, e células indiferenciadas da medula óssea, que irão formar um tecido fibrocartilaginoso, e por fim haverá uma resposta sintética na margem da lesão, assim como ocorre em lesões superficiais, com diminuição subsequente de condrócitos e da sua atividade metabólica (HAYES JÚNIOR et al., 2001; MANKIN, 1982).

Essa ação acarretará na redução de proteoglicanos, aumento da permeabilidade hídrica e menor rigidez do tecido. Desta forma, as cargas serão transmitidas ao osso subjacente, que aumentará sua rigidez e conseqüentemente transmitirá as cargas de impacto à cartilagem danificada, resultando em um círculo vicioso que culminará em... (ALFORD; COLE, 2005).

A resposta molecular à lesão de cartilagem articular, é basicamente inflamatória, incluindo principalmente os condrócitos e o líquido sinovial, e quando não controlada resulta em osteoartrite pós-traumática (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019). Na fase aguda, após injúria, as citocinas do tecido circundante e do líquido sinovial, IL-1 $\beta$  e FNT- $\alpha$ , se ligam aos seus receptores, estimulando a alta produção de mediadores inflamatórios (IL-6, IL-8 e NO), de enzimas degradantes da matriz e contribuindo para ativação do fator nuclear FN-kB (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019). Além dessas moléculas, nesse tecido e na sinóvia, também se encontram as citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4 e IL-1ar (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019).

Na fase subaguda, ocorrerá a liberação de alarminas pelos condrócitos mortos e pelas células imunes ativas, que vão se ligar aos receptores RTTs, e estes aumentarão a estimulação das vias de sinalização, para o início de respostas imunes inatas e adaptativas (NEFLA et al., 2016). Com isso, pode haver início de reparo tecidual ou inflamação adicional, que neste caso, provocará degradação da cartilagem (NEFLA et al., 2016).

Nesta fase, há o envolvimento de osteócitos, metaloproteinases, agreganases, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e fator de crescimento endotelial vascular, que quando não

regulados acarretarão angiogênese, surgimento de osteófitos, morte celular adicional e avanço da degeneração articular (NEFLA et al., 2016).

### ***2.3.2 Diagnóstico***

O principal sintoma quando há lesão em cartilagem articular, é dor difusa ao movimento, e menos comumente, dor localizada durante a palpação e edemaciação articular (RATH et al., 2017). Em casos de lesões leves, pode ser inclusive, assintomática (ALFORD; COLE, 2005).

Para o diagnóstico, além da anamnese e exame físico, indica-se exames complementares de imagem como radiografia, ressonância magnética, até mesmo a ultrassonografia para avaliação da superfície articular nos animais. A artroscopia e a análise do líquido sinovial também podem ser solicitadas. É necessário, ainda, a identificação de diagnósticos diferenciais, além de estabelecer o prognóstico ao paciente (ALFORD; COLE, 2005; RATH et al., 2017; WANG et al., 2014).

### ***2.3.3 Tratamentos***

#### ***2.3.3.1 Técnica de estimulação da medula óssea***

A estimulação da medula óssea é realizada através da técnica de microfratura, que consiste em micropenetração do osso subcondral (FRISBIE et al., 2003). Ao realizar este procedimento, o local da lesão na cartilagem será preenchido por coágulo sanguíneo, repleto de células-tronco mesenquimais localizadas no interior dos ossos em associação aos capilares sanguíneos do osso trabecular (DWIVEDI et al., 2021; FRISBIE et al., 2003; MAKRIS et al., 2015; ROCHA JÚNIOR et al., 2016).

A técnica de microfratura se tornou comum entre os tratamentos realizados para defeitos de cartilagem da articulação do joelho em humanos, por ser considerada pouco invasiva, por não ocasionar outras complicações e por possibilitar rápida recuperação do paciente no pós-operatório (MITHOEFER et al., 2009). Entretanto, a técnica resulta em produção de fibrocartilagem ao invés de cartilagem hialina, que pode sofrer degradação decorridos dois anos de intervenção cirúrgica (MAKRIS et al., 2015).

Apesar dessa condição, estudos recentes demonstraram que essas células-tronco pluripotentes, resultantes da microfratura, apresentam alto potencial de diferenciação

condrogênica. Desta forma, justifica-se a utilização da técnica, associada com outros procedimentos, como adição de fatores de crescimento (NEUMANN et al., 2008).

#### 2.3.3.2 *Enxerto osteocondral*

O transplante de enxerto osteocondral, pode ser realizado pela retirada de tecido do mesmo indivíduo (autoenxerto) ou entre indivíduos diferentes (aloenxerto), realizada com o enxerto fresco (MITHOEFER et al., 2009; WILLIAMS; DREESE; CHEN, 2004). Essa técnica trata-se da transferência de um pequeno tampão de osso subcondral, coberto com cartilagem articular intacta de uma superfície de baixa carga, para a região que apresente o defeito condral (ALFORD; COLE, 2005).

As dificuldades relacionadas à técnica incluem a incompatibilidade da altura do enxerto com a cartilagem receptora (KOH et al., 2004), a inviabilidade dos condrócitos na margem do implante e na cartilagem circundante por trauma mecânico na transplantação, comprometendo a integração do enxerto (HUNTLEY et al., 2005).

#### 2.3.3.3 *Implantação de condrócitos ou tecido cartilaginoso*

Na implantação de condrócitos autógenos, estes são retirados através de biópsia da cartilagem, de uma região de baixa carga articular e cultivados *in vitro*, posteriormente realiza-se uma segunda cirurgia para implantação sobre a lesão condral, utilizando *scaffolds* ou periósteo como material de apoio (BENTLEY et al., 2013; MITHOEFER et al., 2009).

Uma variação desta técnica seria o uso da própria cartilagem autóloga, que dispensa o cultivo *in vitro*. Este tecido é então fragmentado mecanicamente e incorporado na região com defeito condral (MITHOEFER et al., 2009).

Trabalhos mostram que a implantação de condrócitos e tecido cartilaginoso nas lesões de cartilagem articular foram bem-sucedidas, com tecido de reparo semelhante a cartilagem hialina original e que se apresentaram duráveis a longo prazo (BENTLEY et al., 2013; LU et al., 2006).

#### 2.3.3.4 *Fatores de crescimento cartilágneo*

Existem vários fatores de crescimento como FCT- $\beta$ , FCI, FCF, PMOs e FCDP, que

estimulam os condrócitos e células-tronco mesenquimais, na migração, proliferação e diferenciação celular, além de serem pró-anabólicos e anticatabólicos para o reparo tecidual (FORTIER et al., 2011).

Apesar dos benefícios observados com o uso de fatores de crescimento em lesões de cartilagem, alguns deles, como FCT- $\beta$ , FCF-2 e PMO-2, podem gerar efeitos colaterais como a formação de osteófitos e fibrose sinovial (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019).

Desta forma, ainda há necessidade de estudos mais aprofundados, que avaliem a qualidade da técnica a longo prazo comparando-a com outros tratamentos e considerando o seu custo- benefício (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019).

#### **2.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)**

O PRP é uma preparação de plasma autólogo, com alta concentração de plaquetas, muito acima da contagem do sangue total (MARX, 2001). O seu uso terapêutico é fundamentado, na capacidade das plaquetas em liberar quantidades suprafisiológicas de fatores de crescimento e de citocinas, dos seus grânulos alfa, e assim estimular o reparo de tecidos com pouca capacidade cicatricial, como tendões, ligamentos e cartilagem, em razão do baixo suprimento sanguíneo e lenta renovação celular desses tecidos (WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016). Além das suas propriedades regenerativas em ossos, cartilagens e tecidos moles, vários trabalhos têm mostrado potencial anti-inflamatório em ambiente osteoartrítico (MARX, 2001; XIE; ZHANG; TUAN, 2014).

O PRP é formado basicamente por plaquetas, leucócitos, poucos eritrócitos e plasma (BOSWELL et al., 2012; WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016). As plaquetas possuem tamanho entre 2 e 3  $\mu\text{m}$  e circulam no corpo durante 7 a 10 dias, em concentrações de 100 a 900  $\text{M}/\text{mm}^3$ , dependendo da espécie. São fragmentos citoplasmáticos anucleados, provindos de megacariócitos da medula óssea (BOSWELL et al., 2012; SOARES et al., 2012). A princípio, as plaquetas têm a função de conter hemorragias em lesões vasculares, no entanto, estudos recentes, identificaram mais de 1100 proteínas plaquetárias, algumas com potencial terapêutico (SENZEL; GNATENKO; BAHOU, 2009).

No reparo tecidual, utilizando o PRP, as plaquetas atraem as células para a região, formando uma matriz de fibrina, que funciona como base para a liberação dos fatores de crescimento e citocinas (WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016). Estes por sua vez, estimularão o recrutamento, a diferenciação e a comunicação entre células tronco (BORRELLI JÚNIOR et al., 2019; SCHERER et al., 2012; XIE; ZHANG; TUAN, 2014).

Os fatores de crescimento liberados pelos grânulos alfa das plaquetas, envolvidos no processo de regeneração, incluem: FCDP (estimula a angiogênese, a proliferação, quimiotaxia e diferenciação celular), FCT- $\beta$  (estimula a angiogênese, a produção de colágeno tipo I e tipo III, e sintetiza inibidores de proteases, impedindo a degradação do colágeno), FCEV (estimula também a angiogênese e regula a proliferação e migração de células endoteliais) e FCF (estimula a angiogênese, a diferenciação de células-tronco e a proliferação celular, além de promover a produção de colágeno e a reparação do tecido). Além disso, o FCI-1, apesar de não ser armazenado pelas plaquetas, está presente no plasma e tem a função de regular a proliferação e diferenciação celular, produção de proteoglicanos, colágenos e outras proteínas não colágenas (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009; BOSWELL et al., 2012; DAVIS et al., 2014; MALANGA; GOLDIN, 2014).

Apesar da ação pró-inflamatória e imunológica, os leucócitos podem causar uma inflamação exacerbada, sendo prejudicial para o processo de cicatrização do tecido (BOSWELL et al., 2014). Desta forma, no PRP, é preferível minimizar a quantidade de leucócitos do que maximizar o número de plaquetas, sendo que o aumento excessivo de plaquetas não fornece efeito adicional (BOSWELL et al., 2014).

Os eritrócitos, através da hemoglobina, transportam gases metabólicos, nutrientes e moléculas reguladoras (WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016). Estes por sua vez, estão em quantidades reduzidas ou ausentes no PRP, devido ao processo de centrifugação (WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016).

Apesar da ação vasodilatadora e pelo transporte de oxigênio, que são fundamentais para reparação do tecido, sob estresse oxidativo, o ferro desprendido da hemoglobina, facilita a formação de radicais livres, que podem induzir a apoptose de células, desta forma, a quantidade de eritrócitos no PRP deve ser reduzida (BOSWELL et al., 2012).

Além das células, o plasma sanguíneo, que é a porção líquida, apresenta diversos hormônios e proteínas dispersas, liberadas pelas células, que também irão atuar no processo de reparação tecidual (BOSWELL et al., 2012).

#### ***2.4.1 Obtenção e preparação***

O PRP só pode ser obtido a partir do sangue total não coagulado, pois o coágulo retém as células do sangue (inclusive as plaquetas). No conteúdo restante, o soro, há pouca presença de células sanguíneas, sendo necessário adicionar anticoagulante (FOSTER et al., 2009). Os anticoagulantes mais utilizados são: heparina (ativa a antitrombina), citrato de sódio, citrato

dextrose ácido e citrato-teofilina-adenosina-dipiridamol, sendo que estes à base de citrato atuam quelando o cálcio ionizado do sangue, impedindo sua coagulação (LATALSKI et al., 2019). A heparina e o citrato de sódio causam, ainda, ativação plaquetária mínima no momento da coleta (NISHIOKA et al., 2002).

Após a coleta, o material é centrifugado duas vezes, a primeira para separar os glóbulos vermelhos e brancos, que apresentam maior diâmetro, das plaquetas e do plasma, e a segunda para separar o plasma pobre e rico em plaquetas. Por fim, é feita a coagulação do PRP, com ativação plaquetária, que acarretará liberação dos fatores de crescimento pelos grânulos  $\alpha$ . As plaquetas podem então, continuar produzindo e liberando fatores de crescimento de forma reduzida, durante sua vida útil (FOSTER et al., 2009). A coagulação pode ser feita com o uso de trombina, cloreto de cálcio ou gluconato de cálcio, com isso, o material torna-se gelatinoso (FOSTER et al., 2009; VENDRAMIN et al. 2006).

Os métodos de preparação do PRP descritos na literatura, se diferem de acordo com a variação do tempo (3 a 15 minutos) e da força ou rpm (120 g – 700 g; 1000 rpm – 3000 rpm) nas duas centrifugações, podendo incluir tempo de descanso da amostra entre as etapas (CARMONA; LÓPEZ; PRADES, 2009; CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013; MILANO et al., 2010; VENDRAMIN et al. 2006; YAMADA et al., 2016).

Após a gelatinização do PRP, este deve ser aplicado imediatamente no local desejado, pois as plaquetas liberarão cerca de 70 % dos fatores de crescimento armazenados, dentro de 10 minutos e 100 % na primeira hora. Continuando a produção e liberação dos fatores de forma limitada por aproximadamente 8 dias, durante sua vida útil (MARX, 2001).

É considerado um PRP, quando este contém no mínimo 200.000 plaquetas/ $\mu$ l (BOSWELL et al., 2012). Mas para Marx (2001) é necessária uma concentração de 1.000.000 de plaquetas/ $\mu$ l para que haja boa reparação tecidual em humanos. No entanto, resultados satisfatórios foram obtidos com concentração de plaquetas de 120.000 plaquetas/ $\mu$ l em ovinos (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013).

## **2.5 Anatomia do joelho de ovinos**

O joelho é uma articulação sinovial, que pode ser dividida em duas articulações: femoropatelar e femorotibial. A articulação femorotibial une o fêmur e a tíbia, através dos ligamentos colaterais lateral e medial. É uma articulação discordante, desta forma, possui grandes meniscos no entremeio para melhorar sua conformidade, unidos entre si pelos ligamentos craniais e caudais do menisco lateral e do menisco medial, possui também o

ligamento meniscofemoral, que se estende da face caudal do menisco lateral ao côndilo medial do fêmur. Proximal a esta região, os ovinos apresentam um coxim de gordura infrapatelar associado ao ligamento patelar e que cobre o ligamento cruzado cranial (ALLEN et al., 1998; GODINHO; CARDOSO; NASCIMENTO, 1987; ORTH; MADRY, 2013).

Já a articulação femoropatelar é composta pela tróclea do fêmur e pela face caudal da patela, unidas pelos ligamentos femoropatelares lateral e medial. A tróclea apresenta-se cranialmente na extremidade distal do fêmur, em forma de polia, formada por duas cristas ou arestas e um sulco entre essas. Nos pequenos ruminantes as cristas lateral e medial apresentam tamanho aproximadamente igual. A patela, um grande osso sesamoide, apresenta-se em formato triangular, com o vértice em sentido distal, sendo esta porção mais alongada e estreita nos pequenos ruminantes. Sua superfície cranial é rugosa e no ângulo medial, apresenta cartilagem da patela. Todas essas articulações apresentam o mesmo tecido articular superficial (ALLEN et al., 1998; GODINHO; CARDOSO; NASCIMENTO, 1987; ORTH; MADRY, 2013).

Os ligamentos cruzados cranial e caudal dos ovinos apresentam morfologia/topografia semelhante à humana. Os ovinos têm um único ligamento patelar, que se origina nos dois terços proximais da face cranial da patela e se insere na tuberosidade da tibia. Além do ligamento patelar e dos femoropatelares medial e lateral, os tendões e músculos envolvidos nessa articulação incluem: o tendão do músculo quadríceps femoral, que envolve a patela; os músculos bíceps femoral, quadríceps e músculo tensor da fâscia lata, que se inserem na patela; semitendíneo, semimembranáceo, sartório, extensor longo dos dedos, fibular terceiro, fibular longo, gastrocnêmio, flexor superficial dos dedos e poplíteo (ALLEN et al., 1998; ORTH; MADRY, 2013).

## **2.6 Modelos de experimentação para reparo de cartilagem articular**

Os ovinos e caprinos, são animais de eleição como modelo animal de experimentação para reparo da cartilagem da articulação do joelho (HUGTEN et al., 2021).

O côndilo medial do fêmur é o principal local afetado nesta articulação em humanos, desta forma, nos estudos experimentais em animais, a indução das lesões é comumente realizada nesta região óssea (HUGTEN et al., 2021). Embora lesões em cartilagem troclear tenham sido relatadas como as mais difíceis de tratar (GALLO; FEELEY, 2009), o tecido de reparo formado na tróclea após indução do defeito, apresenta-se em quantidade e qualidade superior ao se comparar ao do côndilo (DWIVEDI et al., 2021).

A região utilizada para execução experimental de defeito osteocondral em equinos inclui a face lateral da tróclea, com o intuito de facilitar o acesso cirúrgico (FORTIER et al., 2002; ROCHA JÚNIOR et al., 2016; WILKE; NYDAM; NIXON, 2007). Em coelhos e ovelhas: sulco troclear, com maior manutenção do implante ao local pela sua concavidade (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013; HOEMANN et al., 2005; HOEMANN et al., 2010; WILLIAMS; DREESE; CHEN, 2004); em caprinos e mini pigs: face medial da tróclea, pois sua superfície mais plana permite maior fixação de implantes (LOTZ et al., 2021); em caprinos: em ambas as faces da tróclea, medial e lateral (BREHM et al., 2006; LU et al., 2006).

A artrotomia desta articulação é comumente realizada através da abordagem parapatelar medial em pequenos ruminantes (HUGTEN et al., 2021; ORTH; MADRY, 2013), com a incisão cutânea dessa região 5 cm proximal à patela até 5 cm da tuberosidade da tíbia. Seguida da incisão proximal do músculo vasto medial, da cápsula paralelamente ao ligamento patelar e transsecção do ligamento patelar medial. Desta forma, a patela é rebatida lateralmente (ALLEN et al., 1998; ORTH; MADRY, 2013).

No entanto, o acesso também pode ser realizado lateralmente, dependendo da estrutura a ser exposta. Neste caso, é feita uma incisão curvilínea, 3 cm lateralmente ao ligamento patelar, e se estende 8 cm proximal à patela até 5 cm distalmente à crista tibial. É feita a dissecação da cápsula articular, caudolateral ao ligamento patelar, a articulação é exposta ao flexionar o joelho e rebater a patela medialmente (ALLEN et al., 1998; ORTH; MADRY, 2013).

## **2.7 Histologia do tecido cartilágneo**

Na avaliação microscópica de um corte de cartilagem hialina articular normal, é possível notar os condrócitos dispersos por todo o tecido e alguns reunidos em grupos, denominados grupos isógenos, que podem estar apresentados de forma circular ou em colunas, estes grupos são originados de um mesmo condroblasto e caracterizam a multiplicação mitótica das células. Os condrócitos nas lâminas histológicas apresentam citoplasma retraído pelo processo de corte, sendo possível observar geralmente apenas o núcleo da célula. A matriz extracelular ao redor das células (matriz territorial) é basófila, pela presença de proteoglicanos, e nas regiões mais afastadas dos condrócitos (matriz interterritorial) menos basófila, corada em rosa, devido à grande quantidade de colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).



Após injúria o tecido neoformado apresenta morfologia diferente da original, caracterizado por fibras colágenas desorganizadas e fibroblastos, formando tecido fibroso ou fibrocartilaginoso, com predomínio de colágeno tipo I (ROCHA JÚNIOR et al., 2016).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e manejo

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU), sob o protocolo nº 085/19. Sendo todos os animais manuseados de acordo com as recomendações do *Committee on Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996).

Utilizou-se a espécie ovina (*Ovis aries*), como modelo experimental. Sendo animais machos, hígdos, da raça Dorper x Santa Inês, com idade aproximada de 18 meses e peso corpóreo em torno de  $45 \pm 4,45$  kg.

Foram utilizados 9 animais, os quais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de artrotomia femoropatelar lateral do membro pélvico esquerdo, para execução da falha articular e posterior avaliação histológica do tecido cartilágneo. Além do piloto, os animais foram divididos em 2 grupos, entre tratados e controle e subdivididos de acordo com o tempo de avaliação pós-operatória em 30 e 120 dias. Desta forma, foram denominados: GC I – animal controle, avaliado aos 30 dias; GC II – animais controle, avaliados aos 120 dias; GT I – animal tratado com gel de PRP e avaliado aos 30 dias e GT II – animais tratados com gel de PRP e avaliados aos 120 dias.

Para os grupos controle (I e II) realizou-se apenas a falha na cartilagem articular. Enquanto nos grupos tratados (I e II), após o procedimento cirúrgico e execução da falha, adicionou-se imediatamente o gel de PRP no local, como abordagem terapêutica (Tabela 1).

**Tabela 1:** Divisão dos grupos experimentais, de acordo com o tempo de pós-operatório.

	GC I	GC II	GT I	GT II
Tempo pós-operatório	30 dias	120 dias	30 dias	120 dias
Nº de animais	1	4	1	2

Os animais foram mantidos individualmente em baias com ventilação natural, de 1,5 x 1,0 m<sup>2</sup>, com cama de maravalha. Foram alimentados com feno de *Coast cross*, silagem de

milho, sal mineral para ovinos e água tratada em cocho, *ad libitum*. Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a avaliação clínica, hematológica e coproparasitológica, para verificação de higidez, uma semana anterior aos procedimentos. A técnica de artrotomia femoropatelar lateral, bem como a confecção da falha articular modificada, foram propostas como modelo de experimentação para análise do reparo de cartilagem articular. Além disso, as adaptações feitas na preparação do gel de PPR, podem ser reaplicadas em trabalhos futuros.

### 3.2 Procedimento cirúrgico

Primeiramente foi feita a cirurgia com um animal do projeto piloto. O uso deste serviu para avaliação inicial do procedimento sugerido, determinando-se a logística e cronologia dos eventos a serem executados durante o estudo.

Para realização das falhas articulares dos grupos controle e tratados, foi realizada artrotomia femoropatelar do membro pélvico esquerdo, com acesso articular lateral.

Após 72 horas de jejum alimentar e 12 horas de jejum hídrico, os animais foram submetidos ao protocolo de anestesia geral inalatória, utilizando-se medicação pré-anestésica com acepromazina 0,05 mg/kg, via intravenosa, seguindo-se a indução anestésica com cetamina 3,0 mg/kg e xilazina 0,05 mg/kg, ambas intravenosas. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano 2% em circuito aberto, após intubação orotraqueal.

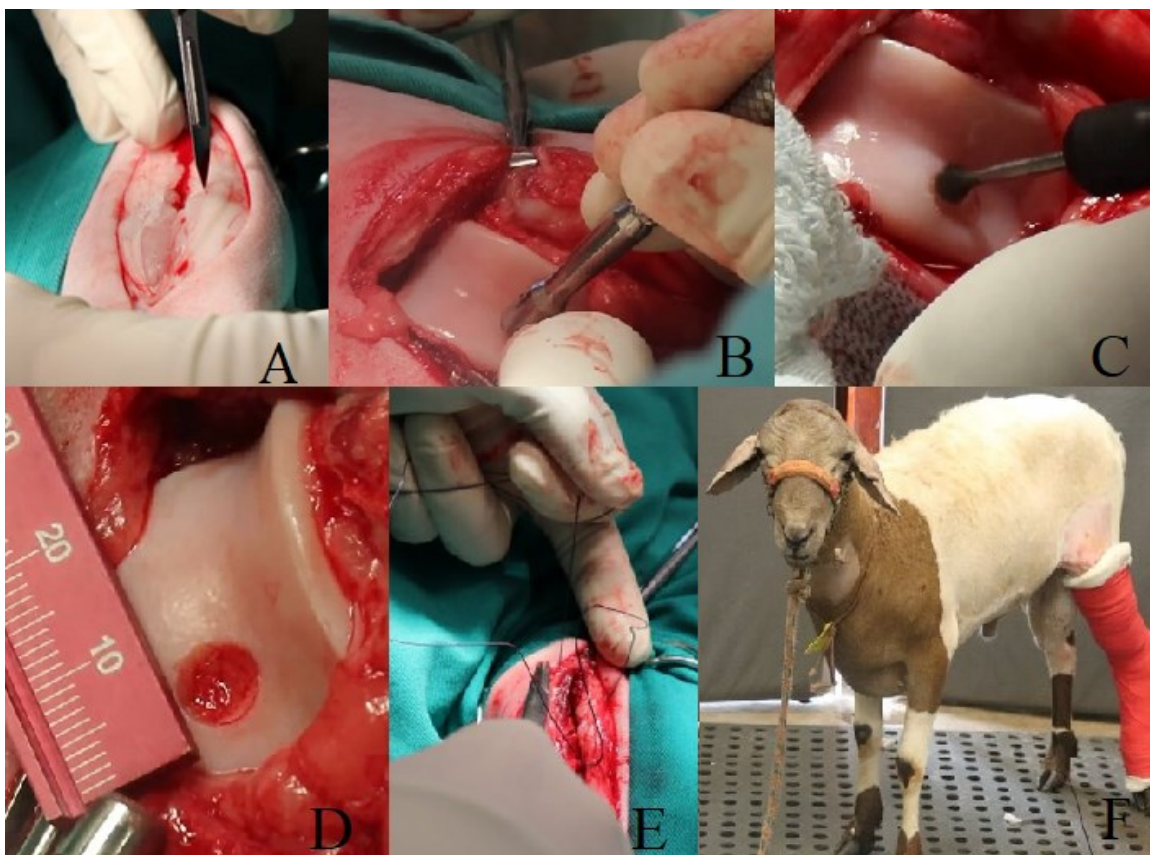
De forma complementar ao protocolo anestésico utilizado, realizou-se anestesia epidural lombossacral, com a associação de lidocaína 2% sem vasoconstritor e bupivacaína 0,5% sem vasoconstritor, 0,1 mL/kg de cada fármaco, administrado no espaço epidural.

Para realização das falhas articulares, procedeu-se a artrotomia femoropatelar, com o animal em decúbito lateral direito. Realizou-se ampla tricotomia da articulação femorotibiopatelar, seguido da antisepsia da região com clorexidina degermante e clorexidina alcoólica.

As lesões articulares foram realizadas após abordagem cirúrgica parapatelar lateral, com incisão cutânea de 8 cm da região proximal da patela até 5 cm da tuberosidade da tíbia, caudolateral ao ligamento patelar, seccionando o ligamento femoropatelar e a cápsula articular subsequente (Figura 1A). Após a exposição da superfície articular troclear, com a patela rebatida medialmente e articulação femorotibial flexionada, utilizou-se um *punch* dermatológico de 7,0 mm, para confecção do molde de lesão articular (Figura 1B). Posteriormente, foi procedido o desgaste por escariação com fresa de 4,8 mm da área

demarcada (Figura 1C).

**Figura 1:** Artrotomia femoropatelar. **A)** Incisão cirúrgica. **B)** Confeção do molde da lesão, utilizando um punch dermatológico de 7,0 mm. **C)** Escariação da falha com fresa de 4,8 mm. **D)** Falha articular. **E)** Artrorrafia. **F)** Animal após recuperação anestésica do procedimento cirúrgico, com bandagem no membro operado.



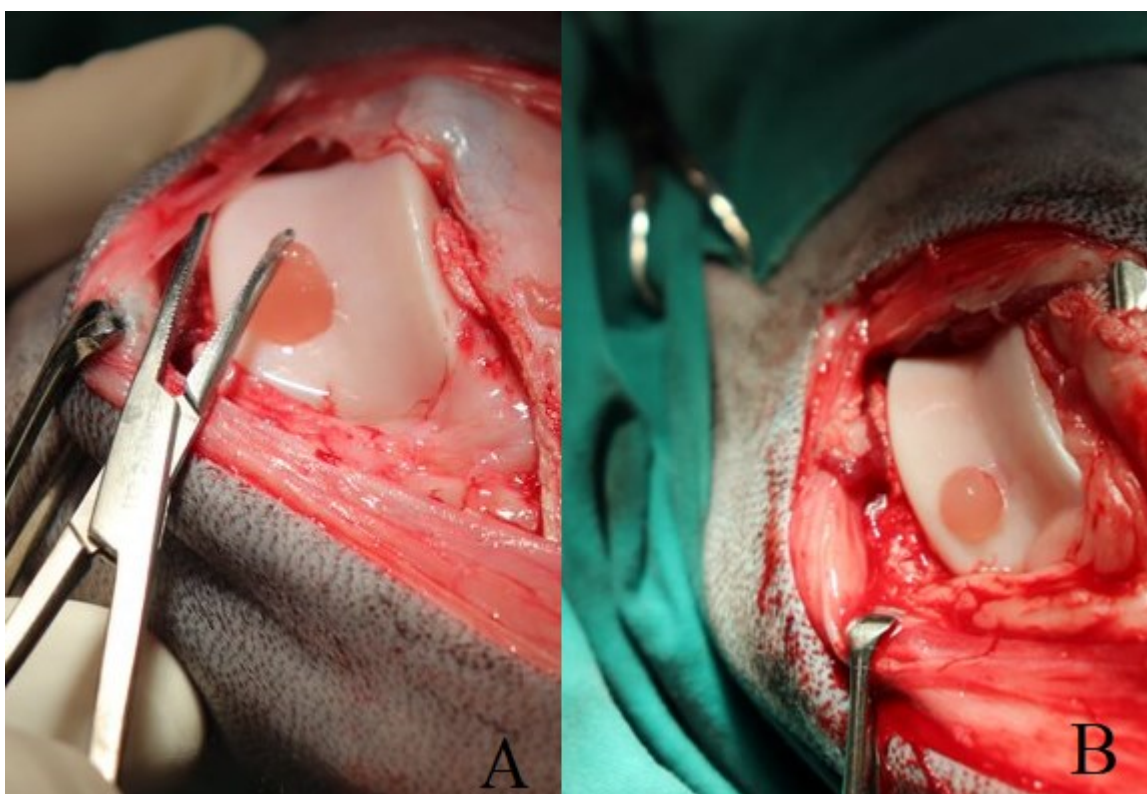
As falhas articulares foram realizadas na porção distal da superfície articular, entre a crista troclear medial e o sulco troclear, até a exposição do osso subcondral.

Nos animais controle, após a realização da falha articular, procedeu-se o reposicionamento patelar no sulco troclear e artrorrafia (Figura 1E). Nos tratados, após a confecção da falha, realizou-se o recobrimento da mesma com gel de PRP, até o nível da superfície articular, sendo mantido no local da lesão por meio de reposição patelar, recobrando a área (Figura 2). Antes da artrorrafia deste grupo, foram executados movimentos de flexão e extensão, para posterior confirmação visual de manutenção do gel no local da falha.

Para artrorrafia foi utilizado fio de ácido poliglicólico número 1, em padrão simples contínuo na cápsula articular, seguido de aproximação de subcutâneo com fio de ácido poliglicólico número 0 e sutura de pele com fio de náilon número 0, em padrão Riverdin.

Após a recuperação pós-anestésica, os animais foram encaminhados para as baias e acompanhados diariamente, para realização de exame clínico, curativos locais e administração de medicamentos. A região cirúrgica foi higienizada com clorexidina, solução tópica aquosa e administração de rifamicina tópica *spray*, seguindo-se aplicação de bandagem compressiva, executada com malha tubular, algodão ortopédico, atadura, seguida de bandagem elástica autocolante; até a retirada dos pontos, com sete dias (Figura 1F). Os animais foram submetidos a antibioticoterapia pós-operatória com ceftiofur sódico 2,2 mg/kg, via intramuscular, uma vez ao dia, durante sete dias. A analgesia foi realizada através da administração intramuscular de cetoprofeno 3,0 mg/kg, uma vez ao dia, durante cinco dias.

**Figura 2:** Incorporação do gel de PRP no defeito induzido da articulação femorotibiopatelar do membro pélvico esquerdo de um ovino. **A)** Alinhamento do gel de PRP na falha cirúrgica. **B)** Gel de PRP posicionado na ferida cirúrgica.



Como protocolo, os animais que apresentassem desconforto pós-operatório, evidenciado por inapetência, diminuição de ingestão de água ou reflexo de retirada do membro à palpação, seriam submetidos a resgate analgésico por meio da administração adicional de opióide (butorfanol), via intravenosa na dose de 0,2 mg/kg, administrado lentamente durante um minuto, repetindo-se a cada quatro horas, quando necessário.

### 3.3 Preparação do PRP

No dia do experimento, após tricotomia e antissepsia com álcool 70% da região cervical, foi efetuada a colheita via punção jugular de aproximadamente 31 mL de sangue de cada animal, em seis tubos a vácuo de 4,5 mL com citrato de sódio 3,2 % (BD Vacutainer®, Brasil), para preparação em duplicata do PRP, e um tubo de 4 mL contendo EDTA K2 (BD Vacutainer®, Brasil), para quantificar as plaquetas totais (Figura 3A).

Utilizou-se agulha para coleta múltipla de sangue a vácuo 21G (0,8 x 25 mm) (Labor Import, Comercial Importadora Exportadora LTDA, Osasco, São Paulo, Brasil) e adaptador padrão de agulha (Labor Import, Comercial Importadora Exportadora LTDA, Osasco, São Paulo, Brasil). Após a coleta, os animais foram encaminhados ao centro cirúrgico, para a realização da artrotomia, e de forma simultânea, foi realizado o processamento da amostra em laboratório.

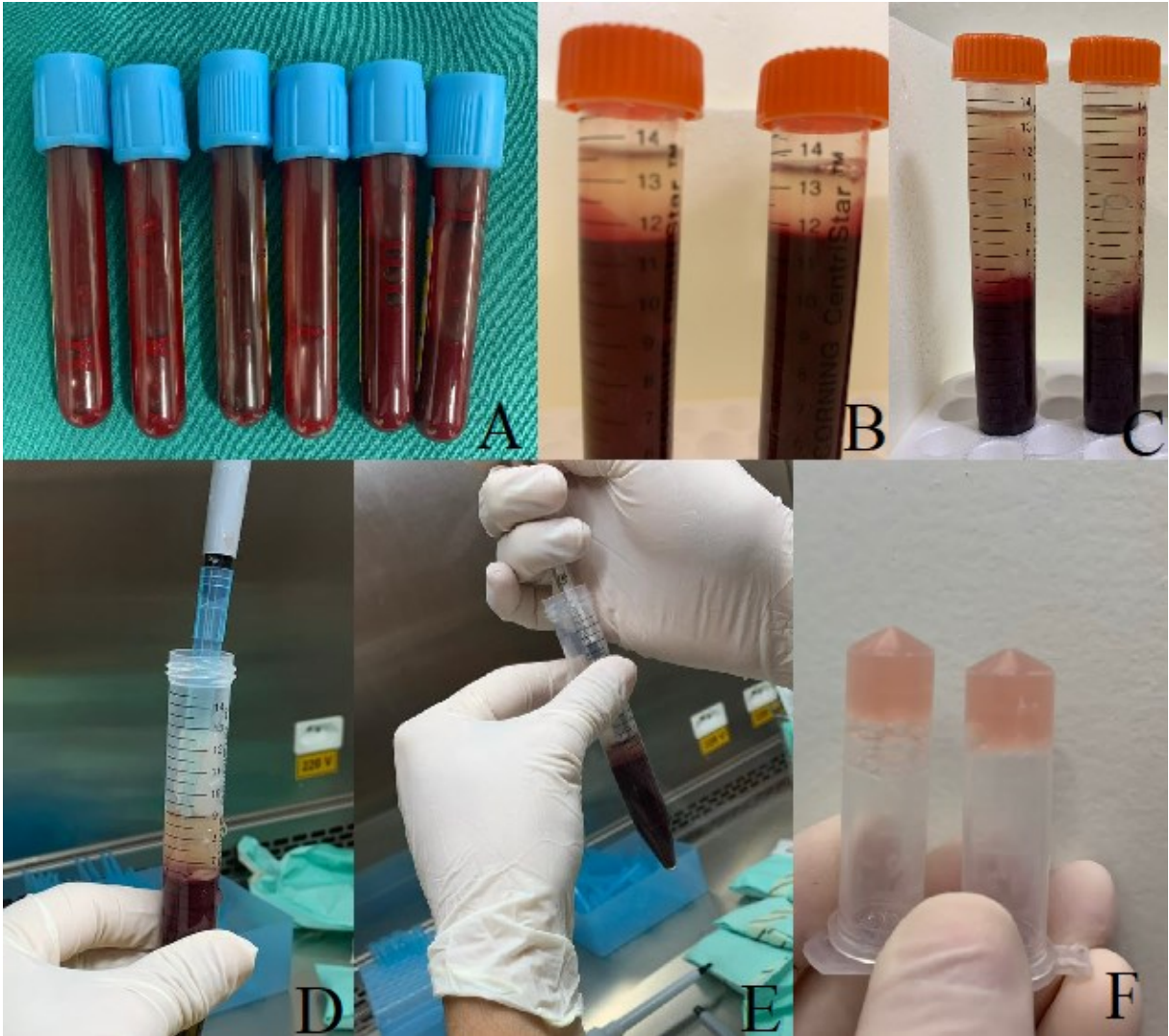
A amostra de sangue foi então dividida em dois tubos Falcon de 15 mL (Corning® CentriStar, Nova Iorque, EUA), que se mantiveram em descanso por 30 minutos em caixa de isopor fechada sem gelo, seguido da primeira centrifugação durante cinco minutos a aproximadamente 1600 rpm em centrífuga (modelo 80-2B, Daiki, Japão) (Figura 3B). Os tubos então foram acomodados em caixa de isopor e permaneceram em descanso por 30 minutos nas mesmas condições, para em seguida passarem pela segunda centrifugação durante 20 minutos a aproximadamente 2400 rpm (Figura 3C). Após a centrifugação, o sangue foi mantido em repouso durante 40 minutos também na caixa de isopor.

Ao final dessa etapa, descartou-se 75% do volume do plasma sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) de cada tubo (Figura 3D). O restante do plasma, o PRP, foi coletado com uma seringa de 1 mL (Figura 3E) e transferido individualmente para outros dois tubos Falcon, com as mesmas especificações, identificados, para realização da duplicata. Esse conteúdo por fim, foi homogeneizado e retirado uma pequena porção de cada tubo, para contagem de plaquetas separadamente.

Com a verificação do número de plaquetas, a amostra que apresentou maior quantidade, foi selecionada e submetida a ativação plaquetária para ser transformado o estado líquido em gelatinoso. Desta forma, o PRP foi transferido para um microtubo de centrifugação (tipo eppendorf) de 2,0 mL (Olen, Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) e para cada 1 mL de plasma, foi adicionado 40 µL de cloreto de cálcio a 10%, homogeneizado e mantido por 30 segundos em banho-maria a 37,0 °C, conforme descrito por Nunes Filho et al. (2007). Após aproximadamente 15 minutos ocorreu a geleificação do material, o qual foi encaminhado para

o centro cirúrgico e implantado imediatamente na falha articular (Figura 3F).

**Figura 3:** Preparação do PRP. **A)** Coleta de sangue nos tubos a vácuo de 4,5 mL com citrato de sódio 3,2 %. **B)** Tubos Falcon após primeira centrifugação. **C)** Amostras em descanso, após segunda centrifugação. **D)** Descarte de 75% do plasma sobrenadante. **E)** Coleta do plasma restante. **F)** PRP após geleificação em banho- maria.



### 3.4 Coleta de material e preparação das lâminas histológicas

Após o período de 30 e 120 dias, dependendo do grupo experimental, os animais foram submetidos a eutanásia, por meio de protocolo anestésico, utilizando-se medicação pré-anestésica com xilazina 0,1 mg/kg, via intravenosa, seguindo-se a indução anestésica com tiopental 25,0 mg/kg, via intravenosa, e, posteriormente a administração intravenosa de cloreto de potássio na dose de 100 mg/kg. Após a confirmação da eutanásia, foi procedida a

artrotomia com acesso lateral, para coleta da superfície articular troclear. Foram obtidos blocos osteoarticulares, por meio de serra óssea, removendo-se toda a tróclea femoral, com o cuidado em evitar a manipulação da superfície articular.

### 3.5 Análise histológica

**Tabela 2:** Pontuação histológica usada, para reparo da cartilagem articular (0 = totalmente reparado; 1 = intensamente reparado; 2 = parcialmente reparado; 3 = fracamente reparado; 4 = ausência de reparo).

Análises	Escore	Qualificações
Preenchimento do defeito	0	91–110%
	1	76–90%
	2	51–75%
	3	26–50%
	4	<25%
Predominância de condrócitos	0	80-100% da área
	1	Base e laterais
	2	Apenas laterais
	3	Nenhum
Organização de condrócitos	0	Arranjo normal
	1	Grupos isógenos múltiplos na base
	2	Grupos isógenos duplos na base
	3	Nenhum grupo isógeno
Integração com cartilagem perimétrica	0	Totalmente integrado
	1	Fenda de um lado
	2	Fenda nos dois lados
	3	Defeito vazio
Integração com osso subcondral	0	Completamente anexado
	1	Fenda em <50% da base
	2	Fenda em 50-90% da base
	3	Sem anexação
Arquitetura de superfície (fibrilação)	0	Superfície lisa normal
	1	Fibrilação leve
	2	Fibrilação moderada
	3	Fibrilação grave

As peças anatômicas foram fixadas em solução aquosa de formaldeído a 10%, até o momento do processamento histotécnico, segundo técnica de rotina. Em laboratório, as peças foram emblocadas em parafina, após a inclusão, realizou-se a descalcificação e microtomia em micrótomo com cortes histológicos seriados de 5  $\mu$ m. Os cortes histológicos foram então desparafinados em xilol e hidratados sequencialmente em etanol 100%, 95%, 70% e água destilada. Por fim, os cortes foram corados com HE para avaliar a morfologia.

A leitura das lâminas foi realizada às cegas por dois observadores, os quais atribuíram escores, de acordo com as qualificações das análises. Os parâmetros avaliados foram: preenchimento do defeito, predominância de condrócitos, organização de condrócitos, fixação do tecido de reparo ao osso subcondral e à cartilagem perimétrica, fibrilação superficial do tecido de reparo (Tabela 2), adaptado de Wilke, Nydam e Nixon (2007).

Os dados foram tabulados e avaliados por análise descritiva.

#### 4 RESULTADOS

Não houve nenhuma complicação durante o procedimento cirúrgico ou após. Os animais foram tolerantes a anestesia e ao procolo analgésico, sem a necessidade de analgésico de resgate. Além disso, com os testes de flexão e extensão do membro, antes da artrografia nos animais dos grupos tratados, foi possível confirmar visualmente que o gel de Plasma Rico em Plaquetas se manteve no local da falha.

Quanto à avaliação microscópica, houve completa integração do tecido de reparo com o osso subcondral e com a cartilagem perimétrica, em todos os animais do experimento. Nenhum dos animais apresentaram organização normal de condrócitos (escore 0) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Escores de cada parâmetro identificados por grupo.

	GC I	GC II	GT I	GT II
Preenchimento do defeito	1	0, 1, 2 e 4	0	0 e 1
Predominância de condrócitos	1	0, 1 e 2	1	0 e 1
Organização de condrócitos	1	2 e 3	1	1
Integração com cartilagem perimétrica	0	0	0	0
Integração com osso subcondral	0	0	0	0
Arquitetura de superfície (fibrilação)	2	1, 2 e 3	0	1

No parâmetro preenchimento do defeito, os grupos tratados apresentaram mais de 76 ou 91% da área preenchida. Houve predominância de condrócitos em mais de 80% do tecido

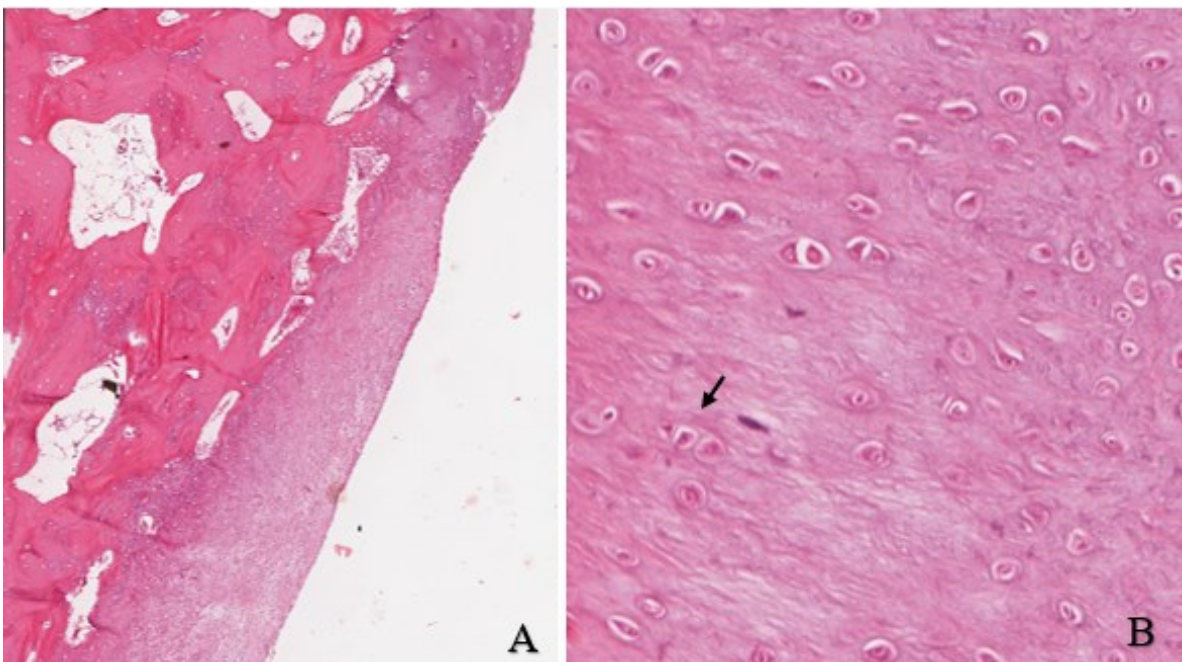


neoformado no GT II e em um animal do GC II. Quanto à organização de condrócitos, foi identificado presença de grupos isógenos múltiplos no GC I, GT I e GT II. Em relação a arquitetura de superfície no GT I, não houve fibrilação, apresentando uma superfície lisa, semelhante ao tecido íntegro.

O GT I foi superior ao GC I no critério preenchimento do defeito e arquitetura da superfície, e escore igual nos demais quesitos. Já o GT II, em geral apresentou escores superiores ao GC II (Tabela 3), com arquitetura superficial lisa, presença de grupos isógenos múltiplos e matriz densa e organizada (Figura 4). Nos grupos controle, os animais apresentaram grau de fibrilação leve à grave, com presença de fibroblastos e fibras colágenas desorganizadas, caracterizando um tecido fibroso ou fibrocartilaginoso (Figura 5).

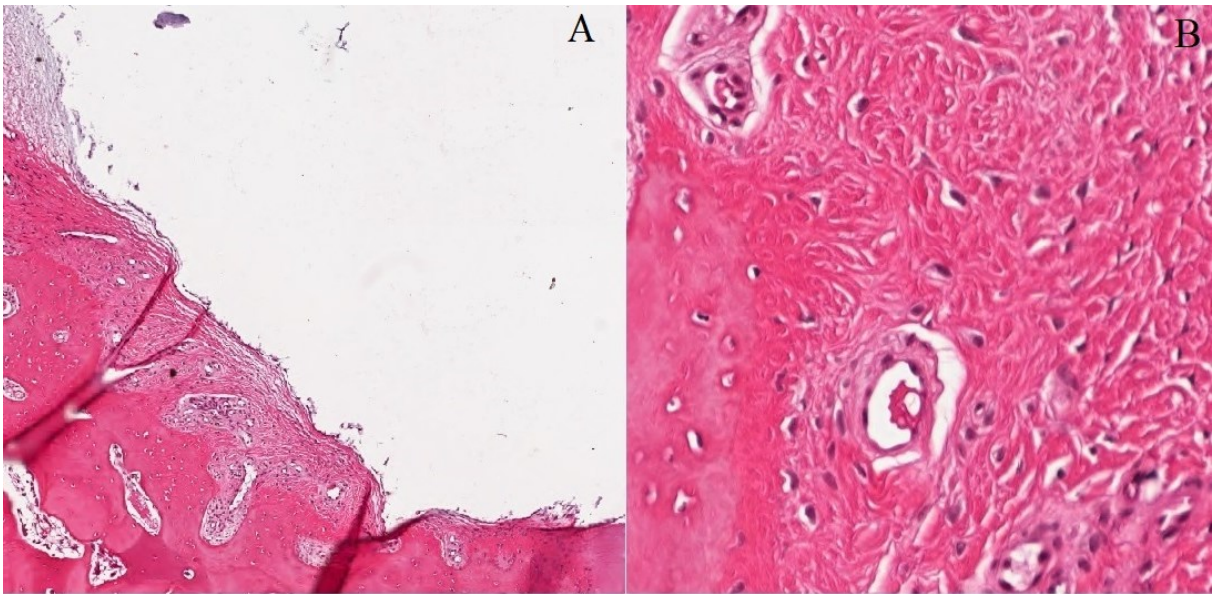
Durante a avaliação das lâminas histológicas, foi detectado no tecido de reparo do animal tratado com gel de PRP e avaliado aos 30 dias, plasmócitos na região mais profunda, e tecido de granulação com grupos isógenos múltiplos ao redor na superfície do material em formação.

**Figura 4:** Tecido neoformado, do GTII. **A)** Possível observar falha completamente preenchida, com integração do tecido neoformado com o original e arquitetura superficial lisa, sem desnivelamento entre os tecidos, em aumento de 4x, corado com HE. **B)** Presença de condrócitos, grupos isógenos e grupo isógeno múltiplo (seta preta), matriz densa e organizada, em aumento de 20x, corado com HE.



A concentração de plaquetas no PRP obtido dos ovinos, foram 158.000/ $\mu$ l, 230.000/ $\mu$ l e 459.000/ $\mu$ l, sendo 1,8 vezes maior que no sangue total em média.

**Figura 5:** Tecido neoformado, do GC II. **A)** Possível observar área pouco preenchida, com fibrilação moderada e integração do tecido neoformado com o original, em aumento de 4x, corado com HE. **B)** Presença de fibras colágenas desorganizadas, fibroblastos e alguns condrócitos), em aumento de 20x, corado com HE.



## 5 DISCUSSÃO

A cartilagem articular exerce funções essenciais para o bom funcionamento da articulação. Com sua morfologia específica e reparo limitado após a lesão, há procura constante por alternativas de tratamento que promova sua regeneração, envolvendo principalmente intervenções cirúrgicas (ALFORD; COLE, 2005; HAYES JÚNIOR et al., 2001; MITHOEFER et al., 2009).

Devido à semelhança da articulação femorotibiopatelar dos caprinos e ovinos com a humana, estes são animais de eleição como modelo animal de experimentação para reparo da cartilagem nesta articulação (HUGTEN et al., 2021).

Em um estudo experimental comparando os defeitos trocleares e condilares em coelhos, as lesões que apresentaram maior qualidade e quantidade do tecido de reparo, foram aquelas induzidas na tróclea, possivelmente devido as diferenças nas propriedades biológicas das células-tronco da medula óssea subcondrais desses dois locais (DWIVEDI et al., 2021). Além disso, defeitos osteocondrais na tróclea apresentam menos formação de cistos quando

comparado aos defeitos em cõndilos (LOTZ et al., 2021; NIEDERAUER et al., 2000). Desta forma, a tróclea foi o local de escolha para realização da falha da cartilagem articular neste estudo.

Apesar do defeito da cartilagem articular geralmente ser executada de forma experimental no sulco troclear do fêmur em ovinos, pela concavidade que a região apresenta (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013; HOEMANN et al., 2005; HOEMANN et al., 2010; WILLIAMS; DREESE; CHEN, 2004), Lotz e colaboradores (2021) afirmaram que a superfície mais plana da face medial da tróclea, permite maior fixação de implantes, assim como observado no presente estudo. Isso demonstra que a técnica pode ser utilizada como modelo de experimentação animal, para análise de reparo de cartilagem articular, em trabalhos futuros.

De acordo com a avaliação microscópica, nos animais tratados observou-se maior espessura do tecido neoformado, no entanto, todos apresentaram bom nivelamento deste tecido com a cartilagem íntegra, diferentemente de Carneiro e colaboradores (2013), em que todas as ovelhas apresentaram desnivelamento do tecido, no membro tratado e não tratado, o que pode ter ocorrido devido ao local de escolha da falha, no sulco troclear.

A presença de condrócitos e a integração completa do tecido neoformado com a cartilagem íntegra e com o osso subcondral foi identificada em todos os animais, pois ao penetrar o osso subcondral e acessar as células tronco mesenquimais, estas já atuam por si só no reparo cartilaginoso, por gerar uma resposta inflamatória e liberar fatores de crescimento. No entanto, usando apenas células tronco a condrogênese tende a cessar (BUCKWALTER, 1998; WILKE; NYDAM; NIXON, 2007).

Quanto à organização dos condrócitos, houve presença de grupos isógenos múltiplos e várias duplas de condrócitos no GC I, GT I e GT II. Essa ação é resultado da divisão mitótica dos condrócitos, na tentativa formação da cartilagem hialina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O tecido de reparo, após sua formação, se remodela progressivamente, tornando-se cada vez mais liso, semelhante ao tecido original (BUCKWALTER, 1998). No presente estudo o GT I e o GT II apresentaram melhor arquitetura, com superfície lisa ou leve fibrilação e tecido mais organizado, enquanto em ambos os grupos controle, todos os animais apresentaram algum grau de fibrilação, presença de fibroblastos e fibras colágenas desorganizadas semelhante ao tecido fibroso (conjuntivo denso), sendo esta uma depleção característica de grandes lesões osteocondrais (BUCKWALTER, 1998; ROCHA JÚNIOR et al., 2016).

O PRP por definição deve conter no mínimo 200.000 de plaquetas/ $\mu$ l (BOSWELL et al., 2012), porém alguns autores afirmam que, para obter resultados satisfatórios na reparação tecidual com o uso de PRP, é necessária uma concentração de 1.000.000 de plaquetas/ $\mu$ l em humanos (MARX, 2001).

Outros autores indicam o uso de concentrações de plaquetas 4 a 6 vezes maiores do que no sangue total (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; RUIZ-SANTIAGO; GARCÍA-ESPINOSA, 2018; VENDRAMIN et al. 2006; WU; DIAZ; BORG-STEIN, 2016). No entanto, resultados satisfatórios foram obtidos com concentrações de plaquetas entre 1,56 a 4,34 vezes maiores que os valores basais em ovinos (CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013) e 2 vezes maior em média em equinos (BOSWELL et al., 2014).

Essas variações ocorrem porque a concentração média de plaquetas no sangue total dos ovinos pode oscilar entre 100.000 e 512.000 plaquetas/ $\mu$ l, de acordo com a idade e condição física do animal nos diferentes trabalhos (BATISTA et al., 2009; CARNEIRO; BARBIERI; BARBIERI NETO, 2013; JAKSE et al., 2003). Já neste estudo, a concentração de plaquetas nos animais tratados variou de 136.000 a 257.000 plaquetas/ $\mu$ l no sangue total e 158.000/ $\mu$ l a 459.000/ $\mu$ l no PRP, sendo este 1,8 vezes maior que no sangue total em média.

O tecido de granulação geralmente é encontrado na base do defeito (BUCKWALTER, 1998), no entanto, no presente estudo houve um achado de tecido de granulação próximo à superfície do tecido neoformado em um animal tratado com avaliação aos 30 dias, repleto de condrócitos ao redor. Este processo é resultado da estimulação da medula óssea, ao acessar o osso subcondral, o qual promove a formação de tecido fibrocartilaginoso (ROCHA JÚNIOR et al., 2016).

## **6 CONCLUSÃO**

Conclui-se que o modelo experimental de falha articular na face medial da tróclea do fêmur em carneiros, realizada entre o sulco e a crista troclear medial, para avaliação de reparo da cartilagem articular, mostrou-se viável nos animais utilizados. E que o protocolo do plasma rico em plaquetas empregado de forma terapêutica, resultou em tecido neoformado com boa característica morfológica nos animais avaliados.

## REFERÊNCIAS

- ALFORD, J. W.; COLE, B. J. Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. **American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 295-306, fev. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0363546504273510>>. Acesso em: 26 out. 2021.
- ALLEN, M. J. et al. The Surgical Anatomy of the Stifle Joint in Sheep. **Veterinary Surgery**, v. 27, n. 6, p. 596-605, nov./dez. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1998.tb00536.x>>. Acesso em: 14 fev. 2022.
- BENTLEY, G. et al. Repair of osteochondral defects in joints—how to achieve success. **Injury**, v. 44, p. S3-S10, jan. 2013. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(13\)70003-2](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(13)70003-2)>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. **Blood Reviews**, v. 23, n. 4, p. 177-189, jul. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>>. Acesso em: 5 jan. 2022.
- BORRELLI JÚNIOR, J. et al. Understanding Articular Cartilage Injury and Potential Treatments. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 33, n. 6, p. S6-S12, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001472>>. Acesso em: 8 nov. 2021.
- BOSWELL, S. G. et al. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. **Arthroscopy**, v. 28, n. 3, p. 429-439, mar. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arthro.2011.10.018>>. Acesso em: 5 jan. 2022.
- BOSWELL, S. G. et al. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. **American Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 1, p. 42-49, jan. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0363546513507566>>. Acesso em: 6 jan. 2022.
- BREHM, W. et al. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, n. 12, p. 1214-1226, dez. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.05.002>>. Acesso em: 22 mar. 2022.
- BUCKWALTER, J. A. Articular cartilage: injuries and potential for healing. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 28, n. 4, p. 192-202, out. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.2519/jospt.1998.28.4.192>>. Acesso em: 22 mar. 2022.
- CARMONA, J. U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Uso de concentrados autólogos obtidos mediante el método del tubo como tratamiento de artropatías em caballos. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 41, n. 2, p. 175-179, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.4067/S0301-732X2009000200012>>. Acesso em: 12 jan. 2022.
- CARNEIRO, M. O.; BARBIERI, C. H.; BARBIERI NETO, J. Platelet-rich plasma gel promotes regeneration of articular cartilage in knees of sheep's. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 80-86, mar./abr. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413->

78522013000200003>. Acesso em: 26 nov. 2020.

DAVIS, V. L. et al. Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: workable options for every size practice. **Journal of Oral Implantology**, v. 40, n. 4, p. 500-510, ago. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-12-00104>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

DWIVEDI, G. et al. Quality of cartilage repair from marrow stimulation correlates with cell number, clonogenic, chondrogenic, and matrix production potential of underlying bone marrow stromal cells in a rabbit model. **Cartilage**, v. 12, n. 2, p. 237-250, abr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1947603518812555>>. Acesso em: 9 mar. 2022.

FILARDO, G. et al. Platelet-rich plasma: Why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, n. 9, p. 2459-2474, set. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00167-013-2743-1>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

FORTIER, L. A. et al. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based articular cartilage repair. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84, n. 2, p. 276-288, abr. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1302/0301-620X.84B2.0840276>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

FORTIER, L. A. et al. The role of growth factors in cartilage repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 10, p. 2706-2715, out. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11999-011-1857-3>>. Acesso em: 20 nov. 2021.

FOSTER, T. E. et al. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. **American Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 11, p. 2259-2272, nov. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0363546509349921>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. Articulações. In: \_\_\_\_\_. **Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. cap. 6, p. 69-81.

FRISBIE, D. D. et al. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 407, p. 215-227, fev. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/00003086-200302000-00031>>. Acesso em: 21 dez. 2021.

GALLO, R. A.; FEELEY, B. T. Cartilage defects of the femoral trochlea. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 17, n. 11, p. 1316-1325, nov. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00167-009-0799-8>>. Acesso em: 16 mar. 2022.

GODINHO, H. P.; CARDOSO, F. M.; NASCIMENTO, J. F. **Anatomia dos ruminantes domésticos**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 1-296, 1987.

HAYES JÚNIOR, D. W.; BROWER, R. L.; JOHN, K. J. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 18, n. 1, p. 35-53, jan. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11344979/>>. Acesso em: 28 out. 2021.

HOEMANN, C. D. et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. **Journal of Bone and Joint Surgery**.

**American volume**, v. 15, n. 1, p. 78-89, jan. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458406002032>>. Acesso em: 17 mar. 2022.

HOEMANN, C. D. et al. Scaffold-Guided Subchondral Bone Repair: Implication of Neutrophils and Alternatively Activated Arginase-1+ Macrophages. **American Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 9, p. 1845–1856, set. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0363546510369547>>. Acesso em: 6 jan. 2022.

HUGTEN, P.P.W. et al. An optimized medial parapatellar approach to the goat medial femoral condyle. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 4, n. 1, p. 54-58, fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ame2.12150>>. Acesso em: 8 fev. 2022.

HUNTLEY, J. S. et al. Chondrocyte death associated with human femoral osteochondral harvest as performed for mosaicplasty. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 87, n. 2, p. 351-360, fev. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.2106/JBJS.D.02086>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

JAKSE N. et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 5, p. 578-583, out. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.00928.x>>. Acesso em: 8 fev. 2022.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KOH, J. L. et al. The effect of graft height mismatch on contact pressure following osteochondral grafting: A biomechanical study. **American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 317-320, mar. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0363546503261730>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

LATALSKI, M. et al. Allergic reaction to platelet-rich plasma (PRP). **Medicine (Baltimore)**, v. 98, n. 10, p. e14702, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014702>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

LOTZ, B. et al. Preclinical testing of new hydrogel materials for cartilage repair: Overcoming fixation issues in a large animal model. **International Journal of Biomaterials**, v. 2021, p. 1-14, jun. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2021/5583815>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

LU, Y. et al. Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 6, p. 1261-1270, jun. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jor.20135>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

MAKRIS, E. A. et al. Repair and Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 21-34, jan. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.157>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

MALANGA, G. A.; GOLDIN, M. PRP: review of the current evidence for musculoskeletal conditions. **Current Physical Medicine and Rehabilitation Reports**, v. 2, p. 1-15, jan. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40141-013-0039-5>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

MANKIN, H. J. The response of articular cartilage to mechanical injury. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 64, n. 3, p. 460-466, mar. 1982. Disponível em: <<https://doi.org/10.2106/00004623-198264030-00022>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, 14. ed. v. 10, p. 225-228, dez. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/00008505-200110000-00002>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, A.; RUIZ-SANTIAGO, F., GARCÍA-ESPINOSA, J. Plasma rico en plaquetas: ¿mito o realidad? **Radiología**, v. 60, n. 6, p. 465-475, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rx.2018.08.006>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

MCCORMICK, F. et al. Minced articular cartilage-basic science, surgical technique, and clinical application. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 16, n. 4, p. 217-220, dez. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/JSA.0b013e31818e0e4a>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

MITHOEFER, K. et al. Emerging options for treatment of articular cartilage injury in the athlete. **Clinics in Sports Medicine**, v. 28, n. 1, p. 25-40, jan. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.csm.2008.09.001>>. Acesso em: 26 out. 2021.

NEFLA, M. et al. The danger from within: Alarmins in arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 11, p. 669-683, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.162>>. Acesso em: 20 dez. 2021.

NEUMANN, K. et al. Chondrogenic differentiation capacity of human mesenchymal progenitor cells derived from subchondral cortico-spongious bone. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 11, p. 1449-1456, nov. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jor.20635>>. Acesso em: 21 dez. 2021.

NIEDERAUER, G. G. et al. Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2561-2574, dez. 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00124-1)>. Acesso em: 17 mar. 2022.

NISHIOKA, T. et al. Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. **Clinical & Laboratory Haematology**, v. 24, n. 2, p. 115-119, abr. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2002.00436.x>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

NUNES FILHO, D. P. et al. Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. **Revista Implantnews**, v. 4, n. 3, p. 263-269, mai./jun. 2007. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/10931786-Avaliacao-microscopica-da-acao-do-osso-autogeno-associado-ou-nao-ao-prp-em-cavidades-osseas-de-caes.html>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

MILANO, G. et al. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, n. 7, p.971-980, jul. 2010. Disponível em:



<<https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.03.013>>. Acesso em: 23 nov. 2022.

MOW, V. C.; HUNG, C. T. Biomecânica da Cartilagem Articular. In: NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica Básica do Sistema Musculoesquelético**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. cap. 3, p. 50-85.

ORTH, P.; MADRY, H. A low morbidity surgical approach to the sheep femoral trochlea. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 14, n. 5, p. 1-8, jan. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-5>>. Acesso em: 8 fev. 2022.

RATH, B. et al. Knorpelreparative Eingriffe am Kniegelenk. **Der Orthopäde**, v. 46, n. 5, p. 919-927, ago. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00132-017-3463-x>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

ROCHA JÚNIOR, S. S. et al. Avaliações macroscópica e histológica do reparo da cartilagem articular equina tratada com microperfurações do osso subcondral associadas ou não à injeção intra-articular de cartogenina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 272-278, abr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000400004>>. Acesso em: 16 mar. 2022.

SCHERER, S. S. et al. Nonactivated versus thrombin-activated platelets on wound healing and fibroblast-to-myofibroblast differentiation in vivo and in vitro. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 129, n. 1, p. 46e-54e, jan. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182362010>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

SENZEL, L.; GNATENKO, D. V.; BAHOU, W. F. The platelet proteome. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 5, p. 329-333, set. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832e9dc6>>. Acesso em: 6 jan. 2022.

SOARES, B. F. et al. Estudo comparativo entre o hemograma humano e veterinário. **Ensaios e Ciência**, v. 16, n. 4, p. 87-100, 2012. Disponível em: <<https://ensaioseciencia.pgskroton.com.br/article/view/2773>>. Acesso em: 6 jan. 2022.

VAN DEN BORNE, M. P. et al. International cartilage repair society (ICRS) and oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in autologous chondrocyte implantation (ACI) and microfracture. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15, n. 12, p. 1397-1402, dez. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.05.005>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

VENDRAMIN, F. S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24-28, fev. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-69912006000100007>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

WANG, Y. et al. Correlation between plasma, synovial fluid and articular cartilage Interleukin-18 with radiographic severity in 33 patients with osteoarthritis of the knee. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 14, n. 3, p. 297-304, ago. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10238-013-0251-8>>. Acesso em: 6 jan. 2022.

WILKE, M. M.; NYDAM, D. V.; NIXON, A. J. Enhanced early chondrogenesis in articular

defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 7, p. 913-925, abr. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jor.20382>>. Acesso em: 7 fev. 2022.

WILLIAMS, R. J.; DREESE, J. C.; CHEN, C. T. Chondrocyte survival and material properties of hypothermically stored cartilage: an evaluation of tissue used for osteochondral allograft transplantation. **American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 1, p. 132-139, jan. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0095399703258733>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

WU, P. I-K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 825-853, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmr.2016.06.002>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

YAMADA, A. L. M. et al. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 461-467, jun. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000600001>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

XIE, X.; ZHANG, C.; TUAN, R. S. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 204, p. 1-15, fev. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/ar4493>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

## ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia  
 – Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação quantitativa e qualitativa do reparo cartilaginoso de falhas articulares pelo uso de scaffold colagenoso.” protocolo nº **085/19**, sob a responsabilidade de **Geison Morel Nogueira** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **22 de Maio de 2020**.

(We certify that the project entitled “Avaliação quantitativa e qualitativa do reparo cartilaginoso de falhas articulares pelo uso de scaffold colagenoso.” protocol **085/19**, under the responsibility of **Geison Morel Nogueira** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of **May 22th, 2020**).

Vigência do Projeto	Início: 30/04/2020 Término: 30/04/2024
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ovino
Número de animais	81
Peso / Idade	40 Kg / 18 meses
Sexo	Macho
Origem / Local	Fazenda Bela Vista- Tupaciguara
Local onde serão mantidos os animais:	Hospital Veterinário - UFU (Setor de Grandes Animais)

Uberlândia, 19 de Junho de 2020.

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU  
 Coordenador da CEUA

Portaria Nº 1234 DE 01 DE OUTUBRO DE 2019