

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**ENXERTO OSTEOCONDRA L ALÓGENO, ASSOCIADO
À INOCULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA
OSSEA E DEXAMETASONA NO REPARO DA TRÓCLEA DE
COELHOS**

Lorena Borges Alves
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
2011

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

**ENXERTO OSTEOCONDRAI ALÓGENO, ASSOCIADO
À INOCULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA
OSSEA E DEXAMETASONA NO REPARO DA TRÓCLEA DE
COELHOS**

Lorena Borges Alves

Orientador: Prof. Duvaldo Eurides

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2011

EPÍGRAFE

*“Procure ser uma pessoa de valor,
em vez procurar ser uma pessoa de sucesso.
O sucesso é consequência...”*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

À Deus que me possibilitou ser quem sou hoje.

Agradeço muito pela vida, oportunidades, sabedoria
e por Ele ter escolhido pessoas tão especiais para conviver comigo.

Agradeço ainda, pelo maravilhoso dom de ser veterinária.

Por essa e tantas outras Graças concedidas,
ofereço essa conquista exclusivamente à ELE.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha **mãe** que foi a maior responsável pela pessoa que sou hoje. Agradeço ainda por ter sido meu suporte sempre, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu **pai** que sempre foi meu exemplo de persistência e força de vontade.

Aos meus irmãos **Andréa e César Filho** que sempre estiveram comigo, mesmo quando distantes, me apoiando.

Ao meu **esposo**, que durante toda essa jornada se fez presente me ajudando, principalmente na parte “tecnológica” da pesquisa.

Ao meu querido professor **Duvaldo Eurides**, que sem dúvida alguma foi muito mais que um orientador. Foi um super amigo, quase um pai. Que soube me incentivar e “puxar a minha orelha” nas horas necessárias. E hoje, é um dos principais responsáveis por essa conquista. Agradeço muito, de coração; e espero que nossa amizade seja eterna.

Aos amigos **Lilian, Daniel, Evelyn, Laura, Luiz Augusto e Benito** que participaram para que esse projeto acontecesse. Obrigada pela dedicação e carinho.

As professoras **Tânia Machado de Alcântara e Deise Aparecida de Oliveira e Silva** pela paciência e ensinamentos essenciais na execução do trabalho.

Aos funcionários **Amado, João Batista, Zé Maria, Rondino, Antônio e Célia**.

A **FAPEMIG** por contribuir financeiramente com a bolsa de mestrado.

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

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

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELA	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	13
II. REVISÃO DE LITERATURA	14
II.a Origem, características e utilização de células mesenquimais da medula óssea	14
II.b Técnicas e sítios de coleta de medula óssea	16
II.c Osteoindução	16
II.d Enxertos osteocondrais alógenos e sua conservação	18
III.MATERIAL E MÉTODOS	19
III.a Obtenção e conservação dos enxertos alógenos	19
III.b Animais	19
III.c Pré-operatório	20
III.d Coleta da amostra da medula óssea	20
III.e Isolamento, rendimento e viabilidade das células mononucleares	21
III.f Diluição do sedimento celular inoculado	22
III.g Procedimento cirúrgico	22
III.h Pós-operatório	24
III.i Avaliação macroscópica	24
III.j Avaliação microscópica	25
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
V. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE	51
Fontes de aquisição dos materiais da pesquisa	51

ABREVIATURAS

β GP – Beta glicerolfosfato

CEUA – Comitê de Ética de Utilização de Animais

CTMs – Células-tronco mesenquimais

DMEM – Meio de cultivo modificado de Dulbecco

DPBS – Solução salina tamponada de Dulbecco

EDTA – Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

g - Força gravitacional

HE – Hematoxilina-eosina

MO – Medula óssea

mM – milimolar

M – molar

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

pH – potencial hidrogeniônico

PO – Pós operatório

UI/mL – Unidades internacionais por mililitro

v/v – volume a volume

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01. Coelho da raça Nova Zelândia, macho, adulto submetido a introdução da agulha no tubérculo maior do úmero esquerdo (A) e aspiração da medula óssea (B).....	20
Figura 02. Aspirados da medula óssea de coelho diluída v/v em DPBS (seta branca) sobre 2,0 mL de solução Ficoll-Hypaque Plus (seta verde). Após centrifugação à 495 G, observar a separação da amostra em plasma (seta amarela), nuvem celular (seta azul), Ficoll-Hypaque (seta vermelha) e parte vermelha do sangue (seta laranja).....	21
Figura 03 Luxação medial da patela e exposição da tróclea do fêmur de coelho da raça Nova Zelândia (A). Notar o posicionamento do disco próximo ao tubérculo troclear medial (B), remoção do osso subcondral com uma lâmina de bisturi (C) e o segmento removido do sulco troclear (D).....	23
Figura 04. . Enxerto osteocartilaginoso alógeno preenchendo a área entre os tubérculos medial e lateral da tróclea de coelhos.....	24
Figura 05 Células mononucleares de coelho da raça Nova Zelândia em câmara hemocitométrica de Neubauer. Notar a presença de célula não viável corada pelo azul de tripan (seta).....	29
Figura 06. Aspecto látero-medial da articulação do joelho esquerdo do coelho C3 do grupo controle decorridos 45 dias de PO. Observar o espessamento da cápsula e aderências aos tecidos adjacentes.....	29
Figura 07. Membro pélvico esquerdo dos coelhos C10 e C11 do GII-45. Notar em A, líquido sinovial fluído e transparente (seta azul) e cápsula articular aparentemente normal (seta preta). Em B a presença de líquido sinovial viscoso e amarelado (seta laranja) e pontos hemorrágicos (estrelas).....	31
Figura 08. Membro pélvico esquerdo dos coelhos C4 e C1 do GII-90. Notar em A, crescimento de tecido (setas) semelhante à fibrocartilagem ao redor do enxerto com alteração dos tubérculos trocleares. Em B, crescimento de cartilagem integrando o enxerto ao leito receptor (seta), com a tróclea em formato anatômico aparentemente normal.....	32
Figura 09. Fotomicrografia do sulco troclear femoral do coelho C9, GI-45 após reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%. Notar descontinuidade da cartilagem (C) do implante (IM) e o leito receptor (LR), descamação da superfície articular, áreas de necrose, eburnação óssea, ausência de condrócitos (circulo), intenso infiltrado inflamatório (quadrado), áreas de hemorragias (setas) e reabsorção óssea (estrela). HE-40X.....	32
Figura 10. Fotomicrografia do enxerto conservado em glicerina a 98% implantado no animal C9, do GI-45 e no C8, do GII-45. Notar em A, rarefação óssea com intenso infiltrado inflamatório (estrela) abaixo do implante com	33

predomínio de macrófagos e neutrófilos (HE-100X). Em B, discreto infiltrado inflamatório composto por macrófagos e células gigantes (circulo), HE-400X.....

Figura 11. Fotomicrografia do enxerto conservado em glicerina a 98% implantado no coelho C1, do GII-90. Notar em A aderência superficial incompleta (seta) entre o enxerto (E) e o leito receptor, com porção profunda bem aderida (HE-40X). Em B descontinuidade entre a superfície do enxerto (E) e o leito receptor (LR) circundado por cartilagem fibrosa (retângulo), e enxerto deprimido em relação ao leito (HE-40X). Em C, área de reabsorção óssea, com osteoclastos (seta) degradando o osso; observar ainda, presença de discreto infiltrado inflamatório com célula gigante (circulo), HE-400X.....

34

Figura 12. Cartilagem hialina do enxerto do coelho C8, do GII-45. Notar presença de fissura. HE-200X.....

34

LISTA DE TABELA

	Página
Tabela 1. Valores individuais da contagem e viabilidade das células mononucleares isoladas da medula óssea de coelhos, referentes à coleta de 2,0mL de medula óssea.....	28

RESUMO

A articulação do joelho frequentemente é acometida por traumatismos, deformidades congênitas, tumores e infecções; com prognóstico reservado devido sua capacidade limitada de regeneração. O presente projeto avaliou a eficácia do enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98%, associado à inoculação de células mononucleares autógenas e dexametasona, no reparo ósseo e cartilaginoso da área entre os tubérculos medial e lateral da tróclea femural. Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, separados aleatoriamente em dois grupos, ambos com doze animais. Todos os animais foram submetidos ao enxerto osteocondral alógeno do sulco troclear, preservado em glicerina a 98% e avaliados com 45 e 90 dias de pós-operatório. Os animais do grupo tratado receberam ainda injeção intra-articular contendo $2,0 \times 10^6$ células mononucleares autólogas e dexametasona intramuscular. A implantação de enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98%, associado à inoculação de células mononucleares autógenas e dexametasona em coelhos favorece a ossificação endocondral e reduz a inflamação.

Palavras-chave: Joelho. Medula óssea. Osso.

ABSTRACT

Trauma, congenital deformities, tumors and infections often affected the articulation genus, with poor prognosis due to its limited regeneration capacity. This study evaluated the effectiveness of osteochondral graft preserved in glycerin 98% associated with mononuclear cells cells and dexamethasone in bone repair and cartilage of the trochlear groove. We used 24 New Zealand rabbits were randomly separated into two groups, each with twelve animals. All animals were subjected to graft osteochondral allograft of the trochlear groove, preserved in 98% glycerin and evaluated with 45 and 90 days postoperatively. The treated group also received intra-articular injection containing 2.0×10^6 mononuclear cells and intramuscular dexamethasone. The implantation of allogenic osteochondral graft preserved in glycerin 98% associated with injection of mononuclear cells and dexamethasone promotes endochondral ossification and reduces inflammation in rabbits.

Keywords: Genus. Bone. Bone marrow.

I INTRODUÇÃO

A articulação do joelho sofre intensa compressão e ampla amplitude de movimentos de flexão e extensão (HEBERT et al., 2003). Frequentemente são acometidas por traumatismos, deformidades congênitas, tumores e infecções; com prognóstico reservado devido sua capacidade limitada de regeneração (OLSSON, 1993). O uso de enxertos ósseos tem auxiliado os cirurgiões restabelecer a fisiologia óssea (WEIGEL, 1993). A difícil regeneração óssea tem instigado à descoberta de métodos que possam reduzir a dor, a rigidez articular e aumentar a mobilidade da articulação (OLSSON, 1993).

Diversas abordagens experimentais vêm sendo realizadas na tentativa de elucidar a formação e reparação óssea em defeitos osteocondrais. São empregados enxertos ósseos em consequência de lesões tumorais (MUSCOLO et al., 1998), biomateriais (BURG, 2000), esqueletos de matriz extracelular osteocondutiva com implantação de substâncias imunossupressoras como a dexametasona, na tentativa de reduzir a reação inflamatória ou rejeição (SILVA et al., 2008).

As células tronco mesenquimais (CTMs) possuem alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo como osso, cartilagem, gordura e músculo (CONRAD, HUSS, 2005). Em vários experimentos têm sido obtida as CTMs e controlada, *in vitro*, a sua diferenciação em tecido cartilaginoso e ósseo (MARTIN et al., 1998; PITTENGER et al., 1999). Estas células têm sido isoladas da medula óssea de roedores (SIMMONS et al., 1991; BITTENCOURT et al., 2006), cães (HUSS, HOY, DEEG, 1995), humanos (PITTENGER et al., 1999), gatos (MARTIN et al., 2002), suínos (RINGE et al., 2002) e coelhos (OLIVEIRA, 2008a; SOUZA, 2008).

Objetivou-se avaliar a eficácia de reparo ósseo e cartilaginoso do sulco troclear de coelhos submetidos à implantação de enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98%, associado à inoculação de células mononucleares autógenas isoladas da medula óssea e à aplicação intramuscular de dexametasona, por meio de avaliações macroscópica e histológica.

II REVISÃO DE LITERATURA

II.a Origem, características e utilização de células mesenquimais da medula óssea

A medula óssea (MO) apresenta dois sistemas troncos, um que promove a reconstituição hematopoiética e de outros tecidos, estando presente no embrião, sangue periférico, medula óssea e sangue do cordão umbilical (JAISWAL et al., 1997). O outro, células mesenquimais (CTMs) caracterizadas pela auto-renovação e potencial de diferenciação em várias linhagens de tecidos (CAMPAGNOLLI et al., 2001), também denominado de plasticidade celular (HERZOG, CHAI, KRAUSE, 2003) por exibirem ampla capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares. Assim como dar origem e regenerar diversos tecidos, incluindo ossos, cartilagem, adiposo, tendões, músculos e estroma medular (CAMPAGNOLLI et al., 2001).

Para maior compreensão da plasticidade celular seria fundamental estudar a expressão gênica das CTMs adultas (FONTANA, 2009), mas Zipori (2005) referiu-se à hipótese de que elas não possuem um grupo de genes que a especifiquem. Propôs o conceito de “stem state” colocando a propriedade “tronco” como um estado e não como “entidade”. Argumentou que esse estado “de espera” torna a célula apta a mudar rapidamente, sem necessidade de um longo processo. Já para Woodybury, Reynolds e Black (2002), estas células são multidiferenciadas ao invés de indiferenciadas. Confirmando essa teoria, Tremain et al. (2001), usando a técnica de microSAGE (Microserial Analysis of Gene Expression) catalogaram mais de 2000 sequências transcritas por uma colônia de CTMs humanas, derivadas de uma só célula. Observaram ainda, a expressão simultânea de transcritos característicos de células estromais, osteoblastos, mioblastos, condrócitos, endotélio, epitélio e células da linhagem neural.

As células tronco mesenquimais permanecem quiescentes até que algum estímulo ambiental induza sua diferenciação, como ocorre durante o processo de cicatrização (PERIN et al., 2003). De acordo com Jiang et al. (2005), a intensidade de lesão do tecido pode interferir na migração das CTMs. Elas sobrevivem em tecidos-alvos distintos por um longo período (MINGUELL, ERICES, 2006) e multiplicam rapidamente, originando células-filhas, capazes de substituir as células doentes (BANFI et al., 2000). Realizam divisões assimétricas originando células que permanecem indiferenciadas, repondo a reserva de células-tronco, evitando a redução da população (ZAGO, 2006). Isto é, quando uma célula-tronco se divide, uma das células filhas permanece e substitui a progenitora, enquanto que, a outra se divide e

se diferencia em células maduras com o aspecto do tecido específico (DUA, 1995; SANTOS, SOARES, CARVALHO, 2004).

Foi referido por Aggarwal, Pittenger (2005) e Bocelli-Tyndall et al. (2007) que as células tronco mesenquimais tem sido utilizadas em protocolos de transplante para aumentar a aderência do enxerto e reduzir a proliferação de linfócitos. Acrescentaram ainda que quando expandidas *ex vivo* foram usadas com sucesso para tratar doença do enxerto contra o hospedeiro, demonstrando propriedades imunossupressoras. Além disso, possuem habilidade quimiotática e de migração para áreas de lesão ou inflamação, propriedade conhecida como *homing* (AGGARWAL, PITTENGER, 2005). Existem relatos que as células-tronco da medula óssea circulam no sangue periférico e se dirigem para os tecidos lesados (XU et al., 2005) e que, em seguida, voltam para a medula, por processo fisiológico regulado por uma complexa interação de citocinas (WRIGHT et al., 2001; PETIT et al., 2005). Não há, contudo, de acordo com Romano (2004) a possibilidade de formação de tumor, já que não se diferenciam em tecidos indesejados no organismo hospedeiro. Quando as células mesenquimais são transplantadas por via intravenosa migram para o local da injúria (BARRY, MURPHY, 2004), que foi comprovada em fraturas ósseas, infarto do miocárdio (SHAKE et al., 2002) e em isquemia cerebral (WANG et al., 2002).

As células mesenquimais se encontram distribuídas na medula óssea e correspondem de 0,001 a 0,01% de todas as células nucleadas medulares, separando-se a fração mononuclear por gradiente de densidade (COVAS, 2006). Seu emprego terapêutico tem direcionado as pesquisas para seu isolamento, purificação e concentração, métodos que tornam possível favorecer a reparação tecidual (CONNOLLY, 1995). Geralmente, a maioria dos estudos científicos envolve a administração das CTMs associadas a marcadores para avaliação e a determinação da identidade celular por análise morfológica, imunofenotípica e/ou funcional (COLOMÉ, 2007).

As CTMs são facilmente coletadas e, de acordo com Wang et al. (2004), por serem provenientes do próprio paciente excluem a possibilidade de rejeição e não provocam controvérsias aos aspectos éticos e legais. A medula óssea da espécie humana é a principal fonte, porém são isoladas também no músculo esquelético e da derme (YOUNG et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), rins (ALMEIDA-PORADA et al., 2002), endotélio e subendotélio da veia umbilical (COVAS et al., 2003), sangue de cordão umbilical e placentário (YU, XIAO, SHEN, 2004). Assim como da medula óssea vertebral (AHRENS et al., 2004), cartilagem articular (ALSALAMEH et al.,

2004), vilosidade coriônica da placenta (IGURA et al., 2004), ligamento periodontal (SEO et al., 2004) e até do pulmão (SABATINI et al., 2005).

II.b Técnicas e sítios de coleta de medula óssea

A técnica de coleta da medula óssea é relativamente simples, geralmente as punções ocorrem na crista ilíaca, no trocanter maior do fêmur, na área transiliaca e na região epifisária proximal do úmero. O material deve ser coletado em condições assépticas, com o paciente sob anestesia geral, utilizando seringas contendo anticoagulantes para sua sucção (RASKIN, 1998). Se a coleta for realizada no osso fêmur ou tíbia, sugere-se o decúbito lateral (MENDONÇA et al., 2003; CASTANIA, 2007; ZAMPROGNO, 2007), quando for na crista ilíaca, o decúbito ventral (OLIVEIRA, 2008b; TOGNOLI et al., 2009).

As agulhas de eleição para infusões intraósseas são as de Jamshidi ou de mielograma, (JUNIOR, CARVALHO, LIMA, 2008). Quando é necessária a obtenção de quantidade elevada de MO, sugere-se a utilização de agulhas com o calibre maior, para aumentar o volume coletado e reduzir o tempo cirúrgico (OLIVEIRA, 2008b; TOGNOLI et al., 2009). Podem ser utilizadas as agulhas de Osgood, diâmetro 30 x 12mm (LOPES et al., 1998), de Steiss (OLIVEIRA, 2008b; TOGNOLI et al., 2009) ou de Rosenthal (RASKIN, 1998; OLIVEIRA, 2008a; SOUZA, 2008).

Algumas complicações podem ocorrer durante a coleta de MO nos ossos longos, dentre elas, as fraturas que são comuns quando são realizadas múltiplas perfurações em uma mesma região óssea, ou quando são realizados movimentos de alavanca com a agulha, ocasionando a formação de fragmentos ósseos (LARUE et al., 2005). Oliveira (2008a) e Souza (2008) obtiveram êxitos na punção no tubérculo umeral de coelhos por meio de movimentos rotacionais com agulha de Rosenthal heparinizada. Existe ainda o risco de contaminação do canal medular, que pode evoluir para osteomielite. Mesmo tratando-se de um pequeno orifício, constitui uma porta de entrada à patógenos, sendo fundamental a realização de antissepsia pré-operatória e pós-operatória (JUNIOR, CARVALHO, LIMA, 2008).

II.c Osteoindução

O recrutamento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos são conhecidos como osteoindução (JOHNSON, 1991). Tem sido pesquisada, principalmente, no emprego de proteínas indutoras de tecido ósseo e outros fatores de

crescimento, que poderão ainda ser associados a enxertos ósseos através da administração local ou sistêmica (KIRKER - HEAD, 1995).

Os osteoblastos são definidos como células pós-proliferativas, cubóides, fortemente positivas para fosfatase alcalina, que revestem a matriz óssea em regiões ativas de produção de matriz. Possuem capacidade de sintetizar macromoléculas fenótipo-específicas, como proteínas da matriz óssea, receptores de hormônios, citocinas e fatores de crescimento. Quando maduros, possuem ainda a habilidade de síntese de tecido mineralizado, definido como osso. Uma pequena proporção de osteoblastos (10-20%) é incorporada no interior da matriz celular recém formada. Fazem parte do estágio mais maduro de diferenciação da linhagem osteoblástica, os osteócitos, que menores que seus precursores, perdem muitas organelas citoplasmáticas e são considerados metabolicamente inativos (AUBIN, 1998).

As células tronco mesenquimais são isoladas em laboratório, expandidas e conduzidas à diferenciação a osteoblastos, em meios específicos, como meio α -mem, dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato (FONTANA, 2009). Os glicocorticóides endógenos se encontram envolvidos no remodelamento e formação óssea. A dexametasona é um potente corticosteróide utilizado na avaliação de respostas celulares *in vitro*. Foi relatado a diferenciação de culturas de CTMs para a linhagem osteoblástica pela suplementação do meio de cultura com dexametasona, beta-glicerolfosfato e ácido ascórbico (JAISWAL et al., 1997). Neste meio de cultivo, as células tronco mesenquimais adultas ingressam em uma cascata de desenvolvimento, definida pela aquisição de morfologia osteoblástica cuboidal, indução transitória de produção de fosfatase alcalina, expressão de mRNAs de proteína de matriz óssea e deposição de matriz extracelular de hidroxiapatita mineralizada (BRUDER, FOX, 1998).

De acordo com Pittenger et al. (1999), células mesenquimais humanas cultivadas em presença de dexametasona e ácido ascórbico passaram a apresentar depósitos de cálcio indicando sua diferenciação para osteoblastos. Jaiswal et al. (1997) desenvolveram um sistema modelo de diferenciação de CTMs em osteoblastos, o protocolo utilizado inclui o meio de cultura DMEM suplementado com indutores (dexametasona, ácido ascórbico e β GP) e observaram significativa mudança na morfologia celular, acompanhada por aumento expressivo na atividade da fosfatase alcalina após quatro dias em cultivo. Além disso, em 16 dias de cultivo, notaram ainda o depósito de matriz calcificada na superfície da placa de cultura.

II.d Enxertos osteocondrais alógenos e sua conservação

Múltiplos métodos têm sido estudados para a restauração de defeitos ósseos no campo da cirurgia reconstrutiva craniomaxilofacial e cirurgia ortopédica. Os enxertos ósseos favorecem a consolidação óssea, provendo uma fonte osteogênica, osteocondutiva, osteoindutiva e, dependendo do tipo, suporte mecânico (FITCH et al., 1997).

Definiu-se como enxertos alógenos ou aloenxertos os transplantes feitos entre indivíduos diferentes de uma mesma espécie (PARKER, 1993). No entanto, mesmo sendo da mesma espécie, reações de rejeição ou reabsorção são esperadas, já que o transplante envolve códigos genéticos diferentes (JANEWAY, 2002). Contudo, no reparo de injúrias osteocondrais, os enxertos de cartilagem hialina são alternativas atraentes por restabelecerem a superfície articular e serem resistentes à rejeição imunológica (LANE et al., 1977).

Foi enumerado por Rabelo et al. (2002), as principais vantagens do uso do enxerto como o baixo custo, a facilidade de obtenção, esterilização e conservação. A glicerina tem sido frequentemente usada como conservante por atuar na redução da antigenicidade (PINTO JÚNIOR, ALVARENGA, IWASAKI, 1996). Pigossi (1967) descreveu sua ação antisséptica, bactericida e fungicida, exceto contra formas esporuladas; acrescentou ainda a ação de proteção da integridade celular.

A glicerina desidrata o tecido ósseo substituindo a maior parte da água intracelular, sem alterar a concentração iônica das células (PINTO JUNIOR, 1990; COSTA, 1996). Preserva ainda a função osteoindutora e adequada intensidade osteocondutiva, não apresenta sinais de infecção e de rejeição no receptor (ZILLOTTO et al., 2003). Contudo, os ossos conservados neste meio tornam-se frágeis e quebradiços, entretanto, é uma característica encontrada em todos os métodos de conservação (COSTA, 1996).

Os tecidos devem ser mantidos em glicerina por um período mínimo de 30 dias e devido à desidratação tecidual decorrente à conservação, é necessária a hidratação durante 30 minutos antes de sua implantação no organismo (DALECK et al., 1992; BUSNARDO et al., 2009).

Foi relatado por Roe, Pijanowski, Johnson (1988), que não houve rejeição do organismo a enxertos ósseos alógenos conservados em glicerina na evolução pós-operatória e que também não existe diferença quanto ao crescimento de microorganismos na glicerina a 98% autoclavada e in natura, isso analisando um período de até dois anos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.a Obtenção e conservação dos enxertos alógenos

Foram coletadas 24 articulações do joelho em cadáveres de coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia, com massa corporal variando de 3,0 kg a 4,5 kg. As peças foram obtidas após o abate dos animais, realizado no abatedouro do Centro Federal de Educação Tecnológica de Uberlândia, fiscalizado pelo serviço de inspeção municipal. Os doadores selecionados não apresentavam alterações ortopédicas.

Com um paquímetro graduado¹ foi demarcada com lâmina de bisturi nº 10² uma área com comprimento de 1,0 cm x 0,4 cm de largura na área media entre os tubérculos medial e lateral da tróclea femural do membro pélvico esquerdo. Com uma micro retífica de alta rotação com disco de diamante (Dremel® série 300)³, o segmento osteocartilágneo foi removido em forma de cunha e higienizado repetidas vezes com solução de cloreto de sódio a 0,9%⁴. Os fragmentos foram armazenados e identificados em frascos individuais contendo solução de glicerina pura para análise a 98%⁵, à temperatura ambiente, durante um período mínimo de 30 dias.

III.b Animais

Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, adultos com aproximadamente 18 meses de idade e massa corporal variando entre 3,0 kg a 4,5 kg, provenientes do Laboratório Vallée de Uberlândia. O número de animais envolvidos baseou-se em princípios bioéticos, utilizando o mínimo de coelhos para validação dos dados (LEOPIZZI et al., 1998). Os doadores selecionados se apresentavam clinicamente saudáveis. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 063/10.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam ração comercial⁶ uma vez ao dia e água a vontade. Administrou-se ivermectina a 1%⁷ (0,1 mg/ kg, SC) (VIANA, 2007) em dose única, como medicamento de ação vermífuga e para ectoparasitas. Respeitou-se um período de 15 dias para adaptação dos animais ao ambiente e socialização com os pesquisadores.

Os coelhos foram separados aleatoriamente em dois grupos de 12 animais. O grupo controle (GI) foi submetido ao enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98% e o tratado (GII), ao enxerto alógeno também conservado em glicerina, associado ao transplante de células mononucleares autógenas da medula óssea e à aplicação intramuscular de

dexametasona⁸. 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 45 e 90 dias para avaliações pós-operatórias (PO), macroscópica e histológica. Foi selecionada a articulação do joelho esquerdo aleatoriamente para a realização dos procedimentos de enxertia e transplante.

III.c Pré-operatório

Os animais permaneceram em jejum hídrico e sólido de duas e quatro horas respectivamente. Para analgesia pré-operatória foi administrado tramadol¹¹ (2,0 mg/ kg, SC) (SOUZA, 2008). Em seguida, foram submetidos à medicação anestésica com cloridrato de cetamina⁹ (30,0 mg/ kg, IM) e de xilazina¹⁰ (5,0 mg/ kg, IM). A antibioticoprofilaxia foi realizada com cefazolina sódica¹² (30,0 mg/ kg, IM), 30 minutos antes dos procedimentos cirúrgicos (VIANA, 2007).

A pele da região da articulação do joelho esquerdo e escápulo-umeral esquerda foram submetidas à tricotomia e antissepsia com polivinil-pirrolidona degermante¹³, álcool 70%¹⁴ e polivinil-pirrolidona tópico¹⁵.

III.d Coleta da amostra da medula óssea

Para aspiração de 2,0 mL de MO, utilizou-se uma agulha de 1,6 x 40 mm (16G)¹⁶ que foi introduzida com movimentos rotacionais na epífise proximal do tubérculo umeral esquerdo dos coelhos, acoplada a uma seringa de 5,0 mL contendo 0,1 mL de solução estéril de heparina (5000 UI/ mL)¹⁷, figura 1. Após a coleta, as amostras de MO foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, para isolamento e determinação do rendimento e viabilidade das células mononucleares.

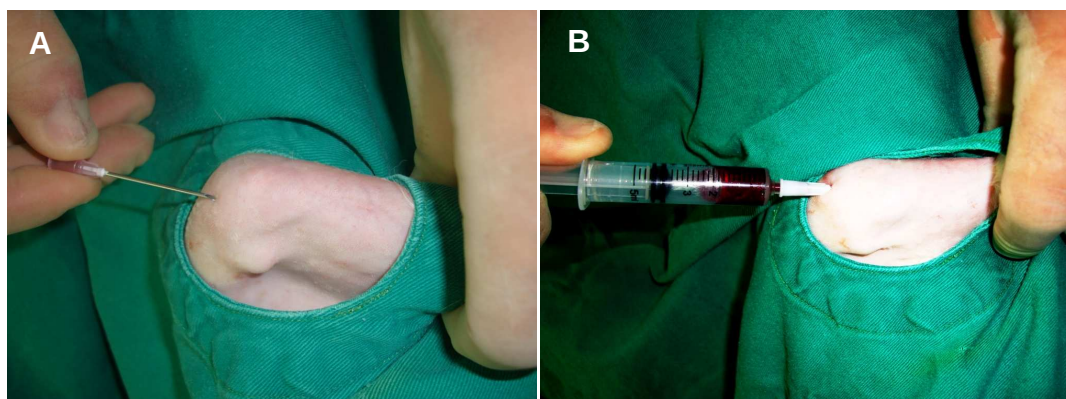


Figura 1. Coelho da raça Nova Zelândia, macho, adulto submetido à introdução da agulha no tubérculo maior do úmero esquerdo (A) e aspiração da medula óssea (B).

III.e Isolamento, rendimento e viabilidade das células mononucleares

Em capela de fluxo laminar desinfetada com álcool 70% e luz germicida, os aspirados de MO foram colocados individualmente em tubos tipo Falcon estéreis de 15 mL¹⁸, diluídos volume a volume (v/v) em 2,0 mL de solução salina tamponada de Dulbecco's (DPBS)¹⁹ e, em seguida, para separação das células mononucleares, a mistura foi adicionada lentamente, com pipeta de Pasteur em um outro tubo, sobre 2,0 mL de solução Ficoll-Hypaque Plus²⁰ na densidade 1,077 g/ mL (Figura 2).

Após centrifugação da solução à 495 G (força centrípeta) durante 30 minutos a 15 °C, cada amostra foi separada em quatro porções distintas. Na superfície, o plasma, logo abaixo a nuvem celular composta pelas células mononucleares, seguida do Ficoll-Hypaque e por fim, na porção inferior do tubo, as células que compõe a parte vermelha do sangue (Figura 2).

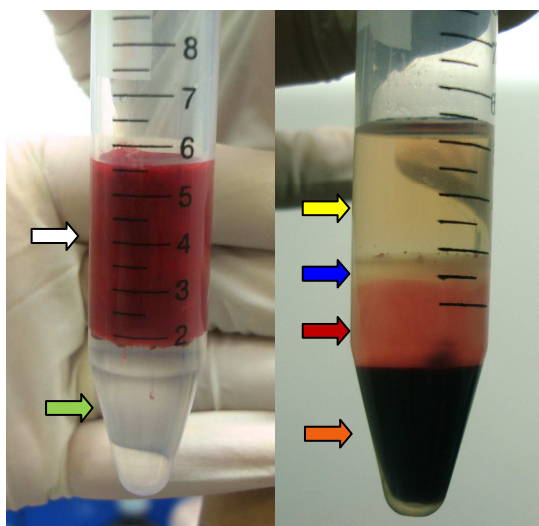


Figura 2. Aspirados da medula óssea de coelho diluída v/v em DPBS (seta branca) sobre 2,0 mL de solução Ficoll-Hypaque Plus (seta verde). Após centrifugação à 495 G, observar a separação da amostra em plasma (seta amarela), nuvem celular (seta azul), Ficoll-Hypaque (seta vermelha) e parte vermelha do sangue (seta laranja).

Depois da remoção do sobrenadante, a nuvem celular formada sobre a solução de Ficoll-Hypaque foi coletada com pipeta Pasteur e transferida para um novo tubo estéril de 15 mL. Para remoção de restos de plasma, Ficoll- Hypaque e células vermelhas, o sedimento celular foi lavado duas vezes com 10,0 mL de DPBS a 395 G durante 10 minutos a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se à amostra 1,0 mL de tampão de lise de eritrócitos contendo cloreto de amônio 0,16 M e Tris 0,17 M, com pH 7,6 durante cinco minutos à temperatura ambiente. Foi realizada uma terceira lavagem com a adição de 10 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)²¹ suplementado com 10% de soro fetal bovino²². Posteriormente desprezado, permanecendo aderido no fundo do tubo apenas o aglomerado

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 de 500 µl que foi mantida em gelo até a contagem das células e análise da viabilidade celular. Deste volume, uma alíquota de 10 µl da suspensão foi adicionada a 10 µl do corante azul de Tripán²³ em um tubo de Eppendorf²⁴ para contagem das células em 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 seguinte fórmula: $V \times FN \times FT / \#Q$, onde V = número de células viáveis contadas; FN = fator da câmara de Neubauer (10^4); FT = fator de diluição do azul de tripan (2) e #Q = número de quadrantes da câmara utilizados na contagem. A viabilidade foi determinada por técnica de exclusão vital, ou seja, as células não coradas por azul de tripan, como descrito por Freshney (2001) e Bittencourt et al. (2006). Para determinar a viabilidade celular em porcentagem aplicou-se a equação matemática: $V \times 100 / NT$, onde NT = número total de células (viáveis e não viáveis) contadas na câmara hemocitométrica.

III.f Diluição do sedimento celular inoculado

Para padronizar a quantidade e o volume de células inoculadas, realizou-se 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 µl do sedimento celular; e CT = quantidade de células a serem transplantadas ($2,0 \times 10^6$). O volume final foi calculado pela fórmula: $VF = VI / FD$, onde VI = volume inicial do inoculado (500 µl); e FD = fator de diluição. Os volumes finais da fração de células mononucleares foram ajustados, sendo armazenados em tubos de Eppendorffs. A fração celular foi aspirada dos tubos de Eppendorff por seringas estéreis de 1,0 mL para inoculação intra-articular no momento do procedimento cirúrgico no mesmo coelho em que a medula óssea foi aspirada, caracterizando dessa forma, um transplante autógeno.

III.g Procedimento cirúrgico

Aproximadamente 20 minutos antes do término do isolamento das células tronco mononucleares, iniciou-se os preparativos cirúrgicos de enxertia e transplante celular autógeno. Os mesmos coelhos utilizados na coleta de medula óssea foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico.

Com o animal em decúbito dorsal foi realizada uma incisão na pele de aproximadamente 4,0 cm na região lateral à articulação do joelho esquerdo e incisão de cerca de 3,0 cm na cápsula articular. A patela foi deslocada medialmente para exposição do sulco troclear femoral esquerdo onde com um paquímetro graduado, mensurou uma área de 0,4 cm x 1,0 cm. A área foi delimitada por incisões na cartilagem articular com lâmina de bisturi nº 10. O segmento do sulco troclear foi removido com um disco diamantado acoplado a uma micro-retífica (Dremel®) em baixa rotação e sob refrigeração com gotejamento de solução de cloreto de sódio a 0,9%. O disco foi angulado em torno de 30° para que o segmento fosse removido em forma de cunha, preservando os tubérculos medial e lateral da tróclea do fêmur. Posteriormente, efetuou-se remoção do osso subcondral com uma lâmina de bisturi, evitando-se danificar os tubérculos da tróclea e à cartilagem articular adjacente (Figura 3).

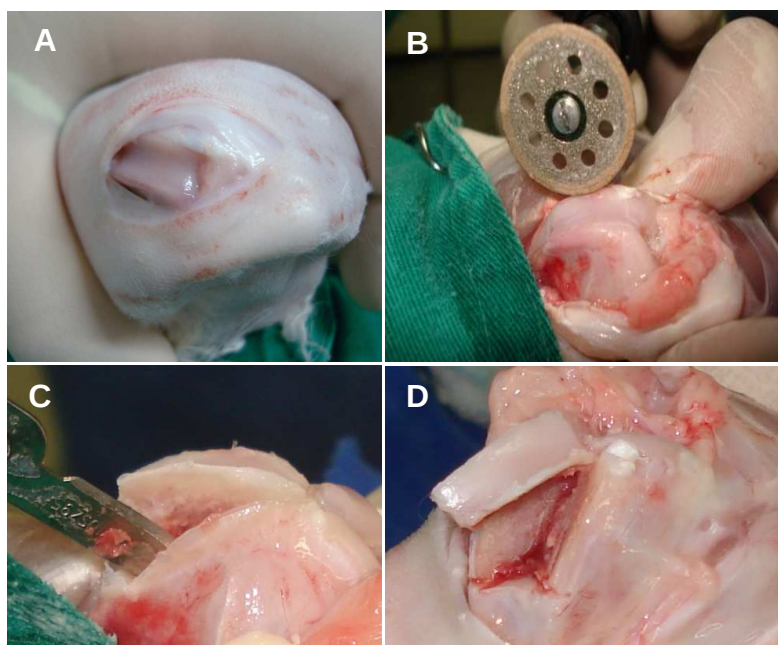


Figura 3. Luxação medial da patela e exposição da tróclea do fêmur de coelho da raça Nova Zelândia (A). Notar o posicionamento do disco próximo ao tubérculo troclear medial (B), remoção do osso subcondral com uma lâmina de bisturi (C) e o segmento removido do sulco troclear (D).

O local removido foi preenchido com enxerto osteocartilaginoso alógeno conservado em glicerina a 98%, previamente hidratado por 30 minutos com solução de cloreto de sódio a 0,9%. A adequação das bordas dos enxertos se fez necessária para melhor acomodação do enxerto ao leito receptor (Figura 4). A patela foi reposicionada, procedendo-se a sutura da cápsula articular e redução do espaço subcutâneo com fio poliglactina 910, nº 4-0²⁶ com pontos simples isolados e zigue-zague, respectivamente. A reaproximação da pele foi realizada com sutura simples isolada utilizando fio mononáilon nº 3-0 agulhado²⁷.



Figura 4. Enxerto osteocartilaginoso alógeno preenchendo a área entre os tubérculos medial e lateral da tróclea de coelhos.

Nos coelhos do grupo tratado foram efetivados os mesmos procedimentos, porém associados à administração intra-articular de solução contendo de 0,5mL células mesenquimais mononucleares isoladas e quantificadas. A fração total inoculada foi de $2,0 \times 10^6$ células mononucleares da medula óssea autóloga, diluídas em DMEM, meio potencializador da osteoindução. Foi aplicado ainda dexametasona (2,0 mg/ kg, IM), de 12 em 12 horas, por três dias.

III.h Pós-operatório

Submeteu-se os animais à aplicação de cefazolina sódica (30,0 mg/ kg, IM) de 12/12 horas durante sete dias e de flunixinina meglumina²⁸ (1,0 mg/ kg, IM) a cada 24 horas por três dias. Para analgesia utilizou-se o cloridrato de tramadol (2,0 mg/ kg, SC) de oito em oito horas, durante três dias. As feridas foram higienizadas duas vezes ao dia, com gazes umedecidas em solução de cloreto de sódio a 0,9%, e posterior aplicação tópica de solução polivinil-pirrolidona a 10% e rifamicina²⁹ spray por dez dias, quando os pontos foram retirados.

Os coelhos foram mantidos por 12 dias com colar elisabetano, confeccionado com filmes radiográficos, a fim de evitar sua interferência na área da intervenção cirúrgica.

III.i Avaliação macroscópica

Para coleta das articulações operadas, decorridos os períodos pré-estabelecidos de 45 e 90 dias, os animais foram submetidos à eutanasia com sobredose de tiopental sódico 2,5%³⁰ e

cloreto de potássio 10%³¹, conforme recomendado pela resolução CFMV 714/02 (CFMV, 2002).

Na inspeção macroscópica intra-articular foram observadas a presença de transudato e/ou exsudato, reações teciduais, coloração, volume e consistência do líquido sinovial. Assim como as aderências entre tecidos adjacentes, espessura da cápsula articular, posicionamento da patela e os aspectos das bordas trocleares. Foram também avaliados a coloração, consistência, irregularidades na superfície do enxerto, área de contato com as bordas trocleares e adesão do enxerto ao sítio receptor. Os enxertos osteocondrais alógenos foram examinados quanto à mobilidade, crescimento de tecidos periarticulares e existência de áreas com reabsorção óssea.

III.j Avaliação microscópica

Os locais das enxertias das articulações do joelho foram coletados, armazenadas em frascos individuais e fixadas em formol 10%³² por um período mínimo de 24 horas, à temperatura ambiente. Para a descalcificação utilizou-se o descalcificador usado no Massachusets General Hospital, MGH, Boston, USA (EDTA tetrassódico 7,0 g³³, tartarato de sódio e potássio 80 g³⁴, ácido clorídrico 1200 mL³⁵ e água destilada 9000 mL) (AYMORE & AMSTALDEN, 2005), durante um período de seis horas. Em seguida, as peças foram seccionadas no plano sagital e desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico³⁶, diafanizadas em xilol³⁷ e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo³⁸, obtendo-se cortes de 5 µm que foram colocados sobre lâmina histológica e corados por Hematoxilina e Eosina³⁹ (HE). A análise microscópica foi realizada em microscópio óptico Olympus BX60⁴⁰.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os coelhos foram escolhidos como modelo experimental devido, principalmente, a sua capacidade de adaptação em gaiolas, docilidade, facilidade de manejo e controle de doenças. De acordo com Schanaider e Silva (2004) camundongos e cobaias são muito susceptíveis a salmonelose, ratos e camundongos à micoplasmas e pneumonia, já os coelhos apresentam maior resistência a essas doenças, contudo são facilmente infectados por sarna. Visando o controle ectoparasitos e endoparasitos, os coelhos foram submetidos à aplicação de ivermectina 1%, que se mostrou eficaz em dose única, por não ter sido verificado durante o experimento, manifestações clínicas de parasitismo.

A escolha da anestesia foi fundamentada na facilidade de aplicação, na segurança dos fármacos e no custo. Optou-se pela associação de cetamina e xilazina por produzirem anestesia dissociativa entre o córtex e o tálamo, e analgesia, sem perda total dos reflexos protetores, o que facilita a observação dos parâmetros vitais dos animais. Outra vantagem dessa associação é manter o animal sob anestesia por 40 a 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose (SCHANAIDER & SILVA, 2004).

Visando a reparação osteocartilaginosa das articulações do joelho utilizou-se enxertos alógenos que serviram como arcabouço para o desenvolvimento de um novo tecido (DALECK, 1999), preservados em glicerina 98%, a qual possui ação antisséptica, bactericida e fungicida (PIGOSSI, 1967). A glicerina se mostrou eficaz, possivelmente, por ter prevenido o crescimento de microorganismos, como referido por Roe, Pijanowski e Johnson (1988).

A coleta da medula óssea pode ser feita em vários locais, como no trocanter maior do fêmur, na área transilíaca, na crista ilíaca ou na região epifisária proximal do úmero (RASKIN, 1998). Segundo Connolly (1995) a crista ilíaca é a melhor fonte de medula óssea, contudo, Tarvin e Lenehan (2005) citaram que alguns acidentes podem ocorrer na punção dos ossos da pelve, já que essa região se apresenta como um envoltório de vísceras pélvicas. Portanto, qualquer deslizamento da agulha, pode projetar sua extremidade cortante através do osso e perfurar uma víscera. Por esta razão e com intuito de evitar a claudicação decorrente da coleta, que poderia interferir na avaliação pós-operatória da articulação do joelho, o local de escolha para aspiração da medula óssea foi na epífise proximal do tubérculo umeral. O método proporcionou com facilidade a coleta de 2,0 mL de medula óssea.

Foi referido que a coleta realizada com múltiplas perfurações do osso ou por meio de movimentos de alavanca com a agulha pode predispor a fraturas do osso (LARUE, 2005). Neste experimento, os movimentos rotacionais realizados com a agulha na perfuração da

epífise proximal do tubérculo umeral, para a coleta da MO, não demonstrou clinicamente ter ocasionado lesões ósseas graves. O diâmetro da agulha de 1,6 x 40 mm utilizado neste trabalho facilitou a aspiração e a obtenção da quantidade desejada da MO.

Após coletada a medula óssea, é importante para eficácia da terapia celular, o protocolo de isolamento celular e o número de células inoculadas (LUNDE et al., 2006). Neste trabalho, para separação das células mononucleares foi utilizado na proporção de 2:1, a solução Ficoll-Hypaque Plus na densidade 1,077 g/ mL, em centrifugação à 495G, durante 30 minutos a 15 °C. O método empregado foi eficaz por apresentar, após centrifugação, as camadas bem delimitadas do plasma, da nuvem de células mononucleares, da solução Ficoll-hypaque e da porção vermelha do sangue (Figura 2).

As soluções empregadas no isolamento celular provavelmente não interferiram na quantidade das células mononucleares. Observou-se uma quantidade celular variando de $2,72 \times 10^6$ a $12,28 \times 10^6$, com média celular de $5,56 \times 10^6$ células/ mL (Tabela 1). Número inferior ao descrito por Connolly et al. (1989) que retiraram de 7,0 a 10,0 mL de MO de coelhos, utilizando também o gradiente Ficoll-Hypaque e obtiveram uma média de 8×10^6 células/ mL. Possivelmente, essa diferença da média celular foi ocasionada pela quantidade de MO coletada, que neste experimento foi cerca de quatro vezes menor. Contudo, a quantidade celular foi superior aos relatos de Im et al. (2001), que encontraram, também em coelhos, uma média de $3,4 \times 10^6$ células/ mL. Yanai et al. (2005) coletaram 2,0 mL de MO do fêmur de coelhos e obtiveram uma média de $5,0 \times 10^6$ células/ mL, valores próximos aos observados nesta pesquisa. Portanto, a média celular obtida neste experimento demonstra a eficiência do método aplicado.

Baseado no número celular encontrado/mL pode-se determinar a quantidade de aspirado necessário para obter número suficiente de células para a terapia celular. O efeito final a partir de uma perfuração óssea e obtenção de volumes menores de aspirado, evita múltiplas perfurações e aspirações da MO o que pode complicar o período de PO. No entanto, é importante ressaltar que a quantidade celular encontrada pode variar entre os animais (OLIVEIRA, 2008a), como observado neste trabalho (Tabela 1).

A maior dificuldade na manipulação celular é a preservação de suas características funcionais e a manutenção de sua viabilidade (OLSSON et al., 2009). Deste modo, é necessário considerar além da quantidade celular, sua viabilidade; que é mantida utilizando materiais apropriados ao isolamento e, principalmente, dependente de um manuseio adequado. A viabilidade celular foi determinada pela técnica de exclusão vital com auxílio do corante azul de tripan (Figura 5), e variou de 78,08 a 95,97%, com média de 91,05% (Tabela

1). A viabilidade celular obtida foi inferior a descrita por Bittencourt et al. (2006), que relataram uma viabilidade superior a 95%, diferença que pode estar relacionada com a espécie utilizada, já que os autores utilizaram camundongos. Contudo corrobora com os achados de Tognoli et al. (2007), que encontraram média de 90% em cães, e por Souza (2008), que em coelhos, relatou média de 91,19%.

Tabela 1. Valores individuais da contagem e viabilidade das células mononucleares isoladas da medula óssea de coelhos da raça Nova Zelândia, referentes à coleta de 2,0 mL de medula óssea do úmero.

Coelhos	Contagem X10 ⁶	Viabilidade	Células viáveis/ inviáveis	Total de células
01	3,42	91,81	157/14	171
02	4,22	94,31	199/12	211
03	6,78	94,98	322/17	339
04	3,92	90,81	178/18	196
05	4,38	78,08	171/48	219
06	5,66	90,81	257/26	283
07	2,72	95,58	130/06	136
08	4,60	90,86	209/21	230
09	10,52	90,11	474/52	526
10	4,78	88,28	211/28	239
11	3,48	95,97	167/07	174
12	12,28	91,04	559/55	614
Média	5,56	91,05		

Os animais dos grupos GI e GII exibiram boa cicatrização da ferida de pele. Durante a análise macroscópica foi constatada em apenas um (4,16%) animal do GI-45, exsudação sero-sanguinolenta extracapsular, sugerindo uma infecção. Contudo, nos demais (95,84%) coelhos do GI e do GII não foram encontrados casos semelhantes, o que sugere que a cefazolina sódica foi eficaz por impedir a proliferação de microorganismos nos tecidos adjacentes à articulação.

No grupo controle, a cápsula articular se encontrava espessa em nove (75%) animais, aderida aos tecidos adjacentes em cinco (41,66%), figura 6, sendo que em quatro coelhos (33,33%) foram observadas as duas anormalidades. De acordo com Lipowitz (1993), o aumento da espessura capsular ocorre em consequência do processo inflamatório instalado. Essa alteração inicia-se com a degradação da matriz por enzimas e mediadores inflamatórios, seguida da quebra dos proteoglicanos e do colágeno, que resulta no aumento da espessura da cartilagem, no edema entre as fibrilas de colágeno e na necrose dos condrócitos superficiais.

Em todos (100%) os animais do grupo tratado, a cápsula articular manteve sua aparência próxima a fisiológica, não sendo observadas expressivas aderências ou espessamentos. A diferença entre os grupos controle e tratado provavelmente foi em consequência da terapia com as células tronco mesenquimais, que possuem a capacidade de reduzir a proliferação de linfócitos (AGGARWAL, PITTENGER, 2005; BOCELLI-TYNDALL et al., 2007). Além disso, o uso da dexametasona no GII se mostrou eficaz em reduzir a inflamação.

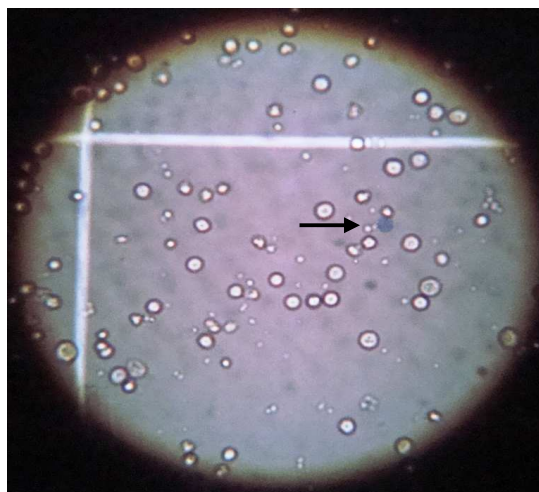


Figura 5. Células mononucleares de coelho da raça Nova Zelândia em câmara hemocitométrica de Neubauer. Notar a presença de célula não viável corada pelo azul de tripan (seta).

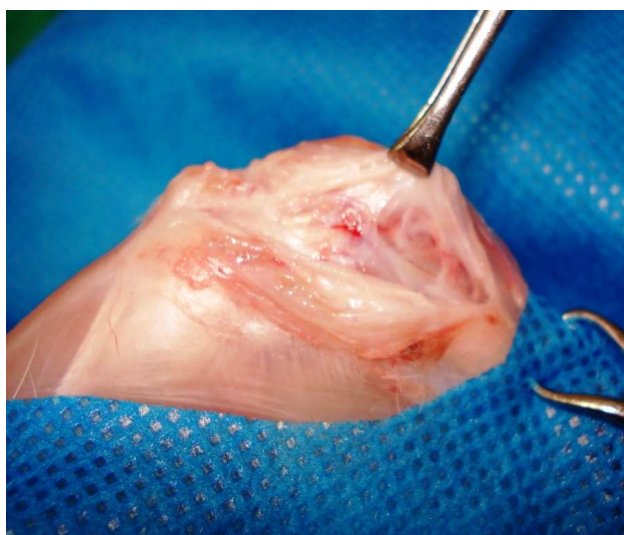


Figura 6. Aspecto látero-medial da articulação do joelho esquerdo do coelho C3 do grupo controle decorridos 45 dias de PO. Observar o espessamento da cápsula e aderências aos tecidos adjacentes.

No grupo controle, o líquido sinovial apresentava-se de coloração amarelada em cinco (41,66%) coelhos (C1, C4, C5, C6, e C12). O fato deveu-se, provavelmente, em consequência

do processo inflamatório provocado pelo processo degenerativo do enxerto. No C7 (8,33%) observou-se grânulos de pus no espaço articular, devido a contaminação no decorrer do procedimento cirúrgico. Nos coelhos C8, C9, C10 e C11 (33,33%), a coloração, volume e viscosidade do líquido sinovial se apresentavam semelhantes ao normal. Em um (8,33%) animal (C2), o líquido sinovial estava ausente. A redução da viscosidade pode ser devida à liberação da enzima hialuronidase que atua na degradação do ácido hialurônico durante o processo inflamatório. A membrana sinovial quando inflamada produz em excesso um fluido aquoso, tornando-o relativamente ineficiente na proteção das cartilagens articulares (BENNET, 2004). Além disso, a patela encontrava-se luxada medialmente, devido ao arrasamento da área media da tróclea femoral e perda dos tubérculos trocleares em consequência do crescimento exacerbado de tecido fibroso.

No coelho C3 (8,33%), do grupo controle verificou-se reabsorção do enxerto e o líquido sinovial encontrava-se avermelhado, sugestivo de hemorragia. Quando há injúrias da membrana sinovial, as enzimas lisossomais são liberadas pelas células inflamatórias, com isso, prostaglandinas, radicais livres e citocinas são secretadas no fluido sinovial (LESCHONSKI, 1999). As enzimas lisossomais destroem os proteoglicanos, os glicosaminoglicanos e o colágeno, acarretando a degradação da cartilagem articular (STASHAK, 1994).

Verificou-se luxação medial de patela de grau quatro em um coelho (8,33%) do grupo controle (C2) com formação de tecido cicatricial no local da incisão capsular. Apresentava ainda, cápsula articular espessa aderida ao enxerto e crescimento tecidual exacerbado sob o enxerto e tubérculos trocleares. O processo de adesão pode ser definido como artrofibrose, sendo deposição de fibrina nas estruturas envolvidas, uma consequência do processo inflamatório.

No grupo tratado, 66,66% dos animais (C1, C2, C3, C5, C6, C7, C10 e C12), apresentavam enxerto bem aderido e líquido sinovial com coloração, volume e viscosidade aparentemente normais (Figura 7). No animal C4 (8,33%), o líquido sinovial estava fluido e transparente, porém em quantidade reduzida. Observou-se ainda o crescimento de cartilagem fibrosa e hialina nas laterais e superfície do enxerto (Figura 8), o que provavelmente foi decorrente da falha no acondicionamento do enxerto ao leito receptor, comprometendo a sua instabilidade e ocasionando a neoformação óssea na área de transição (SOUZA, 2009)

Em C8, 8,33% do GII, o líquido sinovial se assemelhava ao fisiológico, porém o enxerto apresenta-se solto nas laterais, consequência provavelmente do acoplamento imperfeito do enxerto ao leito receptor ou até por alguma deficiência na força de compressão

patelar. Em C9 e C11 (16,66%), apesar dos enxertos se apresentarem bem aderidos, notou-se o líquido sinovial viscoso e amarelado, com pontos hemorrágicos (Figura 7). Sugestivo de processo infeccioso, provavelmente consequência da contaminação durante os períodos transoperatório ou pós-operatório referente aos cuidados com os curativos e antibioticoterapia, ou ainda, a falha na ação antisséptica da glicerina 98%. Na conservação do enxerto optou-se pela não utilização de antibiótico a fim de evitar interferências nos resultados, e, devido ao seu efeito tóxico para as células (FOX, 1984; JOHNSON, 1995; PIERMATTEI, FLO, 1997).

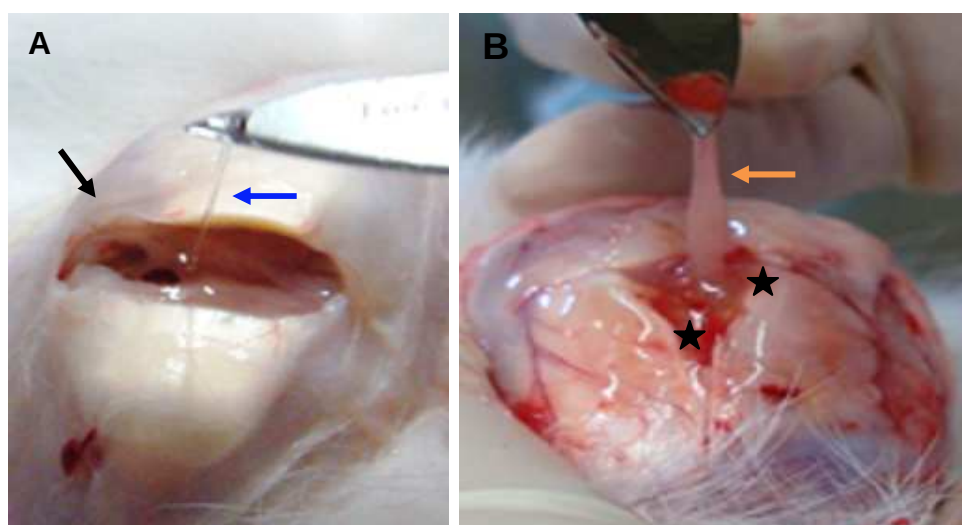


Figura 7. Membro pélvico esquerdo dos coelhos C10 e C11 do GII-45. Notar em A, líquido sinovial fluido e transparente (seta azul) e cápsula articular aparentemente normal (seta preta). Em B a presença de líquido sinovial viscoso e amarelado (seta laranja) e pontos hemorrágicos (estrelas).

Os aspectos histológicos dos joelhos dos coelhos do grupo controle foram caracterizados por processos degenerativos (Figura 9). Dos 12 animais, quatro coelhos (33,33%) apresentavam o enxerto e o leito receptor integrados, oito (66,66%) com grande parte da cartilagem em processo de necrose e um coelho (8,33%) manifestava necrose e reabsorção óssea. Cinco animais (41,66%) demonstrava intensa rarefação óssea e em três (25%), reabsorção da cartilagem do enxerto. Todos os coelhos (100%) continham ainda, por toda extensão do implante, células características de processo inflamatório, entre elas, macrófagos e neutrófilos (Figura 10 - A). Os processos degenerativos podem ter sido ocasionados por uma deficiência da glicerina como conservante do enxerto, sendo que Daleck et al. (1992) caracterizaram a glicerina como antibacteriana e antifúngica. Entretanto, Melo et al. (1998) observaram crescimento de *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus* spp em 21,4% das amostras ósseas analisadas. Também pode ser considerada a contaminação durante os procedimentos cirúrgicos. A reduzida aderência do enxerto pode ter ocorrido pelo encaixe

imperfeito com o leito receptor ou por deficiência na força compressiva da patela. São fatores que geram instabilidade, prejudica o processo de neovascularização e favorece o processo degenerativo.

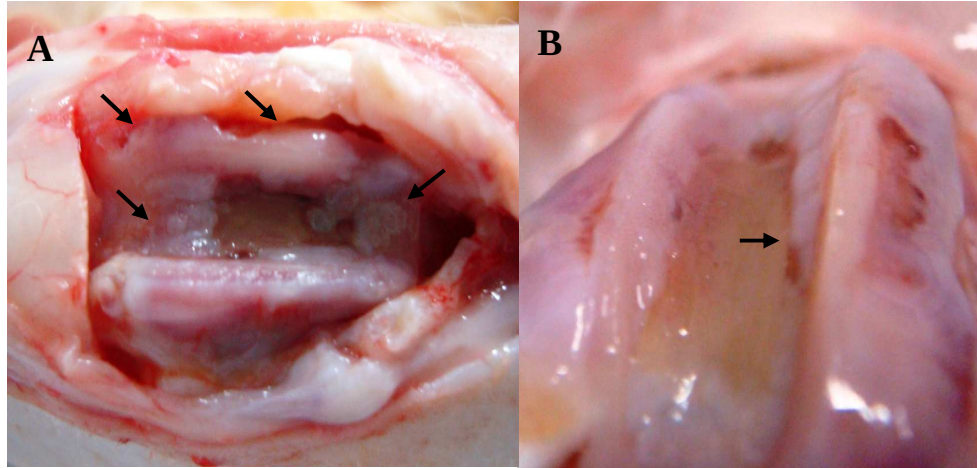


Figura 8. Membro pélvico esquerdo dos coelhos C4 e C1 do GII-90. Notar em A, crescimento de tecido (setas) semelhante à fibrocartilagem ao redor do enxerto com alteração dos tubérculos trocleares. Em B, crescimento de cartilagem integrando o enxerto ao leito receptor (seta), com a tróclea em formato anatômico aparentemente normal.

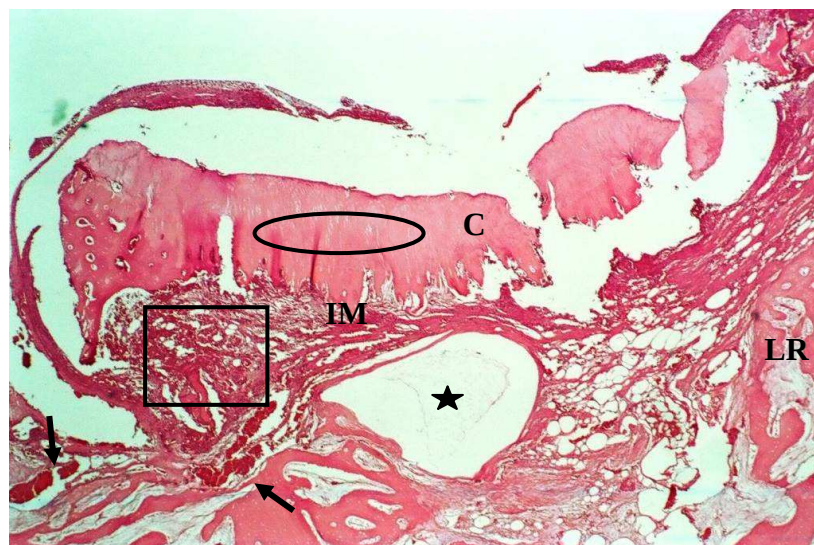


Figura 9. Fotomicrografia do sulco troclear femoral do coelho C9, GI-45 após reparo com enxerto alógeno preservado em glicerina a 98%. Notar descontinuidade da cartilagem (C) do implante (IM) e o leito receptor (LR), descamação da superfície articular, áreas de necrose, eburnação óssea, ausência de condrócitos (círculo), intenso infiltrado inflamatório (quadrado), áreas de hemorragias (setas) e reabsorção óssea (estrela). HE-40X.

No grupo dos coelhos tratados, o animal C8 (8,33%) exibiu a porção lateral e medial do enxerto desprendida. Histologicamente, em todos os animais uma das extremidades do enxerto apresentavam-se em descontinuidade com o leito receptor, contudo, proporcionavam

extremidade ventral do enxerto aderida ao leito (Figura 11-A). Notou-se o crescimento de cartilagem fibrosa e hialina do leito receptor em direção ao enxerto. Segundo Croci (1997), ilhotas de cartilagem podem ser encontradas no tecido celular que cresce dentro e fora do osso.

Podem ocorrer diferenciações de culturas de células tronco mesenquimais para a linhagem osteoblásticas quando efetuada a suplementação do meio de cultura com dexametasona e ácido ascórbico (MANIATOPOULOS et al., 1988; JAISWAL et al., 1997; PITTENGER et al., 1999; BOO et al., 2002; TROPEL et al., 2004). Provavelmente, a área de cartilagem fibrosa e hialina encontradas na região intermediária entre o enxerto e seu leito, caracterizou o processo de ossificação endocondral, que pode ter sido favorecida pela ação da dexametasona. A formação de fibrocartilagem e cartilagem hialina, mesmo sem a arquitetura típica da cartilagem articular, demonstrou que as lesões articulares foram reparadas a partir das CTMs associadas à dexametasona (Figura 11-B). Entretanto, considera-se que a restauração da arquitetura tecidual característica da superfície articular é rara, ocorrendo em número reduzido de falhas osteocondrais (MITCHELL, SHEPARD, 1976; FRENCH et al., 1989, KIM et al., 1991; HANIE et al., 1992; SHAPIRO et al., 1993).

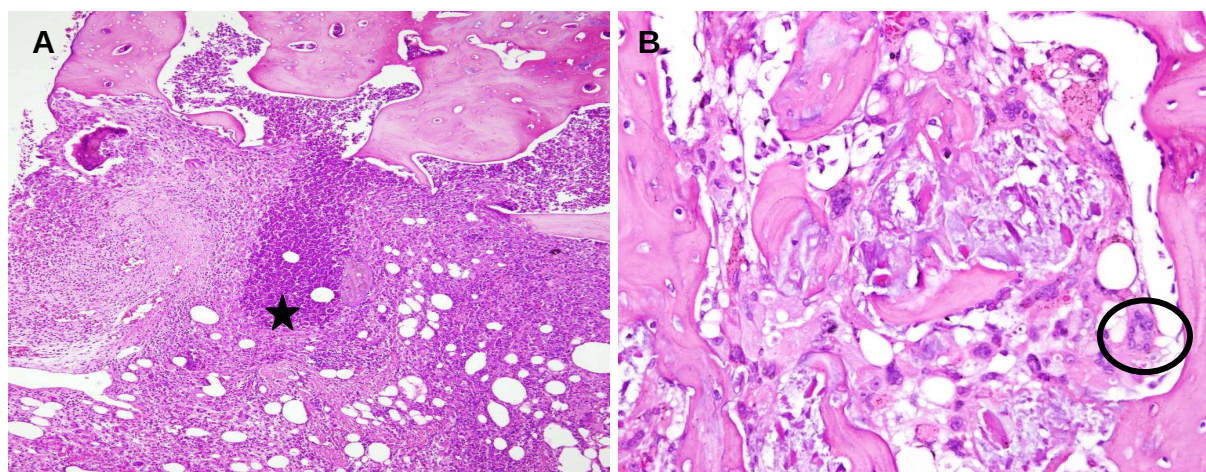


Figura 10. Fotomicrografia do enxerto conservado em glicerina a 98% implantado no animal C9, do GI-45 e no C8, do GII-45. Notar em A, rarefação óssea com intenso infiltrado inflamatório (estrela) abaixo do implante com predomínio de macrófagos e neutrófilos (HE-100X). Em B, discreto infiltrado inflamatório composto por macrófagos e células gigantes (circulo), HE-400X.

Verificou-se que cinco coelhos (41,66%) do grupo tratado apresentavam o enxerto deprimido em relação ao leito receptor (Figura 11 - B). Resultado que pode ser explicado, nos animais C1, C2 e C10 (25%) pela presença de focos de reabsorção óssea na parte profunda do enxerto, com osteoclastos degradando o osso (Figura 11 - C). A perda óssea deve ter reduzido a altura do enxerto, deixando-o menor em relação ao leito. Nos demais coelhos (75%), em que

não ocorreu reabsorção óssea, supõem-se que o enxerto não preencheu o leito receptor adequadamente, ou a inapropriada compressão patelar que pode ter gerado instabilidade do enxerto. Portanto, promoveu desequilíbrio na distribuição das forças sobre a superfície do enxerto.

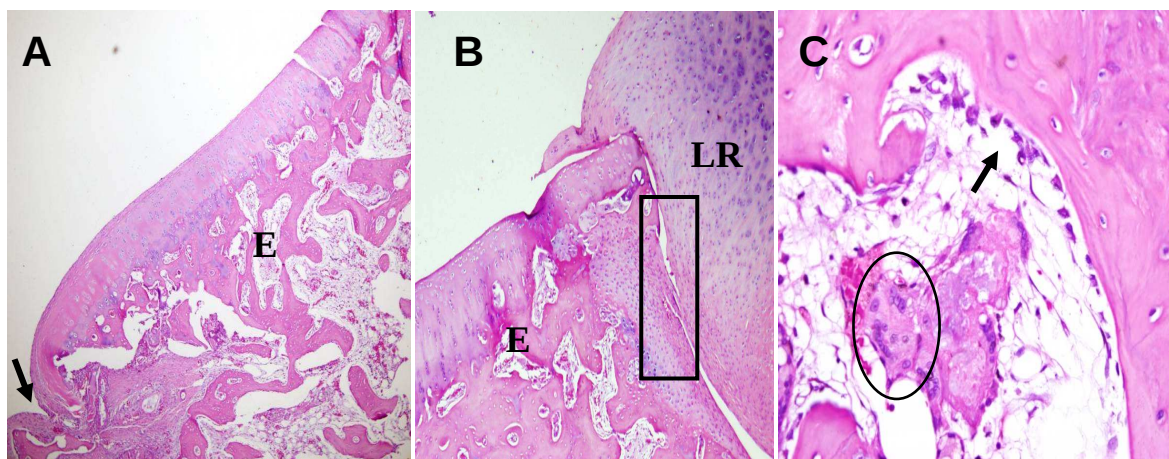


Figura 11. Fotomicrografia do enxerto conservado em glicerina a 98% implantado no coelho C1, do GII-90. Notar em A aderência superficial incompleta (seta) entre o enxerto (E) e o leito receptor, com porção profunda bem aderida (HE-40X). Em B descontinuidade entre a superfície do enxerto (E) e o leito receptor (LR) circundado por cartilagem fibrosa (retângulo), e enxerto deprimido em relação ao leito (HE-40X). Em C, área de reabsorção óssea, com osteoclastos (seta) degradando o osso; observar ainda, presença de discreto infiltrado inflamatório com célula gigante (circulo), HE-400X.

Em quatro dos 12 animais (33,33%) do GII (C1, C8, C10 e C11) foram observadas fissuras na cartilagem do implante (Figura 12).

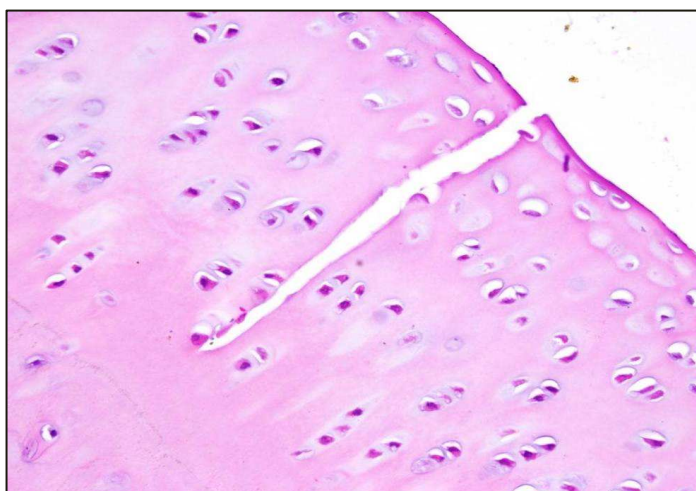


Figura 12. Cartilagem hialina do enxerto do coelho C8, do GII-45. Notar presença de fissura. HE-200X.

Alteração que pode ter surgido em consequência da conservação do implante, já que a glicerina, como todos os outros métodos de conservação, torna os ossos mais frágeis e quebradiços (COSTA, 1996). Um osso se mantém forte se as fibrilas colágenas estiverem alinhadas paralelamente com a força de tração (REILLY, BURSTEIN, 1974). Possivelmente a conservação em glicerina a 98% provocou ruptura dos arranjos de proteoglicanos e consequente alteração na orientação das fibrilas de colágeno, deixando o osso menos resistente e susceptível às fissuras.

Dos 12 animais do grupo tratado, apenas um (8,33%), C9, apresentou intenso infiltrado inflamatório, com presença predominante de neutrófilos e macrófagos, áreas de rarefação óssea e de hemorragia. Notou-se ainda eburnação do implante com raríssimas ilhas de cartilagem hialina. Por ser um achado único dentro do grupo tratado, o fato foi atribuído a contaminações provenientes do processo cirúrgico. Áreas de infiltrado inflamatório também foram observadas em mais dois animais (C8 e C10), 16,66% do grupo tratado, contudo tratava-se de áreas focais, não expressivas, contrastando com o grupo controle, em que se observou intenso infiltrado inflamatório em oito (66,66%) dos 12 dos animais. A diferença entre os grupos deve ter sido em decorrência da utilização das CTMs no GII, que possui como uma de suas características, a capacidade de reduzir a proliferação de linfócitos (AGGARWAL, PITTENGER, 2005; BOCELLI-TYNDALL et al., 2007).

V CONCLUSÕES

A implantação de enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina a 98%, associado à inoculação de células mononucleares e à aplicação intramuscular de dexametasona em coelhos favorece a ossificação endocondral e reduz a inflamação.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, n.4, p.1815-1822, 2005.

AHRENS, N.; TORMIN, A.; PAULUS, M.; ROOSTERMAN, D.; SALAMA, A.; KRENN, V.; NEUMANN, U.; SCHEDING, S. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. **Transplantation**, v.78, n.6, p.925-929, 2004.

ALMEIDA-PORADA, G.; EL SHABRAWY, D.; PORADA, C.; ZANJANI, E.D. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. **Experimental Hematology**, v.30, n.12, p.1454-1462, 2002.

ALSALAMEH, S.; AMIN, R.; GEMBA, T.; LOTZ, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Arthritis Rheumatism**, v.50, n.5, p.1522-1532, 2004.

AUBIN, J.E. Advances in the osteoblast lineage. Biochem. **Cell Biology**, n.76, p.899-910, 1998.

AYMORE, I.L.; AMSTALDEN, E.M.I. Neoplasias ósseas. In: Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos / Sociedade Brasileira de Patologia; Eds: BACCHI, C.E.; FRANCO, M.F.; ALMEIDA, P.C C. 3.ed., São Paulo: Reichmann & Autores Editores, p.332, 2005.

BANFI, A.; MURAGLIA, A.; DOZIN, B.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v.28, n.6, p.707-715, 2000.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, n.4, p.568-84, 2004.

BENNET, D.G. Terapia das articulações. **Revista EQUUS/USA**, p.31-35, 2004.

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**, v.14, n.1, p.22-24, 2006.

BOCELLI-TYNDALL, C.; BRACCI, L.; SPAGNOLI, G.; BRACCINI, A.; BOUCHENAKI, M.; CEREDIG, R.; PISTOIA, V.; MARTIN, I.; TYNDALL, A. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous and allogeneic stimulated lymphocytes *in vitro*. **Rheumatology**, n.46, p.403-408, 2007.

BOO J.S.; YAMADA Y.; OKAZAKI Y.; HIBINO Y.; OKADA K.; HATA K.I.; YOSHIKAWA T.; SUGIURA Y.; UEDA, M. Tissue-Engineered Bone Using Mesenchymal Stem Cells and a Biodegradable Scaffold. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v.13, n.2, p.231-239, 2002.

BRUDER S.P.; FOX B.S. Tissue Engineering of Bone - Cell Based Strategies. **Clinical orthopaedics and related research**, n.367, p.68-83, 1998.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. **Biomaterials**, v.21, p.2347-2359, 2000.

BUSNARDO, C.A.; EURIDES, D.; BELETTI, M.E.; BAUNGARTEN, L.B.; GUIMARÃES, E.C.; SILVA, F.O.C.; ALVES, L.B.; OLIVEIRA, B.J.N.A.; SOUZA, L.A.; SILVA, L.A.F.; DALECK, C.R. Neurorrafia do ramo bucal dorsal do nervo facial em coelhos com proteção de segmento intestinal alógeno. **Brazilian Journal veterinary Reserach animal. Science**, v.46, n. 3, p. 228-236, 2009.

CAMPAGNOLLI, 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**, v.98, p.2396-2402, 2001.

CASTANIA, V.A. **Enxerto corticoesponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena**. 2007. 67f. Tese (Doutorado em ortopedia. Traumatologia e reabilitação) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo.

COLOMÉ, L.M. **Avaliação do envolvimento de células tronco autólogas de medula óssea em associação com técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração do nervo tibial de coelhos.** Santa Maria, RS, 2007. 77p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em cirurgia veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

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

CONNOLLY, J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. **Clinical orthopaedics and related research**, n.313, p.8-18, 1995.

CONRAD, C.; HUSS, R. Adult Stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **Journal of Surgical Research**, v.124, p.201-208, 2005.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução 714/02 de 20 de junho de 2002. Disponível em: <<http://defensoresdosanimais.wordpress.com/juridico-2/legislacao/legislacao-federal/resolucao-cfmv-71402/>>. Acesso em: dez. 2010.

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.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 1996.

COVAS, D.T.; SIUFI, J.L.; SILVA, A.R.; ORELLANA, M.D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.9, p.1179-1183, 2003.

COVAS, D.T. Células-tronco mesenquimais. In:_____. **Células tronco, a nova fronteira da medicina.** São Paulo: Atheneu, 2006. p. 35-48.

CROCI. A.T. Retarde de consolidação e pseudoartrose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.5, p.26-34, 1997.

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**, v.22, n.2, p.179-183, 1992.

DALECK, C.R. **Reparação cirúrgica da “Pars Musculares” do diafragma por ligamento nugal 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.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheumatism**, v.44, n.8, p.1928-1942, 2001.

DUA, H.S. Stem cells of the ocular surface: scientific principles and clinical applications. **British Journal of Ophthalmology**, v.79, p.968-969, 1995.

EL-WARRAK, A.O.; SCHOSSLER, J.E.W. Osteossíntese diafisiária de tíbia em cães mediante inserção intramedular de pinos de steinmann pela crista tibial. **Ciência Rural**, v.28, n.1, p.77-82, 1998.

FITCH, R.; KERWIN, S.; NEWMAN-GAGE, H.; SINIBALDI, K.R. Bone autografts and allografts in dogs. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.19, n.5, p.558-576, 1997.

FONTANA, V. **Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica**. 2009. 128f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de São Paulo, Ribeirão Preto.

FOX, S.M. Cancellous bone grafting in the dog: Na overview. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.20, p.840-848, 1984.

FRENCH, D.A.; BARBER, S.M.; LEACH, D.H.; DOIGE, C.E. The effect of exercise on the healing of articular cartilage defects in the equine carpus. **Veterinary Surgery**, v.18, n.4, p.312-321, 1989.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 2001.

HANIE, E.A.; SULLINS, K.E.; POWERS, B.E.; NELSON, P.R. Healing of fullthickness cartilage compared with full-thickness cartilage and subchondral bone defects in the equine third carpal bone. **Equine Veterinary Journal**, v.24, n.5, p.382-386, 1992.

HEBERT, S; XAVIER, L.R.; PARDINI, A.G.; BARROS FILHO, T.E.P. **Ortopedia e Traumatologia**: Princípios e Prática. 3.ed., Porto Alegre: Artmed, 2003. p.444-451.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S.; Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, n.10, p.3483-3493, 2003.

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

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUCHI, S.; TAKASHI, T.A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, v.6, n.6, p.543-553, 2004.

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**, v.83-B, n.2, p.289-294, 2001.

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

JAISWAL, O; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells *In vitro*. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.64, p.295-312, 1997.

JIANG, W.H.; MA, A.Q.; ZHANG, Y.M.; HAN, K.; LIU, Y.; ZHANG, Z.T.; WANG, T.Z.;HUANG, X.; ZHENG, X.P. Migration of intravenously grafted mesenchymal stem cells to injured heart in rats. **Acta Physiologica Sinica**, v.57, n.5, p.566-572, 2005.

JOHNSON, A.L. Bone grafting. In:_____. OLMSTEAD, M. L. **Small Animal Orthopedics**, p.146-151, 1995.

JONES, E.A.; KINSEY, E.S.; ENGLISH, A.; JONES, A.R.; STRASZYNSKI, L.; MEREDITH, D.M.; MARKHAM, A. F.; JACK, A.; EMERY, P.; McGONAGLE, D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitors cells. **Arthritis and Rheumatism**, v.50, n.3, p.817-827, 2002.

JUNIOR, I.F.; CARVALHO, M.V.; LIMA, G.M.; **Punção e infusão intra-óssea**. Disponível em: www.uff.br/ph/artigos/intraossea.pdf. Acessado em 10 dez. 2008. Online.

KIM, H.K.W.; MORAN, M.E.; SALTER, R.B. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.73A, n.9, p.1301-1315, 1991.

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

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**, v.59-A, n.2, p.218-222, 1977.

LARUE, S.M. et al. Biópsia óssea. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. Cap.48, p.794-797.

LEOPIZZI, N.; BOLLINGER NETO, R.; BARROS FILHO, T.E.P.; AZZE, R.J. Modelos experimentais em ortopedia e ISSO 10993: “Biological evaluation os medical devices-part 2: Animal welfare requirements” interpretação e extensão da norma. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.6, p.139-142, 1998.

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

LIPOWITZ, A.J. Degenerative joints diseases. In:_____. SLATTER, D. (Ed). **Textbook of Small Animal. Surgery**, 2.ed., Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. p.1921-1927.

LOPES, R.; SILVA, C.F.; LOPES, S.T.A.; GUIMARÃES, L.A.; SANTURIO, J.M.; MALLMANN, C.A.; OLIVEIRA, J.F.C. Avaliação do hemograma, reticulócitos e mielograma na intoxicação subaguda experimental por aflatoxina em cães. **Ciência Rural**, v.28, n.2, p.257-262, 1998.

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**, v.355, n.12, p.1199-1209, 2006.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A. H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Journal of Cell and Tissue Research**, v.254, n.2, p.317-330. 1988.

MARTIN, I.; PADERA, R.F.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FREED, L.E. *In vitro* differentiation of chick embryo bone marrow stroma cells into cartilaginous and bone-like tissues. **Journal of Orthopaedic Research**, v.16, p.181-189, 1998.

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**, v.30, n.8, p.879-886, 2002.

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**, v. 50, n. 4, p. 385-94, 1998.

MENDONÇA, C.L.; VIEIRA, D.; KOHAYAGAWA, A.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; AFONSO, J.A.B. Avaliação clínica e hematológica em bezerros Nelore infectados

experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.2, p.52-60, 2003.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. **Experimental Biology and Medicine**, v.231, n.1, p.39-49, 2006.

MITCHELL, N.; SHEPARD, N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.58A, n.2, p.230-233, 1976.

MUSCOLO, D.L.; AYERZA, M.A. Allografts. In:_____. CALLAGHAN, J.J.; ROSENBERG, A.G.; RUBASH, H.E. **Adult Hip**, New York: Lippincott-Raven, 1998. p.297-312.

OLIVEIRA, B.J.A.O. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. 2008a. 68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

OLIVEIRA, G.K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão**. 2008b. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

OLSSON, S. Pathophysiology, morphology, and clinical signs of osteochondrosis in the dog. IN:_____. BOJRAB, M. J. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2.ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap.111, p.777-796.

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**, v.39, n.1, 2009

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.

PERIN, E.C.; DOHMANN, H.F.R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SOUSA, A.L.S.; MESQUITA, C.T.; ROSSI, M.I.D.; CARVALHO, A.C.; DUTRA, H.S.; DOHMANN, H.J.F.; SILVA, G.V.; BELÉM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F.O.D.; ESPORCATTE, R.; GENG, Y.J.; VAUGHN, W.K.; ASSAD, J.A.R.; MESQUITA, E.T.; WILLERSON, J.T. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, v.107, p.2294-2302, 2003.

PETIT, I.; GOICHBERG, P.; SPIEGEL, A.; PELED, A.; BRODIE, C.; SEGER, R.; NAGLER, A.; ALON, R.; LAPIDOT, T. Atypical PKC- regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, p.168-76, 2005.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Bone grafting. In:_____. **Small animal orthopedics and fracture repair**. 3.ed., Philadelphia: Saunders, 1997. cap.3, pag.147-153.

PIGOSSI, N. **Glicerina na conservação de dura-máter. Estudo experimental**. São Paulo, 1967. 83p. Tese (Livre docência em Cirurgia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 1967.

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**, n.92, p.72-76, 1996.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; et al. Multilineage potencial of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p.143-147, 1999.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury Internal Journal Care Injured**, v.36S, p.8-12, 2005.

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**, v.9, n.1, p.269-271, 2002.

RASKIN, R. Medula óssea. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. Cap.64, p.1135-1142.

REILLY, D.; BURSTEIN, A.H. The mechanical properties of cortical bone. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.56-A, p.1001-1021, 1974.

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**, 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**, v.49, n.6, p.873-877, 1988.

ROMANO, G. Stem cells transplantation therapy: controversy over ethical issues and clinical relevance. **Drug News & Perspectives**, v.17, n.10, p.637-45, 2004.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; JODON DE VILLEROCHÉ, V.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYE, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**, v.85, n.8, p.962-971, 2005.

SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.6, p.490-495, 2004.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.19, n.4, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502004000400014&lng=e&nrm=iso>. Acesso em 15 dez 2010.

SEO, B.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P.M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J.; YOUNG, M.; ROBEY, P.G.; WANG, C.; SHI, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v.364, n.9429, p.149-155, 2004.

SILVA, R.A.; FAGUNDES, D.J.; SILVA, A.C.M.B.A.; SISTI, K.E.; CARVALHO, T.M.M.B.; SILVA, D.N. Efeito de antiinflamatórios na integração de enxerto ósseo autógeno e de matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.23, n.2, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502008000200006&script=sci_arttext>. Acesso em: Nov. 2010.

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**, v.48, n.5, p.326-334, 1991.

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**, v.73, n.6, p.1919-1925, 2002.

SHAPIRO, F.; KOIDE, S.; GLIMCHER, M.J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.75A, n.4, p.532-553, 1993.

SOUZA, L.A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

STASHAK, T.S. **Claudicação em Equinos Segundo Adams**. São Paulo: Roca, 1994. p.351-454.

TARVIN, G.B.; LENEHAN, T.M. Tratamento dos deslocamentos sacroilíacos e das fraturas ilíacas. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 45, p.610-616.

TIEDEMAN, J.J.; CONNOLLY, J.F.; STRATES, B.S.; LIPPIELLO, L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix an experimental study in dogs. **Clinical Orthopaedics**, n.268, p.294-302, 1991.

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**, v.35, n.2, p.368-369, 2007.

TOGNOLI, G.K.; OLSSON, D.C.; MARTINS, D.B.; JUNIOR, E.B.S.; SALBEGO, F.Z.; OLIVEIRA, G.K.; et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.148-155, 2009.

TREMAIN, N.; KORKKO, J.; IBBERSON, D.; KOPEN, G.C.; DIGIROLAMO, C.; PHINNEY, D.G. MicroSAGE analysis of 2.353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNA of multiple lineages. **Stem Cells**, v.19, p.408-418, 2001.

TROPEL, P.; NOEL, D.; PLATET, N.; LEGRAND, P.; BENABID, A.L.; BERGER, F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research**, v.295, p.395-406, 2004.

VIANA, F.A.B. Guia terapêutico veterinário. 2ªed, ed.CEM, 2007, 444p.

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**, v.7, n.2, p.113-117, 2002.

WANG, J.; LI, C.; FAN, H.E.H.; SUN, Y. Allograft bone-marrow derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate infarcted heart. **Journal of Zhejiang University Science**, v.5, n.10, p.1279-85, 2004.

WEIGEL, J.P. Bone grafting. In: BOJRAB, M.J.; SMEAK, D. D.; BLOOMBERG, M. S. **Disease mechanisms in small animal surgery**, 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. c.98, p.678-684.

WRIGHT, D.E.; WAGERS, A.J.; GULATI, A.P.; JOHNSON, F.L.; WEISSMAN, I.L. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. **Science**, v.294, p.1933-1936, 2001.

WOODYBURY, D.; REYNOLDS, K.; BLACK, I.B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. **Journal of Neuroscience Research**, v.96, p.908-917, 2002.

XU, M.; BRUNO, E.; CHAO, J.; NI, H.; LINDGREN, V.; NUNEZ, R.; MAHMUD, N.; FINAZZI, G.; FRUCHTMAN, S.M.; POPAT, U.; LIU, E.; PRCHAL, J.T.; RONDELLI, D.; BAROSI, G.; HOFFMAN, R. The constitutive mobilization of bone marrowrepopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. **Blood**, v.105, p.1699-1705, 2005.

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 bonemarrow-derived mesenchymal cell transplantation. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.87B, n.5, p.721-729, 2005.

YOUNG, H.E.; STEELE, T.A.; BRAY, R.A.; HUDSON, J.; FLOYD, J.A.; HAWKINS, K.; THOMAS, K.; AUSTIN, T.; EDWARDS, C.; CUZZOURT, J.; DUENZL, M.; LUCAS, P.A.; BLACK JR., A.C. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anatomical Record**, v.264, n.1, p.51-62, 2001.

YU, M.; XIAO, Z.; SHEN, L.; LI, L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. **British Journal of Haematology**, v.124, n.5, p.666-675, 2004.

ZAGO, M.A. Células tronco origens e propriedades In:_____. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p.109-113.

ZAMPROGNO, H. Células-tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.2, p.289-290, 2007.

ZILIOOTTO, L.; DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; SOUZA, A.P.; FANTINATTI, A.P.; DINIZ, P.P.V.P. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. **Acta Cirurgia Brasileira**, v.18, n.2, p.107-115, 2003.

ZIPORI, D. The Stem State: Plasticity is essential, Whereas self-renewal and hierarchy are optional. **Stem Cells**, v. 23, p.719-726, 2005.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

APÊNDICE

Fontes de aquisição dos materiais da pesquisa

- ¹ Paquímetro graduado. Ideal Ferramentas. São Paulo, SP. Brasil.
- ² Lâmina de bisturi. Emp. Bras. Mat. Cir. Ind. Com. Imp. Exp. Ltda. Itapira, SP. Brasil.
- ³ Dremel® série 300. Magazine Stoebel. São Paulo, SP. Brasil.
- ⁴ Solução de cloreto de sódio a 0,9%. Sanobiol Ltda. Pouso Alegre, MG. Brasil.
- ⁵ Glicerina a 98%. Drogasil. Uberlândia, MG. Brasil.
- ⁶ Ração COMIGO. Cooperativa Agroindustrial dos Produtores Rurais do Sudoeste Goiano. Rio Verde, GO. Brasil.
- ⁷ Ivomec. Merial Saúde Animal Ltda. Paulínia, SP. Brasil
- ⁸ Cort-trat. Santa Marina S.A. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ⁹ Ketamina. União Química Farmacêutica Nacional S.A. Embu-Guaçu, SP. Brasil.
- ¹⁰ Dorcipec. Vallée S.A. Montes Claros, MG. Brasil
- ¹¹ Tramadol. União Química. Pouso Alegre, MG. Brasil.
- ¹² Cezolin. BioChimico. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ¹³ Biotrat Iodopovidona solução degermante. LMFarma Ind. e Comércio Ltda. São José dos Campos, São Paulo, SP. Brasil.
- ¹⁴ Álcool 70%. Minasúcar S/A. Santa Rosa de Viterbo. São Paulo, SP. Brasil.
- ¹⁵ Riordine. Rioquímica Indústria Farmacêutica. São Jose do Rio Preto, SP. Brasil.
- ¹⁶ Agulha 16G. Becton Dickinson Indústria Cirurgicas Ltda. Curitiba, PR. Brasil.
- ¹⁷ Heparina. Prospitalar. Uberlândia, MG. Brasil.
- ¹⁸ Tubos Falcon. CRAL artigos para Laboratórios Ltda. Cotia, SP. Brasil.
- ¹⁹ Solução salina tamponada de Dulbecco's (DPBS). Gibco® Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²⁰ Solução Ficoll-Hypaque Plus. Amersham Biosciences do Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²¹ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Gibco®. Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²² Fetal Bovine Serum. Gibco®. Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²³ Azul de Tripán. Gibco BRL Life Technologies, Inc., Grand Island, Nova York, EUA.
- ²⁴ Tubo de Eppendorf. CRAL artigos para Laboratórios Ltda. Cotia, SP. Brasil.
- ²⁵ Câmara hemocitométrica de Neubauer. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ²⁶ Vicryl 4-0. Ethicon. São Paulo, SP. Brasil.

²⁷ Fio Nylon. Needle Line. Uberlândia, MG. Brasil.

²⁸ Banamine® Injetável. Schering-Plough Saúde Animal Indústria e Comércio Ltda. Cotia, SP. Brasil.

²⁹ Rifocina spray. Hoechst Marion Roussel. Suzano, SP. Brasil.]

³⁰ Tiopental sódico 2,5%. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Campinas, SP. Brasil.

³¹ Cloreto de potássio 10%. Darrow Laboratórios. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

³² Formol 10% . Start Química. Uberlândia, MG. Brasil.

³³ EDTA tetrassódico. Chemco Indústria e Comércio. Campinas, SP. Brasil.

³⁴ Tartarato de sódio e potássio 80 g. Chemco Indústria e Comércio. Campinas, SP. Brasil.

³⁵ Ácido clorídrico. Chemco Indústria e Comércio. Campinas, SP. Brasil.

³⁶ Álcool etílico. Minasçúcar S/A. Santa Rosa de Viterbo. São Paulo, SP. Brasil.

³⁷ Xilol. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.

³⁸ Micrótomo. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.

³⁹ Hematoxilina e Eosina (HE). Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.

⁴⁰ Microscópio óptico Olympus BX60. Reichert Microscope Services. New York, EUA.