

**RICHARD DA ROCHA FILGUEIRAS**

**USO DE CONDRÓCITOS HETERÓLOGOS CULTIVADOS NA  
REPARAÇÃO DE FALHAS OSTEOCONDRAIS PRODUZIDAS NO  
JOELHO DE COELHOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

**RICHARD DA ROCHA FILGUEIRAS**

**USO DE CONDRÓCITOS HETERÓLOGOS CULTIVADOS NA  
REPARAÇÃO DE FALHAS OSTEOCONDRAIS PRODUZIDAS NO  
JOELHO DE COELHOS.**

**Aprovada em: 03 de outubro de 2008**

---

**Prof.Dr. Ricardo Junqueira Del Carlo**

**Orientador**

---

**Prof. Dr. Nivaldo Pereira Alves**

**Co-orientador**

---

**Profa. Dra. Marlene Isabel Vargas Vitoria**

**Co-orientadora**

---

**Profa. Dra. Cleuza Maria de Faria Rezende**

**Membro**

---

**Prof. Dr. Luíz Gonzaga Pompermayer**

**Membro**

A Espedito Filgueiras (*in memorian*), motivo de mais esta etapa.

A Levi Fiúza (*in memorian*), pela amizade e companheirismo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Junqueira Del Carlo, pela parceria de 11 anos e pelos ensinamentos que me fizeram crescer na profissão. Agradeço ainda o brilhante auxílio e empenho nas correções deste trabalho.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Marlene Isabel Vargas Vilorio, por estar sempre presente quando precisei durante esses 11 anos. Muito obrigado por melhorar este trabalho com suas considerações.

Ao meu co-orientador, Dr. Nivaldo Pereira Alves, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e pelo apoio financeiro.

A Dra. Elisiane, pelo entusiasmo e por disponibilizar parte do seu tempo para a compra dos reagentes.

Ao Laboratório Tecnogene, pelo apoio financeiro, sem o qual, este projeto jamais seria realizado.

Aos colegas, Romana, Rose, Rosânia, Fabrício, Cidinha, Mauricilene, Romário, Michael, Igor, Luciano, Sílvio, Rodrigo e demais integrantes da Tecnogene, meus agradecimentos pelo auxílio e desculpas pela interrupção na rotina do trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Pompermayer, pelas correções realizadas durante o exame de qualificação que auxiliaram a redação dos materiais e métodos.

A Profa. Dra. Cleuza Maria de Faria Resende, pelo aceite em participar de minha banca. Todo meu respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, brilhante cientista, pela confiança e pelo treinamento em seu laboratório.

A amiga Betânia Monteiro, pelo apoio oferecido no início do projeto, momento em que mais precisei dos amigos.

A Dra. Cláudia e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pelo apoio na realização da microscopia eletrônica.

Ao amigo Rafael Rocha, por todo auxílio nas operações e por permitir o alojamento dos animais. Desculpas à sua esposa Eloá pelos trabalhos durante os finais de semana.

A dona Maria, pessoa iluminada, por cuidar dos animais utilizados neste trabalho.

A equipe do Laboratório de Cirurgia Experimental da UnB, obrigado pelo auxílio nas operações.

A Diego e Mariana, pelo carinho e ajuda laboratorial.

Ao amigo Ricardo Titze, por permitir o uso do seu laboratório.

Ao amigo Márcio Botelho, exemplo de superação, por toda ajuda na histopatologia e imunofluorescência.

A equipe do laboratório de Patologia Veterinária da UnB, Cris, Érika, Vanessa, Nara, Sr. Francisco e Jonas, pelo excelente trabalho realizado e pela tolerância com minha constante presença no laboratório.

Aos amigos Alexandre De Paula e Ricardo Miyasaka, por toda ajuda na anestesia e pela parceria incondicional. Podem sempre contar comigo quando precisarem.

Ao amigo, Anderson pelo auxílio na anestesia e pela alegre e agradável companhia nas manhãs e tardes de trabalho.

As amigas Larissa, Maria Fernanda e Nazaré, pelo auxílio na coleta das cartilagens.

A amiga Paula Galera pela parceria e pelo auxílio na disciplina de Clínica Cirúrgica.

Ao amigo Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges, pela confiança e pelo apoio a este projeto.

A amiga Christine Martins pela companhia de todos os dias e pelo auxílio na tradução do abstract.

A amiga Connie McMannus, pelo brilhante trabalho na análise estatística.

A Rosi, alicerce do programa de pós-graduação da UFV, sem você nada disso seria possível.

A Maria do Carmo, Regina e toda equipe do CCB – UFV, pelo auxílio nos documentos e por sempre me atenderem de maneira tão cordial.

A amiga Rosana Marques, pelo carinho e amizade.

A amiga Samara Maguilnik que, mesmo com sua alergia ao pêlo dos coelhos, não me abandonou nas operações.

A minha prima Alda Regina, pelo exemplo de luta demonstrado que alicerça toda a família.

As amigas Tatinha e Kelly, pelo carinho e companhia nas noites solitárias de Viçosa.

A Vanessa e Gabriel, que tenham força e sucesso na caminhada. Estarei sempre com vocês.

Aos meus irmãos Robson, Rosane e Ronald, desculpas pela falta de paciência e pela ausência na fase final deste trabalho. Todos estão guardados em meu coração.

A minha mãe Isete da Rocha Filgueiras, por toda luta para que eu chegasse a essa fase.

Você será sempre minha parceira.

A minha noiva Fernanda Firmino, por reconhecer a importância deste trabalho e por estar sempre ao meu lado. Ofereço-lhe todo amor e carinho.

## BIOGRAFIA

RICHARD DA ROCHA FILGUEIRAS, filho de Espedito Gomes Filgueiras e Isete da Rocha Filgueiras, nasceu em 07 de Outubro de 1975, no Rio de Janeiro - RJ.

Em março de 2001, graduou-se Médico Veterinário pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em 2002 obteve o título de *Magister Scientiae* em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa.

Em 2005 iniciou o programa de pós-graduação para obtenção do título de *Doctor Scientiae* na mesma instituição.

Professor da disciplina Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais na Universidade de Brasília – UnB desde 2004.

Membro fundador da Associação Brasileira de Ortopedia e Traumatologia Veterinária – OTV.

| <b>CONTEÚDO</b>                                                                                                                                                 | <b>Página</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                                                              | <b>ix</b>     |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                                            | <b>x</b>      |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                                                                                                                                    | <b>12</b>     |
| <b>EFEITOS DO CONGELAMENTO NO CONDRÓCITO EM CULTURA.</b>                                                                                                        | <b>15</b>     |
| <b>Resumo.....</b>                                                                                                                                              | <b>15</b>     |
| <b>Introdução.....</b>                                                                                                                                          | <b>16</b>     |
| <b>Material e Métodos.....</b>                                                                                                                                  | <b>17</b>     |
| <b>Resultados .....</b>                                                                                                                                         | <b>23</b>     |
| <b>Discussão.....</b>                                                                                                                                           | <b>25</b>     |
| <b>Referências.....</b>                                                                                                                                         | <b>28</b>     |
| <b>Figuras.....</b>                                                                                                                                             | <b>30</b>     |
| <b>USO DE CONDRÓCITOS HETERÓLOGOS, FRESCOS E DESCONGELADOS, ASSOCIADOS AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM LESÕES OSTEOCONDRAIS PRODUZIDAS NO JOELHO DE COELHOS.</b> | <b>34</b>     |
| <b>Resumo.....</b>                                                                                                                                              | <b>34</b>     |
| <b>Introdução.....</b>                                                                                                                                          | <b>36</b>     |
| <b>Material e Métodos.....</b>                                                                                                                                  | <b>38</b>     |
| <b>Resultados .....</b>                                                                                                                                         | <b>45</b>     |
| <b>Discussão.....</b>                                                                                                                                           | <b>49</b>     |
| <b>Referências .....</b>                                                                                                                                        | <b>53</b>     |
| <b>Figuras.....</b>                                                                                                                                             | <b>57</b>     |
| <b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>                                                                                                                                   | <b>65</b>     |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                         | <b>66</b>     |

## RESUMO

FILGUEIRAS, Richard da Rocha D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008.  
**Uso de condrócitos heterólogos cultivados na reparação de falhas osteocondrais produzidas no joelho de coelhos.** Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Nivaldo Pereira Alves.

Condrócitos extraídos da cartilagem articular de nove coelhos, da raça Nova Zelândia Branca, foram cultivados e submetidos ao congelamento, com citoprotetor DMSO a 5%, por um período de seis meses. Análises fenotípicas e de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas objetivando identificar diferenças morfológicas e funcionais entre as células frescas e as descongeladas. Para o estudo *in vivo*, foram utilizados 36 coelhos, machos e fêmeas, da raça Nova Zelândia Branca, adultos, distribuídos randomicamente em quatro grupos de nove animais. Foram produzidas falhas osteocondrais no joelho direito, e estas, preenchidas com condrócitos frescos ou descongelados associados ao plasma rico em plaqueta (PRP). O presente estudo demonstrou que, sob as condições de congelamento utilizadas, o uso de condrócitos heterólogos crio-preservados é viável. Entretanto, outros estudos com uso de substratos que sustentem o fenótipo condrocítico e diferentes concentrações de DMSO deverão ser realizados para que se possa estabelecer um banco de condrócitos preservados por longo tempo. A associação ao PRP permite a fixação das células na lesão e fornece fatores de crescimento que aceleram a reparação com tecido semelhante à cartilagem hialina articular e, clinicamente, o implante de condrócitos associados ao PRP reduz a dor articular e a claudicação por inibir a aderência capsular às lesões, e por permitir a integração do tecido de reparação cartilaginoso ao osso subcondral.

## ABSTRACT

FILGUEIRAS, Richard da Rocha D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october of 2008.  
**Use of cultivated heterologous chondrocytes in the repair of experimental induced osteochondral defects in rabbits.** Adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-advisers: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Nivaldo Pereira Alves.

Chondrocytes removed from articular cartilage of nine healthy New Zealand White rabbits were cultivated and frozen, with cryoprotector DMSO 5% for six months. Phenotype and scanning electron microscopy analysis were performed in order to identify morphological and function differences between fresh and thawed cells. Thirty six New Zealand White rabbits, males and females, randomly divided in four groups of nine animals were used for the *in vivo* study. Circular osteochondral defects were induced on the right stifle, and were filled with fresh and thawed chondrocytes associated with platelet rich plasma (PRP). The present study demonstrates that, under the freezing conditions used, the use of heterologous chondrocytes is feasible. However, other studies using substrates that keep the chondrocytic phenotype and different concentrations of DMSO should be done to maintain a long term preserved chondrocyte bank. The association with PRP allows the cells to adhere to the site of injury and also provide growth factors that accelerate the repair with hyaline cartilage-like tissue. Clinically, the chondrocyte implantation associated with PRP reduces the articular pain and lameness due to capsular adherence inhibition and the integration of cartilaginous tissue on subchondral bone.

## INTRODUÇÃO GERAL

A cartilagem hialina é um tecido aneural, alinfático e avascular que recobre e protege as superfícies articulares. É composta de matriz extracelular, no interior da qual estão mergulhados pequena quantidade de condrócitos responsáveis pela síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II. Os condrócitos representam apenas 10% dos componentes presentes na matriz, e esta pode apresentar entre 80% a 90% do seu peso em água<sup>1</sup>.

As fibrilas de colágeno tipo II correspondem a 50% do peso seco da cartilagem articular e juntamente com os proteoglicanos conferem propriedades viscoelásticas ao tecido. Os proteoglicanos estão dispostos em agregados de um único núcleo protéico, ao qual se aderem várias moléculas de glicosaminoglicanos altamente aniônicas, com elevada capacidade de retenção de água e que conferem resiliência à cartilagem hialina<sup>1,2</sup>.

Em lesões superficiais da cartilagem articular o processo de reparação não segue uma resposta inflamatória padrão, já que os vasos sanguíneos e as células inflamatórias não atingem a área lesionada<sup>3</sup>. Desta forma, condrócitos próximos à lesão multiplicam-se e sintetizam nova matriz para preencher a falha com tecido semelhante à cartilagem hialina. Entretanto, essa resposta é cessada a partir de uma semana após a lesão porque os condrócitos marginais entram em apoptose e o tecido neoformado se desprende do tecido sadio<sup>4</sup>.

Por outro lado, as lesões que atingem o osso subcondral formam um hematoma que lança na superfície articular leucócitos, células mesenquimais e constituintes do plasma ricos em fatores condrogênicos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)<sup>5</sup>. Após a formação do hematoma,

segue-se o modelamento da malha de fibrina que constitui um arcabouço para fibroblastos que ocupam a área lesionada. Cerca de 15 dias após a lesão, o tecido fibroso sofre hialinização devido a diferenciação das células mesenquimais em condroblastos, passando a apresentar aspecto fibrocartilaginoso<sup>6</sup>.

Diversos tratamentos cirúrgicos e clínicos foram propostos ao longo dos anos para reparar as lesões articulares, citando-se a eletroterapia<sup>7</sup>, excisão cirúrgica do tecido lesionado<sup>8</sup>, uso de nutracêuticos<sup>9</sup> e mosaicoplastia<sup>10</sup>. Entretanto, todos esses procedimentos têm resultado no reparo da lesão com fibrocartilagem, que não apresenta as mesmas propriedades biomecânicas da cartilagem hialina articular. Nesse contexto, a terapia celular é utilizada como alternativa para obtenção de melhor resultado reparador morfofisiológico.

Os primeiros relatos de uso clínico de condrócitos autólogos cultivados para reparo de lesões da cartilagem hialina datam da década de 80<sup>11</sup> e, desde então, a técnica se expandiu rapidamente. A técnica possui a vantagem de oferecer à área lesionada uma maior quantidade de condrócitos ativos que sintetizam a matriz cartilaginosa composta de colágeno tipo II e proteoglicanos. Diversos trabalhos demonstram resultados diferentes em relação ao tecido formado após o implante de condrócitos cultivados, porém, todos enfatizam que o tecido formado possui características biomecânicas e morfológicas próximas ao tecido original<sup>11,12,13,14</sup>.

Um inconveniente para o uso de condrócitos autólogos é que a técnica demanda dois procedimentos: um para a coleta e outro para o implante das células<sup>13,15,16</sup>. O uso de culturas heterólogas armazenadas em banco celular esbarra na comprovação de que os condrócitos são células imunocompetentes<sup>17</sup>, entretanto, resultados preliminares não demonstram reações inflamatórias ou de rejeição em períodos de observação que variam de 3-8 meses<sup>18,19</sup>.

Condrócitos heterólogos podem ser criopreservados em nitrogênio líquido e mantidos como banco celular por tempo indeterminado. Entretanto, durante o congelamento, existe a possibilidade de formação de cristais intracelulares que rompem a membrana da célula. A adição ao meio de cultura de crioprotetores como o dimetilsulfóxido (DMSO) e proteínas séricas obtidas do soro fetal bovino (SFB) protegem as células dos choques térmico e osmótico<sup>15</sup>

A fixação das células no local da lesão, durante o movimento articular, influencia a qualidade dos resultados obtidos. O uso de um enxerto de periósteo, suturado sobre a lesão, é a técnica de eleição utilizada em pacientes humanos e eqüinos<sup>14,20</sup>. Em animais de pequeno porte são utilizados substratos aderentes, como o plasma rico em plaquetas (PRP) que, além de atuar como agente de fixação, fornece fatores de crescimento condrogênicos como o PDGF, IGF e TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta) que estimulam a diferenciação e multiplicação dos condrócitos *in situ*<sup>5,21</sup>.

Este trabalho teve como objetivos avaliar *in vitro* os efeitos do congelamento em condrócitos articulares cultivados visando instituir critérios para estabelecimento de um banco de condrócitos heterólogos e, avaliar *in vivo*, a reparação da cartilagem articular de coelhos após implante dos condrócitos heterólogos frescos e descongelados associados ao plasma rico em plaqueta.

Os artigos que compõem este trabalho foram redigidos segundo normas da revista *Osteoarthritis and Cartilage* ISSN: 1063-4584.

## **EFEITOS DO CONGELAMENTO NO CONDRÓCITO EM CULTURA.**

### **Resumo**

*Objetivo:* Avaliar os efeitos do congelamento em condrócitos articulares de coelhos cultivados, objetivando a manutenção em banco celular.

*Métodos:* Condrócitos extraídos da cartilagem articular de nove coelhos saudáveis, da raça Nova Zelândia Branca, foram cultivados e submetidos ao congelamento, com citoprotetor DMSO a 5%, por um período de seis meses. Análises fenotípicas e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas objetivando identificar diferenças morfológicas e funcionais entre as células frescas e as descongeladas.

*Resultados:* Após a digestão enzimática foi obtido o número de  $4,8 \times 10^5$  células por coelho. Os condrócitos frescos apresentaram elevada taxa mitótica e abundante presença de matriz até os 60 dias de cultura. Nas culturas dos condrócitos descongelados, a perda de estabilidade fenotípica foi marcante, o que foi demonstrado pela baixa intensidade da coloração dos proteoglicanos e pela fraca imunomarcação do colágeno tipo II, confirmando que o processo de congelamento influenciou a irreversibilidade da desdiferenciação dos condrócitos, possivelmente decorrente dos efeitos letais que ocorrem durante o congelamento, quando as células passaram por temperaturas intermediárias até congelar em nitrogênio líquido

*Conclusões:* o presente estudo demonstrou que, sob as condições de congelamento utilizadas, o uso de condrócitos heterólogos crio-preservados é viável. Entretanto, é necessário implantar um número elevado de condrócitos descongelados para que se possa elevar o número de células viáveis no sítio de implantação. Os condrócitos deverão ser

implantados com duas semanas de cultivo, período em que apresentam melhor taxa de viabilidade.

*Palavras chave:* cartilagem articular, colágeno tipo II, condrócitos, congelamento celular.

## **Introdução**

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo responsável pela transmissão da carga compressiva da articulação para o osso subcondral e por fornecer uma interface de baixo atrito entre as superfícies articulares<sup>1</sup>. Na cartilagem articular é observada elevada capacidade de resiliência devido à presença de grande quantidade de proteoglicanos que são capazes de reter cerca de 80% de água na matriz e, juntamente com o colágeno tipo II, mantêm a rigidez e elasticidade do tecido<sup>2,3</sup>.

O tecido cartilaginoso da superfície articular não possui vascularização e sua nutrição é feita por difusão de substâncias encontradas no líquido sinovial. Por isso, as lesões da cartilagem articular são de difícil cura<sup>4</sup>. Diversos tratamentos cirúrgicos e clínicos foram propostos ao longo dos anos para reparar as lesões articulares, citando-se a excisão cirúrgica do tecido lesionado<sup>5</sup>, eletroterapia<sup>6</sup>, uso de nutracêuticos<sup>7</sup> e mosaicoplastia<sup>8</sup>. Entretanto, todos esses procedimentos têm resultado num tecido de reparação fibrocartilaginoso, que não apresenta as mesmas propriedades biomecânicas da cartilagem hialina articular. Nesse contexto, a terapia celular pode ser utilizada como alternativa para obtenção de melhor resultado reparador morfofisiológico.

O uso clínico do implante de condrócitos autólogos cultivados iniciou-se em 1987<sup>9</sup>. Atualmente, esta metodologia é utilizada em pacientes humanos portadores de osteoartrite com o inconveniente de demandar um procedimento operatório para a coleta e outro para o implante das células<sup>10</sup>.

O uso de condrócitos heterólogos permite que o paciente seja submetido apenas ao procedimento operatório para implantação das células, com resposta imune baixa ou inexistente<sup>11</sup>. Hidaka et al<sup>12</sup> informaram que os condrócitos são células imuno-privilegiadas e demonstraram, em cartilagem articular de cavalos, que células inflamatórias não foram observadas até oito meses após a implantação.

Condrócitos heterólogos podem ser criopreservados em nitrogênio líquido e mantidos como banco celular por tempo indeterminado. Entretanto, durante o congelamento, existe a possibilidade de formação de cristais intracelulares que rompem a membrana da célula. A adição ao meio de cultura de crioprotetores como o dimetilsulfóxido (DMSO) e proteínas séricas obtidas do soro fetal bovino (SFB) protegem as células dos choques térmico e osmótico<sup>13</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do congelamento sobre condrócitos articulares cultivados visando instituir critérios para estabelecimento de um banco de condrócitos heterólogos para implantação *in vivo*.

## **Material e Métodos**

### **CULTIVO PRIMÁRIO DE CONDRÓCITOS**

O experimento foi aprovado pela comissão de ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, sob protocolo número 076/2005. As cartilagens foram obtidas por biópsias do joelho de nove coelhos machos da raça Nova Zelândia Branca, adultos e saudáveis, após anestesia intravenosa com propofol 10% (Propovan, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Brasil), na dose de 10mg/kg, seguida de anestesia epidural com ropivacaina 0,75% (Ropi, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Brasil), na dose de 2,25mg/kg. Após preparação, o

joelho esquerdo foi exposto e fragmentos de cartilagem foram removidos com auxílio de lamina de bisturi número 15. Os fragmentos foram colocados em um anteparo metálico estéril e, posteriormente, recortados com lâmina de bisturi número 15 a uma espessura aproximada de  $1\text{mm}^3$ . Oito desses pequenos fragmentos, livres de tecidos moles e osso subcondral, foram selecionados de cada coelho. Após a coleta, a cápsula articular, tecido subcutâneo e pele foram suturados com técnica rotineira e todos os coelhos receberam, por via intramuscular, 30mg/kg de cefazolina 10% (Cefazolina 1g, Bristol Myers Squibb - Brasil) e 2,0mg/kg de cetoprofeno 10% (Ketofen, Merial Saúde Animal - Brasil), via subcutânea, a cada 24 horas, durante três dias.

A técnica para cultura celular foi adaptada de Freshney<sup>14</sup>. Os fragmentos de cartilagem foram depositados em tubos plásticos estéreis (BD-Falcon - USA) contendo 10mL de meio de cultura Ham's F12 (Gibco-Invitrogen -USA) adicionado de 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina G, estreptomicina e anfotericina B – Gibco-Invitrogen - USA). Os tubos foram identificados para cada coelho e levados ao laboratório em recipiente refrigerado.

As amostras de cartilagens foram transferidas para beakers estéreis e submetidas à digestão enzimática, durante 25 minutos, com 0,05% de tripsina (Gibco-Invitrogen - USA) diluída em 10mL de Ham's F12. Após remoção da tripsina, outra digestão foi realizada, durante 30 minutos, com collagenase tipo I a 0,3% (Gibco-Invitrogen - USA) diluída em 10mL de Ham's F12. Todos os procedimentos foram realizados em agitador magnético, em temperatura ambiente, e em condições estéreis.

A solução de collagenase foi removida e os fragmentos transferidos para garrafas de cultura de  $25\text{cm}^2$ , contendo collagenase 0,06%, diluída em 10mL de Ham's F12 com 10% de SFB (Cultilab, Meios para Cultivo Celular - Brasil). O material foi colocado em estufa a

37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 15 horas. Após, a suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga de 50mL e agitado em vortex, por alguns segundos. Em seguida, foi filtrada, em filtro de nylon de 70µm (BD-Falcon - USA), e os condrócitos suspensos foram contados em hemocítômetro. Após a contagem, os condrócitos foram transferidos para garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo 5mL de meio de crescimento completo constituído de DMEM (Dulbeco Modified Eagle Medium)/Ham's F12 (1:1, v/v), 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina G, estreptomicina e anfotericina B – Gibco-Invitrogen - USA) e suplementado com 10% de SFB.

Cada garrafa recebeu  $4,8 \times 10^5$  condrócitos. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, até alcançar 75% de confluência. Neste momento, os condrócitos foram desprendidos da garrafa com PBS (salina de fosfato tamponado pH 7,4) contendo 0,1% de tripsina e 0,02% de EDTA (ácido dietileno diamino tetra acético) e, após as lavagens, foram submetidos à nova passagem. Para neutralização da tripsina, os condrócitos foram lavados em meio DMEM contendo 10% de SFB, durante cinco minutos e posteriormente centrifugados a 400g, por 10 minutos em centrífuga refrigerada. Após 10 passagens, os condrócitos foram ressuspensos, contados em hemocítômetro e metade da suspensão celular de cada amostra foi congelada. A outra metade da suspensão foi novamente cultivada, sendo realizados subcultivos, a cada três dias, até 60 dias de avaliação.

## PROCESSO DE CONGELAMENTO

Após a contagem, os condrócitos foram ressuspensos em tubo de centrifuga de 15mL contendo meio resfriado composto de DMEM e 10% de SFB, adicionando-se lentamente 5% de dimetil sulfóxido (DMSO, Dimesol, Marcolab Produtos Farmacêuticos - Brasil) à suspensão. Em seguida, foram transferidos para crio-tubos com concentração

celular de  $2,4 \times 10^6$  cels/mL. Os crio-tubos foram deixados em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por 45 minutos e, posteriormente, estocados em nitrogênio líquido por seis meses.

## PROCESSO DE DESCONGELAMENTO

Após seis meses, os crio-tubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados rapidamente, em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  para descongelamento da suspensão celular. Em seguida, os condrócitos foram ressuspensos em meio de crescimento completo, como descrito anteriormente, contados em hemocitômetro e a viabilidade celular determinada. Os condrócitos foram incubados em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$ , em garrafas de  $25\text{cm}^2$  e as passagens foram realizadas, a cada três dias.

Tanto os condrócitos frescos quanto os descongelados foram observados a cada três dias, durante os 60 dias de cultivo, com auxílio de um microscópio invertido com contraste de fase (modelo CK2, Olympus - USA), para avaliar o comportamento dos condrócitos quanto à aderência à superfície plástica da garrafa e à presença de matriz em cultura.

## ANÁLISE DE VIABILIDADE

A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do Azul de Tripán (Cambrex Corporation, USA) e a contagem celular em hemocitômetro. A viabilidade das células frescas foi determinada em três tempos diferentes: imediatamente após digestão enzimática (tempo 1); após quinze (tempo 2) e 60 dias de cultura (tempo 3). Para as células descongeladas, a viabilidade foi determinada imediatamente após o descongelamento (tempo 1), aos quinze (tempo 2) e 60 (tempo 3) dias de cultura após serem descongeladas.

## ANÁLISE SOB MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os condrócitos frescos foram analisados à microscopia eletrônica após 15 e 60 dias de cultivo e os descongelados foram analisados aos 15 e 60 dias de cultivo após o descongelamento.

Uma lamínula de vidro de 50mm de diâmetro, estéril, foi colocada no fundo de cada poço de placas de cultivo de seis poços, contendo meio de crescimento completo. Em seguida, foram adicionadas  $2 \times 10^4$  cels/poço. As placas foram colocadas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas, para permitir a aderência dos condrócitos às lamínulas. Após este período, as lamínulas foram lavadas duas vezes, durante uma hora, em PBS, pH 7,4, e fixadas com glutaraldeído a 5%, diluído em PBS, pH 7,4 (1:1, v/v), durante uma hora, em temperatura ambiente. Em seguida, os condrócitos foram pós-fixados, durante quatro horas, em OsO<sub>4</sub> a 1%, diluído em PBS, pH 7,4, a 4°C. Foi realizada desidratação com etanol e secagem em ponto crítico. Posteriormente, os condrócitos foram metalizados com deposição térmica de ouro-paládio (Balzers - Germany). Um microscópio de alta resolução (LEO 1430VP, Carl Zeiss Inc - Germany) foi utilizado para observar a morfologia dos condrócitos e a formação de matriz.

## CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

Para evidenciar a diferenciação funcional de condrócitos foi utilizada a coloração com Alcian Blue, que evidencia a presença de proteoglicanos sulfatados na matriz extracelular. Após 15 dias de cultivo, os condrócitos frescos de uma garrafa e os condrócitos descongelados de outra garrafa foram fixados em paraformaldeído 4%, durante 15 minutos, a temperatura ambiente e corados com Alcian Blue 1%, diluído em HCl 0,1N.

Após coloração, os condrócitos foram observados em microscópio invertido com contraste de fase.

O colágeno tipo II, sintetizado por condrócitos ativos, foi utilizado como marcador da atividade celular. Após 15 dias de cultivo, os condrócitos frescos e os descongelados foram transferidos para placas de cultivo de seis poços contendo meio de crescimento completo e lamínula de vidro de 50 mm de diâmetro no fundo de cada poço. Em cada poço foram colocadas  $2 \times 10^4$  células. Após 24 horas de incubação, em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, as lamínulas com os condrócitos aderidos foram lavadas, duas vezes, com PBS, pH 7,4, fixados em temperatura ambiente em paraformaldeído a 4%, por 10 minutos, e incubados por 12 horas, a 4°C, com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal de camundongo anti colágeno tipo II – Lab-Vision - USA). Após três lavagens em PBS, pH 7,4, os condrócitos foram incubados em temperatura ambiente, durante duas horas, com anticorpo secundário (anticorpo de ovino anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína - Cappel Organon Teknika Corp. - USA), diluído em PBS, pH 7,4, a 1/100. Após várias lavagens em PBS, pH 7,4, as lamínulas foram montadas com meio fluorescente (Dako Corp. - USA) e observadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss Inc - Germany) equipado com lâmpada de mercúrio.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os animais foram distribuídos entre os tratamentos de forma aleatória. A análise estatística foi realizada com uso do sistema SAS<sup>®</sup> (Enterprise Guide v.4 - USA) e nível de significância de 5%. Quando necessário, os dados foram transformados por arcoseno ou raiz quadrada e, para determinar o efeito da resposta ao congelamento foram analisados pelo teste F de variância usando Proc GLM. Quando um nível de significância ( $P < 0,05$ ) foi encontrado para interação entre tratamento e resposta ao tempo, os dados foram

analisados dentro de cada grupo (congelado ou não). Foi calculada a regressão linear e quadrática para o tempo de cultivo usando Proc REG e os resultados mostrados graficamente.

## **Resultados**

### **CULTIVO PRIMÁRIO DE CONDRÓCITOS**

Foram obtidos  $4,8 \times 10^5$  condrócitos por coelho, que se multiplicaram e alcançaram 75% de confluência entre 3 a 4 dias. Os condrócitos mantiveram o formato arredondado e encontravam-se aderidos à superfície da garrafa, uma hora após a digestão enzimática, e demonstraram espalhamento e adesão celulares aos três dias de cultivo (Fig. 1. A e B).

À microscopia de contraste de fase foi evidenciada elevada taxa de mitose dos condrócitos frescos, com morfologia fibroblástica, os quais alcançaram confluência de 75% em três dias. Aos 45 dias de cultivo, as células mantiveram as mesmas características e já se observava presença de matriz extracelular. Porém, aos 60 dias reduziram a taxa de mitose e a presença de matriz tornou-se escassa.

Os condrócitos descongelados apresentaram taxa de confluência lenta, com média de 50%, aos três dias após o descongelamento. Somente aos seis dias de cultivo a taxa de 75% de confluência foi alcançada em todas as amostras. A presença de matriz e o número de mitoses foram reduzidos em todas as amostras descongeladas após 35 dias de cultura.

### **VIABILIDADE CELULAR**

Os condrócitos frescos apresentaram alta viabilidade, sempre acima de 90%, imediatamente após digestão enzimática (tempo 1) e após 15 dias de cultivo (tempo 2). Entretanto, aos 60 dias de cultivo (tempo 3), todas as amostras de condrócitos frescos

mostraram redução, com viabilidade média de 80,43% (tabela 1). Os condrócitos descongelados apresentaram baixa viabilidade imediatamente após o descongelamento (tempo 1), em média 15,16%. Já aos 15 dias de cultivo (tempo 2) demonstraram viabilidade acima de 90%, e uma redução acentuada aos 60 dias, em média de 66,87% (tabela 2).

O tempo de cultivo e o congelamento reduziram o número total de células (NTC) e a viabilidade celular, demonstrados pela alta significância ( $p < 0,001$ ) encontrada para todas as amostras. Aos 15 dias de cultivo, ocorreu aumento do número total de condrócitos frescos, mas, aos 60 dias o NTC reduziu significativamente. Por outro lado, o número de condrócitos descongelados começou a diminuir a partir dos 15 dias de cultivo, permanecendo reduzido até os 60 dias (Fig. 2).

#### ANÁLISE SOB MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Nas amostras de condrócitos frescos, após 15 dias de cultivo, observou-se elevada densidade celular e intensa presença de matriz. Entretanto, aos 60 dias, houve redução da multiplicação celular e a matriz tornou-se escassa (Fig. 3 A e B). Aos 15 dias de cultivo, os condrócitos descongelados mantiveram a densidade celular elevada, porém a produção de matriz foi reduzida. Aos 60 dias de cultivo, a matriz tornou-se ausente e foi observada presença de grande número de condrócitos apoptóticos (Fig. 3 C e D).

#### CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

Nos condrócitos frescos, a marcação de proteoglicanos foi intensamente positiva caracterizando presença de matriz rica em proteoglicanos. Por outro lado, nos condrócitos descongelados houve redução da produção de matriz, com fraca marcação de proteoglicanos (Fig. 4). Nos condrócitos frescos, a imunomarcação pela reação de

imunofluorescência indireta revelou uma intensa e brilhante fluorescência, indicando elevada expressão de colágeno tipo II. Nas células descongeladas, a fluorescência foi menos intensa, indicando uma redução na expressão do colágeno tipo II (Fig. 5).

## **Discussão**

Os condrócitos que crescem em monocamadas perdem rapidamente suas características fenotípicas e diminuem sua multiplicação<sup>1,15</sup>, como demonstrado neste estudo, já que a produção de matriz extracelular e a taxa mitótica decresceram drasticamente aos 60 dias de cultura. Esta observação é suportada pela ausência de forças mecânicas *in vitro*, que em condições fisiológicas são essenciais para estimular a síntese de matriz<sup>1</sup> e, também, pela intensa perda que ocorre nos telômeros, após cada divisão celular, o que conseqüentemente reduz a taxa mitótica<sup>16</sup>.

Imediatamente após o descongelamento, à MEV, as culturas mostraram baixa viabilidade e expressiva redução de mitoses, ocasionadas pela morte celular por apoptose. Segundo Takahashi et al<sup>15</sup>, o cultivo de condrócitos humanos em meio de cultura suplementado com SFB evidenciou aumento da ocorrência de apoptose. Isto pode explicar o que foi observado nas células descongeladas deste estudo, embora não possa ser excluída, como causa, o método de congelamento utilizado. Segundo os mesmos autores, a substituição do soro heterólogo pelo soro autólogo, na mesma concentração, reduz a ocorrência de apoptose por mecanismos ainda não esclarecidos.

O DMSO é um crioprotetor amplamente utilizado para preservação celular durante o congelamento e, neste estudo, foi utilizado a 5% em DMEM. Almqvist et al.<sup>13</sup>, utilizaram-no, na mesma concentração, no congelamento, por 24 horas, de condrócitos humanos e não observaram alterações tanto na viabilidade celular quanto na produção de

matriz. Entretanto, neste estudo, o tempo de congelamento foi de seis meses, o que pode ter influenciado a baixa viabilidade observada imediatamente após o descongelamento em todas as amostras. Outro fator que pode ter influenciado é o número de passagens e a idade da cultura no momento do congelamento, quando os condrócitos poderiam estar mais desdiferenciados, sugerindo que quando o fenótipo condrocítico é perdido ele não é rapidamente re-expresso<sup>17</sup>.

A perda de estabilidade fenotípica de condrócitos cultivados em monocamada pode estar associada com algumas condições de cultura, principalmente o aumento da idade da cultura, a baixa densidade celular durante o subcultivo e o número de passagens. Entretanto, os resultados da análise de proteoglicanos e de colágeno tipo II, indicam que os condrócitos permaneceram fenotipicamente estáveis na cultura primária por duas semanas, quando houve maior síntese de matriz, a diferença do observado aos sessenta dias, quando ocorreu perda das características fenotípicas demonstrada pela diminuição de matriz. Estes dados corroboram os observados por Lee et al.<sup>17</sup>, quando compararam culturas de condrócitos articulares bovinos em monocamada e em alginato submetidas à passagens a cada sete dias, demonstrando que a diminuição na síntese de proteoglicanos ocorreu após 2 a 4 passagens nas culturas em monocamada. Ainda, Brodtkin et. al<sup>18</sup> relataram que a síntese do colágeno tipo II diminuiu através do tempo e após sucessivas divisões quando os condrócitos crescem em monocamadas.

Já, nas culturas dos condrócitos descongelados, a perda de estabilidade fenotípica foi mais marcada, o que foi demonstrado pela baixa intensidade da coloração dos proteoglicanos e pela fraca imunomarcagem do colágeno tipo II, confirmando que o processo de congelamento influenciou a irreversibilidade da desdiferenciação dos condrócitos, possivelmente decorrente dos efeitos letais que ocorrem durante o

congelamento, quando as células passaram por temperaturas intermediárias até congelar em nitrogênio líquido

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que, sob as condições de congelamento utilizadas, o uso de condrócitos heterólogos crio-preservados é viável. Entretanto, é necessário implantar um número elevado de condrócitos descongelados para que se possa elevar o número de células viáveis no sítio de implantação. Os condrócitos deverão ser implantados com duas semanas de cultivo, período em que apresentam melhor taxa de viabilidade. Outros estudos com uso de substratos que sustentem o fenótipo condrocítico e diferentes concentrações de DMSO deverão ser realizados para que se possa estabelecer um banco de condrócitos preservados por longo tempo.

## Referências

1. Waldman SD, Spiteri, CG, Gryn timer MD, Pilliar RM, Hong J, Kandel RA. Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue in vitro. J Bone Joint Surg 2003; 85-A:101-105.
2. Grodzinsky AJ, Levenston ME, Jin M, Frank EH. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. Annu Rev Biomed Eng 2000; 2:691-713.
3. Rezende MU, Hernandez AJ, Camanho GL, Amatu zzi MM. Articular cartilage and osteoarthritis. Acta Ortop Bras 2000; 8:100-104.
4. Lombello C, Reis Jr GM, Cohen M. Study on human chondrocyte culture viability for autologous transplantation in clinical application. Einstein 2003; 1:84-88.
5. Denoncourt PM, Patel D, Dimakopoulos P. Treatment of osteochondrosis dissecans of the knee by arthroscopic curettage, follow up study. Orthop Rev 1986; 15:652-657.
6. Sousa TD, Del Carlo, RJ, Vitoria MIV. Electrotherapy on the healing process in the articular surface of rabbits. Cien Rur 2001; 31:819-824.
7. Henrotin Y, Sanches C, Balligand M. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: present and future perspectives. Vet J 2005; 170:113-123.
8. Huntley JS, Bush PG, Mc Birnie JM, Simpson AH, Hall AC. Chondrocyte death associated with human femoral osteochondral harvest as performed for mosaicplasty. J Bone Joint Surg 2005; 87-A:351-360.
9. Jones DG, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. J Bone Joint Surg 2006; 88-A:2501-2520.

10. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A:17-24.
11. Stevenson S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg* 1987; 69-A:573-582.
12. Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2003; 21:573-583.
13. Almqvist KF, Wang L, Brodtkorb C, Veyz EM, Verbruggen G. Biological freezing of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cart* 2001; 9:341-350.
14. Freshney RI. *Culture of Animal Cells*, Fifth Edition. New Jersey, Wiley-Liss 2005.
15. Takahashi T, Yamamoto H, Ogawa Y, Yoshida S, Kataoka S, Majumdar M, et al. Role of apoptosis inhibition in various chondrocyte culture systems. *Int J Mol Med* 2003; 11:299-303.
16. Martin JA, Buckwalter JA. The Role of Chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A:106-110.
17. Lee DA, Reisler T, Bader DL. Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques. *Acta Orthop Scand* 2003; 74:6-15.
18. Brodtkorb KR, García AJ, Levenston ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 2004; 25:5929-5938.

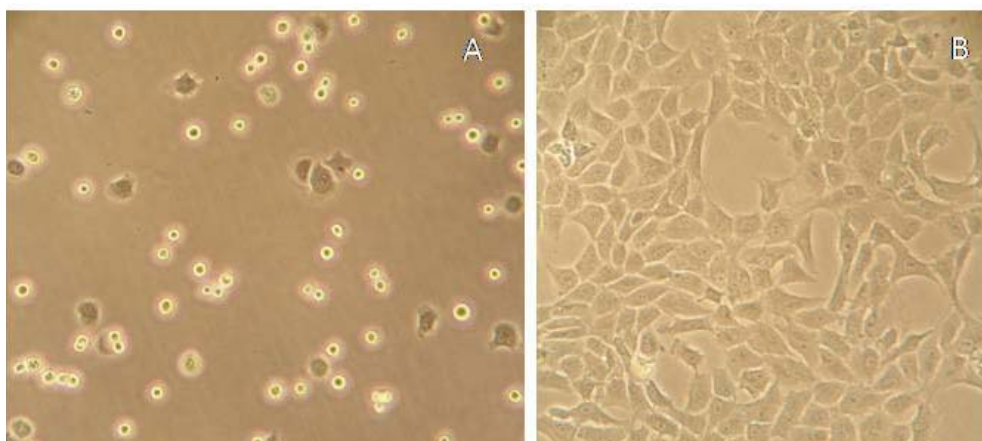


Fig. 1. Cultura primária de condrócitos de coelho. (A) Aparência dos condrócitos uma hora após digestão enzimática demonstrando adesão celular. (B) Condrócitos com 75% de confluência apresentando espalhamento e adesão celular no terceiro dia de cultivo (contraste de fase, 100 X).

Tabela 1. Viabilidade dos condrócitos, imediatamente após digestão enzimática (tempo 1), aos 15 dias de cultivo (tempo 2) e aos 60 dias de cultura (tempo 3).

| Amostra   | tempo 1  | tempo 2 | tempo 3 |
|-----------|----------|---------|---------|
| 1         | 98,50%   | 96,70%  | 78,00%  |
| 2         | 97,70%   | 98,40%  | 83,00%  |
| 3         | 100,00 % | 96,25%  | 81,00%  |
| 4         | 96,40%   | 100,00% | 82,00%  |
| 5         | 98,40%   | 96,80%  | 71,50%  |
| 6         | 100,00%  | 95,30%  | 81,60%  |
| 7         | 100,00%  | 88,80%  | 76,70%  |
| 8         | 92,00%   | 98,60%  | 82,90%  |
| 9         | 100,00%  | 97,00%  | 87,20%  |
| $\bar{x}$ | 98,11%   | 96,43%  | 80,43%  |

Tabela 2. Viabilidade dos condrócitos, imediatamente após o descongelamento (tempo 1), aos 15 dias de cultivo (tempo 2), e aos 60 dias de cultura (tempo 3).

| Amostra   | tempo 1 | tempo 2 | tempo 3 |
|-----------|---------|---------|---------|
| 1         | 16,67%  | 98,63%  | 62,50%  |
| 2         | 11,00%  | 96,30%  | 71,43%  |
| 3         | 12,14%  | 100,00% | 70,00%  |
| 4         | 11,50%  | 98,41%  | 66,77%  |
| 5         | 13,75%  | 96,43%  | 66,77%  |
| 6         | 23,63%  | 98,40%  | 75,00%  |
| 7         | 11,70%  | 100,00% | 63,64%  |
| 8         | 18,25%  | 96,92%  | 64,23%  |
| 9         | 17,77%  | 100,00% | 61,54%  |
| $\bar{x}$ | 15,16%  | 98,34%  | 66,87%  |

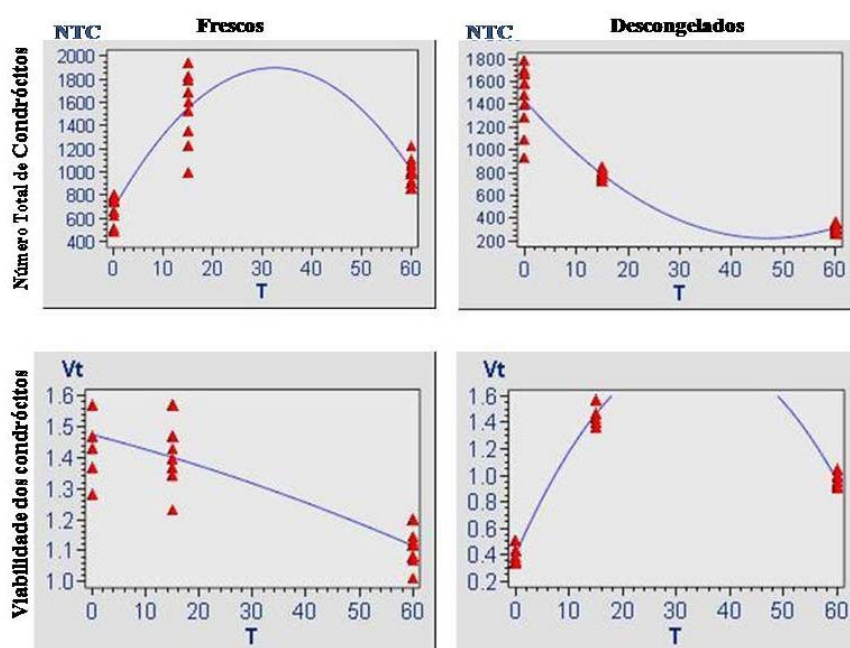


Figura 2. Número total de células (NTC) e viabilidade (Vt) em função do tempo de cultivo (T) nos condrócitos frescos e descongelados.

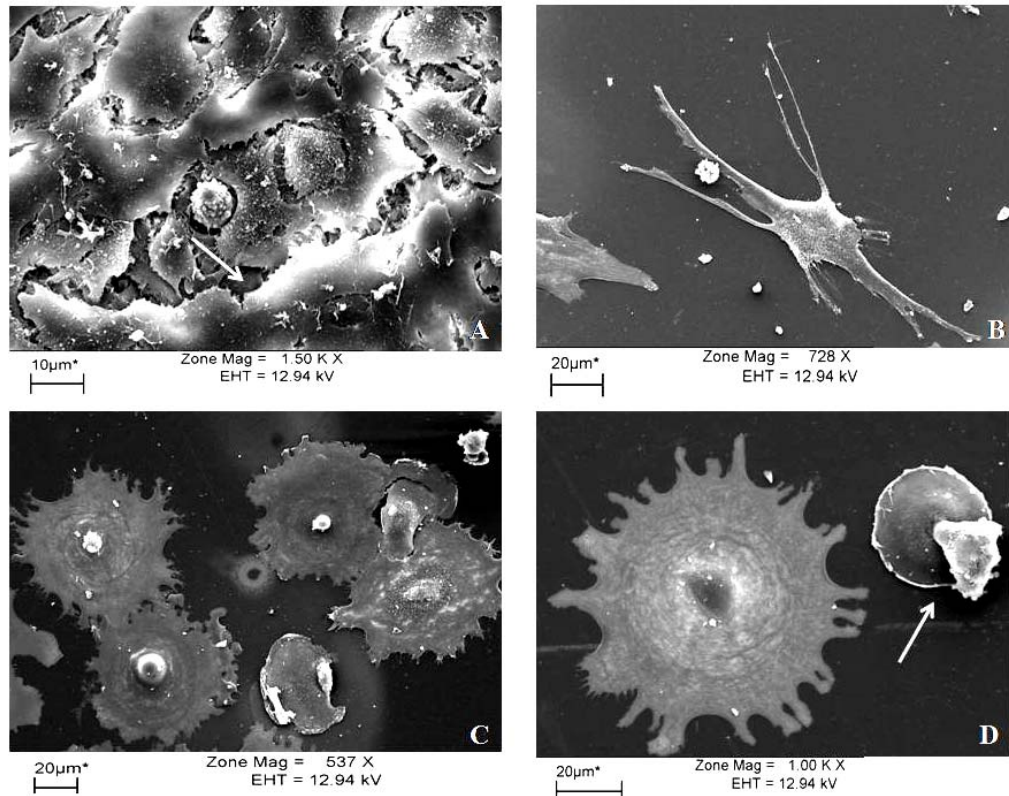


Figura 3. Fotomicrografias dos condrócitos frescos [A (15 dias) e B (60 dias)] e descongelados [C (15 dias) e D (60 dias)] observados ao microscópio eletrônico de varredura. (A) Elevada densidade celular com intensa presença de matriz (seta). (B) Baixa densidade celular e escassez de matriz. (C) Manutenção da densidade celular, porém com menor presença de matriz. (D) Presença de condrócitos apoptóticos (seta), baixa densidade celular e ausência de matriz.

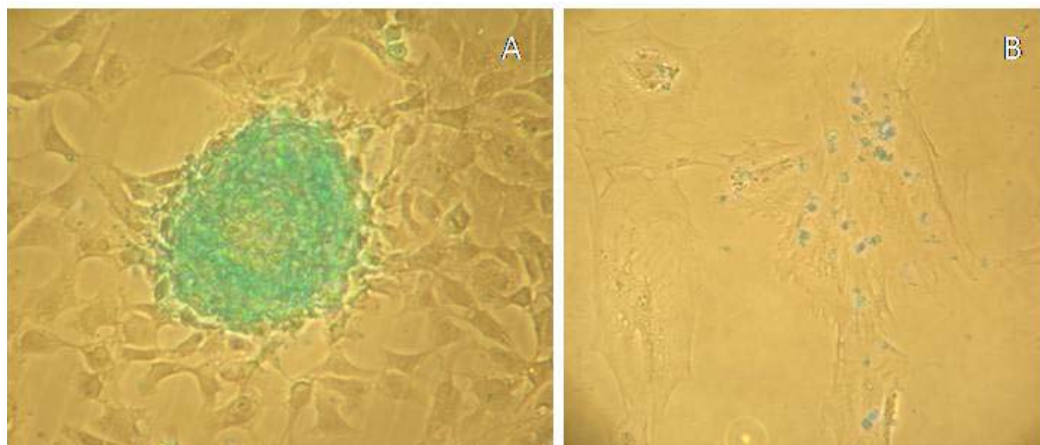


Figura 4. Marcação de condrócitos com Alcian Blue aos 15 dias de cultura. (A) Cultura de condrócitos frescos com presença de proteoglicanos fortemente marcados pelo Alcian Blue. (B) Cultura de condrócitos descongelados com pouca matriz e fraca marcação de proteoglicanos (contraste de fase, 100 X).

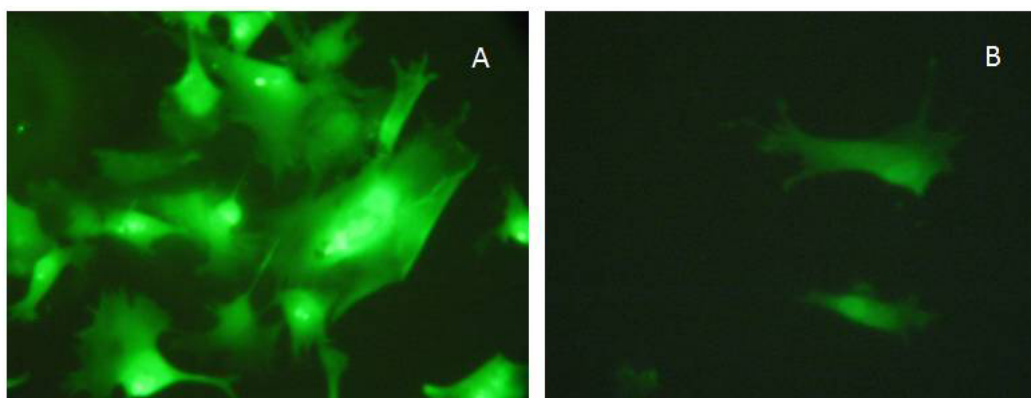


Figura 5. Reação de imunofluorescência indireta dos condrócitos frescos e descongelados, aos 15 dias de cultura. (A) Cultura de condrócitos frescos com intensa imunomarcacão do colágeno tipo II e elevada densidade celular. (B) Cultura de condrócitos descongelados com discreta imunomarcacão do colágeno tipo II e baixa densidade celular (400 X).

**USO DE CONDRÓCITOS HETERÓLOGOS, FRESCOS E DESCONGELADOS,  
ASSOCIADOS AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM LESÕES  
OSTEOCONDRAIS PRODUZIDAS NO JOELHO DE COELHOS.**

**Resumo**

*Objetivo:* avaliar os aspectos clínicos e macro e microscópicos *post mortem*, após a implantação de condrócitos heterólogos, frescos e descongelados, associados ao plasma rico em plaquetas em lesões osteocondrais produzidas no joelho de coelhos.

*Métodos:* os condrócitos foram obtidos da cartilagem articular do joelho esquerdo de um coelho macho da raça Nova Zelândia Branca. Os condrócitos foram cultivados em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em meio de cultivo composto de DMEM /Ham's F12 (1:1, v/v), 1% de antibiótico-antimicótico e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Metade das células foi mantida em cultura para posterior implante *in vivo* e a outra metade foi congelada durante seis meses em nitrogênio líquido em meio contendo DMEM com 10% de SFB e 5% de DMSO. Após descongelamento as células foram submetidas a novo cultivo e então implantadas *in vivo*. Outros trinta e seis coelhos saudáveis, machos e fêmeas, da raça Nova Zelândia Branca, foram separados em quatro grupos de nove animais e, em todos, foi produzida, no joelho direito, uma falha osteocondral circular de 3,0mm de diâmetro por 3,0mm de profundidade. O grupo controle negativo (CN) não recebeu tratamento e o grupo controle positivo (CP) recebeu plasma rico em plaquetas (PRP) no interior da falha. Os grupos heterólogo descongelado (HD) e heterólogo fresco (HF) receberam, respectivamente, implante de condrócitos heterólogos cultivados descongelados e frescos associados ao PRP. Para análise clínica pós-tratamento, foram observadas respostas de dor à palpação do joelho e claudicação do membro, aos sete e 15

dias pós-operatórios. Para avaliar a reparação articular, foram realizadas análises macro e microscópica aos 15, 45 e 90 dias pós-operatórios.

*Resultados:* os animais do grupo CN apresentaram, aos sete dias pós-operatórios, maior intensidade de dor ( $p<0,05$ ) e maior grau de claudicação ( $p<0,001$ ) quando comparados com os demais grupos. Macroscopicamente, nos animais não tratados (CN), a membrana sinovial aderiu à área lesionada e determinou uma reparação com tecido de granulação. No entanto, quando os animais foram tratados com PRP associado aos condrócitos frescos ou descongelados, a reparação com tecido semelhante à cartilagem hialina ocorreu de forma mais rápida e difusa sem que houvesse aderência da cápsula à lesão. Microscopicamente, aos 45 e 90 dias, os grupos CP, HD e HF apresentaram preenchimento com tecido cartilaginoso contendo condrócitos organizados de forma colunar, formando grupos isogênicos envoltos por uma densa matriz de glicosaminoglicanos marcados pela safranina O. Nos mesmos períodos, no grupo CN, a reparação aconteceu por tecido conjuntivo fibroso vascularizado sem integração ao osso subcondral.

*Conclusões:* condrócitos heterólogos crio-preservados são viáveis para implantação e reparação de lesões osteocondrais; a associação ao PRP permite a fixação das células na lesão e fornece fatores de crescimento que aceleram a reparação com tecido semelhante à cartilagem hialina articular.

*Palavras chave:* cartilagem articular, colágeno tipo II, condrócitos.

## **Introdução**

A matriz da cartilagem hialina articular apresenta baixa celularidade e elevada concentração de água que se liga às moléculas de proteoglicanos sintetizadas pelos condrócitos e, juntamente com o colágeno tipo II, mantêm a rigidez e a elasticidade tecidual<sup>1,2</sup>. Como não possui vascularização, a nutrição do tecido cartilaginoso da superfície articular é dependente da difusão de substâncias encontradas no líquido sinovial, tais como glicose, oxigênio e aminoácidos<sup>3,4</sup>.

Para a reparação de lesões superficiais da cartilagem articular, os condrócitos próximos ao defeito multiplicam-se e sintetizam nova matriz preenchendo a falha com tecido semelhante à cartilagem hialina. Entretanto, uma semana após a lesão, essa resposta é cessada porque os condrócitos marginais entram em apoptose e o tecido neoformado desprende-se do tecido sadio<sup>5</sup>. Também, o processo de reparação não segue uma resposta inflamatória padronizada, já que os vasos sanguíneos e as células inflamatórias não atingem a área lesionada<sup>6</sup>.

Sobre as lesões que atingem o osso subcondral forma-se um hematoma que lança na superfície articular diversos leucócitos, células mesenquimais e constituintes do plasma ricos em fatores condrogênicos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)<sup>7</sup>. Em seguida, segue-se o modelamento da malha de fibrina, constituindo um arcabouço para os fibroblastos que passam a ocupar a área lesionada. Cerca de 15 dias após a lesão, o tecido fibroso sofre hialinização, devido a diferenciação das células mesenquimais em condroblastos, passando a apresentar aspecto fibrocartilaginoso<sup>8</sup>.

Uma alternativa para promover a regeneração da cartilagem articular é prolongar a permanência do maior número possível de condrócitos ativos na área de lesão, permitindo a formação e integração de matriz, morfológica e funcionalmente, compatível com a cartilagem hialina. Nesse contexto, o uso de condrócitos cultivados constitui uma alternativa para a reparação, uma vez que, após expansão celular em laboratório, podem ser implantados na área lesionada, em concentração elevada, e assim permanecerem ativos por tempo prolongado, até que nova matriz seja formada e o tecido se integre ao osso subcondral<sup>9</sup>.

Os primeiros relatos do uso clínico de condrócitos autólogos cultivados para reparação de lesões da cartilagem hialina datam da década de 80<sup>10</sup>. A técnica possui a vantagem de oferecer à área lesionada uma maior quantidade de condrócitos ativos que sintetizam a matriz cartilaginosa composta de colágeno tipo II e proteoglicanos. Diversos trabalhos<sup>9,11,12,13,14,15</sup> demonstram resultados diferentes em relação ao tecido formado após o implante de condrócitos cultivados, porém, enfatizam que o tecido formado possui características biomecânicas e morfológicas próximas ao original.

Uma desvantagem no uso de condrócitos autólogos é que a técnica demanda dois procedimentos: um para a coleta e outro para o implante das células<sup>10,12,16,17</sup>. O uso de culturas heterólogas armazenadas em banco celular esbarra na comprovação de que os condrócitos são células imunocompetentes<sup>18</sup>, entretanto, resultados preliminares não demonstram reações inflamatórias ou de rejeição em períodos de observação que variam de 3-8 meses<sup>19,20</sup>.

A fixação das células no local da lesão, durante o movimento articular, influencia a qualidade dos resultados obtidos. O uso de um enxerto de periósteo, suturado sobre a lesão, é a técnica de eleição utilizada em pacientes humanos e eqüinos<sup>9,15</sup>. Em animais de

pequeno porte são utilizados substratos aderentes, como o plasma rico em plaquetas (PRP) que, além de atuar como agente de fixação, fornece fatores de crescimento condrogênicos como o PDGF, IGF e TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta) que estimulam a diferenciação e multiplicação dos condrócitos *in situ*<sup>7,17</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos clínicos e macro e microscópicos *post mortem*, após a implantação de condrócitos heterólogos, frescos e descongelados, associados ao plasma rico em plaquetas em lesões osteocondrais produzidas no joelho de coelhos.

## **Material e Métodos**

### **CULTIVO PRIMÁRIO DE CONDRÓCITOS**

O experimento foi aprovado pela comissão de ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, sob protocolo número 076/2005. A cartilagem foi obtida por biópsia do joelho esquerdo de um coelho macho da raça Nova Zelândia Branca, adulto e saudável, após anestesia intravenosa com propofol 10% (Propovan, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Brasil), na dose de 10mg/kg, seguida de anestesia epidural com ropivacaina 0,75% (Ropi, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Brasil), na dose de 2,25mg/kg. Após preparação, o joelho esquerdo foi exposto e vários fragmentos de cartilagem foram removidos com auxílio de lâmina de bisturi número 15. Os fragmentos foram colocados em um anteparo metálico estéril e, posteriormente, recortados com uma espessura aproximada de 1mm<sup>3</sup>. Oito desses pequenos fragmentos, livres de tecidos moles e osso subcondral, foram selecionados. Após a coleta, a cápsula articular, tecido subcutâneo e pele foram suturados com técnica rotineira e o coelho recebeu, por via intramuscular, 30mg/kg de cefazolina 10% (Cefazolina 1g, Bristol

Myers Squibb - Brasil) e 2,0mg/kg de cetoprofeno 10% (Ketofen, Merial Saúde Animal - Brasil), via subcutânea, a cada 24 horas, durante três dias.

A técnica para o cultivo celular foi adaptada de Freshney<sup>21</sup>. Os fragmentos de cartilagem foram depositados em um tubo plástico estéril (BD-Falcon - USA) contendo 10mL de meio de cultura Ham's F12 (Gibco-Invitrogen -USA) adicionado de 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina G, estreptomicina e anfotericina B – Gibco-Invitrogen - USA) e enviado ao laboratório em recipiente refrigerado.

As amostras de cartilagem foram transferidas para um becker estéril e submetidas à digestão enzimática, durante 25 minutos, com 0,05% de tripsina (Gibco-Invitrogen - USA) diluída em 10mL de Ham's F12. Após remoção da tripsina, outra digestão foi realizada, durante 30 minutos, com collagenase tipo I a 0,3% (Gibco-Invitrogen - USA) diluída em 10mL de Ham's F12. Todos os procedimentos foram realizados em agitador magnético, em temperatura ambiente e sob condições estéreis.

A solução de collagenase foi removida e os fragmentos transferidos para uma garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup>, contendo collagenase 0,06%, diluída em 10mL de Ham's F12 com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab – Brasil). O material foi colocado em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 15 horas. Após, a suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga de 50mL e agitada em vortex por alguns segundos. Em seguida, foi filtrada, em filtro de nylon de 70µm (BD-Falcon - USA), e os condrócitos suspensos foram contados em hemocítômetro e a viabilidade celular determinada. Após a contagem, os condrócitos foram transferidos para uma garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo 5mL de meio de crescimento completo constituído de DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)/Ham's F12 (1:1, v/v), 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina G,

estreptomicina e anfotericina B - Gibco-Invitrogen - USA) e suplementado com 10% de SFB.

A garrafa foi incubada em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, até alcançar 75% de confluência, momento em que os condrócitos foram desprendidos da garrafa com PBS (salina de fosfato tamponado pH 7,4) contendo 0,1% de tripsina e 0,02% de EDTA (ácido dietileno diamino tetra acético) e, após as lavagens, submetidos à nova passagem. Para neutralização da tripsina foram feitas lavagens dos condrócitos com meio DMEM contendo 10% de SFB, durante cinco minutos, e posterior centrifugação a 400g, por dez minutos, em centrífuga refrigerada. Após dez passagens, os condrócitos foram ressuspensos, contados em hemocítômetro e metade da suspensão celular (2,5mL) foi distribuída em partes iguais, em nove garrafas de 25cm<sup>2</sup>, para novo cultivo durante três dias. Após expansão celular, os condrócitos foram desprendidos das garrafas com PBS contendo 0,1% de tripsina e 0,02% de EDTA. Para neutralização da tripsina foram feitas lavagens dos condrócitos com meio DMEM contendo 10% de SFB, durante cinco minutos, e posterior centrifugação a 400g, por dez minutos, em centrífuga refrigerada. Os pellets formados foram ressuspensos em 5mL de DMEM a uma concentração de  $2,0 \times 10^6$  cels./mL, distribuídos em nove tubos de centrífuga e reservados em recipiente refrigerado para posterior associação ao PRP.

A outra metade da solução (2,5mL) foi centrifugada a 400g, por dez minutos, e ressuspensa em tubo de centrífuga de 15mL contendo meio resfriado composto de DMEM e 10% de SFB, adicionando-se lentamente 5% de dimetil sulfoxido (DMSO) (Dimesol, Marcolab Produtos Farmacêuticos - Brasil) à suspensão. Em seguida, foi transferida para crio-tubos com concentração celular de  $2,4 \times 10^6$  cels/mL. Os crio-tubos foram deixados

em congelador a -20°C, por 45 minutos, e após, estocados em nitrogênio líquido por seis meses.

Após seis meses, os crio-tubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados rapidamente em banho-maria a 37°C para descongelamento da suspensão celular. Em seguida, os condrócitos foram ressuspensos em meio de crescimento completo, como descrito anteriormente, contados em hemocitômetro e a viabilidade celular determinada. Após, foram distribuídos em partes iguais em nove garrafas de 75cm<sup>2</sup> e submetidos a um novo cultivo em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 11 dias. Após expansão celular, os condrócitos foram desprendidos das garrafas com PBS contendo 0,1% de tripsina e 0,02% de EDTA. Para neutralização da tripsina foram feitas lavagens dos condrócitos com meio DMEM contendo 10% de SFB, durante cinco minutos, e posterior centrifugação a 400g, por dez minutos, em centrífuga refrigerada. Os pellets formados foram ressuspensos em 5mL de DMEM a uma concentração de  $2,0 \times 10^6$  cels./mL, distribuídos em nove tubos de centrífuga e reservados em recipiente refrigerado para posterior associação ao PRP.

#### PREPARO DO PLASMA RICO EM PLAQUETA

Foram utilizados 36 coelhos, machos e fêmeas, da raça Nova Zelândia Branca, adultos e saudáveis, distribuídos randomicamente em quatro grupos de nove animais. Três horas antes da operação foram coletados 4,5mL de sangue de cada coelho, por meio de punção intra-cardíaca. O sangue foi transferido para tubos de centrífuga contendo 0,5mL de citrato de sódio, identificado, e encaminhado ao laboratório para processamento. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e centrifugado a 400g por 12 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi separado das hemácias e colocado em outro tubo estéril e centrifugado a 800g por 15 minutos. Formou-se um precipitado de plaquetas no fundo do

tubo separado do plasma sobrenadante. Foram mantidos no tubo apenas 250µL de plasma sobrenadante que, juntamente com o precipitado plaquetário, formaram o PRP.

As soluções de condrócitos frescos e descongelados foram centrifugadas a 400g, por dez minutos, e o pellet celular formado foi ressuspenso com o PRP de cada coelho e enviado ao centro cirúrgico, em recipiente identificado e refrigerado, para implante nos animais.

No momento do implante, o PRP com condrócitos foi associado a 125µL de solução coagulante composta de tromboplastina recombinante de coelho e cloreto de cálcio (HemosIL, Instrumentation Laboratories – USA). Após cinco minutos, formou-se um gel que foi colocado sobre a falha criada cirurgicamente de acordo com cada grupo experimental.

## IMPLANTE DOS CONDRÓCITOS

Os animais foram submetidos à anestesia intravenosa com propofol 10% (Propovan, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Brasil), na dose de 10mg/kg, seguida de anestesia epidural com ropivacaina 0,75% (Ropi, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Brasil), 2,25mg/kg. Após preparo asséptico, a articulação do joelho direito de cada animal foi exposta e uma falha osteocondral circular, de 3,0mm de diâmetro X 3,0mm de profundidade, foi produzida no sulco troclear com auxílio de uma broca esférica acoplada a um motor elétrico (LB100, Beltec Micromotores - Brasil). Nos animais do grupo CN (controle negativo) a falha não foi preenchida, e nos animais do grupo CP (controle positivo) a falha foi preenchida apenas com PRP sem condrócitos. Nos animais do grupo HD (heterólogo descongelado) a falha foi preenchida com gel de PRP associado

aos condrócitos descongelados, e nos animais do grupo HF (heterólogo fresco) a falha foi preenchida com gel de PRP associado aos condrócitos frescos.

A cápsula articular, tecido subcutâneo e pele foram suturados com técnica rotineira e todos os coelhos receberam, por via intramuscular, 30mg/kg de cefazolina 10% (Cefazolina 1g, Bristol Myers Squibb - Brasil) e 2,0mg/kg de cetoprofeno 10% (Ketofen, Meril Saúde Animal - Brasil), via subcutânea, a cada 24 horas, durante três dias.

## AVALIAÇÃO CLÍNICA

O grau de claudicação e a intensidade de dor à palpação articular foram avaliados, por dois avaliadores diferentes, segundo protocolo descrito por French et al.<sup>22</sup>, aos sete e 15 dias pós-operatórios. Para avaliação da claudicação foi usado: grau 0 (marcha normal); grau 1 (claudicação leve - imprime carga ao membro quando em estação e reduz a carga quando em marcha); grau 2 (claudicação moderada - imprime carga ao membro quando em estação, porém não apóia o membro à marcha); e grau 3 (claudicação grave - membro recolhido constantemente). A intensidade de dor foi determinada após palpação patelar da seguinte forma: grau 0 (sem dor à palpação); grau 1 (dor leve – permite o toque, porém recolhe o membro quando a patela é movimentada); grau 2 (dor moderada – recolhe o membro ao toque e não permite movimentar a patela); e grau 3 (dor grave – vocaliza ao toque e não permite movimentar a patela).

## AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA

Para permitir as avaliações macro e microscópica, três animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia, após sobredose anestésica (Tiopental, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos - Brasil) aos 15, 45 e 90 dias pós-operatórios. Na necropsia, a articulação operada foi avaliada quanto ao aspecto do tecido depositado na falha óssea e quanto à

presença de aderência da cápsula articular à lesão. Fragmentos osteocondrais de 1cm<sup>2</sup> envolvendo a área operada foram fixados em paraformaldeído 4%, em pH 7,4, por 12 horas, a uma temperatura de 4°C. Após, foi realizada descalcificação em EDTA 10%, em pH 7,4, a uma temperatura de 4°C, por 14 dias. Os fragmentos foram submetidos à desidratação em álcool e incluídos em parafina ultra-pura Paraplast® (Paraplast plus embedding media - Sigma-Aldrich – USA). Os cortes histológicos de 5µm foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) e examinados ao microscópio óptico para análise da morfologia do tecido de reparação e, por Safranina O para avaliar a intensidade de marcação dos glicosaminoglicanos na matriz cartilaginosa.

A presença de infiltrado inflamatório foi quantificada de acordo com a seguinte graduação: grau 0 (ausência de inflamação), grau1 (discreta quantidade de infiltrado inflamatório), grau 2 (moderada quantidade de infiltrado inflamatório); e grau 3 (elevada quantidade de infiltrado inflamatório).

## IMUNOISTOQUÍMICA

Para observar a presença de colágeno tipo II na área reparada foi selecionado aleatoriamente, em cada grupo, um espécime com 90 dias de pós-operatório. Os espécimes foram cortados com 5µm de espessura e aderidos em lâmina silanizada (Silane, Sigma Aldrich – USA). Após remoção da parafina em xilol, foi realizada recuperação antigênica com tripsina 1%, durante 25 minutos, a 37°C. O bloqueio de proteínas específicas foi realizado com soro de cabra, em concentração 1:10, por cinco minutos e então os espécimes foram incubados, por 12 horas, a 4°C, com o anticorpo primário em diluição 1:100 (anticorpo monoclonal de camundongo para colágeno tipo II – Lab-Vision - USA). Após, os espécimes foram incubados com anticorpo secundário anti IgG multiespécie biotinilado (EasyPath, Signet Laboratories – USA), durante 20 minutos, em temperatura

ambiente, e então marcados com peroxidase ultra estreptavidina (EasyPath, Signet Laboratories – USA), durante 20 minutos, em temperatura ambiente. Depois da marcação, os espécimes foram incubados com diaminobenzidina (DAB chromogen system – Signet Laboratories – USA), por cinco minutos, e contra corados com Hematoxilina 1:10, para posterior montagem em bálsamo com lamínula.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os animais foram distribuídos entre os tratamentos de forma aleatória. A análise estatística foi realizada em função do tempo de avaliação para as variáveis: grau de claudicação, intensidade de dor e presença de infiltrado inflamatório. Os grupos foram analisados isoladamente e depois os resultados foram comparados entre os quatro grupos utilizando o teste F para análise de variância. Os dados foram analisados pelo sistema SAS<sup>®</sup> (Enterprise Guide v.4 - USA) e o nível de 5% foi considerado significativo. Para as análises não paramétricas foi utilizado o teste Chernoff-Savage.

## Resultados

### CULTIVO PRIMÁRIO DE CONDRÓCITOS

A técnica de digestão utilizada para liberar os condrócitos da matriz, uma associação enzimática com tripsina e collagenase, permitiu o desprendimento de  $6,5 \times 10^5$  células/mL, com viabilidade de 98,5%, que produziram uma monocamada celular confluenta, em três dias de cultivo. Uma baixa viabilidade, na ordem de 16,67%, foi observada após o descongelamento dos condrócitos. Porém, aos 11 dias de cultivo, eles multiplicaram-se e demonstraram viabilidade de 98,7%, quando então puderam ser desprendidos das garrafas e preparados para o implante.

## IMPLANTE DOS CONDRÓCITOS

Um animal do grupo HF morreu devido a complicações respiratórias e foi excluído do estudo. Os demais animais não apresentaram nenhuma complicação pós-operatória.

O instrumental cirúrgico utilizado permitiu a confecção de uma falha osteocondral com margens lisas e sem lesão no tecido adjacente. A profundidade da falha, 3,0mm, foi suficiente para a acomodação do gel de PRP que, em todos os grupos, demonstrou ser de fácil manipulação e apresentou discreto grau de aderência à lesão imediatamente após sua aplicação.

Os grupos HD e HF receberam um número total de  $1 \times 10^7$  condrócitos misturados ao PRP, que após a gelatinização, manteve as células de forma dispersa. Entretanto, no momento de aplicação, o gel perdeu grande quantidade do plasma e tornou-se um aglomerado, rico em plaquetas e condrócitos, aderido à lesão.

## AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os resultados da avaliação clínica estão ilustrados na figura 1. Foi observada, aos sete dias pós-operatórios, maior intensidade de dor nos animais do grupo CN ( $p < 0,05$ ) quando comparados com os animais dos demais grupos. Não houve diferença significativa para a intensidade de dor à palpação, aos sete dias pós-operatórios, entre os três grupos tratados, embora os grupos CP e HD tenham apresentado melhores resultados, com 33,3% dos animais sem dor à palpação. Foi observada redução na intensidade de dor em todos os grupos aos 15 dias pós-operatórios.

Os animais do grupo CN apresentaram maior grau de claudicação com elevada significância ( $p < 0,001$ ) quando comparados com os demais grupos. Enquanto os animais dos grupos tratados apresentaram melhora para o grau de claudicação, aos 15 dias pós-

operatórios, 67% dos animais do grupo CN ainda apresentavam grau acentuado de claudicação, no mesmo período. Foi observado que os animais tratados com PRP, isoladamente ou associado aos condrócitos, evoluíram para a melhora clínica de maneira mais rápida que aqueles não tratados.

## AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA

À avaliação macroscópica, aos 15 dias, foi observada aderência da cápsula articular à lesão e ausência de tecido de preenchimento nos animais do grupo CN. Nos animais dos grupos CP e HF, a superfície articular mostrou-se brilhante, sem aderência da cápsula e as bordas da lesão demonstraram início de preenchimento com tecido de aspecto liso e coloração branca. No grupo HD, o preenchimento ocorreu à semelhança dos grupos CP e HF, entretanto, a reparação demonstrou preenchimento tanto nas bordas quanto no centro do defeito (figura 2).

Aos 45 dias, dois animais do grupo CN evidenciaram início de reparação nas bordas da lesão com tecido de aspecto ligeiramente irregular e de coloração branca, o terceiro coelho apresentou aderência da cápsula à lesão e preenchimento com tecido de coloração avermelhada, superfície irregular e granulações grosseiras. Nos grupos CP, HD e HF não foram observadas modificações articulares e os animais apresentaram preenchimento com tecido de aspecto liso e brilhante e coloração branca, e este se estendia até o centro da lesão.

Nos grupos CP, HD e HF, aos 90 dias, houve total reparação articular à semelhança do observado aos 45 dias (figura 3). Nos animais não tratados (CN), a membrana sinovial aderiu à área lesionada e determinou uma reparação com tecido de aspecto fibroso e coloração avermelhada. No entanto, quando os animais foram tratados com PRP associado

aos condrócitos frescos ou descongelados, a reparação ocorreu de forma mais rápida e difusa com tecido de aspecto e coloração semelhantes à cartilagem hialina e sem que houvesse aderência da cápsula à lesão.

Os animais do grupo CN apresentaram à histopatologia, aos 15 dias, focos de tecido cartilaginoso na periferia da lesão contendo matriz extracelular basofílica e condrócitos dispostos de forma aleatória com baixa intensidade de marcação pela safranina O. Ao centro, a reparação demonstrou aspecto de tecido de granulação constituído por fibras e células conjuntivas e vasos sanguíneos. Foi observada, na periferia, reabsorção osteoclástica do tecido ósseo subcondral que estava necrosado e, nas áreas onde não ocorreu reabsorção, formou-se uma linha de separação entre o tecido de reparação e o osso subcondral. Nos grupos CP, HD e HF foi visualizada formação de tecido cartilaginoso nas bordas da lesão, e ao centro somente no grupo HD. A cartilagem continha condrócitos dispostos de forma colunar envoltos em uma matriz extracelular fortemente marcada pela safranina O. Nestes animais, não foi visualizada linha de separação entre o tecido depositado e o osso subcondral e foram observados condrócitos em zona de calcificação formando linha de maré. Os animais dos grupos HD e HF apresentaram significativo infiltrado inflamatório polimorfonuclear no osso subcondral ( $p < 0,05$ ) (figuras 4 e 5).

O grupo CN apresentou, aos 45 dias, preenchimento difuso com tecido conjuntivo fibroso vascularizado contendo fibras colágenas sem orientação definida. Nestes animais, houve deposição de tecido adiposo a partir do osso subcondral e presença de uma linha de separação entre o osso adjacente e o tecido de reparação. Nos grupos CP, HD e HF houve deposição de tecido cartilaginoso hipertrófico, com condrócitos organizados de forma colunar e distribuídos em uma matriz fortemente corada pela safranina O. Nos três grupos,

não foi observada linha de separação entre o tecido formado e o osso subcondral e, logo abaixo deste, foi visualizada presença de infiltrado inflamatório mononuclear (figura 6).

No grupo CN, aos 90 dias, os achados histopatológicos foram os mesmos dos animais avaliados aos 45 dias. Os grupos CP, HD e HF apresentaram preenchimento com tecido cartilaginoso contendo condrócitos organizados de forma colunar, formando grupos isogênicos, e circundados por uma densa matriz fortemente marcada pela safranina O. Neste período houve redução do processo inflamatório (figura 7).

## IMUNOISTOQUÍMICA

Somente os espécimes dos grupos CP, HD e HF foram marcados pela peroxidase ultra estreptavidina demonstrando presença de uma matriz rica em colágeno tipo II depositado ao redor dos condrócitos. O espécime do grupo CN demonstrou preenchimento com tecido não marcado pela peroxidase ultra estreptavidina indicando ausência do colágeno tipo II (figura 8).

## Discussão

A criopreservação de condrócitos articulares tem como principal objetivo o estudo *in vitro* da reparação da cartilagem articular<sup>23,24</sup>. Como em estudos recentes se demonstrou que o implante de condrócitos heterólogos armazenados em nitrogênio líquido pode apresentar capacidade reparadora semelhante ao implante de condrócitos autólogos, optou-se, neste estudo, pela implantação de condrócitos articulares heterólogos frescos e descongelados. Os resultados obtidos não mostraram diferenças quanto ao tipo de tecido depositado na área de reparação, nos dois procedimentos.

Apesar da baixa viabilidade celular, observada após o descongelamento, pode-se inferir que a criopreservação permitiu que os condrócitos fossem armazenados, por até seis

meses, com pouca alteração funcional, à semelhança do que foi encontrado por Almqvist et al.<sup>18</sup> que congelaram condrócitos em meio de cultura contendo DMSO na mesma concentração utilizada neste estudo.

Ficou evidenciada a necessidade da associação de condrócitos com técnicas que fixem as células à área lesionada até que haja adsorção destas ao sítio hospedeiro. O flap de periósteo suturado sobre a lesão, além de ser de difícil realização em articulações de animais de pequeno porte, também possui, como inconveniente, células mesenquimais que migram para a lesão e podem induzir a formação de fibrocartilagem<sup>9,15,25</sup>.

Os resultados macroscópicos demonstraram que o PRP manteve-se fixo à lesão e, quando utilizado em associação aos condrócitos frescos ou descongelados, atuou de maneira a acelerar a reparação com tecido semelhante à cartilagem hialina, permitindo a rápida recuperação clínica dos animais tratados em relação ao controle negativo.

Por outro lado, o gel de PRP foi efetivo como alternativa para fixação dos condrócitos à lesão e, por ser rico em fatores de crescimento<sup>26</sup>, pode também ter estimulado os condrócitos implantados, promovendo proliferação via receptores de membrana localizados na superfície destas células<sup>27</sup>.

Kajitani et al.<sup>25</sup> implantaram condrócitos heterólogos frescos em lesões de cartilagem produzidas no joelho de coelhos e não observaram reação inflamatória ou rejeição após seis meses de avaliação. No presente estudo, foram observados infiltrados inflamatórios com polimorfonucleares, aos 15 dias, nos grupos HD e HF e, mononuclear, aos 45 dias, nos três grupos tratados. Entretanto, a presença destas células inflamatórias não parecia estar relacionada a processo de rejeição dos condrócitos heterólogos.

A intensa resposta inflamatória observada pode ser justificada pela ação de citocinas, presentes no PRP, que atraíram células fagocitárias mononucleadas para o local<sup>27</sup>. Esta afirmativa é suportada pela redução da inflamação observada aos 90 dias, pois neste período, o PRP não estava mais presente no local e, conseqüentemente, o estímulo quimiotático havia cessado. Além disso, os animais do controle positivo receberam PRP isoladamente e apresentaram o mesmo padrão de inflamação quando comparados com os animais dos grupos HD e HF, aos 45 dias. Também, a implantação de condrócitos xenógenos não incitou reação inflamatória e as falhas osteocondrais repararam com tecido semelhante à cartilagem hialina<sup>16</sup>. Considerou-se que a capacidade imunocompetente dos condrócitos residiu na ausência da vascularização do tecido e na presença da extensa matriz que impedem a ação de resposta mediada por células.

Os resultados da imunoistoquímica mostraram tecido semelhante à cartilagem hialina articular na lesão promovida nos animais dos grupos tratados. Este teste evidenciou a deposição de tecido cartilaginoso, com matriz rica em colágeno tipo II, que segundo Grigolo et al<sup>28</sup> representa a fase final do processo de reparação em lesões tratadas com implante de condrócitos cultivados.

As aderências da cápsula articular, encontradas nos animais do controle negativo, também foram observadas por Souza et al.<sup>8</sup> e estão relacionadas a projeção da cápsula articular por sobre a lesão, no intuito de recobrir a superfície e permitir que células mesenquimais invadam o tecido, promovendo reparação.

À semelhança do observado por Kajitani et al.<sup>25</sup>, as células mesenquimais diferenciaram-se em fibroblastos e formaram um tecido conjuntivo fibroso vascularizado que preencheu a falha osteocondral, nos animais do grupo controle negativo. Além da aderência capsular, foi observado que este tecido não integrou ao osso subcondral, e ambas

as situações determinaram um maior grau de dor devido ao estímulo de receptores neurológicos encontrados na cápsula articular fibrosada e no osso subcondral exposto<sup>4</sup>. De forma contrária, os animais dos grupos tratados não desenvolveram aderências e, apresentaram macro e microscopicamente, reparação com tecido semelhante à cartilagem hialina, sendo este de surgimento mais precoce nos animais que receberam a associação de condrócitos ao PRP. Ainda, o tecido cartilaginoso formado nestes animais apresentou-se integrado ao osso subcondral, o que pode significar melhor resultado biomecânico.

Em conclusão, nas condições deste experimento, condrócitos heterólogos crio-preservados são viáveis para implantação e reparação de lesões osteocondrais; a associação ao PRP permite a fixação das células na lesão e fornece fatores de crescimento que aceleram a reparação com tecido semelhante à cartilagem hialina articular e, clinicamente, o implante de condrócitos associados ao PRP reduziu a dor articular e a claudicação por inibir a aderência capsular às lesões, e por permitir a integração do tecido de reparação cartilaginoso ao osso subcondral.

## Referências

- 1- Grodzinsky AJ, Levenston ME, Jin M, Frank EH. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. *Annu Rev of Biomed Eng* 2000; 2:691-713.
- 2- Rezende UM, Hernandez AJ, Camanho GL Articular cartilage and osteoarthritis. *Acta Orthop Bras* 2000; 8: 100-104.
- 3- Lombello C, Reis Jr GM, Cohen M. Study on human chondrocyte culture viability for autologous transplantation in clinical application. *Einstein* 2003; 1:84-88.
- 4- Todhunter RJ, Johnston SA. Osteoarthritis. In: Slatter D. *Textbook of small animal surgery*, Third Edition. Philadelphia, Saunders 2003.
- 5- Trippel SB, Mankin HJ. Consolidação da cartilagem articular. In: Bojrab MJ. *Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais*. Segunda Edição. São Paulo, Manole 1996.
- 6- Fossum TW. *Diseases of the joints. Small animal surgery*, Second Edition. St. Louis, Mosby 2002.
- 7- Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis and Cart* 2006; 14:403-412.
- 8- Sousa TD, Del Carlo RJ, Vitoria MIV. Histologic evaluation of the repair process in the articular surface of rabbits. *Ciência Rural* 2000; 30:439-444.
- 9- Jones D, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg* 2006; 88-A:2501-2520.

- 10- Peterson L, Minas T, Brittberg M Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A:17-24.
- 11- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation: Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 2002; 30:2-12.
- 12- Baums MH, Heidrich G, Schultz W, Steckel H, Kahl E, Klinger H-M. Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus. *J Bone Joint Surg* 2006; 88-A:303-308.
- 13- Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A: 109-115.
- 14- Mierisch CM, Wilson HA, Turner MA, Milbrandt TA, Berthouex L, Hammarckjold M-L, et al. Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A:1757-1767.
- 15- Schenider L, Lejeune JP, Deby C, Deby-Dupont GP, Serthein D. Viability of equine articular chondrocytes in alginate beads exposed to different oxygen tensions. *Vet J*; 2004:167-173.
- 16- Susante JLC, Buma P, Schuman L, Homminga GN, Berg WB, Veth RPH. Resurfacing potential chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 1999; 20:1167-1175.
- 17 – Drengk A, Zapf A, Sturmer EK, Sturmer KM, Frosch KH. Influence of platelet –rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2008:1-10   
<http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Doi=151290>

- 18- Almqvist KF, Wang L, Broddlez C, Veyz EM, Verbruggen G. Biological freezing of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cart* 2001; 9:341-350.
- 19 - Stevenson S The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg* 1987; 69:573-582.
- 20 - Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2003; 21:573-583.
- 21- Freshney RI. *Culture of Animal Cells*, Fifth Edition. New Jersey, Wiley-Liss 2005.
- 22- French E, Vandewoude S, Granowsky J, Maul D. Assessment of pain in laboratory animals. *Contemp Topics* 2000; 39:85.
- 23- Ishaug-Rilley S, Okun LE, Prado G, Applegate MA, Ratcliffe A. Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer film. *Biomaterials* 1999; 20:2245-2256.
- 24- Tavakol K, Miller RG, Bazett-Jones DP, Hwang WS, McGann LE, Schachar NS. Ultrastructural changes of articular cartilage chondrocytes associated with freeze-thawing. *J Orthop Res* 1993; 11:1-9.
- 25- Kajitani K, Ochi M, Uchio Y, Adachi N, Kawasaki K, Katsube K, et al. Role of the periosteal flap in chondrocyte transplantation: an experimental study in rabbits. *Tissue Eng* 2004; 10:331-342.
- 26- Akeda K, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar E J-M A, Lenz ME, et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cart* 2006; 14:1272-1280.

- 27- Barbosa ALT, Del Carlo RJ, Gomes HC, Oliveira AC, Monteiro BS, Carlo BN. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural* 2008; 38:1335-1340.
- 28- Grigolo B, Roseti L, Franceschi L, Piacentini A, Cattini L, Manfredini M, et al. Molecular and imuno-histological characterization of human cartilage two years following autologous cell transplantation. *J Bone Joint Surg* 2005; 87-A:46-57.

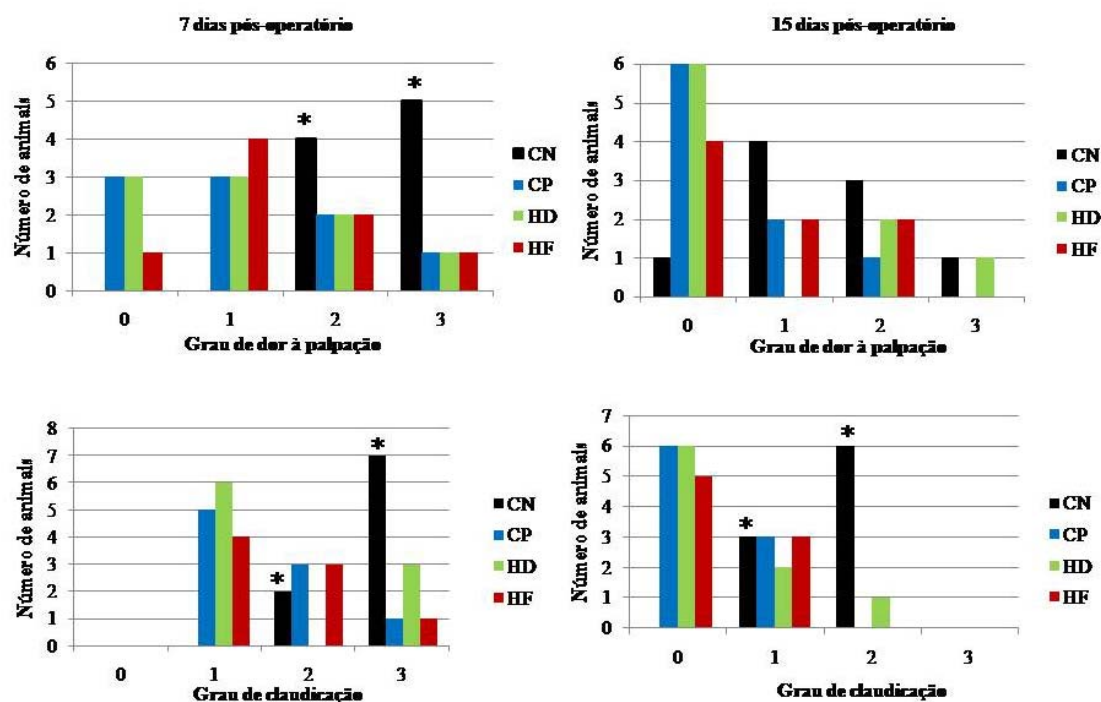


Figura 1. Número de animais em função dos diferentes graus de claudicação e dor à palpação articular após sete e 15 dias pós-operatório. \* Controle negativo apresentou maior intensidade de dor aos sete dias ( $p<0,05$ ) e maior grau de claudicação aos sete e 15 dias pós-operatório ( $p<0,001$ ) quando comparado com os grupos tratados. CN – controle negativo; CP – controle positivo; HD – heterólogo descongelado; HF – heterólogo fresco.

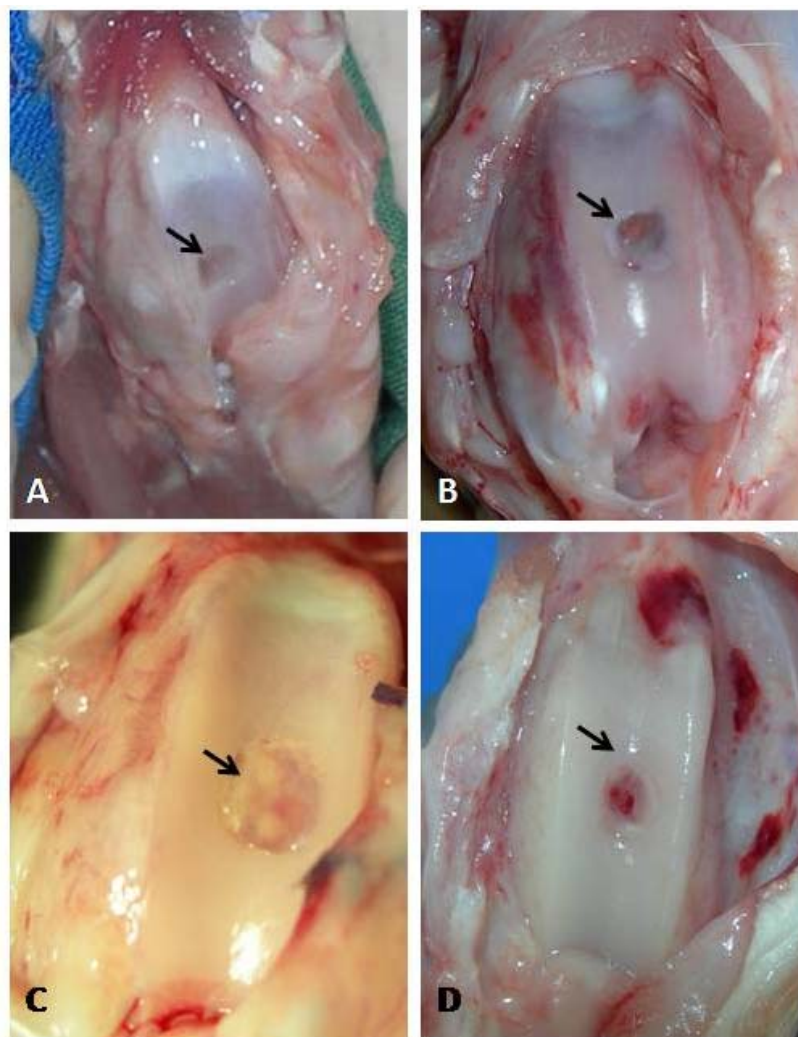


Figura 2. Aspecto macroscópico das falhas osteocondrais observadas no joelho de coelhos, aos 15 dias pós-operatório. (A) Coelho do grupo CN: ausência de tecido de preenchimento no interior da lesão (seta). (B) Coelho do grupo CP: início de preenchimento com material de aspecto hialino na borda da lesão (seta). (C) Grupo HD: presença de tecido de aspecto hialino tanto nas bordas quanto no centro da lesão (seta). (D) Coelho do grupo HF: preenchimento total nas bordas e parcial ao centro com tecido de aspecto hialino (seta).

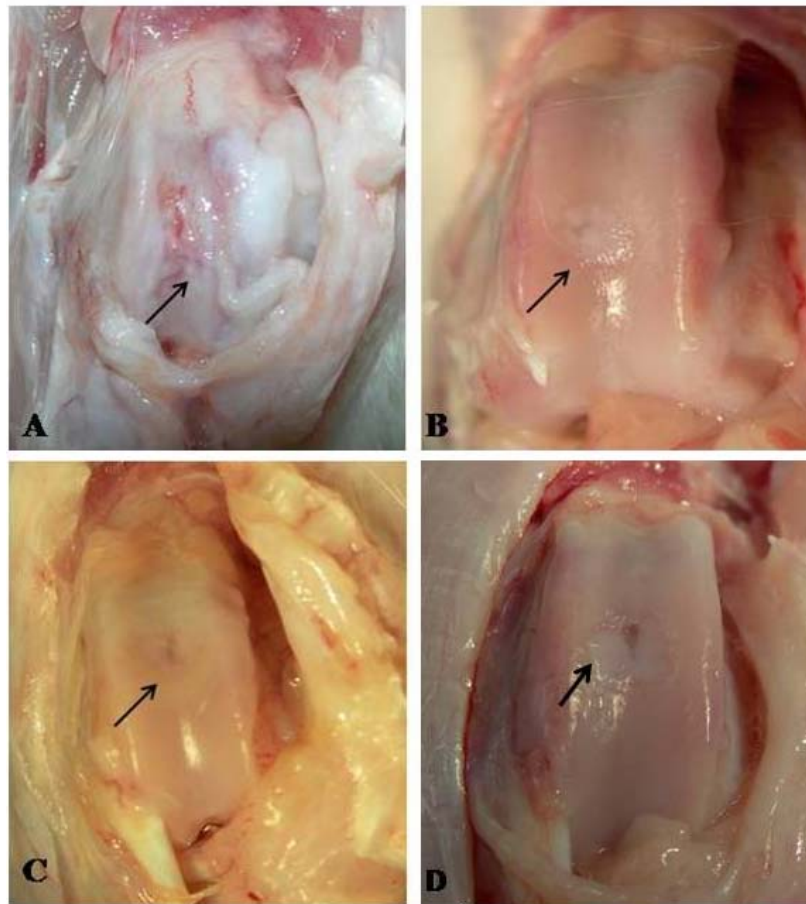


Figura 3. Aspecto macroscópico das falhas osteocondrais observadas no joelho de coelhos, aos 90 dias pós-operatório. (A) Coelho do grupo CN: preenchimento com tecido conjuntivo fibroso e aderência da cápsula articular (seta). (B e C) Lesão totalmente reparada com tecido de aspecto hialino nos coelhos dos grupos CP e HD, respectivamente (setas). (D) Coelho do grupo HF: preenchimento total das bordas e parcial ao centro com tecido de aspecto hialino (seta).

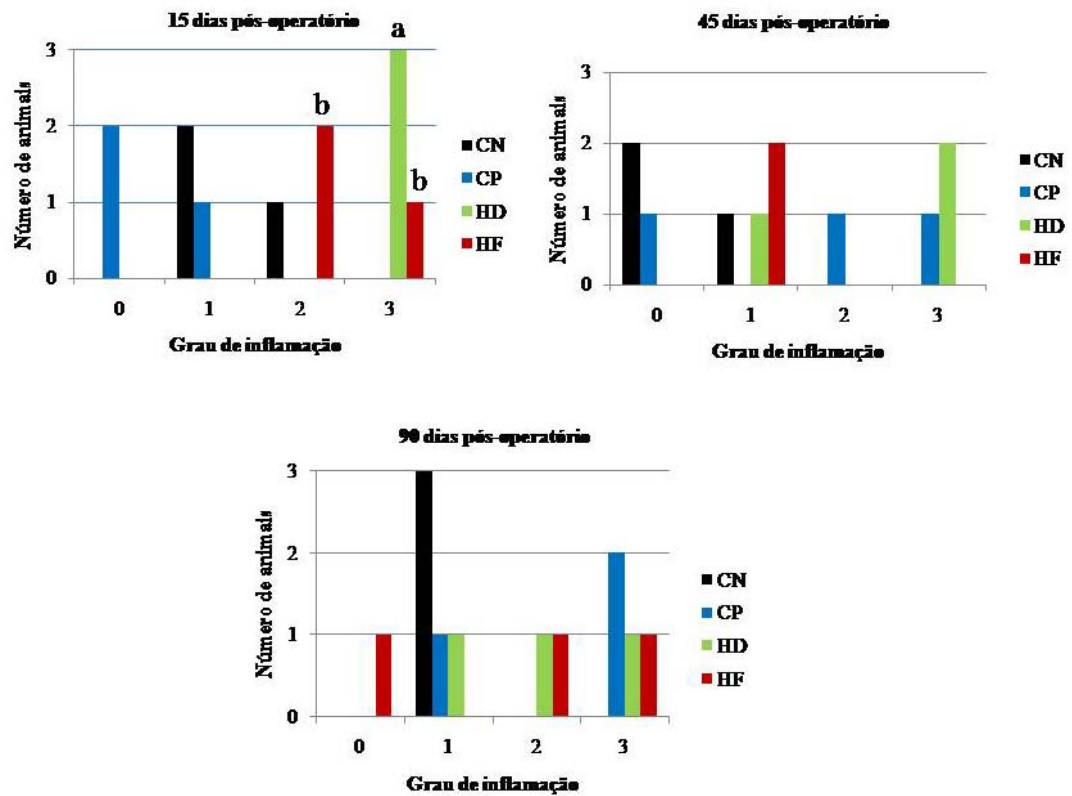


Figura 4. Número de animais em função da intensidade de infiltrado inflamatório encontrado na histopatologia aos 15, 45 e 90 dias pós-operatório. (a) Heterólogo descongelado (HD) e (b) Heterólogo fresco (HF) apresentaram, aos 15 dias, maior intensidade de infiltrado inflamatório ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os grupos controle negativo (CN) e controle positivo (CP).

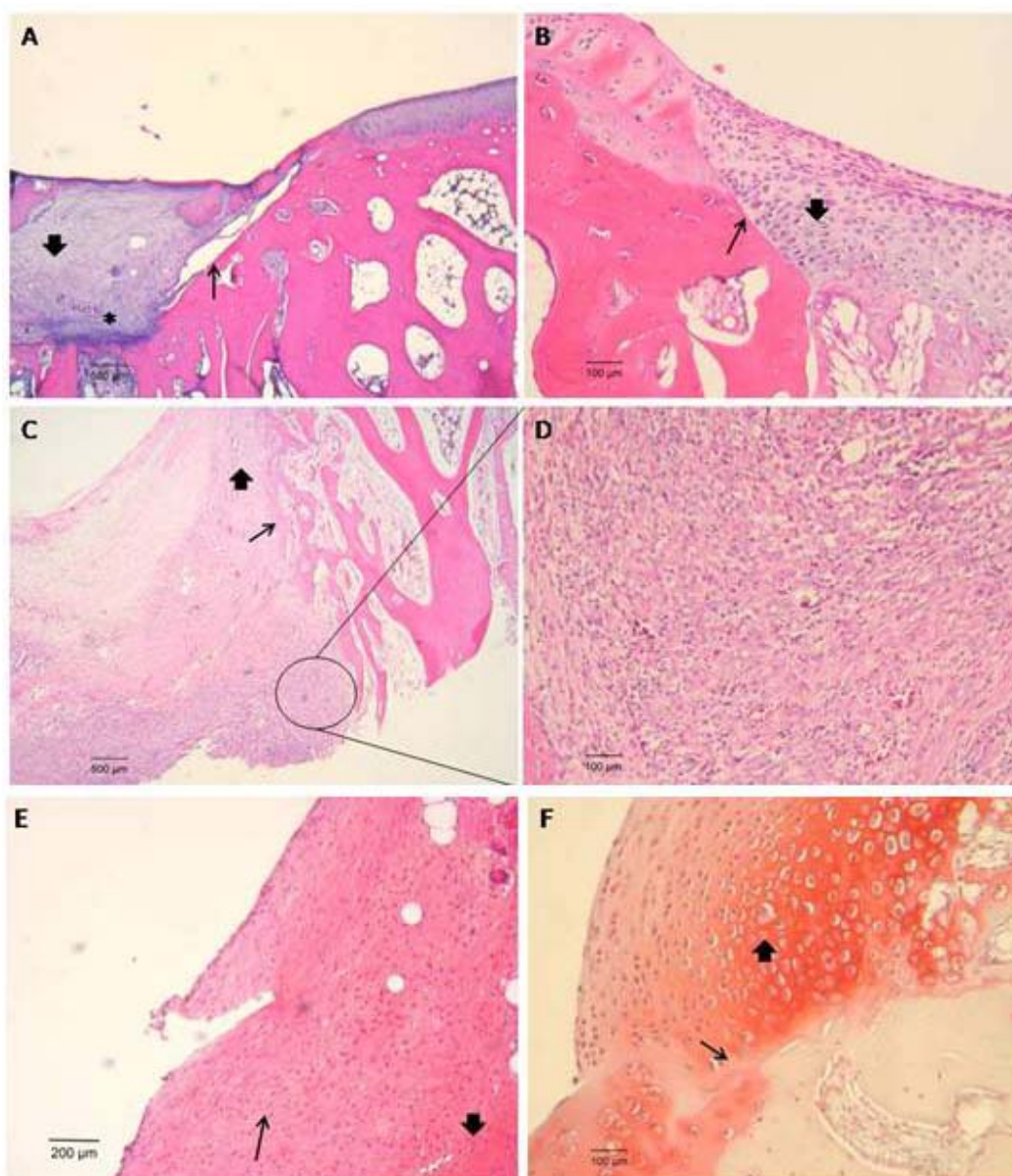


Figura 5. Histopatologia das lesões produzidas no joelho de coelhos, observada aos 15 dias pós-operatórios. (A) Grupo CN: descontinuidade entre o tecido de reparação do osso subcondral adjacente (seta), formação cartilaginosa na borda da lesão (asterisco) e tecido conjuntivo fibroso ao centro (cabeça de seta), H&E 25X. (B) Grupo CP: tecido cartilaginoso com condrócitos dispostos de forma colunar e contíguos ao osso subcondral (seta) com presença matriz basofílica característica de cartilagem hialina (cabeça de seta), H&E 50X. (C) Grupo HD: tecido de reparação apresentando íntimo contato ao osso subcondral (seta) e discreta formação cartilaginosa na borda da lesão (cabeça de seta), H&E 25X. (D) Coelho do grupo CP: infiltrado inflamatório polimorfonuclear localizado na região subcondral, H&E 100X. (E) Coelho do grupo CN: deposição de tecido conjuntivo fibroso vascularizado (seta) com pouca marcação de matriz cartilaginosa (cabeça de seta), Safranina O 50X. (F) Grupo CP: tecido de reparação com condrócitos organizados em colunas e presença de zona de calcificação formando linha de maré (seta) e matriz cartilaginosa abundante com forte marcação dos glicosaminoglicanos (cabeça de seta), Safranina O 100X.

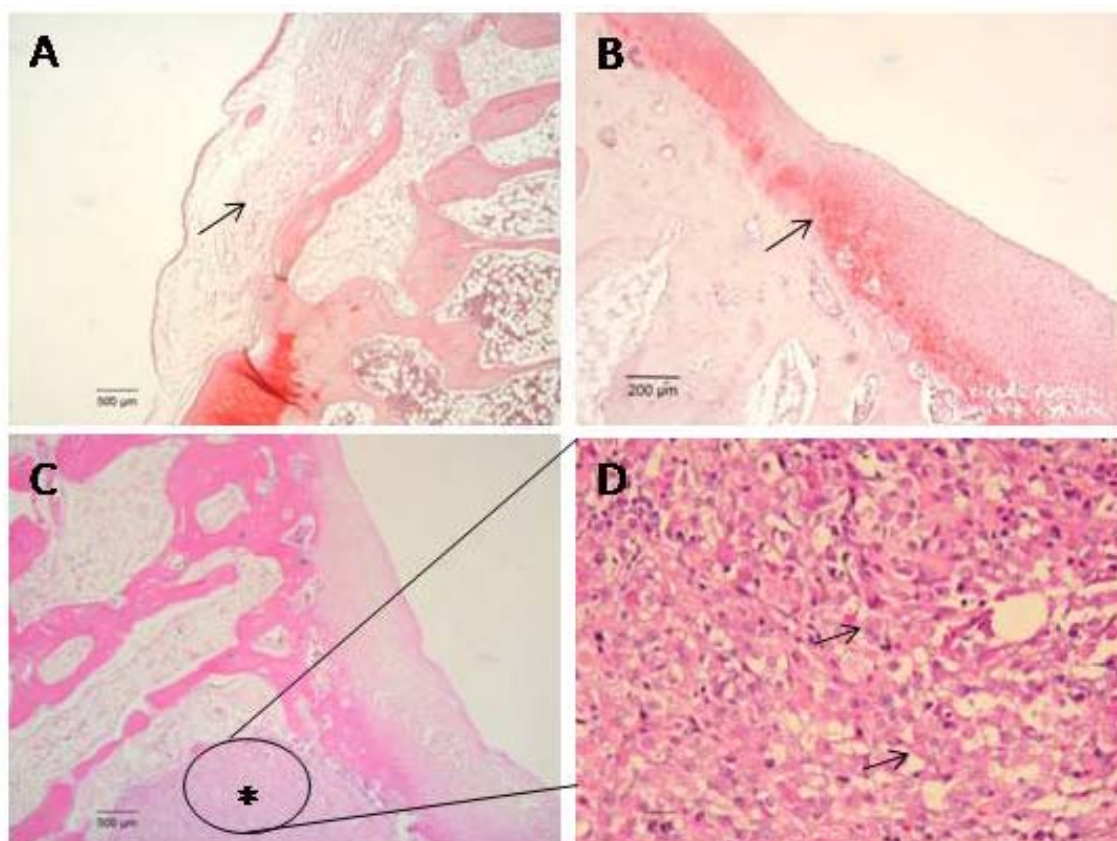


Figura 6. Histopatologia das lesões produzidas no joelho de coelhos, observada aos 45 dias pós-operatórios. (A) Grupo CN: deposição difusa de tecido conjuntivo fibroso vascularizado sem marcação pela safranina (seta), Safranina O 25X. (B) Grupo HD: deposição de tecido cartilagenoso com matriz marcada fortemente pela safranina (seta), Safranina O 50X. (C e D) Coelho do grupo HD: deposição subcondral de infiltrado inflamatório mononuclear (asterisco) composto principalmente de macrófagos (setas), H&E 25X e 400X.

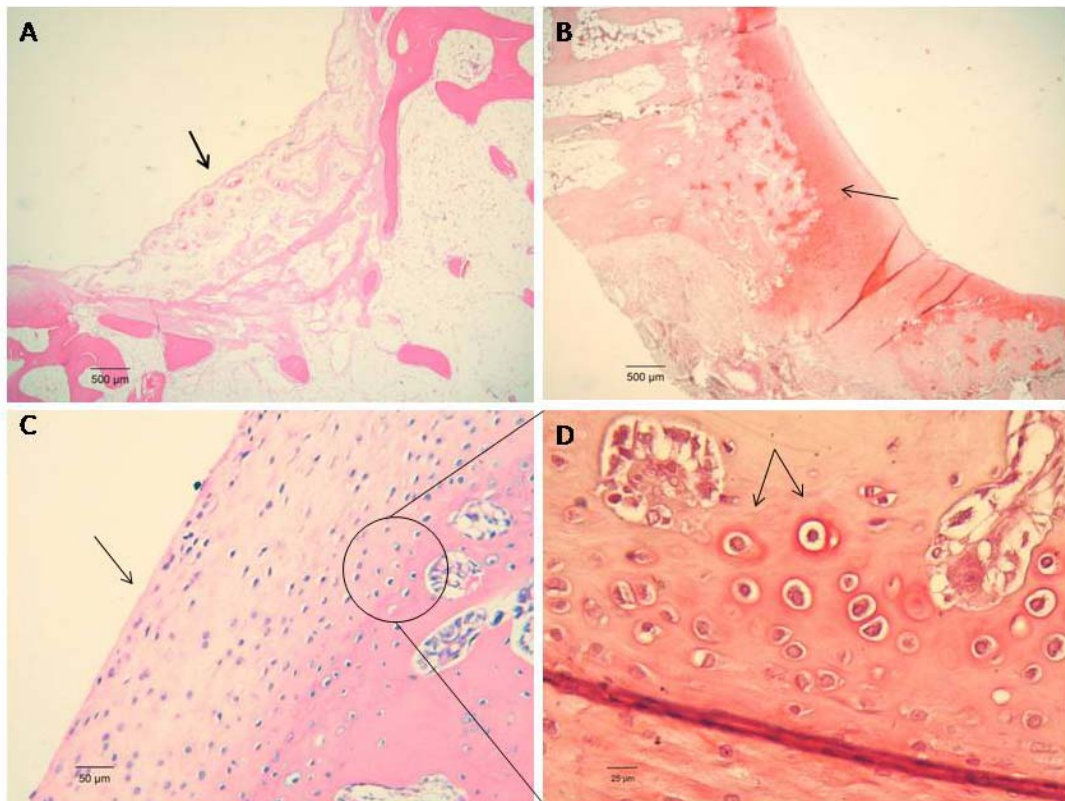


Figura 7. Histopatologia das lesões produzidas no joelho de coelhos, observada aos 90 dias pós-operatórios. (A) Grupo CN: deposição difusa de tecido conjuntivo fibroso vascularizado e sem continuidade com o osso subcondral (seta), H&E 25X. (B) Grupo CP: tecido cartilaginoso com matriz fortemente marcada pela safranina e sem formação de fenda entre o tecido formado e o osso subcondral (seta), Safranina O 25X. (C) Coelho do grupo HD: deposição uniforme de condrócitos arranjados em colunas (seta), H&E 200X. (D) Coelho do grupo HD: condrócitos organizados de forma colunar. Observar a formação de grupos isogênicos circundados por densa matriz marcada pela safranina (seta), Safranina O 400X.

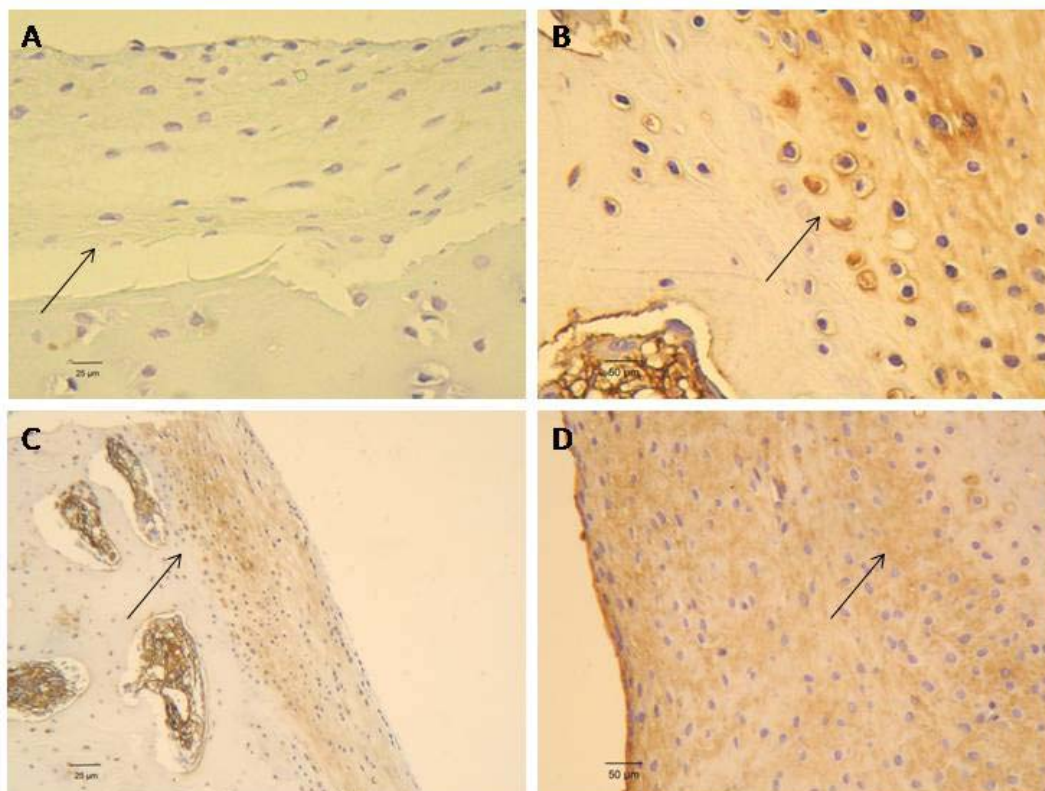


Figura 9. Avaliação imunohistoquímica, aos 90 dias pós-operatórios, por marcação da peroxidase ultra estreptavidina no tecido de reparação depositado nas falhas produzidas no joelho de coelhos. (A) Grupo CN: deposição difusa de tecido desprendido do osso subcondral e sem marcação do colágeno tipo II (seta) 400X. (B, C e D) Grupos CP (200X), HD (100X) e HF (200X): presença de cartilagem contígua ao osso subcondral e condrócitos envolvidos em matriz rica em colágeno tipo II (setas).

## **CONCLUSÕES GERAIS**

O presente estudo demonstrou que, sob as condições de congelamento utilizadas, o uso de condrócitos heterólogos crio-preservados é viável. Entretanto, outros estudos com uso de substratos que sustentem o fenótipo condrocítico e diferentes concentrações de DMSO deverão ser realizados para que se possa estabelecer um banco de condrócitos preservados por longo tempo.

A associação ao PRP permite a fixação das células na lesão e fornece fatores de crescimento que aceleram a reparação com tecido semelhante à cartilagem hialina articular e, clinicamente, o implante de condrócitos associados ao PRP reduz a dor articular e a claudicação por inibir a aderência capsular às lesões, e por permitir a integração do tecido de reparação cartilaginoso ao osso subcondral.

## REFERÊNCIAS

- 1- Mahadev A, Mahara DP, Chang P, Mitra AK, Tay BK, Sim CS. Autogenous osteochondral morselised grafts for full thickness osteochondral defects in the knee joints of pigs. *Sing Med J* 2001; 42:410-416.
- 2- Goring RL, Beale BS. Artropatias imunomediadas. In: Bojrab MJ. Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais. Segunda Edição. São Paulo, Manole 1996.
- 3- Fossum TW. Diseases of the joints. Small animal surgery, Second Edition. St. Louis, Mosby 2002.
- 4- Trippel SB, Mankin HJ. Consolidação da cartilagem articular. In: Bojrab MJ. Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais. Segunda Edição. São Paulo, Manole 1996.
- 5- Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis and Cart* 2006; 14:403-412.
- 6- Sousa TD, Del Carlo RJ, Vilorio MIV. Histologic evaluation of the repair process in the articular surface of rabbits. *Ciência Rural* 2000; 30:439-444.
- 7- Sousa TD, Del Carlo RJ, Vilorio MIV. Electrotherapy on the healing process in the articular surface of rabbits. *Ciência Rural* 2001; 31:819-824.
- 8- Denoncourt PM, Patel D, Dimakopoulos P. Treatment of osteochondrosis dissecans of the knee by arthroscopic curettage, follow up study. *Orthop Rev* 1986; 15:652-657.
- 9- Henrotin Y, Sanches C, Balligand M. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: present and future perspectives. *Vet J* 2005; 170:113-123.

- 10- Huntley JS, Bush PG, McBirnie JM, Simpson AH, Hall AC. Chondrocyte death associated with human femoral osteochondral harvest as performed for mosaicplasty. J Bone Joint Surg 2005; 87-A:351-360.
- 11- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation: Biomechanics and long-term durability. Am J Sports Med 2002; 30:2-12.
- 12- Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. J Bone Joint Surg 2003; 85-A: 109-115..
- 13- Baums MH, Heidrich G, Schultz W, Steckel H, Kahl E, Klinger H-M. Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus. J Bone Joint Surg 2006; 88-A:303-308
- 14- Jones D, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. J Bone Joint Surg 2006; 88-A:2501-2520.
- 15- Susante JLC, Buma P, Schuman L, Homminga GN, Berg WB, Veth RPH. Resurfacing potential chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. Biomaterials 1999; 20:1167-1175.
- 16- Peterson L, Minas T, Brittberg M Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation. J Bone Joint Surg 2003; 85-A:17-24.
- 17- Almqvist KF, Wang L, Brodtkorb C, Veyz EM, Verbruggen G. Biological freezing of human articular chondrocytes. Osteoarthritis Cart 2001; 9:341-350.

- 18- Stevenson S The immune response to osteochondral allografts in dogs. J Bone Joint Surg 1987; 69:573-582.
- 19- Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. J Orthop Res 2003; 21:573-583.
- 20- Schenider L, Lejeune JP, Deby C, Deby-Dupont GP, Serteyn D. Viability of equine articular chondrocytes in alginate beads exposed to different oxygen tensions. Vet J; 2004:167-173.
- 21- Drengk A, Zapf A, Sturmer EK, Sturmer KM, Frosch KH. Influence of platelet –rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. Cells Tissues Organs 2008:1-10   
<http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Doi=151290>