

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS NO TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR COLAGENASE NA ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL DE COELHOS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)

*AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF COLLAGENASE-INDUCED OSTEOARTHRITIS IN THE COXOFEMORAL JOINT OF RABBITS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)*

B. W. MINTO^{1*}, L. P. COELHO¹, M. NOBILE¹, P. F. MALARD², G. G. FRANCO¹, M. B. CASTRO³, E. M.M. LIMA³, L. G. G. G. DIAS¹

RESUMO

Na atualidade, a pesquisa envolvendo células-tronco mesenquimais destaca-se na busca de avanços na reparação da cartilagem articular. Objetivou-se, no presente estudo, comparar a regeneração cartilaginosa da articulação coxofemoral de coelhos, com e sem o transplante de células-tronco mesenquimais autólogas, por meio de exames radiográficos e histopatológicos. Dois grupos, com 15 animais da espécie leporina cada, foram submetidos à indução química de osteoartrite com solução de colagenase 2% na articulação coxofemoral direita. No Grupo 1 (Células-tronco) realizou-se a aplicação intra-articular de células-tronco mesenquimais autólogas. Já o Grupo 2 (Controle) foi constituído por animais submetidos à aplicação intra-articular de solução salina estéril. Foram realizadas avaliações radiográficas e histopatológicas aos 30, 60 e 90 dias após a aplicação. Os resultados histológicos indicam que células-tronco mesenquimais (Grupo 1) melhoraram discretamente a qualidade do tecido de reparo, de acordo com os critérios da escala semi-quantitativa ICRS 1 ("International Cartilage Repair Society"). O Grupo 1 (Células-Tronco) demonstrou superioridade em relação ao Grupo 2 nos parâmetros: Superfície articular, matriz extracelular e distribuição celular, demonstrando que as células-tronco foram benéficas no tratamento da osteoartrite.

PALAVRAS-CHAVE: Cartilagem Articular. Colagenase. Displasia Coxofemoral. Doença Articular Degenerativa.

SUMMARY

The aim of this study was to compare cartilage regeneration of the hip in rabbits, with and without the transplantation of autologous mesenchymal stem cells. Thirty rabbits were submitted to chemical induction of osteoarthritis with a 2% collagenase in the right hip. They were divided into 2 groups of 15 animals each: Group 1 (intra-articular application of autologous mesenchymal stem cells) and Group 2 (control - intra-articular application of sterile saline solution). Radiographic and histopathological evaluations were performed at 30, 60 and 90 days after application. The mesenchymal stem cells group (Group 1) showed slight improvement of the quality of the repair tissue, according to the semi-quantitative scale criteria ICRS 1 (International Cartilage Repair Society). The Group 1 (Stem Cells) showed superiority in relation to Group 2, especially in the parameters joint surface, extracellular matrix and cellular distribution, demonstrating that stem cells were beneficial in the treatment of osteoarthritis.

KEY-WORDS: Articular Cartilage. Collagenase. Hip Dysplasia. Degenerative Joint Disease

¹ UNESP- Universidade Estadual Paulista, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária- FCAV , Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane Castellane S/N - Vila Industrial, 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil

² Biocell Lab, Brasília – DF, Brasil.

³ UNB- Universidade de Brasília, DF, Brasil.

INTRODUÇÃO

A doença articular degenerativa representa importante causa de dor crônica e redução da qualidade de vida em pacientes humanos e veterinários (CUERVO et al., 2014; ANDERSSON; BERGSTRÖM, 2019). As abordagens terapêuticas descritas até o momento baseiam-se, prioritariamente, na prevenção ou retardo de alterações estruturais e funcionais da osteoartrose (OA) (CUERVO et al, 2014). Como alternativa para o manejo de pacientes com OA, a terapia celular mostra-se promissora (CUERVO et al, 2014; VILAR et al., 2016). Embora ainda haja incertezas sobre o uso clínico, diversos estudos já evidenciam, laboratorialmente, os benefícios do uso da terapia celular no tratamento da lesão cartilaginosa (VINATIERA; GUICHEUXA, 2016; COSENZA et al., 2017).

Neste contexto, o uso terapêutico de células-tronco mesenquimais (CTMs) é de especial interesse, uma vez que apresentam processamento menos complexo de coleta e isolamento, facilidade de cultivo e potencial de expansão “in vitro”, com grande capacidade de auto renovação e diferenciação (CHIANG et al., 2016; VINATIERA; GUICHEUXA, 2016). As CTMs apresentam fontes diversas, das quais destacam-se a medula óssea vermelha, músculos estriados esqueléticos e membranas fetais (FREITAG et al., 2016; HERMETO et al., 2016; RUIZ et al., 2016). O tecido adiposo complementa essa lista e vem sendo considerado uma das principais fontes (CUERVO et al., 2014). Além disso, possuem a plasticidade de células multipotentes, com capacidade já evidenciada de diferenciação em tecido ósseo, cartilaginosa, adiposo, muscular, epitelial, células de ilhotas pancreáticas, hepatócitos e neurônios (FREITAG et al., 2016, VINATIERA & GUICHEUXA, 2016).

As CTMs têm capacidade de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento, além de secretarem grande variedade de quimiocinas, permitindo assim, indução celular por mecanismo parácrino e diferenciação em linhagens celulares distintas (FREITAG et al., 2016, HARMAN et al., 2016, RUIZ et al., 2016). Devido à forte propensão para formar cartilagem, relativa facilidade de colheita de tecidos adultos, efeitos anti-inflamatórios e por apresentarem características imunomoduladoras e imunossupressoras, as CTMs têm sido foco de terapias celulares para a promoção a reparação da cartilagem em pacientes com OA (FREITAG et al., 2016, RUIZ et al., 2016).

O objetivo desta pesquisa foi investigar a regeneração da cartilagem articular induzida pelo transplante de células-tronco mesenquimais autólogas na articulação coxofemoral de coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (FCAV- UNESP/ Jaboticabal) sob Protocolo n° (7510/15).

Foram utilizados 30 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas, inteiras, da linhagem Nova Zelândia Branco, com 12 meses de idade e massa corpórea média

de 4,5 kg, provenientes do mesmo lote de cunicultura regulamentada. Todos os animais foram submetidos à indução de osteoartrite e aleatoriamente distribuídos em dois grupos de 15 coelhos: Grupo 1 - aplicação intra-articular de células-tronco mesenquimais autólogas na articulação coxofemoral direita; e Grupo 2 - aplicação intra-articular de solução salina (0,9%) na articulação coxofemoral direita. Em ambos os grupos, o tratamento de escolha foi realizado após sete semanas (49 dias) da indução de OA. O estudo foi dividido em 5 momentos: Momento 1 (Pré OA), Momento 2 (7 semanas após indução de OA), Momento 3 (30 dias após tratamento com CTMs), Momento 4 (60 dias após tratamento com CTMs) e Momento 5 (90 dias após tratamento com CTMs). Cinco animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia aos 30, 60 e 90 dias após as aplicações das substâncias. Avaliação radiográfica e histopatológica foram realizadas.

A indução de osteoartrite (OA) foi realizada por meio da aplicação intra-articular de solução de colagenase a 2% (*Clostridium histolyticum*, tipo II), preparada a partir da diluição de 2 mg de colagenase (*Clostridium histolyticum*, tipo II)⁴ em 1,0 mL de solução salina estéril. A solução foi filtrada em membrana de 0,22 mm (conforme metodologia adaptada de KIKUCHI et al. 1998). Em seguida, foi armazenada em criotubo estéril até a aplicação intra-articular.

As CTMs autólogas foram cultivadas a partir de coleta individual de tecido adiposo de todos os animais (FALCÃO et al., 2019). Foi realizada terapia antimicrobiana, aproximadamente 30 minutos antes dos procedimentos cirúrgicos (enrofloxacina⁵, 5 mg/kg / SC / dose única). O protocolo anestésico para todos os procedimentos realizados baseou-se na medicação pré-anestésica com midazolam⁶ (2 mg/kg / IM) associado à morfina⁷ (2 mg/kg / IM) e cetamina⁸ (25 mg/kg / IM), e indução e manutenção anestésica com isoflurano⁹ diluído em 100% de oxigênio sob ventilação espontânea, por meio de máscara facial completamente vedada, sem intubação endotraqueal.

Foi realizada tricotomia ampla de região dorsal, seguida de rigorosa antisepsia com digluconato de clorexidina a 2%¹⁰ e digluconato de clorexidina a 0,5%¹¹. Após incisão cutânea de aproximadamente dois

⁴ Colagenase *Clostridium histolyticum*, type II - Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, U.S.A.

⁵ Chemitril injetável 2,5%® - Chemitec Agroveterinária Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

⁶ Dormonid injetável® 5 mg/5ml. Laboratorial Roche. São Paulo, SP, Brasil.

⁷ Dimorf injetável® 1mg/ml. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

⁸ Cetamina injetável 10%®. Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brasil.

⁹ Isoforine® 100%. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA. Itapira, SP, Brasil.

¹⁰ RIOHEX® 2% - Solução degermante - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

¹¹ RIOHEX® 0,5% - Solução alcoólica - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

centímetros na linha média dorsal da região interescapular, foram coletados aproximadamente 20 gramas de tecido adiposo da bolsa adiposa interescapular. O tecido adiposo foi acondicionado em tubo de 50 mL por dois minutos, contendo meio de lavagem estéril. Em ato contínuo, o tecido adiposo foi retirado do primeiro tubo de lavagem e acondicionado no segundo tubo de lavagem por três minutos e, em seguida, armazenado no tubo contendo meio de transporte. O tubo foi identificado com o nome do animal e acondicionado em geladeira até o momento do envio do material. O material foi encaminhado devidamente refrigerado a temperatura de aproximadamente 2°C para o laboratório.

O processamento das CTMs de cada animal foi iniciado a partir da lavagem do tecido adiposo em solução tampão fosfato salina (PBS)¹² para retirada de debris celulares e excesso de sangue. Em seguida, foi fragmentado em partículas pequenas e colocado em contato com a solução de colagenase e hialuronidase para realização de digestão enzimática. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 15 minutos e o “*pellet*” celular foi ressuspensionado. Após repetir este procedimento por quatro vezes, foi realizado o método de exclusão “*trypan blue*”, finalizando a preparação do SVF (“*stromal vascular fraction*”).

Após a obtenção de células-tronco, as mesmas foram armazenadas em garrafas de cultivo contendo meio TCM 199¹³. As garrafas de cultivo foram acondicionadas em estufas de cultivo celular à temperatura de 39,5°C e 5% de CO₂.

Após aproximadamente sete dias de cultivo foi realizado o repique celular. Parte das células permaneceram na garrafa de cultivo e cerca de dois milhões de células foram acondicionadas em seringas de 1,0 mL¹⁴, as quais continham células-tronco envolvidas em meio TCM 199, e posteriormente, encaminhadas para aplicação. Uma parte das células que permaneceram no laboratório foram induzidas à diferenciação celular para tecido ósseo e a outra parte foi mantida em nitrogênio líquido. Aproximadamente 2 milhões de células-tronco obtidas de amostras de todos os animais foram fixadas em solução de formaldeído e encaminhadas para o Laboratório MOFA Global (Estados Unidos - EUA) para realização de caracterização celular. Foi realizada a caracterização das células por citometria de fluxo com quantificação por imagem e identificação de marcadores moleculares. Os testes de caracterização molecular das CTMs foram realizados conforme determinado pela Sociedade Internacional para Terapia Celular.

Foram incubadas 1 x10⁶ de células com anticorpos, sendo estes: CD29-RD1 de rato anti-humano, CD44-FITC de rato anti-equino, caprina anti-canina CD90 primária e IgM de rato conjugado anti-caprino AF594 (secundário). E ainda o marcador de superfície

negativo CD34-FITC anti-humano de rato. A manutenção da pluripotência das CTMs foi analisada pela presença de dois fatores de transcrição (marcadores intranucleares) SOX2 e OCT3/4. Os marcadores foram avaliados pelo método de imunofenotipagem por citômetro de fluxo de Imagem Amnis.

O método adotado para a indução de OA foi a abordagem crânio-lateral à articulação coxofemoral direita. Após indução anestésica e antissepsia, foi realizada aplicação intra-articular, com seringa de 1,0 mL e agulha 13x0,46, de 1,0 mL da solução de colagenase (*Clostridium histolyticum*, tipo II) de forma estéril. Quatro dias após a primeira aplicação de solução de colagenase 2%¹, foi realizada segunda aplicação (dia 4) à articulação coxofemoral direita de todos os 30 animais, seguindo o mesmo protocolo da primeira aplicação.

Sete semanas (49 dias) após a segunda aplicação intra-articular de solução indutora de osteoartrite foram realizadas avaliações radiográficas das articulações coxofemorais (ACF) direitas de todos os animais, com o intuito de avaliar o progresso da OA.

Em seguida, os animais foram submetidos à aplicação de CTMs autólogas (animais do Grupo 1 – CT) ou solução salina estéril¹⁵ (animais do Grupo 2 – GC) (Figura 1).

autólogas que estavam acondicionadas em 5 mL de meio de transporte foram submetidas à centrifugação a 1250 rpm durante cinco minutos até a formação de botão celular no fundo do tubo.

O sobrenadante foi descartado e o botão celular foi ressuspensionado em 1,0 mL de solução salina 0,9%¹³ estéril e acondicionado em seringa de 1,0 mL¹². Em seguida, realizou-se a aplicação intra-articular.

Exames radiográficos foram realizados antes dos procedimentos cirúrgicos, 49 dias após a indução de osteoartrite e aos 30, 60, e 90 dias após o tratamento. As radiografias¹⁶ foram obtidas com auxílio anestésico na projeção ventrodorsal (VD) das articulações coxofemorais (ACFs).

Foi realizada avaliação “duplo cego” de imagens radiográficas por três avaliadores experientes na área da ortopedia e imagiologia veterinária, realizando a média entre eles. Foram atribuídos escores radiográficos de acordo com a presença e o grau de osteoartrite, onde: o Grau 0 indicou articulação normal; Grau 1- evidência radiográfica de instabilidade (sem alterações degenerativas); Grau 2- alterações degenerativas discretas (osteófitos ocasionais); Grau 3- alterações degenerativas moderadas (esclerose subcondral, osteófitos); e Grau 4- alterações degenerativas graves (grandes osteófitos, esclerose subcondral grave, remodelação óssea) (adaptado de KELLGREN; LAWRENCE, 1957; BLACK et al, 2007).

¹² Tampão Fosfato (D-PBS) – Cultilab Materiais para Cultura de Células. Campinas, SP, Brasil.

¹³ Solução contendo fosfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio, glicose, antioxidantes e soro halógeno. Biocell – Brasília, DF, Brasil.

¹⁴ Seringa de insulina 1ml com agulha 13x0,45mm - Descarpack do Brasil. São Paulo, SP, Brasil.

¹⁵ Solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% - Eurofarma Brasil - Ribeirão Preto, SP, Brasil

¹⁶ Aparelho de radiografia marca Siemens, modelo tridoros 812E com capacidade para 800mA, equipado com grade antidifusora Polter-Bucky.

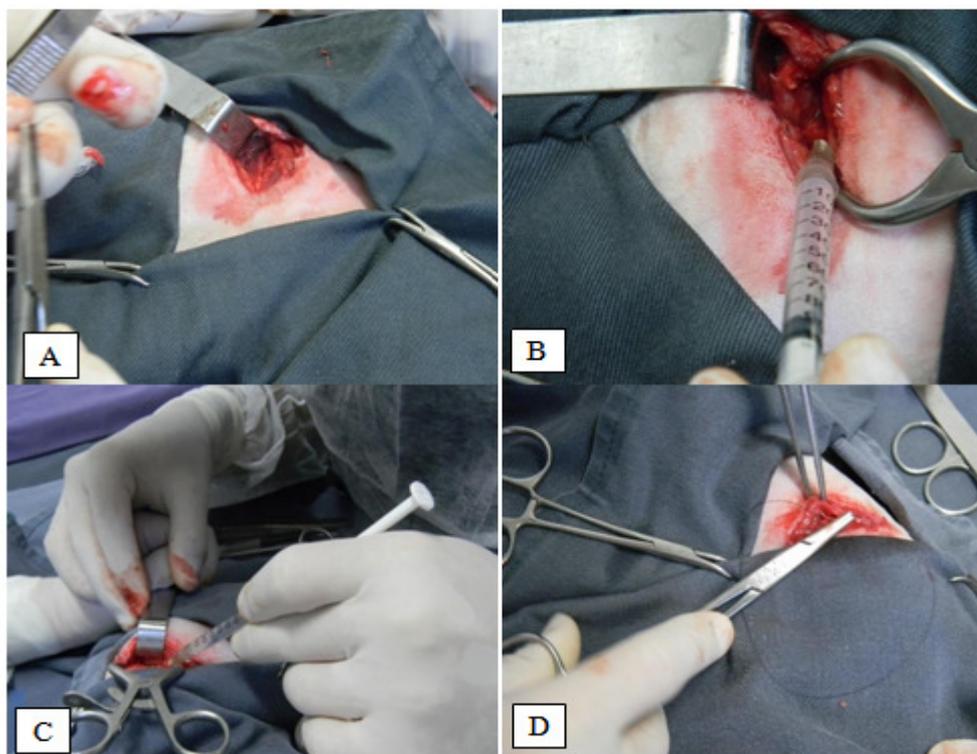


Figura 1 - Imagens fotográficas da abordagem à articulação coxofemoral (ACF) direita de coelhos para aplicação intra-articular de CTMs (CT) e solução salina estéril (GC). A: Acesso cirúrgico à ACF direita de coelho e exposição da cápsula articular. B: Exposição da cápsula articular com auxílio de afastadores cirúrgicos e posterior aplicação intra-articular de 1,0 mL de solução com tratamento de forma estéril. C: Aplicação de 1,0 mL de solução após abordagem à ACF direita de coelho. D: Aproximação da musculatura após acesso cirúrgico à ACF direita e aplicação intra-articular de tratamento; sutura no padrão simples contínuo com fio de poliglactina 910²⁰, 3-0.

A eutanásia dos animais foi realizada 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico de tratamento, através de sedação com cloridrato de xilazina¹⁷ (2,0 mg/kg) por via intramuscular e infusão intravenosa de propofol¹⁸ (10 mg/kg / IV) e cloreto de potássio¹⁹ (1 ml/kg / IV) (FLECKNELL et al., 1996).

As peças foram fixadas em formalina tamponada 10% durante 48 horas e posteriormente mantidas em álcool 70%. A cartilagem e o osso foram descalcificados por ácido nítrico concentrado 7% por 24 horas. Secções com espessura de 7 µm foram feitas ao longo do eixo longitudinal dos blocos, e secção no nível médio foi utilizada para a análise. As secções foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

Para os animais do Grupo 1, as células-tronco

As avaliações microscópicas foram quantificadas em escores de 0 a 3, de acordo com a pontuação da escala ICERS 1 (International Cartilage Repair Society). As características microscópicas avaliadas foram: superfície articular, matriz extracelular, distribuição celular, viabilidade celular, osso subcondral e cartilagem calcificada (Tabela 1). Os escores de cada parâmetro

foram somados após avaliação e pontuação (0 a 3), sendo 0 o valor mínimo (osteoartrite grave) e 18 o valor máximo (cartilagem articular normal). As variáveis (escore de avaliação radiográfica e escore de avaliação histopatológica) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

Na avaliação radiográfica, foi avaliada a média entre os grupos (dois níveis) e entre os grupos dentro dos tempos (cinco níveis). Na análise de dados histopatológicos foi avaliada a média entre os grupos (dois níveis) e entre os grupos dentro dos parâmetros (seis níveis). Para a análise foi utilizado o procedimento NPAR1WAY do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary. NC, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Osteoartrite foi observada e qualificada radiograficamente em todos os animais ao início da fase de tratamento dos grupos. Não houve diferenças estatísticas significativas quanto aos graus de AO na comparação entre os grupos 1 e 2 ($p > 0,05$).

Observou-se presença de osteoartrite aos 49 dias após a indução de OA do Grupo 2 e aos 30, 60 e 90 dias após tratamento de ambos os grupos. O Grupo 2 apresentou média maior do que o Grupo 1 nos momentos 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico (Tabela 2). Segundo a análise estatística da avaliação dos graus de OA a mediana foi 1, classificada como evidência discreta

¹⁷ Xilazin® Syntec do Brasil LTDA- Horlândia, SP, Brasil.

¹⁸ Propovan®. Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA. Itapira, SP, Brasil.

¹⁹ Solução de cloreto de potássio 19,1% - - Indústria Farmacêutica Equiplax, Goiânia, GO, Brasil.

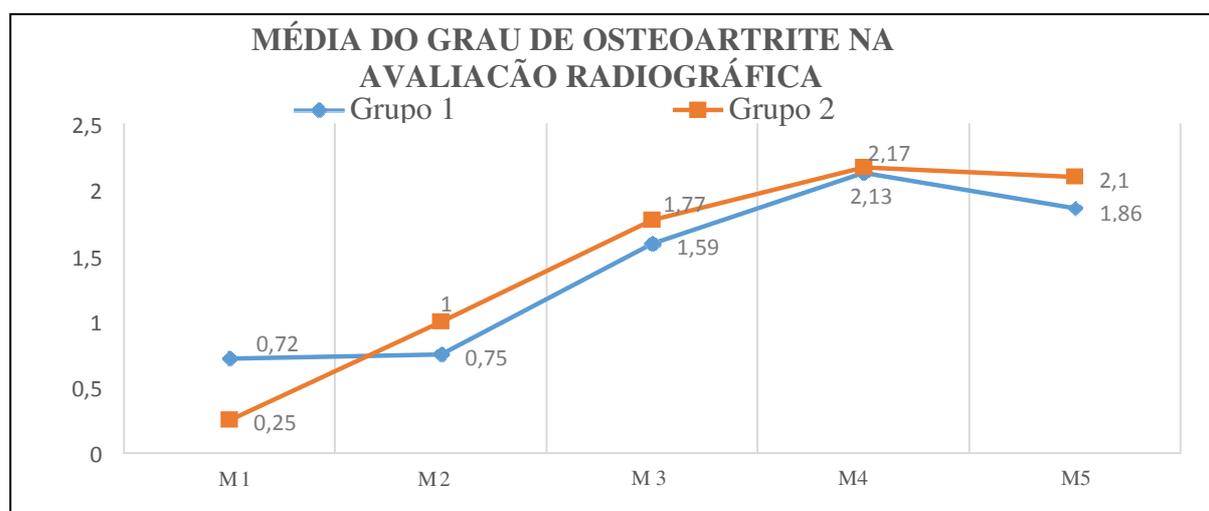
²⁰ Vicryl - Ethicon Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio. São Paulo, SP, Brasil.

Tabela 1 - Escala histológica da Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem - International Cartilage Repair Society (ICRS) (HOEMANN et al., 2011).

Grau	Parâmetro	Score
I (Superfície)	Contínua	3
	Descontínua	0
II (Matriz extracelular)	Hialina	3
	Mista	2
	Fibrocartilagem	1
	Tecido fibroso	0
III (Distribuição celular)	Colunar	3
	Mista	2
	Clusters	1
	Desorganizada	0
IV (Viabilidade celular)	Predominantemente viável	3
	Parcialmente viável	1
	< 10% viáveis	0
V (Osso subcondral)	Normal	3
	Remodelação	2
	Necrose/granulação	1
	Fratura/calos	0
VI (Cartilagem calcificada)	Normal	3
	Mal localizada	0

Tabela.2 - Análise radiográfica de variáveis do grau de osteoartrite entre os Grupos 1 (Células-Tronco – CT) e 2 (Controle – GC) nos tempos M1 (Pré OA), M2 (Pós OA), M3 (30 dias), M4 (60 dias) e M5 (90 dias).

Momento	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
1 (pré OA)	1	0,72 (± 0,99)	0	0	3
	2	0,25 (± 0,48)	0	0	2
2 (Pós OA)	1	0,75 (± 0,94)	0	0	3
	2	1,00 (± 1,14)	1	0	4
3 (30 dias de Tratamento)	1	1,59 (± 1,12)	2	0	4
	2	1,77 (± 1,24)	2	0	4
4 (60 dias de Tratamento)	1	2,13 (± 1,16)	2	0	4
	2	2,17 (± 1,31)	3	0	4
5 (90 dias de Tratamento)	1	1,86 (± 1,35)	2	0	4
	2	2,10 (± 1,29)	2	0	4



** As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Figura 2 - Gráfico demonstrando a evolução da média do score de avaliação radiográfica da osteoartrite (OA) ao longo dos momentos de avaliação dos Grupos 1 (Células-tronco) e 2 (Controle) do presente estudo. Momento 1 representa a avaliação radiográfica pré indução de OA. Momento 2, avaliação após sete semanas de indução de OA. Momentos 3, 4 e 5 avaliações radiográficas após respectivamente 30, 60 e 90 dias de tratamento.

A avaliação histopatológica foi realizada em um total de 30 coelhos, sendo 15 de cada grupo. Os subgrupos (cinco animais de cada grupo) diferenciaram-se quanto ao tempo avaliação após tratamento em 30, 60 e 90 dias. Foram atribuídos escores de 0 a 3 para cada parâmetro segundo a escala ICRS 1. Os escores de cada

parâmetro foram somados após avaliação e pontuação (0 a 3), sendo 0 o valor mínimo (osteoartrite grave) e 18 o valor máximo (cartilagem articular normal). A média da soma do escore de cada parâmetro da avaliação histopatológica do Grupo 1 foi superior à do Grupo 2 nos períodos de 30 dias, 60 dias e 90 dias (Figuras 3; 4; 5).

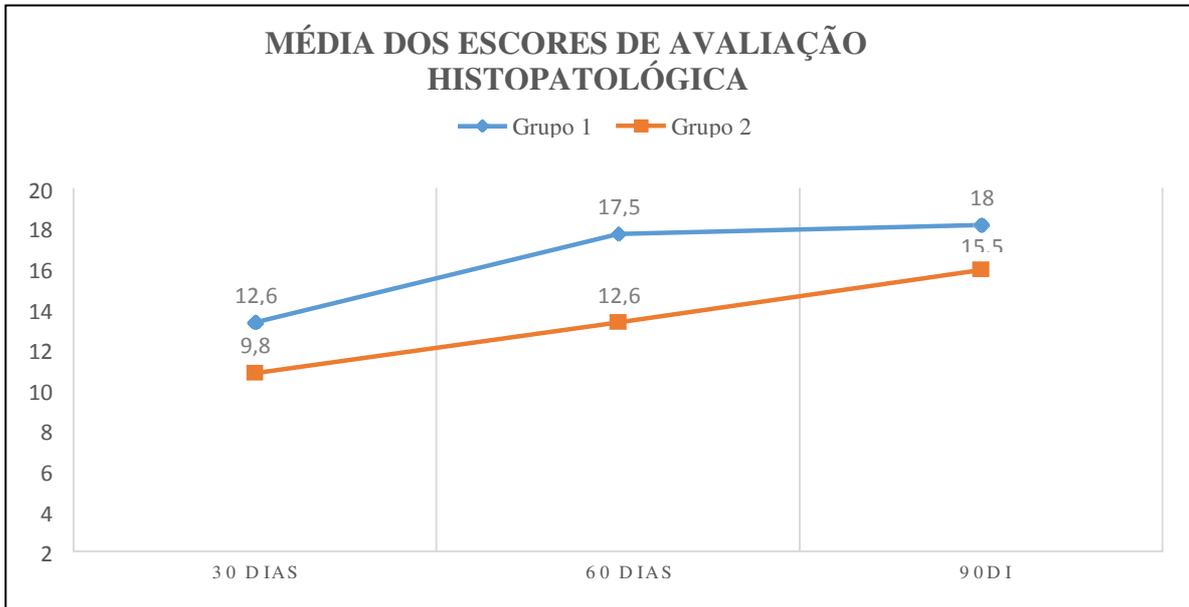


Figura 3 - Gráfico demonstrando a evolução da média do escore de avaliação histopatológica ao longo dos momentos de avaliação para os Grupos 1 (Células-Tronco) e 2 (Controle).

** As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

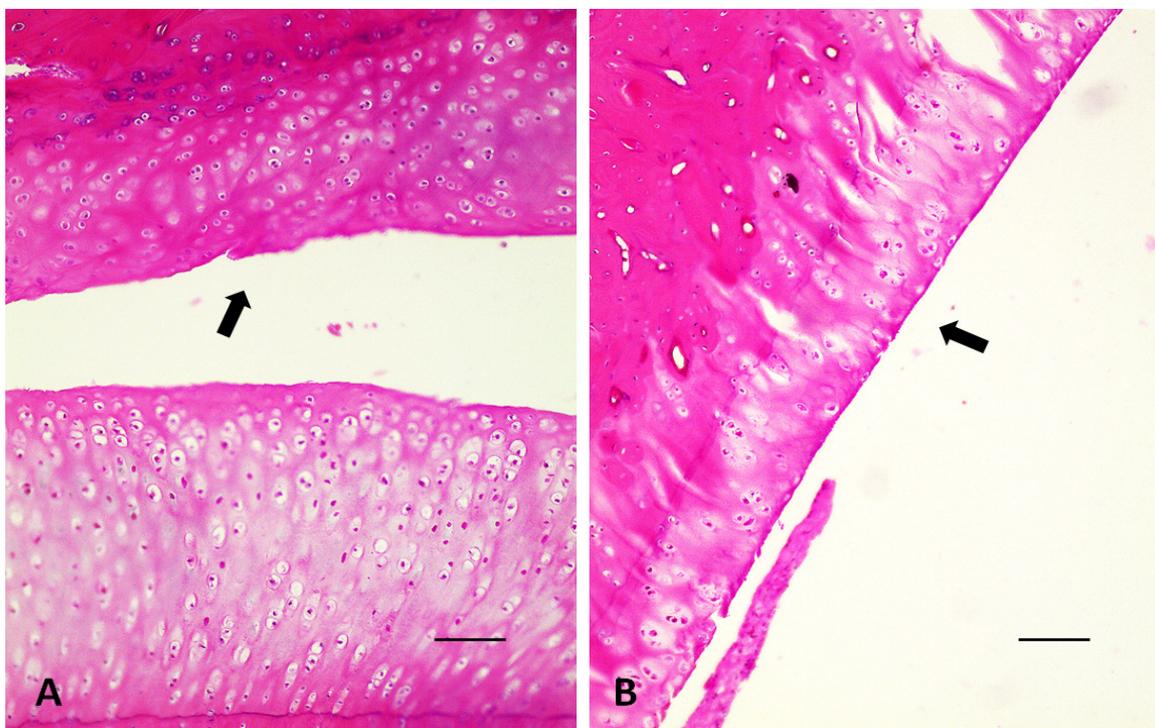


Figura 4 - Imagens microscópicas das lâminas coradas H&E. A- Coelho, articulação coxofemoral, Grupo 2 (Controle), 30 dias. Superfície articular do fêmur íntegra e cartilagem da articulação acetabular (seta) em processo de reparação e superfície discretamente irregular (H&E, barra 100µm). B- Coelho, superfície articular acetabular, Grupo 1 (Célula-tronco), 30 dias. Cartilagem articular com superfície contínua, em processo de reparação (seta) com condrócitos distribuídos em grupos (H&E, barra 100µm).

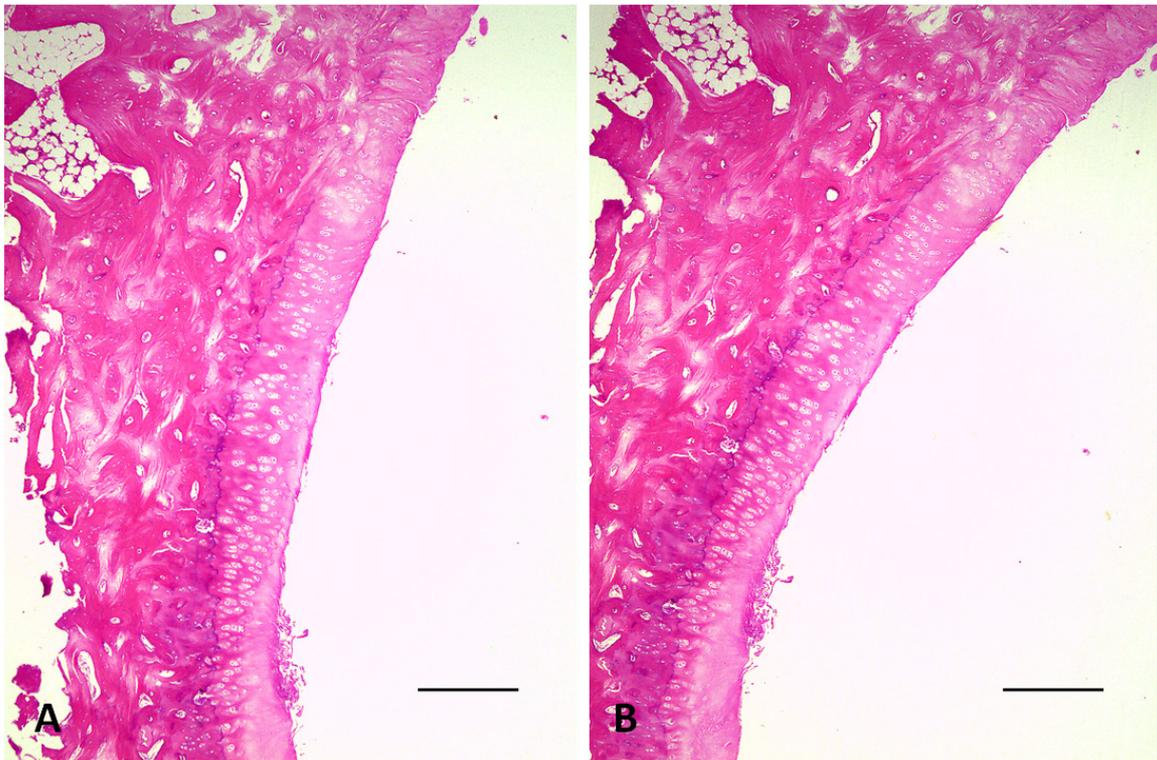


Figura 5 - Imagens microscópicas das lâminas coradas H&E. A- Coelho, superfície articular acetabular, Grupo 2 (Controle), 90 dias. Cartilagem articular e osso subcondral íntegros, totalmente restituídos (H&E, barra 400µm). B- Coelho, superfície articular acetabular, Grupo 1 (Células-tronco), 90 dias. Restituição total da cartilagem articular e integridade do osso subcondral (H&E, barra 400µm).

O tratamento da osteoartrite (OA) e dos defeitos condrais, representa um dos maiores desafios na prática ortopédica humana e veterinária. Estudos utilizando modelos animais têm mostrado resultados promissores a partir do uso de terapia celular com CTMs para o tratamento de lesões musculoesqueléticas (DESANDO et al., 2013). Estes et al. (2010) relataram que as CTMs derivadas do tecido adiposo apresentam maior potencial de diferenciação condrogênica. Além disso, segundo Ruetze e Richter (2014), os sinais de senescência ocorrem mais tardiamente em CTMs derivadas do tecido adiposo em comparação as originadas de medula óssea.

A lógica subjacente ao uso de CMTs refere-se ao tratamento anti-inflamatório e as propriedades imunomoduladoras dessas células, o que poderia facilitar a regeneração articular, conforme estudos realizados por Black (2007), Desando et al. (2013) e Vinatiera e Guicheuxa (2016). O presente estudo evidenciou bom resultado na análise histopatológica do Grupo das células-tronco em comparação ao Grupo Controle, ressaltando os possíveis efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores do uso de CTMs na regeneração articular. Para Frosina (2009), as células-tronco protegem seu genoma por meio do aumento da capacidade de reparação do DNA, e neste sentido, podem reduzir a taxa de proliferação e aumentar a atividade de proteínas envolvidas com o fenômeno da reparação natural. As CTMs também são de maior interesse na engenharia de tecidos, porque geralmente não expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II), responsável pela rejeição imunológica.

Tajima et al. (2014) reiteram que fatores de crescimento secretados por CTMs de origem de tecido adiposo podem induzir respostas parácrinas e autócrinas. Ruetze e Richter (2014), consideram que o efeito parácrino das CTMs pode ser o mecanismo mais relevante na mediação do reparo osteoarticular. Corroborando os achados precedentemente citados pelo presente estudo, pesquisas recentes realizadas por Horie et al. (2012) apontam a terapia com CTMs como ferramenta terapêutica válida no tratamento da OA. Os efeitos benéficos da utilização terapêutica de CTMs foram relatados em modelos experimentais conduzidos, dentre outros, por Lee et al. (2013), Desando et al. (2013) e Song et al. (2014) e, também agora, neste ensaio.

Os resultados deste ensaio sugerem que o uso das CTMs possa colaborar para uma melhora, mesmo que discreta, da qualidade do tecido de reparo, de acordo com os critérios da escala semi-quantitativa ICRS 1; resultado semelhante ao encontrado por Zorzi et al. em 2015.

Os animais do Grupo 1 apresentaram mais frequentemente tecido hialino em relação ao Grupo controle aos 90 dias, demonstrando superioridade principalmente nos parâmetros: Superfície articular, Matriz extracelular e Distribuição celular. As alterações degenerativas no osso subcondral e cartilagem calcificada foram semelhantes em ambos os grupos nos períodos de 60 e 90 dias após tratamento. Predomínio de células viáveis ocorreu nos dois grupos no período após 60 dias de tratamento. Em conjunto, estes achados suportam a ideia de que a implantação de CTMs autólogas de tecido adiposo possam ter colaborado em certo grau com a

melhoria da qualidade do tecido de reparo em comparação com o grupo controle, mas ainda estão longe da qualidade da cartilagem hialina normal. Diferentemente, Brittberg et al. (1996) demonstraram não apenas o reparo tecidual, mas a regeneração de cartilagem hialina originalmente presente na articulação. Noth et al. (2008) apontaram que injeções intra-articulares de CTMs são efetivas nos estágios iniciais da OA, quando as lesões estão localizadas na superfície da cartilagem, como relatado no presente estudo. Entretanto, não ocorreu grande diferença estatística entre os grupos, corroborando com o que se imagina sobre a dificuldade de regeneração do tecido condral, que permanece até os dias de hoje (ZORZI et al., 2015).

Condrócitos são células que necessitam de cultivo tri-dimensional, para a manutenção do seu fenótipo original, pois em monocamadas estas células se diferenciam, produzindo componentes da matriz como o colágeno tipo I característico da fibrocartilagem e não da cartilagem hialina (MURATA, et al. 2015). Este fato pode justificar a pequena quantidade de material hialino encontrada em ambos os grupos.

Dados da literatura suportam os resultados deste ensaio. As CTMs são capazes de se diferenciarem em fenótipo celular específico, dependendo do ambiente em que estão residentes. Segundo Djouad et al. (2007), a diferenciação das CTMs e condrocitos pode ser um fator importante da interação entre as CTMs e a matriz extracelular. Para Birmingham et al. (2007), o microambiente da OA pode influenciar a capacidade das CTMs em regenerar a cartilagem articular ou matriz do osso subcondral, que podem responder conforme os diferentes estímulos, devido a fatores de sinalização secretados pelos condrocitos ou osteoblastos residentes. Csaki et al. (2008) propõem que a diferenciação *in vivo* das CTMs seja iniciada pela interação de moléculas sinalizadoras emitidas por células locais e vizinhas, transduzidas via extra ou intracelular, por estímulo dos receptores de membrana das CTMs, citocinas e fatores de crescimento solúveis, proteínas da matriz extracelular como proteoglicanos e colágeno ou por interação direta com os condrocitos residentes. Todavia, os mecanismos de interações celulares no microambiente da osteoartrite, que influencia a diferenciação condrogênica e osteogênica das CTMs ainda não foram completamente elucidados. Além disso, os fatores que podem modular o fenótipo condrogênico das CTMs ainda não estão, compreensivamente, bem estabelecidos (LEYH et al., 2014).

CONCLUSÕES

O protocolo de coleta de tecido adiposo, isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais autólogas de coelhos, revelaram-se satisfatórios e propícios à obtenção de número viável de células. Foram observados efeitos benéficos do uso de células-tronco mesenquimais autólogas derivadas do tecido adiposo na regeneração da cartilagem articular do quadril de coelhos submetidos a osteoartrite experimental, comprovada pela análise histológica, mostrando-se factível para outras espécies animais, inclusive para dar suporte à medicina regenerativa em geral. Novos estudos ainda são

necessários para que se possa determinar o real benefício e consequente validação do seu uso no tratamento da osteoartrose.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON A., BERGSTRÖM A. Adaptation of the Canine Orthopaedic Index to evaluate chronic elbow osteoarthritis in Swedish dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 61(1): 29. 2019.
- BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G.L.; MCHUGH, P.E. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. **European Cells and Materials** (12): 13–27, 2012.
- BLACK, L.; GAYNOR, J.; GAHRING, D.; ADAM, C. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. **Veterinary Therapeutics** 8 (4): 272–84, 2007.
- BRITTBERG, M.; NILSSON, A.; LINDAH, L.A.; OHLSSON, C.; PETERSON, L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 326: 270–283, 1996.
- CHIANG, E.R.; MA, H.L.; WANG, J.P.; LIU, C.L.; CHEN, T.H.; HUNG, S.C. Allogeneic mesenchymal stem cells in combination with hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis in rabbits. **PLoS one** 11, e0149835, 2016.
- COSENZA, S.; RUIZ, M.; TOUPET, K.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. **Scientific reports** 7(1): 16214, 2017.
- CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology** 128(6): 507-520, 2007.
- CUERVO B., RUBIO, M., SOPENA, J., DOMINGUEZ, J.M., VILAR, J., MORALES, M., CUGAT, R. & CARRILLO, J. M. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. **International journal of molecular sciences**. 15 (8): 13437-13460.2014.
- DESANDO, G.; CAVALLO, C.; SARTONI, F.; MARTINI, L.; PARRILLI, A.; VERONESI, F.; FINI, M.; GIARDINO, R.; FACCHINI, A.; GRIGOLO, B. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. **Arthritis Research & Therapy** 15(1): 1-15, 2013.

- DJOUAD, F.; DELORME, B.; MAURICE, M.; BONY, C.; APPARAILLY, F.; LOUIS-PLENCE, P.; CANOVAS, F.; CHARBORD, P.; NOEL, D.; JORGENSEN, C. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. **Arthritis Research & Therapy** 9(2): 1-12, 2007.
- ESTES, B.T.; DIEKMAN, B.O.; GIMBLE, J.M.; GUILAK, F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. **Nature Protocols** 5(7): 1294-1311, 2010.
- FALCÃO, M.S.A.; BRUNEL, H.S.S.; PEIXER, M.A.S.; DALLAGO, B. S.; COSTA, F. F.; QUEIROZ, L. M.; CAMPBELL, P.; MALARD, P.F. Effect of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) on corneal wound healing in dogs. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 2019
- FLECKNELL P. A., LABER L. K. & SWINDLE M. M. Anaesthesia and analgesia for rodents and rabbits. In: **Handbook of Rodent and Rabbit Medicine**, Pergamon Press, Butterworth Heineman, Newton, MA. p. 219-37.1996.
- FREITAG, J.; BATES, D.; BOYD, R.; SHAH, K.; BARNARD, A.; HUGUENIN, L.; TENEN, A. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy—a review. **BMC musculoskeletal disorders** 17(1):230, 2016.
- FROSINA G. DNA repair in normal and cancer stem cells, with special reference to the central nervous system. **Current Medicinal Chemistry**.16(7): 854-866. 2009.
- HARMAN, R.; CARLSON, K.; GAYNOR, J.; GUSTAFSON, S.; DUPA, S.; CLEMENT, K.; HOELZLER, M.; MCCARTHY, T.; SCHWARTZ, P.; ADAMS, C. Prospective, Randomized, Masked, and Placebo-Controlled Efficacy Study of Intraarticular Allogeneic Adipose Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis in Dogs. **Frontier Veterinary Science** 3: 81, 2016.
- HERMETO, L.C.; DEROSI, R.; OLIVEIRA, R.J.; PESARINI, J.R.; ANTONIOLLI-SILVA, A.C.; JARDIM, P.H.; SANTANA, A.E.; DEFFUNE, E.; RINALDI, J.C.; JUSTULIN, L.A. Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. **Genetics and Molecular Research** 15, gmr. 15038569, 2016.
- HOEMANN, C.; KANDEL, R.; ROBERTS, S.; SARIS, B.F.; CREEMERS, L.; MAINIL-VARLET, P.; METHOT, S.; HOLLANDER, A.P. Buschmann MD (2011): International Cartilage Repair Society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. **Cartilage** 2(2):153-172, 2011.
- HORIE, M.; CHOI, H.; LEE, R.H.; REGER, R.L.; YLOSTALO, J.; MUNETA, T.; SEKIYA, I.; PROCKOP, D.J. Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. **Osteoarthritis Cartilage** 20 (10): 1197–1207, 2012.
- KELLGREN, J.H.; LAWRENCE, J.S. **Radiological Assessment of Osteoarthrosis**. **Annals of the Rheumatic Diseases** 16(4): 494-502, 1957.
- KIKUCHI, T.; SAKUTA, T.; YAMAGUCHI, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. **Osteoarthritis Cartilage** 6(3): 177-186, 1998.
- LEE, J.C.; MIN, H.J.; PARK, H.J.; LEE, S.; SEONG, S.C.; LEE, M.C. Synovial membrane derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery** 29(6): 1034–1046, 2013.
- LEYH, M.; SEITZ, A.; DURSELEN, L.; SCHAUMBURGER, J.; INACIO, A.; GRIFKA, J.; GRASSEL, J. Subchondral bone influences chondrogenic differentiation and collagen production of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and articular chondrocytes. **Arthritis Research & Therapy** 16(5): 453, 2014.
- MURATA, D.; TOKUNAGA, S.; TAMURA, T.; KAWAGUCHI, H.; MIYOSHI, N.; FUJIKI, M.; NAKAYAMA, K.; MISUMI, K. A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free three-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Surgery Research**, 10(1): 35, 2015.
- NÖTH, U., STEINERT, A. F., & TUAN, R. S. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. **Nature clinical practice Rheumatology**. 4(7), 371-380. 2008.
- RUETZE, M.; RICHTER, W. Adipose-derived stromal cells for osteoarticular repair: Trophic function versus stem cell activity. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 16, 2014.
- RUIZ, M.; COSENZA, S.; MAUMUS, M.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in osteoarthritis. **Expert opinion on biological therapy** 16(1): 33-42. 2016.
- SONG, F.; TANG, J.; GENG, R.; HU, H.; ZHU, C.; CUI, W.; FAN, W. Comparison of the efficacy of bone marrow mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep model. **International Journal Clinical Experimental Pathology** 7(4): 1415–1426, 2014.

TAJIMA, S.; TOBITA, H.; ORBAY, H.; HYAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. Direct and Indirect Effects of a Combination of Adipose-Derived Stem 586 Cells and Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration. **Tissue engineering**, 21(5-6): 895-905, 2014.

VILAR J. M.; CUERVO B.; RUBIO M.; SOPENA J.; DOMÍNGUEZ J. M.; SANTANA, A. & CARRILLO, J. M. Effect of intraarticular inoculation of mesenchymal stem cells in dogs with hip osteoarthritis by means of objective force platform gait analysis: concordance with numeric subjective scoring scales. **BMC veterinary research**. 12: (1). 223. 2016.

VINATIERA, C.; GUICHEUXA, J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. **Physical and Rehabilitation Medicine**, 59(3): 139–144, 2016.

ZORZI A.R., AMSTALDEN E.M.I., PLEPIS A.M.G., MARTINS V.C.A., FERRETTI M., ANTONIOLI E., DUARTE A.S.S., LUZO A.C.M. & MIRANDA J.B. Effect of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells on the Regeneration of Ovine Articular Cartilage. **International Journal Molecular Science**. 16(11): 26813–2683. 2015.