

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de veterinária**  
**Programa de pós-graduação em ciência animal**

Fredy Esteban Osorio Carmona

**CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS NA OSTEOARTROSE INDUZIDA  
EM COELHOS: AVALIAÇÕES ARTROSCÓPICA, MACROSCÓPICA,  
HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-  
TÍBIO-PATELAR.**

Belo Horizonte

2020

FREDY ESTEBAN OSORIO CARMONA

**CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS NA OSTEOARTROSE INDUZIDA  
EM COELHOS: AVALIAÇÕES ARTROSCÓPICA, MACROSCÓPICA,  
HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-  
TÍBIO-PATELAR.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em ciência animal.

Área de concentração: Ciência Animal

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

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Gilcinéa de Cássia Santana

**Co-orientador:** Prof. Dr. Felipe Pierezan

Belo Horizonte

2020

C287c Carmona, Fredy Esteban Osorio 1987 -  
Concentrado autólogo de plaquetas na Osteoartrose induzida em coelhos: Avaliações histológica, imuno-histoquímica e artroscópica da articulação Fêmoro-Tíbio-Patelar/ Fredy Esteban Osorio Carmona – 2020.

140 p:il.

Orientadora: Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coorientadores: Felipe Pierezan  
Gilcinea de Cassia Santana

Tese de Doutorado apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Coelho – Doenças - Teses - 2- Plaquetas – Teses - 3 – Ciência animal – Teses - I – Rezende, Cleuza Maria de Faria - II – Pierezan, Felipe – III – Santana, Gilcinea de Cassia – IV - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V- Título.

**CDD – 636.089**

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

FREDY ESTEBAN OSÓRIO CARMONA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 30 de junho de 2020, pela banca constituída pelos membros:

*Cleuza Maria de Faria Rezende*

Dr.(a). Cleuza Maria de Faria Rezende  
Presidente - Orientador(a)



Dr.(a). Jorge Uriel Carmona Ramirez

*Marlene Isabel Vargas Vitoria*

Dr.(a). Marlene Isabel Vargas Vitoria

*Armando de Mattos Carvalho*

Dr.(a). Armando de Mattos Carvalho

*Renata de Pino Albuquerque Maranhão*

Dr.(a). Renata de Pino Albuquerque Maranhão



**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Cleuza Maria de Faria Rezende,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto efeito do plasma rico em plaquetas na osteoartrose em coelhos: estudo experimental, submetido a esta comissão pelo protocolo 63 / 2014, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 07/04/2014.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/ceua/ceua/>

Belo Horizonte, 09/04/2014.

Atenciosamente,

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/ceua/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@pppq.ufmg.br](mailto:ceua@pppq.ufmg.br)

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, por me abençoar com o dom da vida e enche-la de tantas oportunidades e momentos bons;

Quero agradecer imensamente a minha família, meu pai Fredy, minha irmã Paula e a Luly, que é uma mãe em toda a extensão da palavra, pelo apoio contínuo, por sempre me incentivar e aconselhar para ser uma melhor pessoa. Por terem me dado valores para respeitar ao próximo, por terem me ensinado o verdadeiro significado da palavra amor. Nunca terei como agradecer tanto que fizeram por mim;

À minha mãe, que desde o céu, sei que sempre esteve comigo durante todas as minhas caminhadas;

À Ana Paula, que conheci como uma amiga, depois se converteu em minha namorada e hoje em dia é minha esposa, companheira, confidente alicerce e porto seguro. Obrigado a você e sua família por terem me acolhido mesmo sem me conhecer, por terem feito de sua família, minha família e por sempre estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida;

À professora Cleuza, por ter me orientado durante estes anos, por ter me ensinado a ser uma pessoa mais responsável, mais dedicado, mais resiliente, por ter me ensinado a ser um melhor veterinário e profissional. Obrigado pelos ensinamentos, pela paciência, pelo carinho e apoio. Obrigado por tanto professora;

Aos meus coorientadores, professora Natália de Melo Ocarino, professora Gilcinea da Cássia Santana e professor Felipe Pierezan, por terem me guiado nesta caminhada e me ajudado em todas as análises;

À CAPES pela bolsa de estudos durante todo o doutorado, graças a ela foi possível minha estadia no Brasil e o desenvolvimento desta pesquisa.

À Escola de Veterinária da UFMG, por ter sido minha segunda casa, por abrir suas portas para mim e tantos outros colegas. Por ser uma referência na veterinária no Brasil e no mundo e por ter me dado a oportunidade de aprimorar minhas capacidades;

A todos os membros do Hospital Veterinário da UFMG, por sempre terem me ajudado durante os experimentos e sempre estar dispostos a me ajudar em todo o que precisei;

Ao pessoal do laboratório de histopatologia e imuno-histoquímica pelos ensinamentos, companheirismo e ajuda durante as análises de laboratório;

Aos meus companheiros de turma Santiago, Diego, Barbara e Adriano, por terem me ajudado em todas as fases de este experimento e por compartilhar comigo tantos momentos de lazer;

A todas as pessoas que de uma ou outra forma fizeram parte destes 6 anos de Escola de Veterinária, cada um teve uma participação fundamental na minha formação pessoal e profissional.

Ao Brasil, país maravilhoso de gente linda e acolhedora. Gracias por convertirse en mi segunda casa aceptarme como otro hijo tuyo.

---

**SUMÁRIO**

---

<b>TÍTULO.....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>2. HIPÓTESE.....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>16</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I: ARTICULAÇÃO FÊMORO-TÍBIO-PATELAR: ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E ESTRUTURAIS E EFEITO DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP) NA OSTEOARTROSE (OA). (Revisão de literatura) .....</b>	<b>17</b>
Introdução.....	17
1.1. Cartilagem articular.....	18
1.2. Cápsula e membrana sinovial.....	20
1.3. Meniscos.....	22
1.4. Líquido sinovial.....	24
1.5. Tendões e ligamentos.....	26
1.6. Fatores anabólicos que atuam no metabolismo articular.....	28
1.6.1. Fatores de crescimento (FC) .....	28
1.6.2. Proteína morfogenética óssea.....	30
1.7. Fatores catabólicos envolvidos na OA.....	31
1.7.1. Etiopatogenia da OA.....	31
1.8. Fatores inflamatórios envolvidos na AO.....	33
1.8.1. Citocinas pró-inflamatórias.....	34
1.8.2. Óxido nítrico.....	34
1.9. Interações moleculares na OA.....	34
<b>2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP) E SEU EFEITO NA OSTEOARTROSE (OA) .....</b>	<b>36</b>
2.1. O que são o PRP e o CAP e como funcionam?.....	36
2.2. Fisiologia das plaquetas e sua importância no processo de cicatrização.....	37
2.3. PRP/CAP e fatores de crescimento.....	38
2.4. PRP/CAP e suas aplicações na área ortopédica e nos tecidos articulares em animais.....	40
3. Referências bibliográficas.....	43
<b>CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO ARTROSCÓPICA DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-TIBIO-PATELAR DE COELHOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA E TRATADOS OU NÃO COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS.....</b>	<b>54</b>
Resumo.....	54
Introdução.....	54
2.1. LITERATURA CONSULTADA.....	55
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.2.1. Obtenção das amostras de sangue e do CAP.....	56
2.2.2. Avaliação artroscópica e grupos experimentais.....	57
2.2.3. Classificação das alterações artroscópicas.....	58
2.3. Resultados.....	59
2.4. Discussão.....	68
2.5. Conclusão.....	69
2.6. Referências bibliográficas.....	70
<b>CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS DA ARTICULAÇÃO FEMORO-TÍBIO-PATELAR DE COELHOS COM OA INDUZIDA E TRATADOS COM CAP.....</b>	<b>71</b>
Resumo.....	71
Introdução.....	71
3.1. LITERATURA CONSULTADA.....	72
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
3.2.1. Processamento cápsula sinovial.....	74
3.2.2. Colorações.....	74
3.2.3. Processamento cartilagem articular.....	75
3.2.4. Avaliação macroscópica.....	75

3.2.5. Avaliação microscópica.....	75
3.2.5.1. Classificação microscópica das alterações da membrana sinovial.....	76
3.2.5.2. Classificação microscópica das alterações na cartilagem articular.....	76
3.3. Avaliação estatística.....	77
3.4. Resultados.....	78
3.4.1. Avaliação macroscópica.....	78
3.4.2. Avaliação microscópica.....	81
3.4.2.1. Avaliação microscópica da cápsula sinovial.....	81
3.4.2.2. Avaliação microscópica da cartilagem articular.....	89
3.5. Discussão.....	96
3.6. Conclusões.....	99
3.7. Referências bibliográficas.....	100
<b>CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA CÁPSULA SINOVIAL E DA</b>	
<b>CARTILAGEM ARTICULAR DE COELHOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA E</b>	
<b>TRATADOS OU NÃO COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS.....</b>	<b>103</b>
Resumo.....	103
Introdução.....	103
4.1. LITERATURA CONSULTADA.....	104
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	106
4.2.1. Processamento das amostras e análise imuno-histoquímica.....	107
4.3. Análises estatística.....	109
4.4. Resultados.....	109
4.4.1. Avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial.....	113
4.4.2. Avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular.....	118
4.5. Discussão.....	122
4.6. Conclusões.....	125
4.7. Referências bibliográficas.....	136
<b>CAPÍTULO 5: QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO PDGF E DO TGF-</b>	
<b>β1 EM COELHOS COM OA INDUZIDA E TRATADOS OU NÃO COM CONCENTRADO</b>	
<b>AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP).....</b>	<b>128</b>
Resumo.....	128
Introdução.....	128
5.1. LITERATURA CONSULTADA.....	129
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	130
5.2.1. Coleta e armazenamento das amostras de plasma.....	131
5.2.2. Amostras de plasma para determinação do PDGF.....	131
5.2.3. Amostras de plasma para determinação do TGF-β1.....	131
5.2.4. Quantificação dos fatores de crescimento TGF-β1 e PDGF.....	131
5.3. Resultados.....	132
5.4. Discussão.....	133
5.5. Conclusão.....	135
5.6. Referências bibliográficas.....	136
CONCLUSÕES GERAIS.....	138
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	140

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

**CAPÍTULO I: ARTICULAÇÃO FÊMORO-TÍBIO-PATELAR: ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E ESTRUTURAIS E EFEITO DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP) NA OSTEOARTROSE (OA). (Revisão de literatura) .....**

Figura 1. Fisiologia da articulação fêmoro-tíbio-patelar.....	17
Figura 2. Cartilagem articular, organização histológica.....	19
Figura 3. Cápsula sinovial, organização histológica.....	21
Figura 4. Meniscos na articulação fêmoro-tíbio-patelar em sua posição anatômica.....	23
Figura 5. Tendões e ligamentos da articulação fêmoro-tíbio-patelar.....	27
Figura 6. Mudanças fisiológicas e estruturais durante a OA.....	36
Figura 7. Protocolo de obtenção do Concentrado Autólogo de Plaquetas.....	37

**CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO ARTROSCÓPICA DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-TÍBIO-PATELAR DE COELHOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA E TRATADOS COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS**

Figura 8. Fluxograma mostrando as diferentes etapas do experimento.....	56
Figura 9. Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos no M1 (antes da ruptura) .....	60
Figura 10. Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos de ambos os grupos 21 dias após a ruptura do LCCr; M2.....	61
Figura 11. Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e CAP 15 dias após a reconstituição do LCCr; M3.....	63
Figura 12. Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e CAP 30 dias após a reconstituição do LCCr e 15 dias após a segunda aplicação de CAP; M4 .....	65
Figura 13. Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e CAP 60 dias após a reconstituição do LCCr e 30 dias da terceira e última injeção de CAP M5.....	67

**CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-TÍBIO-PATELAR DE COELHOS COM OA INDUZIDA E TRATADOS COM CAP.**

Figura 14. Fotografia da articulação FTP do MPE de coelhos. Articulação saudável.....	79
Figura 15. Avaliação macroscópica das articulações fêmoro-tíbio-patelar dos coelhos de ambos os grupos nos diferentes momentos avaliados.....	80
Figura 16. Microfotografia mostrando a aparência da cápsula sinovial de coelhos saudáveis....	82
Figura 17. Microfotografia da avaliação microscópica da cápsula sinovial, corada com hematoxilina e eosina, de coelhos de ambos os grupos no momento 3 (M3) .....	84
Figura 18. Microfotografia da avaliação microscópica da cápsula sinovial, corada com hematoxilina e eosina, de coelhos de ambos os grupos no momento 4 (M4) .....	86
Figura 19. Avaliação microscópica da cápsula sinovial, corada com hematoxilina e eosina, de coelhos de ambos os grupos no momento 5 (M5) .....	88
Figura 20. Microfotografia da cartilagem articular de coelhos saudáveis corada com hematoxilina e eosina.....	90
Figura 21. Microfotografia da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos corada com hematoxilina e eosina no momento 3 (M3) .....	92
Figura 22. Microfotografia da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos corada com hematoxilina e eosina no momento 4 (M4) .....	94
Figura 23. Microfotografia da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos corada com hematoxilina e eosina no momento 5 (M5) .....	96

**CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA CÁPSULA SINOVIAL E DA CARTILAGEM ARTICULAR DE COELHOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA E TRATADOS COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS**

Figura 24. Microfotografia da cápsula sinovial de coelhos com articulações saudáveis e sem alterações.....	112
Figura 25. Microfotografia da cartilagem articular de coelhos com articulações saudáveis e sem alterações.....	113
Figura 26. Microfotografias da avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial de coelhos de ambos os grupos no momento 3 (M3) .....	114

Figura 27. Microfotografia da avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial de coelhos de ambos os grupos no momento 4 (M4) .....	<b>115</b>
Figura 28. Microfotografia da avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial de coelhos de ambos os grupos no momento 5 (M5) .....	<b>116</b>
Figura 29. Microfotografia da avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos no momento 3 (M3) .....	<b>119</b>
Figura 30. Microfotografia da avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos durante o momento 4 (M4) .....	<b>120</b>
Figura 31. Microfotografia da avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos durante o momento 5 (M5) .....	<b>121</b>
<hr/>	
<b>CAPÍTULO 5: QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMATICOS DO PDGF E DO TGF-<math>\beta</math>1 EM COELHOS COM OA INDUZIDA E TRATADOS COM CAP</b>	
Figura 32. Concentrações plasmáticas do TGF- $\beta$ 1 nos momentos avaliados.....	<b>132</b>
Figura 33. Concentrações plasmáticas do PDGF nos momentos avaliados.....	<b>133</b>

---

---

**LISTA DE TABELAS**

---

**CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO ARTROSCÓPICA DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-TIBIO-PATELAR DE COELHOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA E TRATADOS COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS**

---

Tabela 1. Descrição das alterações artroscópicas observadas na membrana sinovial e na cartilagem da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e do grupo CAP nos momentos M1, M2, M3, M4 e M5.....	<b>58</b>
Tabela 2. Valores da média e do desvio padrão das variáveis hematológicas no sangue total e no CAP de coelhos do grupo CAP no M2, M3 e M4.....	<b>59</b>
Tabela 3. Avaliação artroscópica da membrana sinovial da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e do grupo CAP durante os momentos avaliados.....	<b>59</b>
Tabela 4. Avaliação artroscópica da cartilagem articular da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e do grupo CAP durante os momentos avaliados.....	<b>62</b>

---

**CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-TIBIO-PATELAR DE COELHOS COM OA INDUZIDA E TRATADOS COM CAP**

---

Tabela 5. Sistema de avaliação das alterações macroscópicas da cartilagem articular FTP de coelhos com OA induzida e tratados ou não com CAP.....	<b>75</b>
Tabela 6. Avaliação e classificação histopatológica das alterações da membrana sinovial da articulação FTP de coelhos com OA induzida e tratados ou não com CAP.....	<b>76</b>
Tabela 7. Avaliação e classificação histopatológica das alterações na cartilagem articular da articulação FTP de coelhos com OA induzida e tratados com CAP.....	<b>77</b>
Tabela 8. Avaliação macroscópica da cartilagem articular do fêmur e da tíbia de coelhos com OA induzida e tratados ou não com CAP.....	<b>78</b>
Tabela 9. Resultados da avaliação microscópica da cápsula sinovial com hematoxilina e eosina em coelhos de ambos os grupos nos momentos avaliados.....	<b>81</b>
Tabela 10. Resultados da avaliação microscópica da cartilagem articular corada com hematoxilina e eosina de coelhos de ambos os grupos nos diferentes momentos avaliados.....	<b>89</b>

---

**CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA CÁPSULA SINOVIAl E DA CARTILAGEM ARTICULAR DE COELHOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA E TRATADOS COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS**

---

Tabela 11. Parâmetros considerados para a avaliação imuno-histoquímica dos tecidos da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos de ambos os grupos tratados com CAP.....	<b>108</b>
Tabela 12. Resultados da avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial e cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos nos diferentes momentos avaliados.....	<b>110</b>

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

CAP-	Concentrado autólogo de plaquetas
OA-	Osteoartrose
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador $\beta$ 1
PDGF-	Fator de crescimento derivado das plaquetas
LCCr-	Ligamento cruzado cranial
M1-	Momento 1
M2-	Momento 2
M3-	Momento 3
M4-	Momento 4
M5-	Momento 5
EDTA-	Ácido etileno diamino tetra acético
MEC-	Matriz extra celular
IL-1 $\beta$ -	Interleucina 1 $\beta$
TNF $\alpha$ -	Fator de necrose tumoral $\alpha$
BMP-2-	Proteína morfogenética 2
PRP-	Plasma rico em plaquetas
GAG	Glicosaminoglicanos
IGF-	Fator de crescimento insulínico
MMP-	Metaloproteinases
FC-	Fatores de crescimento
CDMP-	Proteínas morfogenéticas derivadas da cartilagem
CTGF-	Fator de crescimento do tecido conectivo
HGF-	Fator de crescimento dos hepatócitos
FGF-	Fator de crescimento fibroblástico
TIMP-	Inibidor tecidual das metaloproteinases
VEGF-	Fator de crescimento do endotélio vascular
EGF-	Fator de crescimento epidérmico
FTP	Articulação fêmoro-tíbio-patelar

---

# **CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS NA OSTEOARTROSE INDUZIDA EM COELHOS: AVALIAÇÕES ARTROSCÓPICA, MACROSCÓPICA, HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-TÍBIO-PATELAR.**

## **RESUMO**

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do concentrado autólogo de plaquetas (CAP) na osteoartrose (OA) induzida experimentalmente em coelhos, através da avaliação histológica, imuno-histoquímica e artroscópica, e simultaneamente, determinar as concentrações plasmáticas do fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) e do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Foram utilizados 30 coelhos machos, adultos jovens, saudáveis, da raça Nova Zelândia, com massa corporal média de 3,0kg, submetidos à ruptura do ligamento cruzado cranial (LCCr) (M1) por vídeo artroscopia para a indução da OA. Aos 21 dias depois da ruptura, os coelhos foram submetidos à reconstrução do ligamento (M2) por vídeo artroscopia e foram divididos em dois grupos de acordo com o tratamento: O grupo controle, que recebeu 0,5 ml de solução Ringer Lactato por via intra-articular e o grupo CAP, que recebeu 0,5 ml de concentrado autólogo de plaquetas por via intra-articular. As injeções intra-articulares dos tratamentos foram realizadas imediatamente após a reconstrução do ligamento, aos 15 e aos 30 dias após a reconstrução. Cinco coelhos de cada grupo foram eutanasiados aos 15 dias após a reconstrução (M3), outros cinco aos 30 (M4), e os restantes cinco coelhos de cada grupo aos 60 dias (M5) após a reconstrução. Nesses mesmos momentos, foram feitas avaliações artroscópicas para avaliar a evolução do processo degenerativo e a resposta aos tratamentos aplicados e antes de cada procedimento, foram coletados dois ml de sangue da artéria auricular central e depositados em tubos contendo EDTA e posteriormente acondicionadas em eppendorfes estéreis em duas alíquotas iguais para fazer a dosagem de TGF- $\beta 1$  e PDGF respectivamente. Nos M3, M4 e M5, depois da eutanásia dos animais, foram coletados fragmentos da cápsula sinovial e da cartilagem articular para a avaliação histológica e imuno-histoquímica. Foi observado na avaliação histológica que os animais que receberam o CAP apresentaram, significativamente, ( $p < 0,05$ ) menor inflamação sinovial, menor proliferação celular e menor degradação da matriz extra celular (MEC) quando comparados com os coelhos que receberam Ringer Lactato. Na avaliação imuno-histoquímica os animais que receberam o CAP apresentaram, significativamente, menor expressão ( $p < 0,05$ ) de interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ), de fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), da proteína morfogenética 2 (BMP-2) e, significativamente, maior expressão de PDGF na membrana sinovial quando comparados com os coelhos que receberam Ringer Lactato, e na cartilagem dos animais desse mesmo grupo, expressão, significativamente ( $p < 0,05$ ) menor, de IL-1 $\beta$  e de TNF $\alpha$  e maior expressão de BMP-2 e PDGF quando comparados com os animais do grupo controle. Na avaliação artroscópica foi observado nos animais que receberam o CAP melhora significativa ( $p < 0,05$ ) na inflamação da membrana sinovial, menor formação de cordões fibrosos e menos fibrilação da cartilagem. Finalmente, na avaliação da concentração dos fatores de crescimento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) nas concentrações de TGF- $\beta 1$  em nenhum dos momentos avaliados após as aplicações do CAP, e foi observado diferença estatisticamente significativa na concentração plasmática do PDGF no M5 nos animais do grupo CAP quando comparado com os animais do grupo controle. Segundo os resultados deste experimento, conclui-se que o CAP é capaz de controlar o processo inflamatório que acontece durante a OA melhorando a sinovite presente na cápsula sinovial ao tempo que diminui a degradação da

cartilagem articular. Adicionalmente, esse composto biológico regula a síntese e secreção de citocinas inflamatórias e aumenta a liberação do PDGF.

**Palavras chave:** fatores de crescimento, plasma rico em plaquetas, artroscopia, coelho, imunohistoquímica.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of autologous platelet concentrate (APC) on osteoarthritis (OA) experimentally induced in rabbits, through histological, immunohistochemical and arthroscopic evaluation, and simultaneously determine plasma concentrations of the transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and platelet-derived growth factor (PDGF). The study used 30 male rabbits, young, healthy, New Zealand breed, with an average body mass of 3.0 kg, and submitted to rupture of the cranial cruciate ligament (CrCL) (M1) by video arthroscopy to induce OA. At 21 days after the rupture, the rabbits were submitted to ligament replacement (M2) by video arthroscopy and were divided into two groups according to the treatment: The control group, which received 0.5 ml of the Ringer Lactate solution by intra-articular injections and the CAP group, which received 0.5 ml of autologous platelet concentrate by intra-articular injections. The intra-articular injections of the treatments were performed immediately after the ligament replacement, at 15 and 30 days after the replacement. Five rabbits from each group were euthanized at 15 days after replacement (M3), another five at 30 (M4), and the remaining five rabbits from each group at 60 days (M5) after replacement. At those same moments, arthroscopic evaluations were carried out to assess the evolution of the degenerative process and the response to the treatments applied and before each procedure, two ml of blood from the central auricular artery were collected and deposited in tubes containing EDTA and later stored in sterile eppendorfs in two equal aliquots to measure TGF- $\beta$ 1 and PDGF respectively. In M3, M4 and M5, after euthanasia of the animals, fragments of the synovial capsule and articular cartilage were collected for histological and immunohistochemical evaluation. It was observed in the histological evaluation that the animals that received the CAP had significantly ( $p < 0.05$ ) less synovial inflammation, less cell proliferation and less degradation of the extracellular matrix (ECM) when compared to the rabbits that received Ringer Lactate. In the immunohistochemical evaluation, the animals that received the CAP showed lower secretion ( $p < 0.05$ ) of interleukin 1 (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ), morphogenetic protein 2 (BMP-2) and greater secretion of PDGF in the synovial membrane when compared to the rabbits that received Ringer Lactate, and in the cartilage of the animals of that same group, significantly lower ( $p < 0.05$ ) IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  secretion and greater BMP-2 synthesis and secretion and PDGF when compared to animals in the control group. In the arthroscopic evaluation, a significant improvement ( $p < 0.05$ ) in inflammation of the synovial membrane, less formation of fibrous cords and less fibrillation of the cartilage was observed in the animals that received CAP. Finally, when assessing the concentration of growth factors, there were no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) in TGF- $\beta$ 1 concentrations in any of the moments evaluated after CAP applications, and a statistically significant difference in plasma concentration was observed of PDGF in M5 in CAP group animals when compared to control group animals. According to the results of this experiment, it is concluded that the CAP is able to control the inflammatory process that occurs during OA, improving the synovitis present in the synovial capsule while decreasing the degradation of the articular cartilage. Additionally, this biological compound regulates the synthesis and secretion of inflammatory cytokines and increases the release of PDGF.

**Keywords:** growth factors, platelet-rich plasma, arthroscopy, rabbit, immunohistochemistry.

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

A OA ou doença articular degenerativa é uma das principais causas de dor e incapacidade física na medicina humana e na medicina veterinária, resultando em elevados custos médicos, incapacidade física e em baixa qualidade de vida. Embora existam alguns fatores de risco associados com a OA, como predisposição genética, idade, obesidade, mal alinhamento articular, doenças infecciosas e traumas, a patogênese da OA é ainda discutida (Cho et al., 2015; Lee et al., 2013; Valdes e Spector, 2010).

As manifestações clínicas da OA incluem dor, rigidez articular, diminuição da amplitude dos movimentos e perda da função (Osorio-Carmona e Rezende, 2014; Intema et al., 2010). Deterioração progressiva e perda da cartilagem articular com mudanças estruturais e funcionais concomitantes, incluindo a membrana sinovial, ligamentos peri-articulares e osso subcondral também são observadas (Mobasher e Batt, 2016).

As opções terapêuticas atualmente disponíveis têm efeito somente por curto prazo e ação paliativa, sendo que, na maioria dos casos, apresentam-se ineficientes e não interferem nos mecanismos bioquímicos e fisiopatológicos envolvidos na degeneração da cartilagem articular e na indução da dor em articulações artríticas (Cho et al., 2015; Lee et al., 2013).

Com a introdução relativamente recente das terapias celulares, dentre elas o plasma rico em plaquetas (PRP) ou CAP, em diferentes situações clínicas, surge uma possível alternativa de controle mais eficaz da OA que acomete as diferentes articulações. Os resultados clínicos sugerem que este produto pode ser útil no tratamento da doença, mas faltam estudos controlados que comprovem seu efeito (Osorio-Carmona et al., 2017; Patel et al., 2013).

## **2. HIPÓTESE**

O CAP quando aplicado por via intra-articular tem um efeito benéfico sobre a OA em coelhos, diminuindo a sinovite e a degradação da cartilagem articular.

## **3. OBJETIVO**

Identificar, registrar e comparar os efeitos do CAP e do Ringer lactato nas articulações de coelhos com OA induzida, verificando as alterações macroscópicas, celulares e plasmáticas derivadas desses tratamentos.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar por meio da histologia as alterações celulares na cápsula sinovial e na cartilagem articular induzidas pela aplicação do CAP ou do Ringer lactato;
- Avaliar por meio da imuno-histoquímica a influência do CAP ou do Ringer lactato no padrão de síntese e liberação da IL-1 $\beta$ , do TNF- $\alpha$ , da BMP-2 e do PDGF pelos sinoviócitos, condrócitos e macrófagos presentes no tecido articular
- Avaliar por meio da artroscopia as alterações macroscópicas decorrentes da OA e a eficiência do tratamento em tempo real.
- Determinar os níveis plasmáticos do TGF- $\beta$ 1 e do PDGF dos coelhos tratados ou não com CAP através do teste de ELISA.

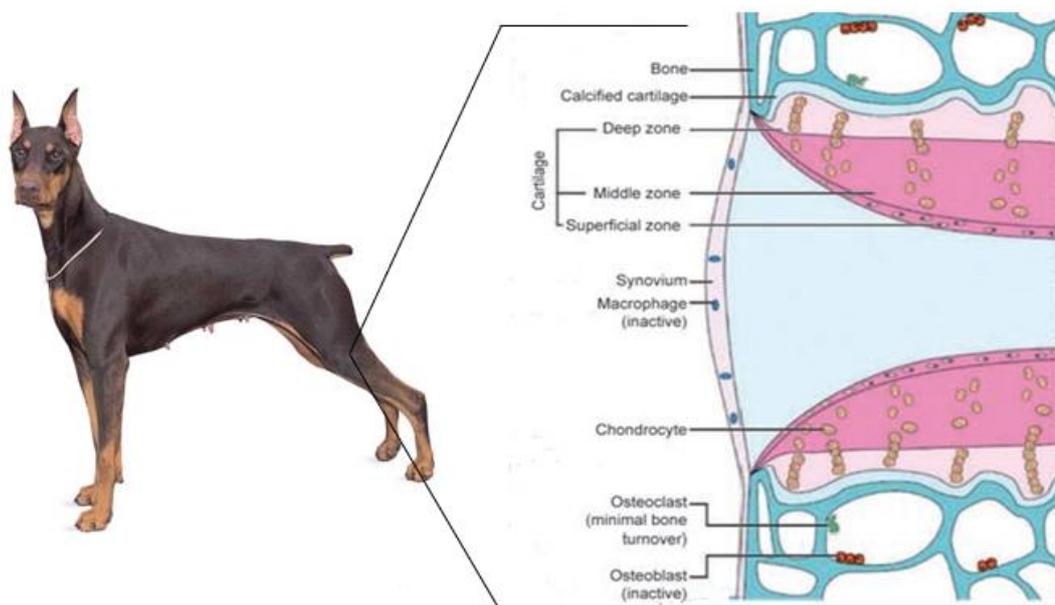
## CAPITULO I

### ARTICULAÇÃO FÊMORO-TÍBIO-PATELAR: ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E ESTRUTURAIS E EFEITO DO CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP) NA OSTEOARTROSE (OA). (Revisão de literatura)

#### Introdução

A complexa articulação fêmoro-tíbio-patelar e as estruturas que a compõem, desenvolvem um importante papel durante a deambulação. Cada um dos componentes da articulação, sob condições normais, desempenha funções fisiológicas específicas que permitem o deslocamento do animal e minimizam o impacto das forças que agem sob os ossos e a musculatura (Figura 1) (Martel-Pelletier et al., 2008).

Do ponto de vista biomecânico os componentes da articulação são tecidos capazes de influenciar constantemente a síntese e degradação da matriz extracelular. Tecidos como a cápsula sinovial, os meniscos, os ligamentos, e inclusive, o líquido sinovial, influenciam a homeostase articular, além de participar ativamente dos processos catabólicos e degradativos que tem lugar nas diferentes patologias que acometem as articulações (Torrente e Farriol, 2012). Os mecanismos de ação dos fatores de crescimento e interleucinas podem favorecer ou inibir a síntese dos componentes da matriz, ao mesmo tempo que favorecem a ação de moléculas que degradam a cartilagem e os demais tecidos (Torrente e Farriol, 2012; Vasara et al., 2009).



**Figura 1.** Fisiologia da articulação fêmoro-tíbio-patelar. Modificado de Ivirico et al., 2017.

Lesões envolvendo um ou vários componentes articulares alteram a estrutura e a função da articulação como um todo. Cápsula, cartilagem, líquido sinovial e ligamentos podem apresentar diversas alterações que podem induzir e acelerar o aparecimento dos sintomas clínicos do processo degenerativo (Guilak, 2011).

Alterações degenerativas que acometem as articulações cursam com perda da arquitetura da MEC, da estrutura do colágeno, dos proteoglicanos, agrecanos e demais moléculas que formam os tecidos articulares. Essas alterações são mediadas por enzimas catabólicas e pelas interações

entre os fatores bioquímicos, biomecânicos e inflamatórios que aceleram e acentuam a degeneração das estruturas (Fukui et al., 2003).

O tratamento disponível para a OA, artrite e outras doenças degenerativas das articulações limita-se ao uso de medicações paliativas e para o controle da dor. A pouca efetividade no controle da progressão da OA é devida principalmente ao pouco conhecimento das interações moleculares que são responsáveis pela degradação da MEC (Hunter e Eckstein, 2011).

Nas últimas décadas, tem sido amplamente documentado em diversas pesquisas o efeito benéfico dos produtos derivados de plaquetas, quando utilizado em lesões que acometem o sistema musculoesquelético. Concentrados de plaquetas, plasma rico em plaquetas, gel de plaquetas, dentre outros produtos atuam diminuindo e regulando a resposta inflamatória no local onde são aplicados e estimulam a diferenciação celular e a regeneração tecidual, sendo assim uma alternativa no auxílio do controle da OA (Brossi et al., 2015).

### **1.1. Cartilagem articular**

A cartilagem articular é um tecido conectivo especializado avascular e aneural que recobre os componentes ósseos das articulações diartrodiais. Este tecido tem a função de suportar as cargas, absorver impactos e suportar as forças de cisalhamento que agem sobre as articulações. As propriedades da cartilagem estão relacionadas com a composição e estrutura de sua MEC, que é constituída principalmente por uma alta concentração de proteoglicanos (agrecanos) dispostos numa densa rede de fibras de colágeno e grande quantidade de água. A cartilagem é composta por uma população de células dispersas no tecido, chamadas condrócitos, os quais são responsáveis pela síntese e manutenção da MEC (Martel-Pelletier et al., 2008).

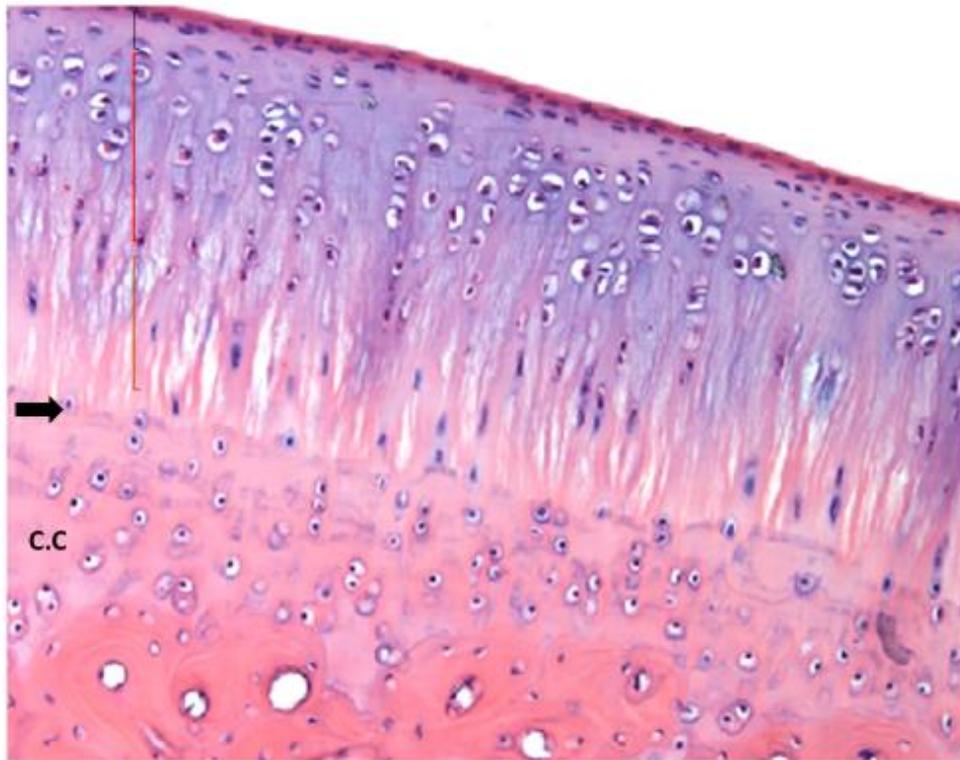
Os componentes da MEC são altamente organizados, desde as camadas superficiais da cartilagem até as camadas mais profundas. A cartilagem é dividida em quatro zonas com diferentes funções: a zona superficial, a zona média ou transicional, a zona profunda ou radial e a zona de cartilagem calcificada. Não há um limite definido entre as três primeiras zonas (Figura 2) (Martel-Pelletier et al., 2008).

A zona superficial, a mais fina das quatro, é formada de fibrilas de colágeno finas com orientação tangencial, baixo conteúdo de proteoglicanos e condrócitos alongados alinhados paralelamente com a superfície. Essa zona está em contato direto com o líquido sinovial e é a responsável pela maior parte das propriedades mecânicas da cartilagem que permitem resistir às forças de cisalhamento, de tensão e de compressão durante a movimentação articular (Martel-Pelletier et al., 2008; Venn, 1979).

A zona média representa 40-60% da espessura total da cartilagem, é formada por proteoglicanos e fibrilas de colágeno mais espessas organizadas em feixes ou camadas radiais. Os condrócitos nesta zona estão em menor quantidade e tem forma redonda. Na zona profunda os condrócitos tem a mesma forma arredondada e estão alinhados perpendicularmente em relação à superfície articular, também em menor quantidade. Essa zona possui as maiores fibrilas de colágeno numa posição radial e o mais alto conteúdo de agrecanos (Martel-Pelletier et al., 2008; Venn, 1979).

A cartilagem calcificada está separada das demais zonas por uma linha cimentada, que delimita, física e mecanicamente a cartilagem hialina do osso subcondral. A principal função dessa zona parece ser a ancoragem da cartilagem ao osso, enquanto as fibrilas de colágeno da zona radial

penetram no interior da cartilagem calcificada. A população celular é escassa nessa zona e os condrócitos são hipertrofiados (Figura 2) (Martel-Pelletier et al., 2008; Stockwell, 1990).



**Figura 2.** Cartilagem articular, organização histológica (x50). Chave preta: zona superficial; Chave vermelha: zona intermédia; Chave laranja: zona profunda. Seta preta: tidemark. C.C: cartilagem calcificada. Fonte: Arquivo pessoal.

Em torno dos condrócitos existe uma fina camada de material não fibrilar, que representa os produtos sintéticos dos condrócitos, dentre eles os proteoglicanos e as glicoproteínas. Adjacente a essa camada está a MEC, que contém uma densa malha de fibras finas de colágeno formando uma estrutura similar a uma cápsula ao redor das células, proporcionando proteção mecânica aos condrócitos (Stockwell, 1990).

A água da cartilagem desempenha um papel fundamental na manutenção da resistência do tecido e contribui para a nutrição da cartilagem e no sistema de lubrificação. O maior conteúdo de água (80%) na cartilagem encontra-se adjacente à zona superficial da cartilagem e vai diminuindo à medida que se aprofunda nas demais camadas. A maior parte do conteúdo hídrico presente na cartilagem é extracelular e carrega alguns sais inorgânicos como sódio, cálcio e cloreto de potássio (Martel-Pelletier et al., 2008; Stockwell, 1990; Venn, 1979).

A manutenção e fluxo da água no tecido depende da interação com as macromoléculas. A difusão de água através da cartilagem auxilia na difusão dos nutrientes do líquido sinovial pelos tecidos, contribuindo para a nutrição dos condrócitos (Stockwell, 1990).

As fibras de colágeno formam uma rede que proporciona a configuração e forma do tecido. O colágeno tipo II é específico da cartilagem e é o tipo de colágeno neste tecido (90-98% do total). As propriedades mecânicas mais importantes das fibras de colágeno são rigidez e resistência à tração (Martel-Pelletier et al., 2008; Stockwell, 1990).

O colágeno tipo II é composto de três cadeias idênticas de polipeptídios que se organizam na MEC em forma de fibrilas de colágeno unidas umas às outras por meio de enlaces cruzados que estabilizam a fibra e lhe proporcionam resistência às forças tensis às quais a cartilagem articular é exposta *in vivo* (Martel-Pelletier et al., 2008; Takahashi et al., 1994). Outros tipos de colágeno presentes na cartilagem incluem o colágeno tipo XI, o colágeno tipo IX, o colágeno tipo VI e o colágeno tipo X que são observados tanto em articulações saudáveis quanto naquelas acometidas pela OA (Martel-Pelletier et al., 2008; Eyre et al., 2006).

Os proteoglicanos são formados por moléculas de agrecanos e representam o segundo constituinte mais abundante na MEC da cartilagem articular (5-10%). Eles são moléculas complexas formadas por um filamento central de ácido hialurônico ao qual estão unidos não covalentemente múltiplos monómeros (Lorenz e Richter, 2006).

A capacidade da cartilagem de absorver as cargas depende do conteúdo de glicosaminoglicanos (GAG) nas moléculas de agrecanos e de sua retenção na MEC. A redução de GAG pode resultar em sobrecarga na cartilagem articular quando submetida a esforços, levando a uma resposta adversa dos condrócitos caracterizada pelo aumento na produção de proteases com consequente degeneração do tecido. (Roughley et al., 2006).

O hialuronato é um GAG não sulfatado caracterizado pelo seu grande comprimento, é sintetizado na membrana plasmática da célula e depositado diretamente no espaço extracelular onde ocorre a formação dos agregados de proteoglicanos na matriz adjacente aos condrócitos. O conteúdo de hialuronato na cartilagem articular aumenta com a idade à medida que seu tamanho diminui (Holmes et al., 1988). A degradação do hialuronato pode ter efeito metabólico adverso sobre as células, enquanto os oligosacarídeos do hialuronato podem promover o catabolismo mediado pela célula (Martel-Pelletier et al., 2008).

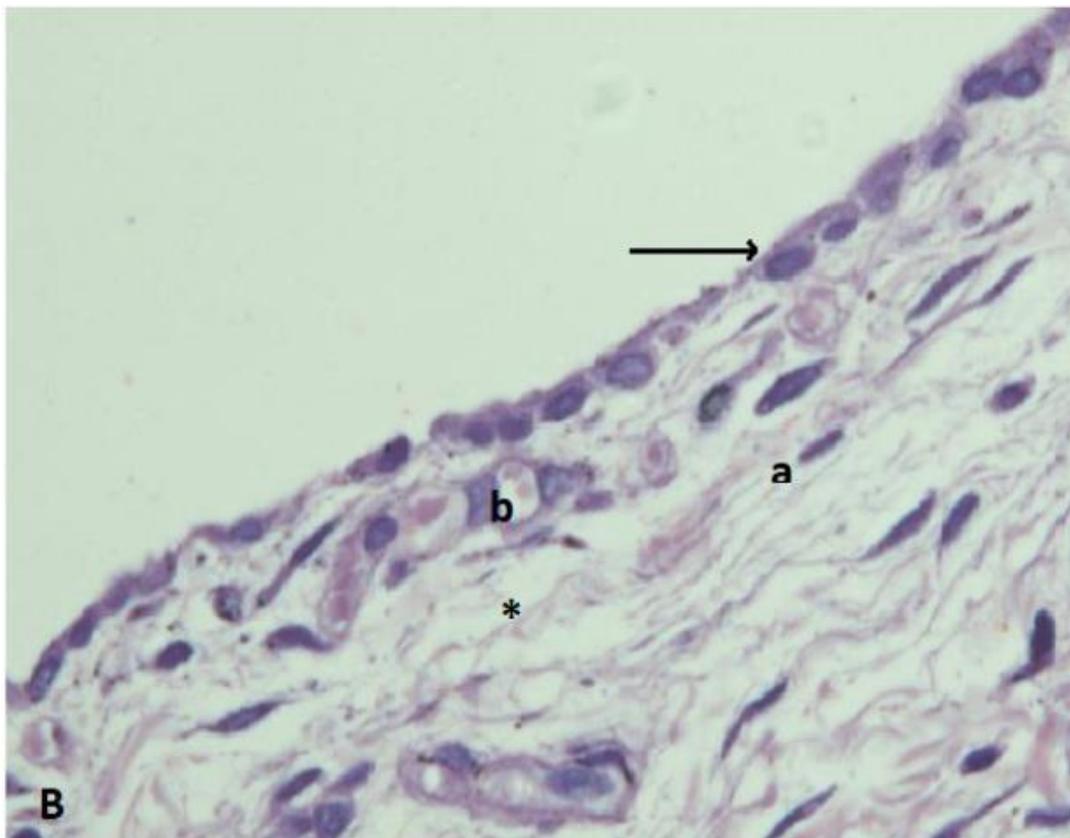
## **1.2. Cápsula e membrana sinovial**

A membrana sinovial atua como uma membrana semipermeável que controla a entrada e saída de moléculas dentro do espaço intra-articular, mantendo a composição do líquido sinovial que é essencial para preservar o estado fisiológico da cartilagem articular. Sob condições normais, as moléculas de alto peso molecular como a lubrificina e o ácido hialurônico não são permeáveis pela membrana, permanecendo dentro da articulação e evitando a alteração na viscosidade e composição do líquido sinovial (Mazieres et al., 2006).

Os elementos celulares da membrana sinovial (sinoviócitos, fibroblastos, monócitos) são as principais fontes dos componentes do líquido sinovial. Estes componentes contribuem com as propriedades funcionais únicas das superfícies articulares e modulam a atividade de outras células como os condrócitos. Duas moléculas importantes produzidas pelas células da membrana sinovial, a lubrificina e o ácido hialurônico, protegem e mantem a integridade das superfícies da cartilagem articular nas articulações diartrodiais. Essas duas moléculas diminuem a fricção proporcionando lubrificação das superfícies articulares. Adicionalmente, a lubrificina diminui a deposição patológica de proteínas sobre a superfície articular (Rhee et al., 2005, Hui et al., 2012).

Pesquisas sobre a fisiopatologia da OA têm focado principalmente nas mudanças que acontecem na cartilagem articular e no osso subcondral durante o curso da doença, porém existem evidências de que a OA afeta todos os componentes articulares, incluindo a cápsula sinovial. Em condições fisiológicas o revestimento sinovial está composto de uma fina camada

de células com características fenotípicas de macrófagos e fibroblastos. Essas células e o estroma do tecido conectivo vascularizado subjacente formam uma estrutura complexa que é uma importante fonte dos componentes do líquido sinovial, essencial para a função normal da cartilagem e da articulação (Figura 3) (Scanzello e Goldring, 2012).



**Figura 3.** Cápsula sinovial, organização histológica (x50). Seta preta: única camada de sinoviócitos com forma de escama. asterisco: estroma de sustentação. a: fibroblastos do estroma; b: vasos sanguíneos.

As alterações histológicas observadas na membrana sinovial durante a OA geralmente incluem características de uma sinovite inflamatória com hiperplasia do revestimento sinovial, infiltração de macrófagos e linfócitos, neo-angiogênese e fibrose. O padrão da reação sinovial varia com a duração da doença e com alterações metabólicas e estruturais em outros tecidos articulares (Scanzello e Goldring, 2012).

Evidências sugerem que o processo inflamatório que tem lugar durante a OA envolve a participação dos receptores tipo Toll e a ativação de complemento causado pelos produtos de degradação da MEC e outros tecidos da articulação. A reação sinovial resultante pode levar à síntese e liberação de ampla variedade de citocinas e quimiocinas. Esses mediadores inflamatórios são detectados nos tecidos articulares e no líquido sinovial durante a OA e possuem efeitos catabólicos sobre os condrócitos. Estes mediadores inflamatórios representam potenciais objetivos para intervenções terapêuticas propostas para reduzir os sintomas clínicos e a injúria articular estrutural que ocorre na OA (Scanzello e Goldring, 2012).

A inflamação sinovial ou sinovite é um fenômeno observado nas articulações osteoartíticas e que contribui para a patogênese da OA através da formação de vários mediadores catabólicos e pró-inflamatórios, alterando o equilíbrio entre a degradação da matriz da cartilagem e sua reparação. Os mediadores catabólicos produzidos pela sinovia inflamada incluem as citocinas

pró-inflamatórias, óxido nítrico, prostaglandina E<sub>2</sub> e alguns neuropéptidos, que também contribuem para a patogênese da OA aumentando a degradação da cartilagem (Sutton et al., 2009).

Durante a progressão da OA a membrana sinovial sintetiza e libera metaloproteinases e agreganases, as quais contribuem para a degradação da MEC. As alterações na membrana sinovial podem resultar em concentrações diminuídas dos fatores protetores da cartilagem e incrementar a produção de fatores que contribuem para a degradação da matriz articular (Bondeson et al., 2010).

O impacto clínico da sinovite na OA tem sido evidenciado em diversas pesquisas publicadas tanto em humanos quanto em animais. Os resultados evidenciam uma correlação entre a inflamação sinovial e sintomas como dor e diminuição da amplitude dos movimentos em pacientes com OA que se acentua dependendo do grau de inflamação, afetando consequentemente atividades como a deambulação, subir e descer escadas, dentre outras (Scanzello e Goldring, 2012; Ishijima et al., 2011).

Resultados de pesquisas em humanos, comprovaram que a sinovite da articulação temporomandibular estimula a produção e liberação de IL 8 causando infiltração de neutrófilos no tecido sinovial e promovendo inflamação do tecido. Os resultados indicam que há uma sobregulação desses mediadores inflamatórios com aumento de seus níveis na membrana sinovial e no líquido sinovial induzindo um ambiente mais catabólico que leva à degradação dos tecidos articulares (Sato et al., 2007).

Animais com sinovite possuem sintomas característicos como inflamação articular, rigidez, hiperemia local, dor e efusão articular como consequência do espessamento da cápsula sinovial e do aumento na síntese de líquido sinovial. Histologicamente essa sinovite é caracterizada pela infiltração de células inflamatórias na membrana sinovial e aumento na liberação de substâncias pró-inflamatórias no espaço articular (Robinson et al., 2016).

### **1.3.Meniscos**

Os meniscos são considerados uma importante estrutura que forma parte da complexa biomecânica articular e é essencial para o adequado funcionamento da articulação fêmoro-tíbio-patelar. Em mamíferos, existem dois meniscos, o medial e o lateral constituídos por tecido fibrocartilaginoso interposto entre o fêmur e a tíbia. Dentre as principais funções dessas estruturas, encontra-se a absorção de impactos, distribuição de cargas, propriocepção, manutenção da estabilidade articular, proteção da cartilagem articular, lubrificação da articulação e nutrição da cartilagem articular (Marsano et al., 2007; Sweigart et al., 2003; Caldwell et al., 1994).

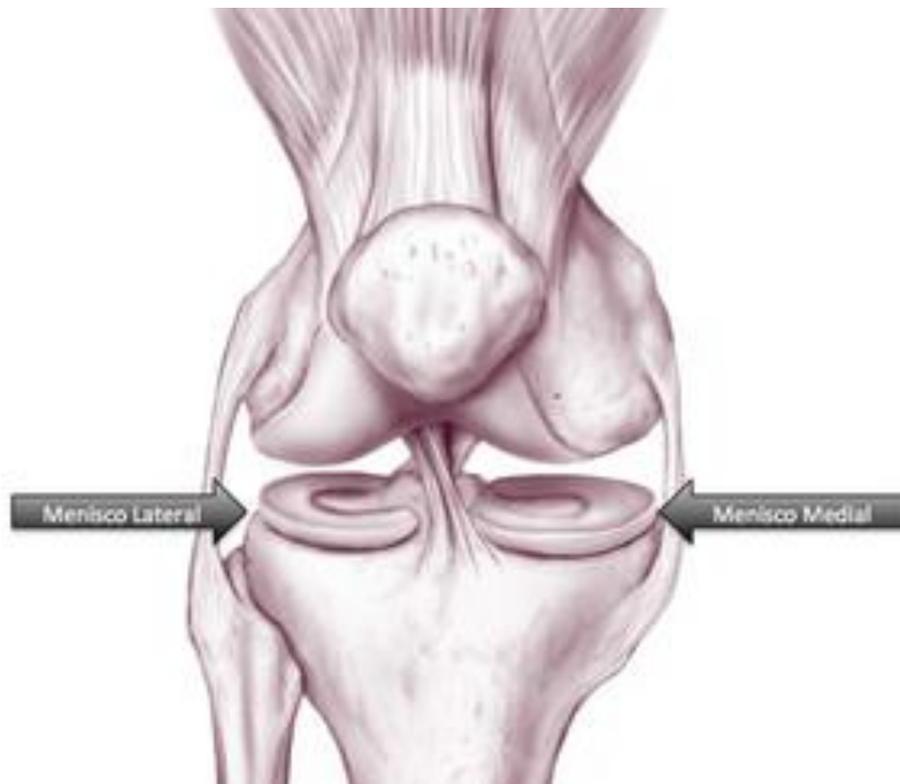
O tecido fibrocartilaginoso que compõe os meniscos dos animais domésticos é composto principalmente de fibras de colágeno tipo I e quantidades menores de fibras de colágeno tipo II organizadas em três camadas. Uma camada de fibrilas finas de aproximadamente 30nm de diâmetro que recobre a superfície do menisco, uma camada em forma lamelar subjacente de feixes de fibras de colágeno arranjadas em forma radial ou em diferentes ângulos e o corpo do menisco que é formado por feixes de colágeno arranjados circunferencialmente e com aparência de fibras atadas (Kambic e McDevitt, 2005). A expressão genética de colágeno tipo I é relativamente inativa nos meniscos de cães adultos, porém é super expressada após alguma lesão no tecido (Willey et al., 2001).

A composição dos meniscos é similar a outros tecidos fibrosos como tendões e ligamentos. O tecido está composto por aproximadamente 70% de água, com o colágeno constituindo do 60-70% do peso seco do tecido. Os proteoglicanos, a matriz de glicoproteínas e pequenas quantidades de elastina compõem o restante do peso seco (Kambic e McDevitt, 2005).

As células predominantes no menisco são os fibrocondrócitos, que lembram os condrócitos, porém sintetizam uma matriz fibrocartilaginosa diferente. O tecido fibrocartilaginoso do menisco é composto de matriz extracelular com poucos fibrocondrócitos intercalados. Outros tipos de colágeno estão presentes em menores quantidades como o colágeno tipo II, III, IV e V (Caldwell et al., 1994).

O colágeno no menisco forma fibras grossas que dão a estrutura e forma característica do menisco. A presença destas fibras permite distinguir a fibrocartilagem do menisco da cartilagem hialina das superfícies articulares. As fibras de colágeno são as responsáveis pela força tensil característica desse tecido que permite resistir as forças de compressão exercidas sobre os meniscos e as outras forças que agem na articulação (Kambic e McDevitt, 2005; Caldwell et al., 1994).

A morfologia dos meniscos assemelha-se a duas cunhas em forma de meia lua e são considerados como extensões da superfície do platô tibial. Geralmente, a borda externa é convexa e constitui a porção mais espessa do menisco. Essa porção encontra-se aderida à cápsula articular adjacente. A forma do menisco afunila gradativamente à medida que este adentra-se no espaço articular. A superfície interior, em contato direto com o platô tibial é geralmente lisa, enquanto a superfície proximal é côncava, conforme a forma dos côndilos femorais (Figura 4) (Kambic e McDevitt, 2005; Caldwell et al., 1994).



**Figura 4.** Meniscos na articulação fêmoro-tíbio-patelar em sua posição anatômica. Tomado de Mateus, 2010.

O menisco possui dois únicos pontos de ancoragem direta nos ossos, através da ancoragem anterior e posterior. O suporte do peso corporal faz com que os côndilos femorais exerçam pressão sobre os meniscos, porém os pontos de ancoragem destes às estruturas adjacentes e a conformação estrutural das fibras de colágeno que o compõem, previnem o colapso do mesmo quando submetido às diferentes forças que suporta a articulação (Kambic e McDevitt, 2005; Caldwell et al., 1994).

O menisco lateral forma um semicírculo mais completo devido as diferentes regiões de ancoragem do corno anterior de ambos os meniscos. Os cornos anteriores e posteriores do menisco lateral ancoram-se ao longo da eminência intercondilar, centralmente, enquanto a ancoragem do menisco medial, se encontra nos aspectos anterior e posterior do platô tibial (Caldwell et al., 1994). Em geral, os pontos de inserção dos meniscos são afastados o suficiente dos ligamentos cruzados e dos tendões. As fibras dos cornos anteriores de ambos os meniscos emergem juntas para formar o ligamento transversal, o qual conecta os dois cornos anteriores dos meniscos lateral e medial (Caldwell et al., 1994).

Os meniscos estão unidos aos côndilos femorais através dos ligamentos meniscofemorais, que se origina no corno posterior de ambos os meniscos e insere-se no aspecto lateral dos côndilos. Esse ligamento é considerado uma estrutura acessória e acredita-se que tem como principal função aumentar a congruência entre os meniscos e os côndilos femorais durante a flexão do joelho (Caldwell et al., 1994).

A grande maioria da estrutura dos meniscos é avascular exceto nas áreas periféricas de ambos meniscos, onde pode-se encontrar um plexo capilar originado do tecido capsular e sinovial (Arnoczky e Warren, 1982). A parte mais interna dos meniscos é avascular e recebe provavelmente toda a nutrição através da difusão do líquido sinovial e do estímulo mecânico, que leva os micronutrientes no interior do menisco através de microcanais (Caldwell et al., 1994).

Do ponto de vista biomecânico, o menisco exerce funções fundamentais como suporte de peso, transmissão de cargas, estabilidade articular, dentre outras. Estas funções são executadas graças à anatomia própria, às propriedades estruturais e mecânicas, mas podem estar comprometidas na presença de lesões na estrutura do menisco ou após cirurgias de meniscectomia, levando inclusive ao desenvolvimento do processo articular degenerativo (Kambic e McDevitt, 2005; Caldwell et al., 1994).

Os meniscos são os responsáveis por suportar aproximadamente 45% da carga articular durante a locomoção e por transmitir aproximadamente 70% destas cargas ao longo da articulação fêmoro-tíbio-patelar, porém esta capacidade é drasticamente reduzida quando há ruptura das fibras de colágeno que compõem o menisco ou quando há lesões que comprometem a capacidade de distribuição radial das cargas na articulação (Caldwell et al., 1994).

#### **1.4.Líquido sinovial**

A análise do líquido sinovial tem sido utilizada rotineiramente como uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico das diferentes alterações articulares. Alguns autores têm enfatizado a importância da análise do fluido sinovial de articulações normais ou com alguma patologia, em relação à sua aparência macroscópica e ao conteúdo celular, para classificar as características inflamatórias ou não inflamatórias das diferentes alterações (Torrente e Forriol, 2012; Martinez-Castillo et al., 2010).

Uma avaliação completa do líquido sinovial inclui três análises básicas: avaliação macroscópica, que permite a definição das características físicas da amostra (volume, cor, viscosidade), avaliação microscópica que inclui contagem completa dos leucócitos e análise da presença de cristais por microscópio de luz polarizada e a avaliação do líquido sinovial com diferentes colorações (Gram, Wright, vermelho de Alizarin, Sudan negro, dentre outras) para avaliar a celularidade e a presença de cristais (Martínez-Castillo et al., 2010).

O líquido sinovial é considerado um dialisado do plasma sanguíneo secretado pela membrana sinovial e, em condições normais, não contém fatores de coagulação, eritrócitos ou hemoglobina e é formado principalmente por hialuronato e glicoproteínas lubrificantes chamadas lubricinas, as quais diminuem a fricção e lubrificam a articulação (Torrente e Forriol, 2012; Cuellar et al., 2010). Os níveis da maioria das proteínas plasmáticas do líquido sinovial dependem de seu tamanho molecular, configuração e carga, da permeabilidade da membrana sinovial e se as proteínas são sintetizadas ou não localmente pela membrana (Strom et al., 1989). O tipo e a concentração das moléculas presentes no líquido sinovial proporcionam informações sobre a origem e o prognóstico de certas alterações e auxiliam os tratamentos específicos conforme a necessidade de cada caso (Martínez-Castillo et al., 2010).

A análise do líquido sinovial permite a identificação de cristais, bactérias, células e alterações físicas e químicas. Adicionalmente, auxilia no diagnóstico e prognóstico das doenças e facilita o acompanhamento da evolução do tratamento de grande variedade de alterações. A avaliação do líquido sinovial em pacientes com diferentes artropatias oriundas de diferentes causas tem ganhado importância devido ao emprego de novas técnicas para quantificar os níveis de citocinas, imunoglobulinas, células e moléculas de ativação que auxiliam na identificação dos processos articulares (Martínez-Castillo et al., 2010).

Com os avanços da biologia molecular, diferentes padrões de expressão de citocinas e proteínas no líquido sinovial têm sido gradativamente definidos e associados com a degradação articular. As citocinas encontradas no líquido estão implicadas na inflamação e na degradação da cartilagem articular e sua concentração neste varia de acordo com a patologia e o estado geral da articulação (Torrente e Forriol, 2012).

As principais citocinas envolvidas na inflamação articular e encontradas no líquido sinovial são as interleucinas 1, 6, 8 e 10, o fator de necrose TNF- $\alpha$ , as metaloproteinases 1,3 e 9 e algumas agreganases. Da mesma forma, existem outros fatores anabólicos tais como o fator de crescimento insulínico (IGF) e o TGF que também são expressos no líquido sinovial e podem ser analisados para avaliar o estado, evolução e resposta ao tratamento de articulações acometidas pela OA (Torrente e Forriol, 2012).

Kosinska et al. (2016) analisaram o perfil lipídico do líquido sinovial de articulações saudáveis e com OA de cães com ruptura do LCCr e de humanos saudáveis e com sinais precoces de OA e o associaram com o estágio da doença. Os autores observaram que mudanças no perfil lipídico tanto de cães quanto de humanos estão associados com uma menor lubrificação da cartilagem e alterações no status inflamatório, assim os lipídeos podem contribuir no desenvolvimento e progressão da OA.

Tem sido comprovada também a presença de outras moléculas inflamatórias no líquido sinovial de articulações acometidas pela OA. A expressão de defensina-3 e a defensina-4, moléculas encarregadas de aumentar as vias catabólicas da cartilagem articular, encontrou-se aumentada no líquido sinovial da articulação temporomandibular de humanos diagnosticados com OA

quando comparado com o LS de indivíduos sem nenhuma alteração, demonstrando assim que o líquido sinovial é uma ferramenta importante no diagnóstico e prognóstico de alterações que acometem as articulações sinoviais (Leonardi et al., 2015).

As patologias podem ter origem inflamatória ou não inflamatória de acordo com a análise do líquido sinovial (De Bruin et al., 2005). As artrites de origem inflamatória são caracterizadas por grave inflamação da membrana sinovial propiciando um aumento no fluxo de células inflamatórias (principalmente células polimorfonucleares) no líquido sinovial, como ocorre, por exemplo, na artrite reumatoide canina, artrite infecciosa e lúpus eritematoso sistêmico. As artrites de origem não inflamatória, que podem ser primárias/idiopáticas ou secundárias, são caracterizadas por discreta a moderada inflamação da sinovia e níveis normais ou discretamente aumentados de células tipicamente mononucleares no líquido sinovial (De Bruin et al., 2005; Bennett, 1999).

Verifica-se, portanto, a importância da análise do líquido sinovial e sua contribuição para o diagnóstico, tratamento, avaliação da resposta a tratamentos e prognóstico das doenças que acometem as articulações sinoviais. A expressão de prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ), quimiocinas e outros mediadores inflamatórios e degenerativos encontra-se aumentada no líquido sinovial durante os processos patológicos independente de sua origem etiológica e os níveis desses mediadores no líquido sinovial variam de acordo com o tempo de evolução e a gravidade da alteração (Martínez-Castillo et al., 2010).

A análise do líquido sinovial deve ser realizada sempre que possível, tanto em articulações saudáveis quanto em articulações doentes para conhecer o tipo de processo instaurado (infeccioso, inflamatório, imunológico, neoplásico, dentre outros) e desenvolver protocolos terapêuticos direcionados de acordo com a necessidade específica para cada caso (Cuellar et al., 2010).

### **1.5. Tendões e ligamentos**

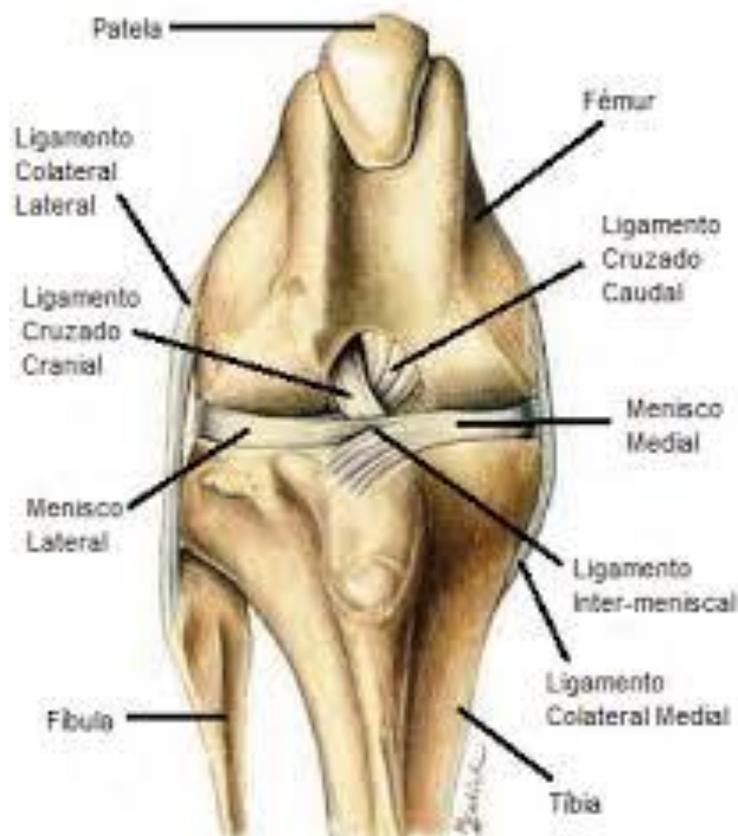
Os tendões e ligamentos são estruturas de tecidos moles similares que executam tarefas similares, porém distintas. Os tendões transmitem forças geradas pela contração da musculatura para favorecer o movimento esquelético, proporcionam suporte aos ossos e aumentam a eficiência da locomoção ao armazenar e liberar energia durante o movimento. Eles são necessários para resistir as altas forças tenséis. Os ligamentos alinham e estabilizam ossos adjacentes e proporcionam resistência passiva ao movimento. Estas estruturas estão submetidas a forças em diversas direções dependendo da amplitude de movimento das articulações (Figura 5) (Rumian et al., 2007).

A complexa estrutura permite a deformação plástica sob altas cargas de tensão. A MEC dos tendões e ligamentos possui dois componentes principais: a substância base amorfa e os elementos fibrosos. A porção fibrosa está constituída de colágeno e elastina. A elastina constitui cerca do 1-2% do peso seco do tendão e do ligamento, e contribui grandemente com a elasticidade destes tecidos (Goodship et al., 1994). A substância base é um gel amorfo de complexos de proteína-carboidratos hidrofílicos (proteoglicanos e glicoproteínas estruturais) e água. Tendões e ligamentos normais estão compostos de 65-70% de água (Woo et al., 2006).

Os proteoglicanos compreendem menos de 5% do peso seco do tendão e do ligamento, entretanto eles desenvolvem um papel vital nas interações célula-célula e célula MEC, na fibrilogênese do colágeno, no controle do diâmetro das fibrilas de colágeno e na homeostase

geral do tendão e do ligamento (Dahlgren, 2007). Aproximadamente 80% do peso seco dos tendões e ligamentos está composto de colágeno, do qual, mais de 95% é colágeno tipo I. A quantidade total de colágeno tipo I no ligamento é ligeiramente menor (aproximadamente 85%).

O tipo de colágeno restante consiste principalmente de colágeno tipo III com pequenas quantidades de outros tipos de colágeno. Alterações no conteúdo total de colágeno e na distribuição dos tipos deste, afetam as propriedades biomecânicas dos tendões e ligamentos lesionados (Dahlgren, 2007; Woo et al., 2006; Frank, 2004).



**Figura 5.** Tendões e ligamentos da articulação fêmoro-tíbio-patelar. Tomado de Mateus, 2010.

As funções diferentes dos tendões e dos ligamentos levam às diferenças estruturais. As fibras de colágeno nos tendões estão organizadas em um padrão estritamente paralelo, enquanto as fibras do ligamento têm um padrão mais aleatório e com menos reticulações maduras para resistir a carga multiaxial. Os ligamentos contêm um conteúdo de colágeno total ligeiramente menor com uma taxa maior de colágeno tipo III e um conteúdo mais alto de glicosaminoglicanos. Os fibroblastos no ligamento tendem a ter um aspecto histologicamente maior e mais arredondado (Dahlgren, 2007; Rumian et al., 2007).

Tendões e ligamentos são caracterizados por escassos fibroblastos embebidos numa complexa hierarquia estrutural de matriz extracelular rica em colágeno organizado ao longo de linhas de tensão. Esse esquema organizacional preciso concede as propriedades mecânicas necessárias para que os ligamentos e os tendões funcionem adequadamente sob altas cargas. A etiologia das lesões nos tendões e ligamentos está predominantemente associada à sobrecarga aguda e a microtraumas acumulados devido a exercícios e outras atividades cotidianas (Dahlgren, 2007).

Sob cargas e condições fisiológicas mantem-se o equilíbrio entre a degeneração da MEC e sua renovação a cargo da população residente de fibroblastos. Quando a natureza das alterações se desenvolve mais rápido do que esta pode ser reparada surgem os sinais clínicos associados com tendinites e desmites. A resposta às alterações moleculares e celulares que ocorrem durante a reparação de tendões e ligamentos são fundamentais para entender o início, avanço e prognóstico das lesões que afetam as estruturas articulares e definir o tratamento para cada caso particular (Dahlgren, 2007).

As lesões nos tendões e ligamentos podem ocorrer por causas extrínsecas e intrínsecas. As primeiras, estão frequentemente associadas a lacerações agudas ou a traumatismos que lesiona fisicamente a MEC e as células. As alterações intrínsecas estão associadas com condições degenerativas dentro dos tendões ou ligamentos propriamente (Dahlgren, 2007).

A etiopatogenia precisa das lesões envolvendo essas duas estruturas é um complexo dinâmico no qual lesões mecânicas têm sido associadas ao desempenho de tarefas repetitivas que resultam em microlesões cumulativas dentro do tendão. Sobrecargas agudas também podem ser a causa dos danos presentes nessas estruturas. Esta sobre carga induz um aumento na expressão de citocinas inflamatórias e de enzimas degradativas (Gardner et al., 2008).

Em contrapartida pesquisas tem demonstrado também que a baixa estimulação das células próximas das células afetadas pelos traumatismos acumulados pode causar a produção de um padrão de expressão de genes catabólicos que resulta na degradação da MEC e na perda da função. Assim, as fibrilas de colágeno afetadas são incapazes de transmitir informação relacionada com as cargas mecânicas para as demais células. O estresse de privação aumenta a expressão de metaloproteinases (MMP's) e aumenta a apoptose que resulta na degradação da MEC e perda das propriedades do tecido (Lavagnino e Arnoczky, 2005).

O entendimento dos mecanismos normais de reparação dos tendões e dos ligamentos ao nível celular e molecular é vital para desenvolver novas alternativas terapêuticas assim como para aplicar os tratamentos disponíveis atualmente de forma correta para cada caso (Dahlgren, 2007).

## **1.6.Fatores anabólicos que atuam no metabolismo articular**

A integridade dos componentes articulares é fortemente influenciada pelo equilíbrio funcional entre os fatores anabólicos e catabólicos que regulam seu metabolismo. Estes fatores propiciam condições ideais para formação de uma superfície articular funcional e durável, além de manter a homeostase e/ou estimular a reparação da cartilagem. Dentre os principais fatores anabólicos encontram-se os fatores de crescimento (FC) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BPM) (Martel-Pelletier et al., 2008).

### **1.6.1. Fatores de crescimento (FC)**

As principais moléculas envolvidas na atividade anabólica da cartilagem articular são os FC. Eles são polipéptideos necessários para a síntese e manutenção de uma MEC capaz de proteger a cartilagem contra os danos ocasionadas pelo movimento repetitivo da articulação, por lesões ou por processos inflamatórios. Embora sejam denominados fatores de crescimento, alguns deles são capazes de induzir um processo degradativo e são responsáveis por parte do processo catabólico que ocorre na OA (Martel-Pelletier et al., 2008).

Existe uma grande variedade de FC envolvidos no desenvolvimento e proliferação da cartilagem articular. Os mais destacados no contexto da formação e manutenção da cartilagem incluem o TGF- $\beta$ , o IGF, as BMP's, as proteínas morfogenéticas derivadas da cartilagem (CDMP's), o fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF), o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF) (Martel-Pelletier et al., 2008).

- **Super família do TGF- $\beta$**

O TGF- $\beta$  é um fator de crescimento multifuncional que regula a proliferação celular e a síntese da MEC. A cartilagem articular contém normalmente TGF- $\beta$  armazenado de forma latente e muito pouco TGF- $\beta$  ativo e tem sido encontrados níveis aumentados deste FC em cartilagem com OA. Este FC é capaz não só de aumentar a síntese de proteoglicanos, mas também de neutralizar a supressão da síntese de proteoglicanos mediada pela IL-1 $\beta$  e outros genes. Nos mamíferos, o efeito protetor do TGF- $\beta$  parece ser dependente da idade (Takahashi et al., 2005; Scharstuhl et al., 2002; Lum et al., 1996).

O TGF- $\beta$  possui propriedades pró e anti-inflamatórias. Embora tenha sido demonstrado em modelos animais que o TGF- $\beta$  induz inflamação sinovial, foi observado também que este FC pode agir limitando o avanço da artrite aguda e crônica. Devido a sua ação inibitória da produção de MMP-9 e MMP-1 sugere-se um papel protetor na destruição do tecido, enquanto seu papel como indutor da MMP-13 e das agreganases nos condrócitos sugere seu envolvimento na renovação de macromoléculas na cartilagem normal, embora isto possa aumentar os danos na cartilagem articular na presença da OA (Moulharat et al., 2004; Moldovan et al., 1997). O TGF- $\beta$  induz, adicionalmente, a formação de osteófitos.

- **Fator de crescimento similar à insulina (IGF)**

O IGF é um polipeptídeo que possui funções em diversos tecidos. O IGF-I é um fator homeostático que controla a síntese de matriz e a atividade mitótica. Está presente em baixas quantidades na cartilagem normal, mas é regulado na cartilagem com OA (Martel-Pelletier et al., 2008; Middleton e Tyler, 1992). No estudo de Madry et al., (2001) empregando transplante de condrócitos articulares humanos, observou-se que o IGF-I promove a síntese de proteoglicanos e induz a formação de novas camadas de tecido contendo colágeno tipo II e proteoglicanos. O transplante também aumentou a síntese de DNA e a síntese de glicosaminoglicanos pelos condrócitos da cartilagem subjacente ao transplante. Foi observado também em cultura de condrócitos humanos que o IGF protegeu a cartilagem articular de danos estruturais diminuindo os níveis de MMP's e aumentando os níveis do inibidor tecidual das metaloproteinases (TIMP) na cartilagem (Rogachefsky et al., 1994).

Na OA, os condrócitos tem menor capacidade de resposta ao efeito do IGF devido ao alto nível de produção de proteínas ligantes do IGF. Estas moléculas formam um complexo com o IGF prevenindo a sinalização e sua atividade anabólica (Martel-Pelletier et al., 2008; Tardif et al., 1996).

- **Fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF)**

Tem sido reportado que este fator de crescimento estimula a expressão genética de agreganos e dos colágenos tipo II e X em culturas de condrócitos. O CTGF é secretado principalmente pelos condrócitos hipertróficos e regulam a proliferação e diferenciação destas células (Fukui et al., 2003; Nishida et al., 2002; Nakanishi et al., 2000).

- **Fator de crescimento hepatócito (HGF)**

O HGF é uma molécula multifuncional e induz a proliferação celular, mobilidade e morfogênese. É encontrado na zona profunda da cartilagem articular normal e seus níveis encontram-se aumentados na cartilagem acometida pela OA. Esse fator de crescimento pode ser produzido também pelos osteoblastos da placa óssea subcondral, que sintetizam aproximadamente cinco vezes mais os níveis desse FC durante o desenvolvimento da OA (Guévremont et al., 2003).

Embora o papel exato do HGF e de suas isoformas ainda não esteja completamente esclarecido, tem sido sugerido que este FC possui um papel na homeostase da cartilagem articular e na reparação durante as etapas iniciais da OA. Contudo, o HGF pode induzir a síntese de MMP-13, uma enzima presente na cartilagem acometida pela OA (Reboul et al., 2001).

- **Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)**

Existem vários tipos deste FC, mas o mais estudado é o FGF- $\beta$  que estimula a síntese de colágeno e GAG e atua como potente mitogênico para os condrócitos. Recentemente foi descoberto que o FGF-9 e o FGF-18 aumentam a síntese da matriz através dos condrócitos e promovem a reparação da cartilagem em ratos acometidos pela OA causada pela ruptura dos meniscos. (Moore et al., 2005; Au et al., 2004).

### **1.6.2. Proteína morfogenética ósea (BMP)**

As BMPs pertencem à família do fator de crescimento transformador (TGF-) que possui a capacidade de inibir ou estimular algumas células dependendo do estágio de diferenciação celular (Wozney et al., 1990). São conhecidos nove tipos de BMPs (2-9 e a 13) que são responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea (Dos Santos et al., 2005; Sommernan et al., 1983).

As BMPs são moléculas pleiotrópicas que estão envolvidas na quimiotaxia, mitose e diferenciação de células mesenquimais no tecido ósseo. Estas proteínas também atuam na reparação do tecido ósseo lesionado e promovem a síntese de matriz e o crescimento dos condrócitos (Dos Santos et al., 2005).

Algumas BMPs são expressas em baixas quantidades nos mamíferos e acredita-se que desenvolvam um papel fundamental na reparação e manutenção da cartilagem articular, particularmente a BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9 e a BMP-13, melhorando a síntese de colágeno tipo II e agrecanos. A BMP-2, A BMP-6 e a BMP-7 tem sido encontrada na cartilagem saudável e na cartilagem acometida pela OA em níveis similares, exceto a BMP-2, que tem os níveis aumentados durante a OA (Fukui et al., 2003).

Estas proteínas são encontradas em alta concentração no tecido ósseo e têm sido consideradas responsáveis pela habilidade indutiva e regenerativa quando usada juntamente com enxertos ósseos desmineralizados em terapia periodontal (Bowers e Reddi, 1992).

Nakashima (1990) avaliou o efeito da implantação de algumas BMPs sobre polpas dentárias de cães e verificou que estas proteínas estimularam a mitose de células mesenquimais e induziram a diferenciação de osteodentinócitos.

O estudo de Graves e Cochran (1994) descreve a família dos cinco fatores de crescimento com potencial para induzir regeneração periodontal, quando em contato com osteoblastos e células do ligamento periodontal *in vitro* e *in vivo*. Foram incluídos o PDGF, o FGF, o TGF- $\beta$ , o IGF e as proteínas ósseas morfogenéticas. Os autores relataram ainda a existência das BMP-4, BMP-5, BMP-6 e BMP-7. A BMP-2 e a BMP-7 estimulam a síntese de moléculas dos membros da família do TGF- $\beta$ .

A BMP-2 melhora a síntese de proteoglicanos, porém seu efeito estimulante é diminuído na presença da IL-1. Tem sido relatado que a BMP-7 neutraliza os efeitos das MMP-1 e MMP-13 induzido pela IL-1 $\beta$  (Van Beuningen et al., 1998). As BMP's induzem a formação de osteófitos, porém em locais diferentes daqueles onde atua o TGF- $\beta$ 1.

Tem sido descrita também a presença de antagonistas das BMPs na cartilagem articular, que bloqueiam a união das BMPs com seus receptores. Os principais antagonistas das BMPs incluem a folistatina e o gremlin que são expressos e produzidos na cartilagem adulta (Tardif et al., 2004; Tardif et al., 2006).

Estudos recentes têm demonstrado a presença de altos níveis de alguns antagonistas das BMPs na cartilagem acometida pela OA. Isto pode alterar a atividade das BMPs causando uma diminuição da atividade metabólica desta molécula afetando assim a reparação e remodelação do tecido (Tardif et al., 2004).

A folistatina parece ter um envolvimento mais forte com a fase inflamatória da OA e pode aparecer tardiamente no processo articular degenerativo, possivelmente induzida pela presença de citocinas envolvidas na inflamação e na OA acentuada (Martel-Pelletier et al., 2008).

## **1.7.Fatores catabólicos envolvidos na OA**

A matriz da cartilagem é renovada ao longo da vida, contudo acredita-se que os produtos da degradação da MEC podem em certo momento, ser catalizadores ou amplificadores do processo degradativo e induzir o desenvolvimento da OA. Alguns desses fatores catabólicos incluem as proteases, collagenases, citocinas inflamatórias, fibronectina, alguns neuromediadores e fatores inflamatórios que estão envolvidos no início e progressão da degradação tecidual (Martel-Pelletier et al, 2008).

### **1.7.1. Etiopatogenia da OA**

A OA é caracterizada pela degradação e perda da cartilagem articular, mudanças ósseas hipertróficas com formação de osteófitos, remodelação do osso subcondral e inflamação da membrana sinovial. As alterações na cartilagem osteoartrítica são numerosas e envolvem mudanças morfológicas e metabólicas nos condrócitos, assim como alterações estruturais e bioquímicas nas macromoléculas da MEC (Martel-Pelletier et al., 2008).

Sob condições normais, os condrócitos articulares mantêm um equilíbrio dinâmico entre a síntese e degradação dos componentes da MEC, incluindo o colágeno tipo II e os agreganos, proteoglicano mais abundante na cartilagem articular (Lee et al., 2013). Na OA, ocorre um desequilíbrio no metabolismo da MEC que conduz a perda progressiva do tecido cartilaginoso, expansão clonal de condrócitos nas regiões acometidas, indução de estados oxidativos num ambiente celular danificado e eventualmente à apoptose celular. Com a progressão da OA, há usualmente um incremento na degradação e na síntese das macromoléculas da MEC com

predomínio geral dos processos catabólicos sobre os anabólicos (Lee et al., 2013; Lane et al., 2011).

As MMPs são as principais enzimas envolvidas na OA e estão divididas em grupos de acordo com a especificidade do substrato e na localização celular. As principais são as collagenases, gelatinases, MMP de membrana e a adamalisina e seus grupos (ADAM e ADAMTS). Na OA a expressão e síntese das collagenases MMP-1, MMP-8 e MMP-13 encontram-se aumentadas (Martel-Pelletier et al., 2000).

A MMP-1 e a MMP-8 localizam-se predominantemente na camada superficial, enquanto a MMP-13 é encontrada nas camadas intermediárias e na profunda (zona profunda). É sugerido também que a MMP-1 tem ação durante a fase inflamatória e que a MMP-13 na fase de remodelação (Fernandes et al., 1998; Moldovan et al., 1997).

As MMP-s 3, 10 e 11 apresentam grande afinidade pelas moléculas de proteoglicanos, fibronectina, elastina e laminina. Na cartilagem articular a MMP mais amplamente expressada é a MMP-3 e acredita-se que esta desenvolve um papel fundamental na renovação da cartilagem. Na OA, esta MMP mostra-se aumentada na fase inicial e reduzida nas fases finais (Aigner et al., 2003).

As gelatinases (MMP-9 e MMP-2) encontradas no tecido articular, tem preferência pelo colágeno degradado e pelos colágenos tipo IV e V. A MMP-9 é encontrada na cartilagem acometida pela OA, mas não na cartilagem normal. Sua presença específica sugere que a MMP-9 seja responsável pela degradação progressiva da cartilagem articular. A expressão da MMP-2 também está aumentada na OA (Aigner et al., 2003; Mohtai et al., 1993).

As agrecanases (ADAM/ADAMTS) promovem o rompimento das moléculas de agrecanos e também da cartilagem articular. Algumas pesquisas têm demonstrado que as agrecanases são as enzimas predominantemente envolvidas no processo degradativo da cartilagem articular (Glasson et al., 2005; Stanton et al., 2005).

A alteração característica na OA é a degradação aumentada do colágeno tipo II. As collagenases se aderem às fibras do colágeno tipo II exclusivamente e as degradam. Diversos membros da família das MMP atuam em conjunto e são responsáveis pela degradação do colágeno, que conduz à fibrilação irreversível da cartilagem articular (Byers, 2001).

As alterações proteolíticas nas fibras de colágeno durante a fase inicial da OA contribuem para hipertrofia e excessiva hidratação da cartilagem articular, fazendo com que a rede de fibras de colágeno, enfraquecidas, não suporte os proteoglicanos envolvidos nela e nem as forças que atuam sobre a superfície articular. Todas as proteases envolvidas na degradação das fibras de colágeno podem ser expressas pelos condrócitos (Martel-Pelletier et al., 2008).

As principais collagenases conhecidas nos mamíferos são as metaloproteinases da matriz MMP-1, MMP-8 e MMP-13, sendo essa última específica para o colágeno tipo II. Os fragmentos de colágeno podem ser desnaturados adicionalmente pela ação das gelatinases (MMP-2 e MMP-9), que induz um lento processo de rompimento das fibrilas no centro da molécula de colágeno (Reboul et al., 1996).

Na OA, os agrecanos são provavelmente os primeiros constituintes da matriz da cartilagem a serem afetados e diminuem progressivamente com a gravidade da doença. Num certo estágio

da evolução da OA, os condrócitos são incapazes de compensar completamente a perda de proteoglicanos, mesmo com aumento na síntese, resultando em perda líquida de MEC. A estrutura dos proteoglicanos remanescentes na cartilagem pode ser alterada (Cs-Szabo et al., 1995; Malesud et al., 1995).

No processo degenerativo, algumas proteases são capazes de destruir os monómeros de proteoglicanos não agregados. A presença de agregados parece diminuir a vulnerabilidade dos mesmos ao ataque das enzimas. Os produtos da degradação dos proteoglicanos podem difundir para a cartilagem, diminuindo a capacidade de formar agregados. Alternativamente há uma redução no conteúdo de hialuronato na cartilagem com OA, que ocasiona uma diminuição no tamanho dos agregados de proteoglicanos (Malesud et al., 1995).

A OA está associada com o aumento na perda de fragmentos de agrecanos pela ação das MMPs e das agrecanases (Struglics et al., 2006). Nas fases iniciais, a MMP-3 é predominantemente expressa nas camadas intermediária e profunda da cartilagem, enquanto as agrecanases são expressas na superfície da cartilagem (Chambers et al., 2001; Fernandes et al., 1998; Moldovan et al., 1997).

A síntese de novos agrecanos ocorre na cartilagem afetada pela OA, aparentemente numa tentativa dos condrócitos para iniciar a reparação. Durante as fases iniciais da OA os agrecanos recentemente sintetizados formam agregados de proteoglicanos que são retidos na cartilagem, porém nas fases tardias eles são perdidos no LS (Lohmander et al., 1999).

Os agrecanos recém-formados tem uma composição similar à cartilagem juvenil, com diminuição de keratan sulfato e aumento na quantidade de condroitín sulfato 4 em relação ao condroitín sulfato 6. A perda de agrecanos tem lugar principalmente nas regiões mais superficiais da cartilagem. A taxa na qual a síntese e degradação de proteoglicanos ocorre, varia nas diferentes regiões da cartilagem como resultado das diferenças no estresse mecânico ao qual ela é submetida. Nas cartilagens acometidas pela OA, tem sido reportado também aumento nas quantidades dos versicanos e dos perlecanos (Hunter e Eckstein, 2011; Martel-Pelleter et al., 2008).

Durante o desenvolvimento da OA, as propriedades físicas da MEC são alteradas dando origem à perda do colágeno e dos agrecanos na cartilagem articular. As alterações no colágeno e nos agrecanos ocorrem não somente na OA, mas também ocorrem com o envelhecimento. Na medida que evoluem as alterações, a estrutura do colágeno torna-se mais rígida e frágil (Chen et al., 2002).

O acúmulo dos produtos finais da degradação da cartilagem interfere negativamente na capacidade da cartilagem para remodelar a MEC (Chen et al., 2002). A susceptibilidade do colágeno à degradação proteolítica das MMPs na cartilagem encontra-se alterada e as funções celulares dos condrócitos estão modificadas, causando diminuição na síntese de colágeno e proteoglicanos (DeGroot et al., 2001).

## **1.8.Fatores inflamatórios envolvidos na OA**

Existem evidências de que os mediadores inflamatórios secretados influenciam diretamente a homeostase da matriz das células do tecido articular, alterando seu metabolismo. Os fatores inflamatórios agem sobre os condrócitos alterando seu catabolismo e aumentando a produção

de proteases, citocinas e outros mediadores inflamatórios (Martel-Pelletier et al., 2008; Martel-Pelletier et al., 2000).

Dentre os mediadores inflamatórios responsáveis pela progressão da doença articular degenerativa cita-se a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  como o fator mais importante responsável pelo processo catabólico durante a OA. Outras citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- $\alpha$ , a IL-6, IL-7, IL-8, a IL-18 e o óxido nítrico também contribuem com a patogênese da OA.

### **1.8.1. Citocinas pró-inflamatórias**

Os efeitos catabólicos da IL-1 $\beta$  são variados. Essa citocina pode estimular sua própria produção, aumentar a síntese de enzimas degradativas como as proteases, inibir a síntese dos inibidores fisiológicos dessas enzimas, inibir a síntese dos elementos constituintes da matriz tais como o colágeno e os proteoglicanos e estimular a síntese e liberação de alguns eicosanóides (Martel-Pelletier et al., 2008).

A ação das citocinas pró-inflamatórias sobre os processos enzimáticos associada com a supressão na síntese da matriz, resultam em acentuada degradação dos tecidos articulares e o aparecimento dos sinais típicos da OA. Esta citocina, adicionalmente, desempenha um papel fundamental na fisiologia normal da cartilagem articular, incluindo o estímulo para a renovação da MEC. Este mecanismo é regulado pelo antagonista do receptor da IL-1 para limitar a ativação excessiva desta citocina e evitar as lesões teciduais potenciais (Martel-Pelletier et al., 2008).

A IL-6 está envolvida também em processos fisiológicos normais e patológicos. O TNF- $\alpha$  está presente em estágios avançados da doença promovendo a inflamação do tecido articular (Plater-Zyberk et al., 2001).

Dentre as outras citocinas, tem sido relatado que a IL-17 e a IL-18 desenvolvem um papel fundamental na patogênese da OA atuando de forma similar à IL-1. Nas células do tecido articular estas citocinas parecem estar envolvidas na fase inicial do processo inflamatório devido a sua presença aumentada na cartilagem articular e na membrana sinovial de articulações acometidas pela OA (Boileau et al., 2002).

### **1.8.2. Óxido nítrico**

O óxido nítrico atua como um mediador em vários processos fisiológicos e patológicos com efeitos reguladores, pró-inflamatórios e destrutivos. A cartilagem acometida pela OA produz grandes quantidades de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio. O óxido nítrico está diretamente envolvido na promoção do catabolismo da cartilagem articular através de diferentes mecanismos. Esta substância pode inibir a síntese das macromoléculas da matriz tais como os agreganos, além de aumentar a atividade das MMP. Adicionalmente tem sido demonstrado que o óxido nítrico regula a apoptose dos condrócitos e induz a síntese de ciclooxigenases e prostaglandinas (Notoya et al., 2000).

## **1.9. Interações moleculares na OA**

Dentre os principais fatores envolvidos na fisiopatologia da OA destacam os mecanismos inflamatórios, bioquímicos, o estresse, inadequadas respostas homeostáticas, controle da apoptose e do estresse celular. Estes fatores atuando por si só ou interagindo entre eles, são os

responsáveis pelas alterações degenerativas observadas durante as principais patologias que acometem a cartilagem articular (Sherwood et al., 2014).

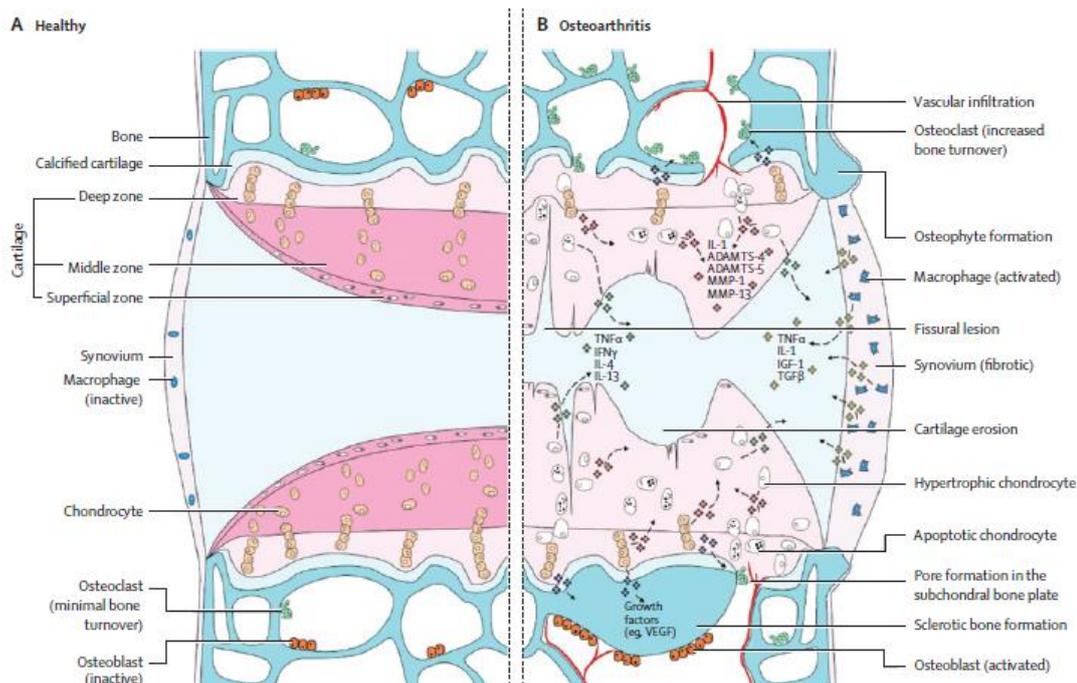
Embora todos estes fatores estejam relacionados entre si, a prevalência de um ou outro mecanismo em diferentes formas de lesões da cartilagem e em pacientes individuais determinará o sucesso das intervenções terapêuticas (Pelletier et al., 2013).

Tem sido proposto que a resposta diminuída dos condrócitos ao IGF durante a OA pode estar relacionada com a dessensibilização dos condrócitos à ação do IGF-I como consequência da ação da IL- $\beta$ 1, que suprime a sinalização das citocinas e inibe a sinalização do receptor para o IGF. Na OA a IL-6 em conjunto com a IL-1, a IL-7 e o TNF- $\alpha$  podem causar proteólise dos proteoglicanos e do colágeno, influenciados pela expressão de colagenases, MMP-3 e das agrecanases IGF (Smeets et al., 2006).

A complexa inter-relação entre os fatores mecânicos e os fatores biológicos influencia notavelmente a estrutura e função do tecido articular durante a OA. Cargas anormais sobre a articulação promove atividade celular anormal e excessiva hidratação do tecido. Adicionalmente, este excesso de carga pode estimular a remodelação do osso subcondral nas fases iniciais do processo degenerativo (Guilak, 2011).

Não somente a sobrecarga mecânica, mas também os componentes da síndrome metabólica estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da OA. A desregulação das citocinas inflamatórias derivadas do tecido adiposo, incluindo a IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , induzem a expressão de mediadores inflamatórios e de enzimas degradativas que inibem a síntese da MEC e estimulam a remodelação do osso subcondral (Findlay, 2007).

A interação entre os fatores genéticos, deficiências hormonais e o envelhecimento com os fatores mecânicos e inflamatórios, associados com a síndrome metabólica, podem proporcionar fenótipos específicos de OA com objetivos terapêuticos específicos e definidos. É necessário, portanto, conhecer a fisiopatologia da OA, para diferenciar qual o principal fator envolvido e promover uma abordagem de acordo com as interações que tem lugar e com o caso específico de cada paciente.



**Figura 6.** Mudanças fisiológicas e estruturais durante a OA. A: Articulação saudável. B: articulação com OA.

## 2. PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP) E SEU EFEITO NA OSTEOARTROSE (OA).

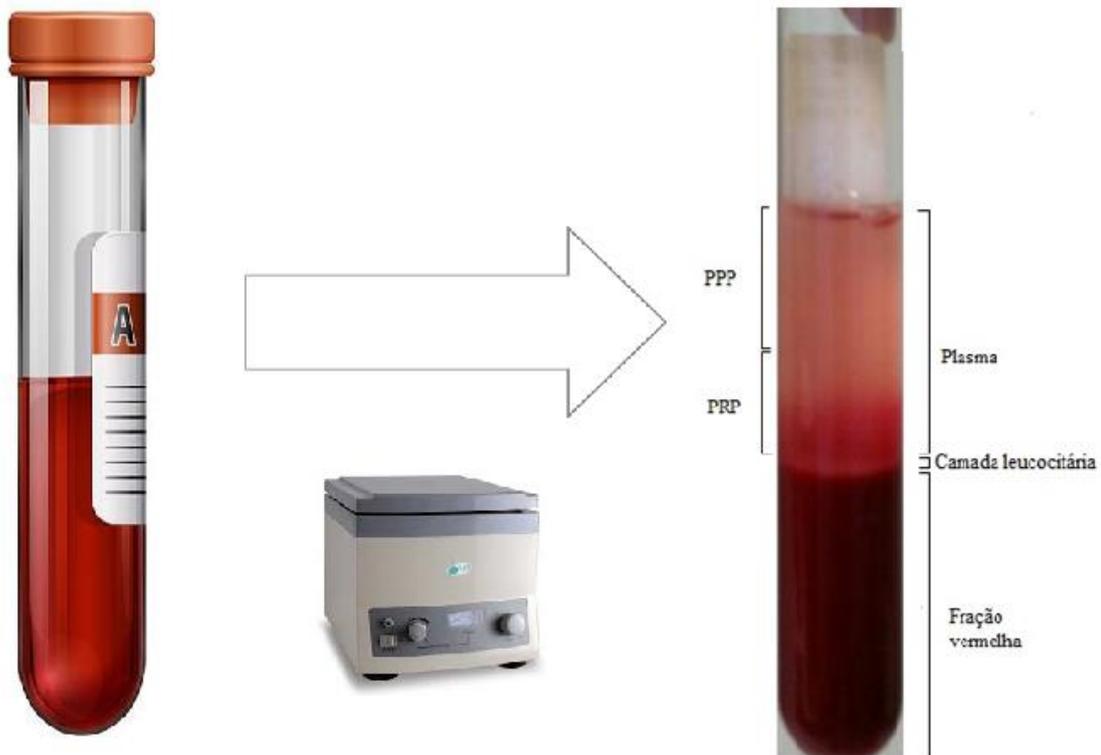
O concentrado de plaquetas é um produto autólogo com propriedades anti-inflamatórias e regenerativas que tem sido amplamente utilizado na medicina humana e na medicina veterinária. Embora existam extensos relatos sobre as propriedades benéficas desse composto biológico, ainda existem dúvidas sobre sua verdadeira ação sobre alguns tecidos e sobre seu efeito ao nível molecular (Anitua et al., 2005).

Algumas das principais substâncias estão contidas nos grânulos dentro das plaquetas e são liberadas depois de sua ativação. Uma vez no meio onde são liberados, os fatores de crescimento e demais citocinas anti e pró-inflamatórias interagem com as moléculas locais, modificando o curso do processo inflamatório e acelerando o processo de cicatrização (Textor, 2011).

Os efeitos benéficos têm sido relatados em diversas áreas incluindo a odontologia, as cirurgias estéticas, no tratamento de feridas contaminadas ou de difícil cicatrização e inclusive na área ortopédica humana e veterinária. Por ser de baixo custo e ter uma elevada segurança para o paciente, o PRP é amplamente utilizado na rotina hospitalar como substituto e coadjuvante nos tratamentos atualmente disponíveis (Yamaguchi et al., 2012).

### 2.1. O que são o PRP e o CAP e como funcionam?

O PRP/CAP são uma fração de plasma obtida de sangue autólogo que possui concentração de plaquetas três a cinco (PRP) e uma a duas (CAP) vezes superior aos níveis basais do sangue total e são considerados como uma fonte natural de fatores de crescimento (Figura 7) (Kon et al., 2012; Jo et al., 2012; Rodriguez et al., 2012).



**Figura 7.** Protocolo de obtenção do Concentrado Autólogo de Plaquetas.

Este produto é utilizado para favorecer o processo de reparação de feridas e lesões em diferentes tecidos como o cutâneo, musculoesquelético, intestinal, dentre outros (Boswell et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012) e proporcionar uma MEC com capacidade de prover um desempenho mecânico e funcional dos tecidos saudáveis (Wasterlain et al., 2012).

O mecanismo de ação do PRP está fundamentado na quantidade de plaquetas concentradas que são aplicadas diretamente sobre os tecidos lesados (Silva et al., 2012; Wasterlain et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012), modulando os processos cicatriciais através dos fatores de crescimento e outras substâncias presentes nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas, que após sua liberação, iniciam e mantêm o processo de regeneração tecidual (Textor, 2011; Mishra et al., 2009).

Este produto, obtido a partir do próprio sangue do paciente, caracteriza-se por possuir altas concentrações de plaquetas (e conseqüentemente de fatores de crescimento) e permitir a regulação e modulação dos processos fisiológicos de cicatrização, estimulando regeneração tecidual (recuperação da estrutura e a função) e não cicatrização normal, onde há formação de tecido fibroso sem função.

## **2.2. Fisiologia das plaquetas e sua importância no processo de cicatrização**

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos derivados dos megacariócitos da medula óssea, cujo diâmetro varia de 1 a 3  $\mu\text{m}$  nos cães e de 2 a 6  $\mu\text{m}$  nos gatos, com uma vida média entre 6 a 10 dias. São células multifuncionais e atuam em vários processos fisiológicos como homeostase, manutenção e regulação do tônus vascular, formação e retração do coágulo (Boudreaux et al., 2010; Harrison, 2005; Wilkerson et al., 2001).

Esses fragmentos citoplasmáticos modulam a homeostase, a reparação de feridas e o início da cicatrização tecidual, uma vez que contêm fatores de crescimento, citocinas e mediadores

inflamatórios. Estes agem produzindo quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, neovascularização, angiogênese e deposição de matriz extracelular (MEC), além de influenciar a resposta imune (Silva et al., 2013a; Silva et al., 2012; Carrasco et al., 2009).

Após a injúria tecidual, as plaquetas chegam ao local e entram em contato com o colágeno e o fator de Von Willebrand expostos na MEC, o que produz ativação das mesmas com consequente liberação de substâncias que aumentam a agregação plaquetária e a ativação das vias de coagulação para a formação do coágulo de fibrina. Desta forma exercem suas funções na coagulação e no processo de cicatrização (Boswell et al., 2012; Iacopetti et al., 2012; Blair e Flaumenhaft, 2009).

As plaquetas contêm no seu interior, uma variedade de grânulos encarregados de secretar diferentes moléculas após ativadas. Os principais grânulos são os lisossomais, os grânulos densos e os grânulos  $\alpha$ , que exercem uma função diferente durante o período de reparação das feridas. As principais moléculas secretadas pelos grânulos, após a ativação, são os fatores de crescimento (PDGF, TGF- $\beta$ , IGF, FGF, EGF, VEGF), citocinas, fator de von Willebrand, serotonina, fator V, XI e XIII, fibrinogênio, ATP, fibronectina, dentre outros que exercem diferentes funções no processo de cicatrização (Gobbi e Vitale, 2012; Intini, 2009).

Após a injúria do tecido a membrana celular libera tromboxanos e prostaglandinas  $2\alpha$ , promovendo vasoconstrição inicial (Broughton et al., 2006a). Posteriormente, as plaquetas são ativadas pela exposição às proteínas da MEC como colágeno, fator de Von Willebrand e fibronectinas dentre outras (Smith e Roukis, 2009), fazendo com que se inicie a agregação plaquetária e a formação inicial de um trombo (Broughton et al., 2006b). Este processo chamado ativação, inclui mudanças na morfologia da plaqueta e a liberação do conteúdo dos grânulos, cujas substâncias liberadas potencializam a ativação plaquetária (Diegelmann e Evans, 2004).

Durante a fase de ativação, os grânulos  $\alpha$  unem-se à membrana da plaqueta para liberar os fatores de crescimento, as citocinas e quimosinas que auxiliam na migração e crescimento celular. Este processo se inicia nos primeiros dez minutos após a ativação e termina aproximadamente uma hora depois (Diegelmann e Evans, 2004; Marx, 2004). A progressão da coagulação sanguínea continua com a formação de trombina e fibrina, através das vias intrínsecas e extrínsecas ao redor do tampão plaquetário inicial. As interações finais entre os fatores e enzimas envolvidos no processo terminam com a formação de um coágulo estável que atua como um suporte para adesão de outras células e citocinas que regulam o processo de cicatrização (Smith e Roukis, 2009).

### **2.3. PRP/CAP e fatores de crescimento**

Os preparados de PRP/CAP possuem alta concentração de fatores de crescimento que desempenham uma função fundamental durante o processo de cicatrização. Os fatores de crescimento, mediadores anti e pró-inflamatórios, fibrina e outras substâncias são capazes de influenciar o meio onde são aplicadas, produzem mitose celular, recrutamento de outras células, proliferação e diferenciação celular, síntese de proteínas da MEC e substâncias que promovem a angiogênese e a vascularização (Anitua et al., 2012; Iacopetti et al., 2012).

A alta concentração de plaquetas ativadas contidas nos preparados de plaquetas garante uma grande concentração de fatores de crescimento liberados nos locais onde há alguma injúria ou inflamação, permitindo a modulação do processo cicatricial (Anitua et al., 2005).

Dentre os principais fatores de crescimento liberados dos grânulos  $\alpha$  encontram-se o TGF- $\beta$ , o PDGF, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento insulínico (IFG), fator de crescimento epidérmico (EGF), dentre outros. Esses fatores de crescimento têm várias funções e atuam em conjunto com as citocinas e as outras moléculas pro-inflamatórias para regenerar os tecidos (Iacopetti et al., 2012; Lee et al., 2012).

**PDGF:** é o primeiro fator de crescimento presente na ferida. Inicia a reparação do tecido conectivo e suas principais funções incluem a mitogênese de células como os neutrófilos, monócitos e fibroblastos que atuam na reparação tecidual, angiogênese das células endoteliais dos capilares e ativação dos macrófagos (Hakimi et al., 2010; Smith e Roukis, 2009). Atua como quimiotático e induz a proliferação celular, promove adicionalmente, a expressão da MMP-1 na fase final da remodelação (Carmona et al., 2011; Theoret, 2005).

**TGF- $\beta$ :** promove a proliferação, migração celular e síntese de proteínas da MEC como o colágeno (Hakimi et al., 2010; Anitua et al., 2005), além de produzir mitogênese e quimiotaxia de osteoblastos e inibe a atividade dos osteoclastos (Bennett e Schultz, 1993). Este fator de crescimento diminui a expressão de MMPs e promove a síntese do FGF e a angiogênese. Estimula a proliferação celular e a síntese de MEC (Carmona et al., 2011).

**IGF:** produz proliferação celular que estimula a síntese de proteínas da MEC, tem efeitos quimiotáticos e mitogênicos (Goh et al., 2003; Bennett e Schultz, 1993), aumenta a síntese de colágeno tipos I e III.

**VEGF, FGF:** Produzem quimiotaxia e estimulam a mitogênese de células endoteliais e vasculares, promovendo a angiogênese e a vascularização (Intini, 2009; Smith e Roukis, 2009). O FGF é uma potente proteína angiogênica e reguladora da síntese da MEC, inibindo a síntese de colágeno tipo I (Carmona et al., 2011). O VGF promove a vascularização dos tecidos lesionados e facilita a chegada de células inflamatórias e reparadoras, adicionalmente estimula a proliferação das células do endotélio vascular (Theoret, 2005).

**EGF:** estimula a migração quimiotática de células epiteliais ao mesmo tempo que estimula a mitose dessas células (Bennett e Schultz, 1993), estimula a proliferação celular (Goh et al., 2003) e a síntese da MEC (Kang e Kang, 1999). Esse fator de crescimento é altamente expressado na margem das feridas e promove a reepitelialização. Induz a expressão da MMP-1 e regula a síntese de colágeno tipo I (Calvin, 1998).

O gluconato de cálcio à 10% é utilizado para ativar o PRP/CAP. Este produto possui altos níveis de cálcio aumentando a presença deste no citosol e conseqüentemente, aumentando a resposta plaquetária que é diretamente dependente do cálcio. Essas respostas são ativação da integrina, liberação de uma segunda onda de mediadores, ADP e tromboxano A<sub>2</sub> e a expressão da atividade procoagulante das plaquetas, principalmente pela geração de trombina (Silva et al., 2012; Bergmeier e Stefanini, 2009).

É importante considerar que diferentes fatores podem influenciar a qualidade do PRP/CAP e a quantidade de plaquetas concentradas mediante os diferentes métodos. Dentre esses fatores tem-se: a fração colhida após a centrifugação, a força e o tempo de centrifugação, o produto empregado para ativar as plaquetas e o conteúdo de leucócitos (Silva et al., 2013a; Tiwari e Bhargava, 2013).

## 2.4. PRP/CAP e suas aplicações na área ortopédica e nos tecidos articulares em animais

Assim como na medicina humana, existem inúmeros relatos do uso do PRP/CAP nas mais diversas áreas da medicina veterinária. Aplicações intra-articulares de PRP para avaliar o seu efeito na OA na articulação FTP tem demonstrado seu efeito benéfico, principalmente para tratar lesões condrais profundas (Chang et al., 2014). Pesquisas tem demonstrado o efeito benéfico do PRP/CAP quando utilizado no tratamento de lesões cutâneas contaminadas e de difícil cicatrização em cães (Kim et al., 2009) e equinos (López e Carmona, 2014; Iacopetti et al., 2012), em lesões do sistema musculoesquelético de cavalos (Carmona e López., 2011; Textor, 2011) e como adjuvante no tratamento de lesões articulares em pequenos animais (Silva et al., 2013b; Xie et al., 2013b).

O uso do PRP/CAP associado com células mononucleadas da medula óssea fresca em equinos atletas afetados com lesões musculoesqueléticas causadas pelo desgaste (desmopatia do ligamento suspensório e tendinopatia do flexor superficial) e refratários a outras terapias mostrou melhora significativa no grau de claudicação e 84% dos animais (11 de 13) conseguiram voltar às competições (Torricelli et al., 2011).

Recentemente têm sido desenvolvidos diversas pesquisas em equinos para avaliar o efeito do concentrado de plaquetas no tratamento da OA. Um destes estudos, relatou a aplicação de CAP em quatro cavalos afetados com OA em diferentes articulações. Os autores obtiveram resultados favoráveis com melhora significativa no grau de claudicação e efusão articular por mais de oito meses após a aplicação (Carmona et al., 2009).

A pesquisa de Abellanet (2009) avaliou o efeito clínico da injeção intra-articular de CAP em 30 cavalos acometidos pela OA. Foi observado melhora clínica significativa em 75% dos cavalos tratados em comparação com o grupo de 12 cavalos que não receberam tratamento. A percentagem de recidiva nessa pesquisa foi de 30%, considerando que os cavalos que apresentaram sintomas novamente mostravam alterações radiográficas acentuadas, com fragmentos ósseos livres maiores de 4 mm.

Foi descrito um modelo experimental em cães avaliando se o uso do PRP afetava os padrões da expressão genética do processo de ligamentização do auto-enxerto utilizado para reparar a ruptura do ligamento cruzado cranial. No grupo que recebeu o PRP observou-se um aumento nos níveis do RNAm do colágeno tipo I e tipo III, dos biglicanos, das MMP-1 e 13 e do TGF- $\beta$ 1 às duas, seis e 12 semanas depois do tratamento em relação aos grupos que não receberam o PRP. Os resultados demonstram que o PRP altera a expressão de alguns genes específicos em certos momentos de tempo, especialmente durante as etapas iniciais do processo de remodelação, que pode explicar o efeito favorável do PRP no processo de maturação do auto-enxerto (Xie et al., 2013a).

Murray et al. (2006) utilizaram uma matriz de colágeno associado ao PRP para tratar um defeito central no ligamento cruzado cranial de cães. Foi avaliada a resposta histológica dos grupos tratados e não tratados às três e seis semanas e foram realizados testes biomecânicos às seis semanas após o tratamento. Os autores observaram que a percentagem de preenchimento dos defeitos foi significativamente maior no grupo que recebeu o tratamento em relação ao grupo controle. Biomecanicamente, os defeitos do ligamento tratados com as matrizes de colágeno com PRP tiveram um aumento de 40% na força seis semanas após o tratamento em relação ao grupo não tratado. Os autores concluíram que o tratamento com o PRP em associação com as matrizes de colágeno estimula a cicatrização do LCCr observado histologicamente.

Os fatores de crescimento são as principais moléculas envolvidas no processo de cicatrização e têm sido usados como terapia de doenças ortopédicas. Lee et al (2001) injetaram fibroblastos expressando TGF- $\beta$ 1 ativo na articulação FTP de coelhos com defeitos experimentais na cartilagem articular para avaliar o efeito do TGF- $\beta$ 1 sobre a regeneração da cartilagem. Os autores observaram duas a três semanas após a injeção evidências de regeneração da cartilagem e, às quatro e seis semanas o defeito da cartilagem estava completamente preenchido com cartilagem hialina recém produzida.

Devido à importância das lesões da cartilagem articular e seu impacto sobre a saúde geral, pesquisas avaliando possíveis tratamentos são desenvolvidas constantemente. Kazemi e Fakhrjou (2015) avaliaram a eficácia de dois tipos diferentes de concentrados de plaquetas no tratamento de lesões agudas da cartilagem articular da articulação FTP de cães. Os autores observaram diferenças estatisticamente significativas nos *scores* macro e microscópicos quando comparados os grupos que receberam os concentrados de plaquetas e o grupo controle, concluindo assim que os concentrados plaquetários podem ser usados para promover efetivamente reparação da cartilagem articular.

O efeito do PRP não só foi testado em problemas envolvendo as articulações, mas também foi avaliado para comprovar seu efeito na regeneração óssea em cães. Foram criados defeitos bilaterais na mandíbula de cães que foram preenchidos com auto-enxerto de osso córtico-esponjoso da crista ilíaca e tratados ou não com PRP. Foi observado que o grupo que não recebeu o PRP teve, radiograficamente, o osso mais denso que o grupo que recebeu o PRP nos primeiros dois meses. Na análise histomorfométrica foi observado que houve, significativamente, menos osso enxertado e mais osso recém-formado no grupo que recebeu o PRP nos primeiros dois meses, concluindo que o tratamento melhorou, aparentemente, a regeneração do enxerto autólogo nas fases iniciais (Gerard et al., 2006).

Além dos resultados das pesquisas clínicas em equinos e caninos, o CAP/PRP tem sido avaliado também em coelhos para comprovar seu efeito nas diferentes alterações do sistema musculoesquelético. Rezende et al. (2016) avaliaram artroscopicamente o efeito do CAP no tratamento da OA induzida em 14 coelhos submetidos à ruptura e reparação do LCCr guiada por vídeo artroscopia. Após a reparação do LCCr foi injetado por via intra-articular, CAP ou solução Ringer Lactato segundo o grupo de estudo. Os pesquisadores observaram que os coelhos tratados com o CAP apresentaram diminuição da sinovite, cápsula sinovial mais lisa, menor grau de vascularização, menor grau de hipertrofia das vilosidades, cartilagem articular lisa e menor evidência de fibrilação. Os coelhos tratados com o CAP apresentaram também articulação menos dolorosa durante a deambulação e a manipulação.

Saito et al (2009) avaliaram também o efeito da aplicação intra-articular de PRP com microesferas de hidrogel de gelatina na progressão da OA na articulação FTP em coelhos. Foram cultivados condrócitos de coelhos adultos para avaliar a síntese de GAG em presença ou não do PRP *in vitro*. Para avaliar o efeito *in vivo* do PRP, foi quantificada a expressão gênica da matriz da cartilagem nos coelhos previamente submetidos à ruptura do LCCr. Os autores observaram que *in vitro* o PRP estimulou significativamente a síntese de GAG e *in vivo* foi observado um aumento na expressão do mRNA de proteoglicanos na cartilagem articular após a aplicação das microesferas de hidrogel de gelatina. Concluiu-se após avaliação morfológica e histopatológica que a administração intra-articular de microesferas de hidrogel de gelatina contendo PRP diminuiu significativamente a progressão da OA nos coelhos.

Embora existam numerosos relatos sobre o efeito clínico benéfico do CAP/PRP ainda há incertezas em relação ao uso desse composto biológico para tratar alterações da cartilagem e do osso. Sem dúvida o efeito clínico benéfico é influenciado pela variabilidade na composição e qualidade do produto. Fatores como a concentração das plaquetas, a fração colhida de plasma, o produto de ativação das plaquetas, o protocolo usado, raça, idade, sexo, estado fisiológico, dentre outros, determinam a resposta clínica ao tratamento (Ornetti et al., 2016; Zhu et al., 2013).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELLANET, I. *La terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencia clínica y bioquímica que valida su utilización*. 2009. Tesis de Doctorado, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

AIGNER, T.; ZIEN, A.; HANISCH, D. *et al.* Gene expression in chondrocytes assessed with use of microarrays. *J Bone Joint Surg.* v. 85-A, (Suppl. 2), p. 117-123. 2003.

ANITUA, E.; PRADO, R.; SANCHEZ, M. *et al.* Platelet-rich plasma: Preparation and formulation. *Oper Tech Orthop.* v. 22, p. 25-32. 2012.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; SANCHEZ, M. *et al.* Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* v. 23, p. 281-286. 2005.

ARNOCZKY, S.P.; WARREN, R.F. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med.* v.10, p. 90-95. 1982.

AU, A.; POLOTSKY, A.; KRZYMINSKI, K. *et al.* Evaluation of thermoreversible polymers containing fibroblast growth factor 9 (FGF-9) for chondrocyte culture. *J Biomed Mater Res A.* v. 69, p. 367-372. 2004.

BENNETT, D. What is osteoarthritis and what can we expect from our treatments? In: *Proceedings of the Recent Advances in Non-Steroidal Anti-Inflammatory Therapy in Small Animals Symposium*, Paris, France, June, pp. 41–50. 1999.

BENNETT, N.T.; SCHULTZ, G.S. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg.* v. 166, p. 74-81. 1993.

BERGMEIER, W.; STEFANINI, L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* v. 7 (S1), p. 187–190. 2009.

BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* v. 23, p. 177-189. 2009.

BOILEAU, C.; MARTEL-PELLETIER, J.; MOLDOVAN, F. *et al.* The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1- converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide. *Arthritis Rheum.* v. 46, p. 2637-2647. 2002.

BONDESON, J.; BLOM, A.B.; WAINWRIGHT, S. *et al.* The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* v. 62, p. 647-657. 2010.

BOSWELL, S.G; COLE, B.J; SUNDMAN, E.A. *et al.* Platelet-rich plasma: A milieu of bioactive factors. *Arthroscopy.* v. 28, n. 3, p. 429-439. 2012.

- BOUDREAUX, M.; OSBORNE, C.D.; HERRE, A.C. et al. Unique structure of the M loop region of  $\beta$ -tubulin may contribute to size variability of platelets in the family Felidae. *Vet Clin Pathol.* v. 39, n. 4, p. 417-423. 2010.
- BOWERS, G.M.; REDDI, A.H. Regeneration of the periodontium in advanced periodontal disease. *J Am Dent Assoc.* v. 122, p. 45-48. 1992.
- BROSSI, P.M.; MOREIRA, J.J.; MACHADO, S.L. et al. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Vet Res.* v. 11, p. 98-115, 2015.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: An overview. *Plast Reconstr Surg.* v. 117, p. 1e-S - 32e-S. 2006a.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The Basic Science of Wound Healing. *Plast Reconstr Surg.* v. 117, p. 12S-34S. 2006b.
- BYERS, P.H. Folding defects in fibrillar collagens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* v. 356, p. 151-157. 2001.
- CALDWELL Jr, G.L.; ALLEN, A.A.; FU, F.H. Functional anatomy and biomechanics of the meniscus. *Oper Tech Sports Med.* v. 2, n. 3, p. 152-163. 1994.
- CALVIN, M. Cutaneous wound repair. *Wounds.* v. 10, p. 12-32. 1998.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; PRADES, M. Use of autologous platelet concentrates obtained by the tube method as a treatment for arthropathies in horses. *Arch Med Vet.* v. 41, p. 175-179. 2009.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C. Autologous platelet concentrates as a treatment for shoulder injury in a horse. *J Equine Vet Sci.* v. 31, p. 506-510. 2011.
- CARMONA, J.U.; LÓPEZ, C.; GIRALDO, C.E. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Arch Med Vet.* v. 43, p. 1-10. 2011.
- CARRASCO, J.; BONETE, D.; GOMAR, F. Plasma rico en plaquetas vs. Plasma rico en factores de crecimiento. *Rev Esp Cir Osteoart.* v. 46, n. 239, p. 127-140. 2009.
- CHAMBERS, M.G.; COX, L.; CHONG, L. et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanases cleave aggrecan in different zones of normal cartilage but colocalize in the development of osteoarthritic lesions in STR/ort mice. *Arthritis Rheum.* v. 44, p. 1455-1465. 2001.
- CHANG, K.V.; HUNG, C.Y.; ALIWARGA, F. et al. Comparative effectiveness of platelet-rich plasma injections for treating knee joint cartilage degenerative pathology: A systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* v. 95, p. 562-575. 2014.
- CHEN, A.C.; TEMPLE, M.M.; NG, D.M. et al. Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of articular cartilage. *Arthritis Rheum.* v. 46, p. 3212-3217. 2002.

- CHO, H.; PINKHASSIK, E.; DAVID, V. et al. Detection of early cartilage damage using targeted nanosomes in a post-traumatic osteoarthritis mouse model. *Nanomed-nanotechnol.* v. 11, p. 939-946. 2015.
- CS-SZABO, G.; ROUGHLEY, P.J.; PLAAS, A.H. et al. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.* v. 38, p. 660-668. 1995.
- CUELLAR, V.G.; CUELLAR, J.M.; GOLISH, R. et al. Cytokine Profiling in Acute Anterior Cruciate Ligament Injury. *Arthroscopy.* v. 26, n. 10, p. 1296-1301. 2010.
- DAHLGREN, L. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. *Clin Tech Equine Pract.* v. 6, p. 168-173. 2007.
- DE BRUIN, T.; DE ROOSTER, H.; VAN BREE, H. et al. Interleukin-8 mRNA expression in synovial fluid of canine stifle joints with osteoarthritis. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 108, p. 387-397. 2005.
- DeGROOT, J.; VERZIIL, N.; WENTING-VAN, M.J. et al. Age-related decrease in susceptibility of human articular cartilage to matrix metalloproteinase-mediated degradation: the role of advanced glycation end products. *Arthritis Rheum.* v. 1, n. 44, p. 2562-2571. 2001.
- DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* v. 9, p. 283-289. 2004.
- EYRE, D.R.; WEIS, M.A.; WU, J.J. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?. *Eur Cell Mater.* v. 12, p. 57-63. 2006.
- FERNANDES, J.C.; MARTEL-PELLETIER, J.; LASCAU-COMAN, V. et al. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in early experimental osteoarthritic canine cartilage. An immunohistochemical study. *J. Rheumatol.* v. 25, p. 1585-1594. 1998.
- FINDLAY, F.M. Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatology.* v. 46, p. 1763-1768. 2007.
- FUKUI, N.; ZHU, Y.; MALONEY, W.J. et al. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg.* v. 85-A (Suppl. 3), p. 59-66. 2003.
- GARDNER, K.; ARNOCKY, S.P.; CABALLERO, O. et al: The effect of stress-deprivation and exercise on the ratio of TIMP/MMP mRNA expression in tendons: an in-vitro experimental study. *Disabil Rehabil.* v. 30, p. 20-22. 2008.
- GERARD, D.; CARLSON, E.R.; GOTCHER, J.E. et al. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* v. 64, p. 443-451. 2006.
- GLASSON, S.S.; ASKEW, R.; SHEPPARD, B. et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* v. 434, p. 644-648. 2005.

GOBBI, G.; VITALE, M. Platelet-rich plasma preparations for biological therapy: Applications and limits. *Oper Tech Orthop.* v. 22, p. 10-15. 2012.

GOH, J.C.; OUYANG, H.W.; TEOH, S.H. et al. Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Eng.* v. 9, n. 1, p. S31–S44. 2003.

GOODSHIP, A.E.; BIRCH, H.L.; WILSON, A.M. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *Vet Clin North Am Equine Pract.* V. 10, p. 323-349. 1994.

GUÉVREMONT, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; MASSICOTTE, F. et al. Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HGF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. *J Bone Miner Res.* v. 18, p. 1073-1081. 2003.

GUILAK, F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin.Rheumatol.* v. 25, p. 815-823. 2011.

HAKIMI, M.; JUNGBLUTH, P.; SAGER, G. et al. Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. *Injury.* v. 41, p. 717-723. 2010.

HARRISON, P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* v. 19, p. 111-123. 2005.

HOLMES, M.W.; BAYLISS, M.T.; MUIR, H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem J.* v. 250, p. 435-441. 1998.

HUANG, P.H.; WANG, C.J.; CHOU, W.J. et al. Short-term clinical results of intra-articular PRP injections for early osteoarthritis of the knee. *Int J Surg.* v. 42, p. 117-122. 2017.

HUI, A.Y.; McCARTY, W.J.; MASUDA, K. et al. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Interdiscip Rev Syst Biol Med.* v. 4, n. 1, p. 15-37. 2012.

HUNTER, D.J.; ECKSTEIN, F. From joint anatomy to clinical outcomes in osteoarthritis and cartilage repair: summary of the fifth annual osteoarthritis imaging workshop. *Osteoarthr Cartil.* v. 19, p. 1263-1269. 2011.

IACOPETTI, I.; PERAZZI, A.; FERRARI, V. et al. Application of platelet-rich gel to enhance wound healing in the horse: A case report. *J Equine Vet Sci.* v. 32, p. 123-128. 2012.

INTINI, G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials.* v. 30, p. 4956- 4966. 2009.

ISHIJIMA, M.; WATARI, T.; NAITO, K. et al. Relationships between biomarkers of cartilage, bone, synovial metabolism and knee pain provide insights into the origins of pain in early knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* v. 13, n. 1, R22. 2011.

JO, C.H.; KIM, J.E.; YOON, K.S. et al. Platelet-rich plasma stimulates cell proliferation and enhances matrix gene expression and synthesis in tenocytes from human rotator cuff tendons with degenerative tears. *Am J Sports Med.* v. 40, n. 5, p. 1035-1045. 2012.

- KANG, H.J.; KANG, E.S. Ideal concentration of growth factors in rabbit's flexor tendon culture. *Yonsei Med J.* v. 40, n. 1, p. 26-29. 1999.
- KAMBIC, H.E.; McDEVITT, C.A. Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus. *J Orthop Res.* v. 23, p.142-149. 2005.
- KAZEMI, D.; FAKHRJOU, A. Leukocyte and platelet rich plasma (L-PRP) versus leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) for articular cartilage repair of the knee: A comparative evaluation in an animal model. *Iran Red Crescent Med J.* v. 17, n. 10, p. 1-8. 2015.
- KIM, J.H.; PARK, C.; PARK, H.M. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol.* v. 20, n. 2, p. 123-126. 2009.
- KON, E.; FILARDO, G.; DI MATTEO, B. et al. Platelet-rich plasma in sports medicine: New treatment for tendon and cartilage lesions. *Oper Tech Orthop.* v. 22, p. 78-85. 2012.
- KOSINSKA, M.K.; MASTBERGEN, S.C.; LIEBISCH, G. et al. Comparative lipidomic analysis of synovial fluid in human and canine osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* v. 24, p. 1470-1478. 2016.
- LANE, N.E.; BRANDT, K.; HAWKER, G. et al. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* v. 19, p. 478-482. 2011.
- LAVAGNINO, M.; ARNOCZKY, S.P. In vitro alterations in cytoskeletal tensional homeostasis control gene expression in tendon cells. *J Orthop Res.* v. 23, p. 1211-1218. 2005.
- LEE, A.J.; CHUNG, W.H.; KIM, D.H. et al. Anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model using canine small intestinal submucosa and autologous platelet-rich plasma. *J Surg Res.* v. 178, p. 206-215. 2012.
- LEE, A.S.; ELLMAN, M.B.; YAN, D. et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene.* v. 527, p. 440-447. 2013.
- LEE, K.H.; SONG, S.U.; HWANG, T.S. Regeneration of hyaline cartilage by cell-Mediated gene therapy using transforming growth factor b1- producing fibroblasts. *Hum Gene Ther x.* v. 12, p. 1805-1813 .2001.
- LEONARDI, R.; CRIMI, S.; De PONTE, F. et al.  $\beta$ -defensin-3 and  $\beta$ -defensin-4 in synovial fluids from temporomandibular joints with osteoarthrosis. *J Oral Maxillofac Pathol.* v. 27, p. 263-266. 2015.
- LOHMANDER, L.S.; IONESCU, M.; JUGESSUR, H. et al. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* v. 42, p. 534-544. 1999.
- LÓPEZ, C.; CARMONA, J.U. Platelet-Rich plasma as an adjunctive therapy for the management of a severe chronic distal limb wound in a foal. *J Equine Vet Sci.* v. 34, n. 9, p. 1128-1133. 2014.

LORENZ, H.; RICHTER, W. Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog Histochem Cyto.* v. 40, p. 135-163. 2006.

LUM, Z.P.; HAKALA, B.E.; MORT, J.S. et al. Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol.* v. 166, p. 351-359. 1996.

MADRY, H.; ZURAKOWSKI, D.; TRIPPEL, S.B. Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther.* v. 8, p. 1443-1449. 2001.

MALEMUD, C.J.; PAPAY, R.S.; HERING, T.M. et al. Phenotypic modulation of newly synthesized proteoglycans in human cartilage and chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* v. 3, p. 227-238. 1995.

MARSANO, A.; MILLWARD-SADLER, S.J.; SALTER, D.M. et al. Differential cartilaginous tissue formation by human synovial membrane, fat pad, meniscus cells and articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* v. 15, p. 48-58. 2007.

MARTINEZ-CASTILLO, A.; NÚÑEZ, C.; CABIEDES, J. Synovial fluid analysis. *Reumatol Clín.* v. 6, n. 6, p. 316-321. 2010.

MARTEL-PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; PELLETIER, J.P. et al. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* v. 22, n. 2, p. 351-384. 2008.

MARTEL-PELLETIER, J.; TARDIF, G.; FERNANDES, J.C. et al. Metalloproteases and their modulation as treatment in osteoarthritis. In Tsokos GC (ed.). *Molecular rheumatology*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2000, pp. 499–514.

MARX, R.E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to support its use. *Oral Maxillofac Surg.* v. 62, p. 489-496. 2004.

MAZIERES, B.; GARNERO, P.; GUEGUEN, A. et al. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. *The ECHODIAH Cohort. Ann Rheum Dis.* v. 65, n. 354-359. 2006.

MIDDLETON, J.F.; TYLER, J.A. Upregulation of insulin-like growth factor-1 gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* v. 51, p. 440-447. 1992.

MISHRA, A.; WOODALL, J.; VIEIRA, A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med.* v. 28, p. 113-125. 2009.

MOBASHERI, A.; BATT, M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* v. 59, p. 333-339. 2016.

MOHTAI, M.; SMITH, R.L.; SCHURMAN, D.J. et al. Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin-1. *J Clin Investig.* v. 92, p. 179-185. 1993.

- MOLDOVAN, F.; PELLETIER, J.P.; HAMBOR, J. et al. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthr Rheum.* v. 40, p. 1653-1661. 1997.
- MOORE, E.E.; BENDELE, A.M.; THOMPSON, D.L. et al. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* v. 13, p. 623-631. 2005.
- MOULHARAT, N.; LESUR, C.; THOMAS, M. et al. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthr Cartil.* v. 12, p. 296-305. 2004.
- MURRAY, M.M.; SPLINDER, K.P.; DEVIN, C. et al. Use of a collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL. *J Orthop Res.* v. 24, p. 820-830. 2006.
- NAKANISHI, T.; NISHIDA, T.; SHIMO, T. et al. Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology.* v. 14, p. 264-273. 2000.
- NAKASHIMA, M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of dog by bone morphogenetic protein. *J. Arch Oral Biol.* v. 35, p. 493-497. 1990.
- NISHIDA, T.; KUBOTA, S.; NAKANISHI, T. et al. CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, stimulates proliferation and differentiation, but not hypertrophy of cultured articular chondrocytes. *J Cell Physiol.* v. 192, p. 55-63. 2002.
- NOTOYA, K.; JOVANOVIC, D.V.; REBOUL, P. et al. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol Res.* v. 165, p. 3402-3410. 2000.
- ORNETTI, P.; NOURISSAT, G.; BERENBAUM, F. et al. Does platelet-rich plasma have a role in the treatment of osteoarthritis?. *Joint Bone Spine.* v. 83, p. 31-36. 2016.
- OSORIO-CARMONA, E.; SANTANA, G.C.; CASTRO-VARÓN, J.A. et al. Efeito precoce do concentrado autólogo de plaquetas sobre a osteoartrose induzida em coelhos: Níveis plasmáticos de PDGF e TGF- $\beta$ 1 e seu potencial como biomarcadores. *Vet Zootec.* v. 11, n. 1, p. 96-115. 2017.
- OSORIO-CARMONA, E. REZENDE, C.M.F. Osteoartrose: aspectos clínicos e novas perspectivas terapêuticas baseadas na terapia regenerativa. *Vet Zootec.* v. 8, n. 2, p. 49-71. 2014.
- PATEL, S.; DHILLON, M.S.; AGGARWAL, S. et al. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: A prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med.* v. 41, n. 2, p. 356-364. 2013.
- PELLETIER, J.P.; KAPOOR, M.; FAHMI, H. et al. Strontium ranelate reduces the progression of experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1beta in the synovium. *Ann. Rheum. Dis.* v. 72, p. 250-257. 2013.

PLATER-ZYBERK, C.; BUCKTON, J.; THOMPSON, S. et al. Amelioration of arthritis in two murine models using antibodies to oncostatin M. *Arthr Rheumat.* v. 44, p. 2697-2702. 2001.

REBOUL, P.; PELLETIER, J.P.; TARDIF, G. et al. Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: involvement of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade. *Arthr Rheumat.* v. 44, p. 73-84. 2001.

REBOUL, P.; PELLETIER, J.P.; TARDIF, G. et al. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. *J Clin Invest.* v. 97, p. 2011-2019. 1996.

REZENDE, C.M.F.; LEME, F.L.; SANTANA, G. et al. Intra-Articular Autologous Platelet Concentrate (APC) in the Treatment of Induced Knee Osteoarthritis (OA) in Rabbits — An Arthroscopic Evaluation. In: BAGARIA, V. (eds): *Arthroplasty a comprehensive review.* London: SE1 9SG, UK. 2016, pp. 211-232.

RHEE, D.K.; MARCELINO, J.; BAKER, M. et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest.* v. 115, p. 622-631. 2005.

ROBINSON, W.H.; LEPUS, C.M.; WANG, Q. et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* v. 12, n. 10, p. 580-592. 2016.

RODRIGUEZ FLORES, J.; PALOMAR, M.A.; TORRES, J. Plasma rico en plaquetas: Fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev Española de Cirugía Oral y Maxilofac.* v. 34, n. 1, p. 8-17. 2012.

ROGACHEFSKY, R.A.; DEAN, D.D.; HOWELL, D.S. et al. Treatment of canine osteoarthritis with sodium pentosan polysulfate and insulin-like growth factor-1. *Ann N Y Acad Sci.* v. 732, p. 392-394. 1994.

ROUGHLEY, P.; MARTENS, D.; RANTAKOKKO, J. et al. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. *Eur Cell Mater.* v. 11, p. 1-7. 2006.

RUMIAN, A.P.; WALLACE, A.L.; BIRCH, H.L. Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features: a comparative study in an ovine model. *J Orthop Res.* v. 25, p. 458-464. 2007.

SATO, J.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M. et al. Expression of interleukin 8 in synovial tissues in patients with internal derangement of the temporomandibular joint and its relationship with clinical variables. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 7, n. 103, p. 467-474. 2007.

SCANZELLO, C.R.; GOLDRING, S.R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone.* v. 51, p. 249-257. 2012.

- SCHARSTUHL, A.; VAN BEUNINGEN, H.M.; VITTERS, E.L. et al. Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice. *Ann Rheum Dis.* v. 61, p. 1095-1098. 2002.
- SHERWOOD, J.C.; BERTRAND, J.; ELDRIDGE, S.E. et al. Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair. *Drug Discov Today.* v. 19, n. 8, p. 1172-1177. 2014.
- SILVA, R.F.; CARMONA, J.U.; REZENDE, C.M.F. Ultrastructural characteristics of fibrin clots from canine and feline platelet concentrates activated with calcium gluconate or calcium gluconate plus batroxobin. *Vet Res.* v. 9, p. 77-82. 2013a.
- SILVA, R.F.; CARMONA, J.U.; REZENDE, C.M.F. Use of intra-articular autologous platelet concentrates as adjuvants in the surgical arthroscopy treatment of elbow dysplasia in a bitch. *Arch Med Vet.* v. 45, n. 2, p. 213-217. 2013b.
- SILVA, R.F.; ALVAREZ, M.E.; RIOS, D.L. et al. Evaluation of the effect of calcium gluconate and bovine thrombin on the temporal release of transforming growth factor beta 1 and platelet-derived growth factor isoform BB from feline platelet concentrates. *Vet Res.* v. 8, n. 212. 2012.
- SMEETS, R.L.; VEENBERGEN, S.; ARNTZ, O.J. et al. A novel role for suppressor of cytokine signaling 3 in cartilage destruction via induction of chondrocyte desensitization toward insulin-like growth factor. *Arthritis Rheum.* v. 54, p. 1518-1528. 2006.
- SMITH, S.E.; ROUKIS, T.S. Bone and wound healing augmentation with platelet-rich plasma. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery.* v. 26, p. 559-588. 2009.
- SOMMERNAN, M.; HEWITT, A.T.; VARNER, H.H. et al. Identification of bone matrix-derived chemotactic factor. *Calcif Tissue Int.* v. 35, p. 481-485. 1983.
- STANTON, H.; ROGERSON, F.M.; EAST, C.J. et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* v. 434, p. 648-652. 2005.
- STOCKWELL, R.A. Morphology of cartilage. In Maroudas A & Keuttner K (eds.). *Methods in cartilage research.* San Diego: Academic Press, 1990, pp. 61–63.
- STROM, H.; ALEXANDERSEN, S.; POULSEN, O.M. et al. synovial fluid proteins in degenerative joint disease in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 22, p. 187-196. 1989.
- STRUGLICS, A.; LARSSON, S.; PRATTA, M.A. et al. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthr Cartil.* v. 14, p. 101-113. 2006.
- SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P. et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J.* v. 179, p. 10-24. 2009.
- SWEIGART, M.A.; AUFDERHEIDE, A.C.; ATHANASIOU, K.A. Fibrochondrocytes and their use in tissue engineering of the meniscus. In: Ashammakhi N, Ferretti P, Eds. *Topics in Tissue Engineering,* University of Oulu. 1:1e18. 2003.

TAKAHASHI, N.; RIENECK, K.; VAN DER KRAAN, P.M. et al. Elucidation of IL-1/TGF-beta interactions in mouse chondrocyte cell line by genome-wide gene expression. *Osteoarthr Cartil.* v. 13, p. 426-438. 2005.

TAKAHASHI, M.; KUSHIDA, K.; OHISHI, T. et al. Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders. *Arthritis Rheum.* v. 37, p. 724-728. 1994.

TARDIF, G.; HUM, D.; PELLETIER, J.P. et al. Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* v. 50, p. 2521-2530. 2004.

TARDIF, G.; PELLETIER, J.P.; HUM, D. et al. Differential regulation of the bone morphogenic protein antagonist chordin in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* v. 65, p. 261-264. 2006.

TARDIF, G.; REBOUL, P.; PELLETIER, J.P. et al. Normal expression of type 1 insulin-like growth factor receptor by human osteoarthritic chondrocytes with increased expression and synthesis of insulin-like growth factor binding proteins. *Arthritis Rheum.* v. 39, p. 968-978. 1996.

TEXTOR, J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: Platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *The Veterinary Clinics of North America. Equine practice.* v. 27, n. 2, p. 275-298. 2011.

THEORET, C.L. The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin Equine.* v. 21, p. 1-13. 2005.

TIWARI, M.; BHARGAVA, R. Platelet rich plasma therapy: A comparative effective therapy with promising results in plantar fasciitis. *J Clin Orthop Trauma.* v. 4, p. 31-35. 2013.

TORRICELLI, P.; FINI, M.; FILARDO, G. et al. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int Orthop.* v. 35, p. 1569-1576. 2011.

TORRENTE, P.M.A.; FORRIOL, F. Modificación del líquido sinovial en diferentes afecciones articulares de la rodilla. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* v. 56, n. 2, p. 140-148. 2012.

VALDES, A.M.; SPECTOR, T.D. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev.* v. 7, n. 1, p. 23-32. 2010.

VAN BEUNINGEN, H.M.; GLANSBEEK, H.L.; VAN DER KRAAN, P.M. et al. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthr Cartil.* v. 6, p. 306-317. 1998.

VASARA, A.I.; KONTTINEN, Y.T.; PETERSOSN, L. et al. Persisting high levels of synovial fluid markers after cartilage repair: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* v. 467, p. 267-272. 2009.

VENN, M.F. Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation. *Ann Rheum Dis.* v.38, p. 57-62. 1979.

WASTERLAIN, A.S.; BRAUN, H.J.; DRAGOO, J.L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper Tech Orthop.* v. 22, p. 33-42. 2012.

WILDEY, G.M.; BILLETZ, A.; MATYAS, J.R. et al. Absolute concentrations of mRNA for type I and type VI collagen in the canine meniscus in normal and ACL-deficient knee joints obtained by RNase protection assay. *J Orthop Res.* v. 19, p. 650-658. 2001.

WILKERSON, M.J.; SHUMAN, W.; SWIST, S. et al. Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *Vet Clin Pathol.* v. 30, n. 3, p. 141-149. 2001.

WOO, S.L.Y.; ABRAMOWITCH, S.D.; KILGER, R. et al: Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech.* v. 39, p. 1-20. 2006.

WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; BYME, M. et al. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci.* v. 13, (Suppl):149-56. 1990.

XIE, X.; WU, H.; ZHAO, S. The effect of platelet-rich plasma on patterns of gene expression in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J Surg Res.* v. 180, p. 80-88. 2013a.

XIE, X.; ZHAO, S.; WU, H. et al. Platelet-rich plasma enhances autograft revascularization and reinnervation in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J Surg Res.* v. 30, p. E1-E9. 2013b.

YAMAGUCHI, R.; TERESHIMA, H.; YONEYAMA, S. et al. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J Surg Res.* v. 173, p. 258-266. 2012.

ZHU, Y.; YUAN, M.; MENG, H.Y. et al. Basic science and clinical application of platelet rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthr Cartil.* v. 21, p. 1627-37. 2013.

## CAPÍTULO 2

### **AVALIAÇÃO ARTROSCÓPICA DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-TIBIO-PATELAR DE COELHOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA E TRATADOS OU NÃO COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS**

#### **Resumo**

O objetivo desta pesquisa foi avaliar, por meio da vídeo artroscopia seriada, o efeito do CAP sobre a articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos com OA induzida. Foram usados 30 coelhos de raça Nova Zelândia, machos, adultos jovens, com massa corporal média de 3,0 kg, submetidos à ruptura do ligamento cruzado cranial para indução da OA. Aos 21 dias depois os coelhos foram submetidos à reconstituição do ligamento e foram divididos em dois grupos: grupo CAP e grupo controle com injeção de solução Ringer Lactato. As aplicações intra-articulares foram realizadas imediatamente após a reconstituição do ligamento, aos 15 e aos 30 dias após a reconstituição. Em todos estes momentos e imediatamente antes da injeção intra-articular, foram feitas as avaliações artroscópicas para acompanhar a evolução da OA e a resposta ao tratamento. Foi observado nos animais que receberam o CAP uma melhora significativa na inflamação da membrana sinovial, menor formação de cordões fibrosos e menos fibrilação da cartilagem. Dos resultados pode-se concluir que a artroscopia permite acompanhar a evolução de alterações articulares e avaliar o efeito dos tratamentos de forma seriada e em tempo real.

#### **Introdução**

A ruptura do LCCr é uma condição degenerativa em animais domésticos que leva inevitavelmente à osteoartrose (OA), inflamação e perda da função da articulação. O modelo animal de ruptura do ligamento é uma das opções disponíveis para induzir lesões degenerativas que permitam fazer uma avaliação comparativa com os modelos que ocorrem naturalmente em animais e no humano. A compreensão das complexas interações que tem lugar na OA se faz obrigatória para estabelecer o plano terapêutico adequado para cada paciente (Little et al., 2014).

O plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido amplamente empregado como coadjuvante no tratamento da ruptura do LCCr e da OA em pequenos animais e em humanos. Dentre seus principais efeitos nas articulações acometidas encontra-se a modulação do processo inflamatório, o controle da dor, a proliferação e diferenciação celular além de estimular a regeneração do tecido afetado através do estímulo da síntese e da produção de produtos anabólicos por parte de certos genes (Rezende et al., 2016; Osorio-Carmona e Rezende, 2014; Saito et al., 2009).

Uma avaliação seriada com menor trauma possível se faz necessária para acompanhar a evolução da resposta aos tratamentos propostos. Assim a artroscopia é uma alternativa favorável, que permitirá avaliar a evolução do processo decorrente das lesões articulares e o efeito do tratamento, em tempo real. Esta técnica tem ganhado espaço na medicina veterinária, já que aporta informações valiosas e imagens detalhadas de lesões na cápsula, na cartilagem e demais estruturas acometidas pela OA. O objetivo desta pesquisa portanto, foi avaliar por meio da vídeo artroscopia o efeito do CAP sobre a articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos com OA induzida.

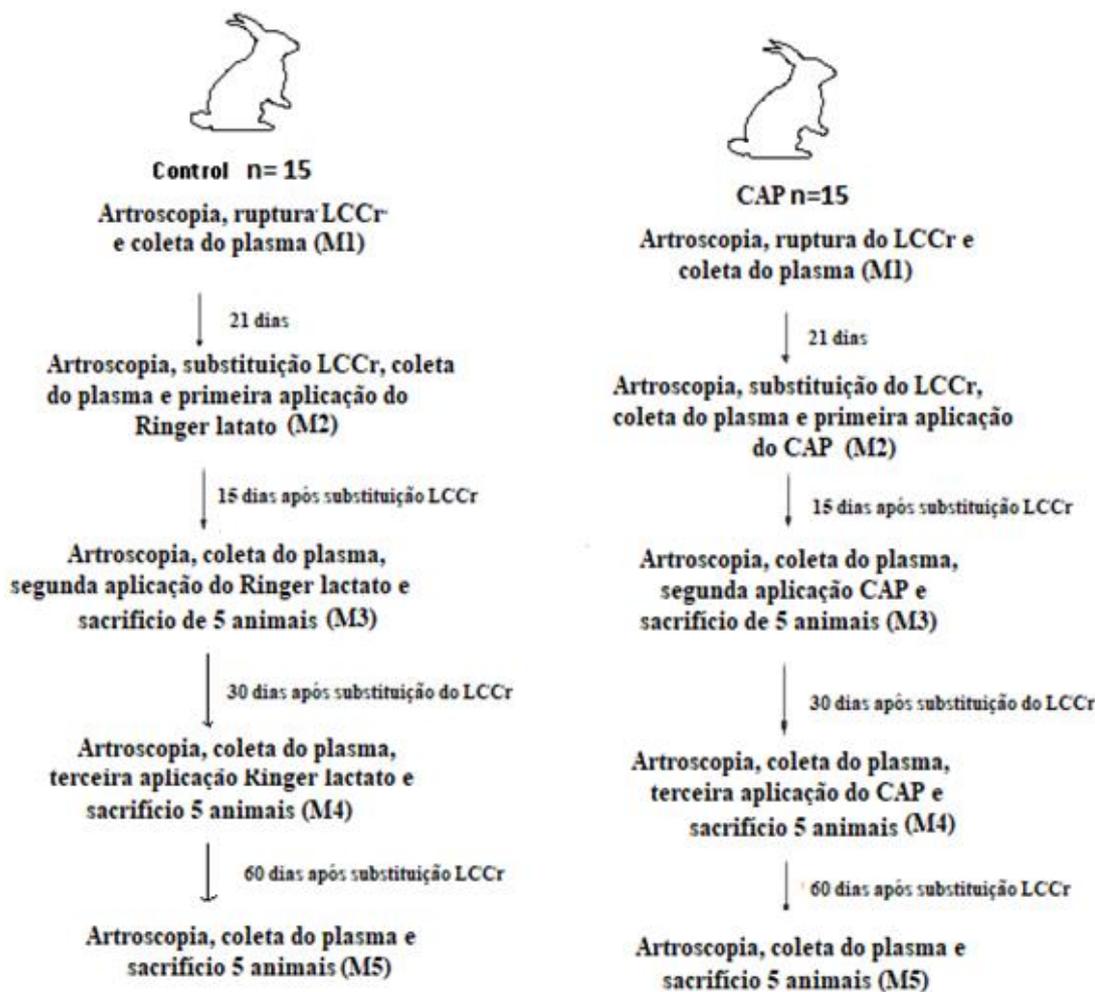
## **2.1. LITERATURA CONSULTADA**

As lesões que tem lugar durante o curso da OA caracterizam-se pela destruição progressiva da cartilagem articular e pelas alterações que ocorrem na MEC dos demais tecidos que compõem a articulação. As lesões decorrentes do processo degenerativo são percebidas através de imagens radiográficas e ultrassonográficas somente em estágios avançados, onde as alterações tornam-se evidentes e, geralmente não tem mais opções terapêuticas eficazes (Betancourt e Murrell, 2016; Rezende et al., 2016).

A artroscopia em pequenos animais é usada como uma ferramenta diagnóstica e terapêutica, devido à ampliação das estruturas articulares e à visão detalhada do ambiente articular que permitem ao cirurgião visibilizar e tratar alterações que não são reconhecidas pela artrotomia tradicional. Além disso, a artroscopia é menos invasiva, apresenta menos complicações pós-operatórias e diminui o tempo de recuperação após as intervenções (Rezende et al., 2012; Borges et al., 2008; Rochat, 2001). Estudos relatam também o uso da artroscopia na avaliação precisa e sob aumento das lesões articulares no seu meio natural (Little et al., 2014; Borges et al., 2008).

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo número 63/2014. A figura 8 ilustra o fluxograma seguido durante todo o experimento.



**Figura 8.** Fluxograma mostrando as diferentes etapas do experimento.

### 2.2.1. Obtenção das amostras de sangue e do CAP

O protocolo para obtenção do CAP aqui descrito aplica-se para todos os outros capítulos. Neste experimento foi empregado o método do tubo com centrifugação única, segundo o relatado por Silva (2012), modificando o tempo de centrifugação para sete minutos com o objetivo de obter uma maior concentração de plaquetas. Foi considerado como CAP a fração de plasma com concentração de plaquetas entre 1,5 e 2,5 vezes os níveis basais do sangue total.

Utilizou-se uma seringa de 10 ml para coletar da veia jugular dos coelhos do grupo II, 7 ml de sangue que foram depositados em tubos de 8,5 ml, contendo solução de ACD-A como anticoagulante (citrato de trisódio; 22 g/L, ácido cítrico; 8g/L e dextrose; 24,5 g/L). As mostras foram processadas imediatamente no laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário da UFMG utilizando uma centrífuga clínica (CENTROBIO-80 2B, CHINA). Adicionalmente, foram coletados 2 ml de sangue em tubos com EDTA para hemograma completo e avaliação dos níveis basais de plaquetas. O sangue nos tubos ACD-A foi centrifugado a 191 g durante 7 minutos. Posteriormente, com auxílio de um cateter calibre 22 e uma seringa de 3 ml foram coletados aproximadamente os primeiros 100 µL da fração vermelha abaixo da interface sangue-plasma e os primeiros 900 µL de plasma acima da mesma interface. As amostras de sangue total e os preparados autólogos foram analisados mediante hemograma automatizado por impedância volumétrica. Cada amostra foi analisada três vezes e a média foi tomada como medida amostral para as análises estatísticas.

Os parâmetros analisados nos preparados plaquetários e no sangue total foram:

- Leucócitos
- Hemácias
- Hematócrito
- Contagem de plaquetas
- Valores relativos e absolutos de linfócitos, monócitos, granulócitos.
- Volume plaquetário médio

Imediatamente antes da aplicação do CAP o mesmo foi ativado com gluconato de cálcio a 10% na proporção de 0,1 ml de gluconato de cálcio por cada ml de CAP, segundo o recomendado.

### **2.2.2. Avaliação artroscópica e grupos experimentais**

Foram utilizados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, machos adultos jovens, com idade média de cinco meses e massa corporal média de 3,0 kg. Os critérios de inclusão foram um estado geral saudável, confirmado por hemograma completo e bioquímica sanguínea e nenhuma alteração no sistema locomotor confirmada por avaliação radiográfica. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de 60 cm x 60 cm x 37 cm, com acesso à água ad libitum e alimento duas vezes ao dia, de acordo com necessidades nutricionais específicas. Os coelhos foram submetidos à seção do ligamento cruzado cranial guiado por vídeo-artroscopia e, após 21 dias, todos os coelhos foram submetidos a estabilização intra-articular com auto-enxerto de fásia lata, também guiado por vídeo-artroscopia. Imediatamente após a estabilização e aos 15 e 30 dias após a estabilização, os coelhos receberam 0,5mL de CAP ou solução de Ringer lactato na articulação operada. Os animais foram divididos em dois grupos de 15: o grupo controle recebeu 0,5 mL de solução de Ringer lactato e o grupo tratado recebeu 0,5 mL de CAP ativado com gluconato de cálcio 10%. A avaliação artroscópica foi realizada no momento da secção do ligamento (M1), imediatamente antes da reconstituição do LCC (M2), 15 (M3), 30 (M4) e 60 (M5) dias após a estabilização.

A medicação pré-anestésica consistiu na aplicação de midazolam (Cristália, Brasil) e metadona (Cristália, Brasil) na dose de 1 mg / kg por via intramuscular, 15 mg / kg de cetamina e bloqueio anestésico dos nervos ciático e femoral com lidocaína (Cristália, Brasil) sem vasoconstritor na dose de 5 mg / kg e a anestesia foi mantida com isoflurano. As frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial e gases sanguíneos foram monitorados. A analgesia pós-operatória foi feita com tramadol (Teuto-Cristalpharma, Brasil), na dose de 1 mg / kg por via subcutânea a cada 12 horas por três dias, a terapia anti-inflamatória com meloxicam (Ourofino, Brasil) na dose de 0,2 mg / kg por via intramuscular a cada 24 horas durante três dias após a seção e a antibioticoterapia com cefalexina na dose de 30 mg / kg a cada 12 horas durante cinco dias. O mesmo tratamento foi realizado após estabilização articular aos 21 dias e depois de cada artroscopia exploratória. A terapia profilática com cefalexina (Aspen-Pharma, Brasil) na dose de 30 mg / kg por via intravenosa foi administrada trinta minutos antes da estabilização articular e a dosagem foi repetida duas horas após a cirurgia.

O procedimento artroscópico foi realizado de acordo com Beale et al (2012). Fez-se inicialmente a punção articular no recesso suprapatelar para colheita do líquido sinovial, seguindo-se a distensão articular com 3mL de solução Ringer lactato. Foi feita uma incisão cutânea parapatelar medial de cerca de 4mm e a cápsula articular foi perfurada usando uma lâmina de bisturi número 11. Em seguida um trocarte rombo travado na camisa artroscópica foi introduzido na articulação. O obturador rombo foi substituído por um artroscópio de 1,9 mm

(Storz, Alemanha) e procedeu-se ao exame de toda a articulação, iniciando pelo recesso suprapatelar, os compartimentos medial e lateral, a fossa intercondilar, ligamentos cruzados, e membrana sinovial. Para a execução da cirurgia foi feito o portal instrumental parapatelar lateral. Por razões técnicas foi usado em alguns casos, o artroscópio 2,7 mm (Storz, Alemanha) tomando-se todos os cuidados para prevenir lesões iatrogênicas.

### 2.2.3. Classificação das alterações artroscópicas

As imagens artroscópicas foram avaliadas e classificadas de acordo com a avaliação proposta por Borges et al. (2006) e adaptadas para descrever as alterações na cartilagem articular dos coelhos.

Na membrana sinovial foram descritas a presença e forma das vilosidades, a vascularização da sinovia e a presença de cordões fibrosos, conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição das alterações artroscópicas observadas na membrana sinovial e na cartilagem da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e do grupo CAP nos momentos M1, M2, M3, M4 e M5.

VILHOSIDADES DA MEMBRANA SINOVIAL	
Score	Descrição
1	<b>Ausentes</b>
2	<b>Discretas:</b> Presença de vilosidades finas, filamentosas, atrofiadas, brancas ou rosadas.
3	<b>Moderadas:</b> Presença de vilosidades finas, filamentosas, em forma de pólipos, leques, galhos de árvores, bastão e de cor vermelha. <b>Acentuadas:</b> Presença de vilosidades grandes, densas, em forma de couve-flor e franjas, localizadas principalmente nos compartimentos lateral e medial de aparência hemorrágica e coloração vermelha.
VASCULARIZAÇÃO DA MEMBRANA SINOVIAL	
Score	Descrição
1	<b>Ausente</b>
2	<b>Discreta:</b> Presença discreta de vasos sanguíneos ingurgitados em não mais que duas regiões da articulação fêmoro-tíbio-patelar
3	<b>Moderada:</b> Presença de vascularização e hiperemia nos compartimentos lateral e medial, ligamentos cruzados e meniscos.
4	<b>Acentuada:</b> Presença de hipervascularização, hiperemia dos compartimentos lateral e medial, ligamentos, menisco e hemorragia articular.
CORDÕES FIBROSOS	
Score	Descrição
1	Ausência
2	Presença
ALTERAÇÕES NA CARTILAGEM ARTICULAR	
Score	Descrição
1	<b>Ausência de lesões:</b> superfície articular lisa
2	<b>Discretas:</b> Presença de fibrilação na superfície da cartilagem com perda de brilho e fissuras na superfície articular.
3	<b>Moderadas:</b> Presença de fibrilação, perda de brilho, fissuras e erosão na superfície articular. Superfície articular rugosa.
4	<b>Acentuadas:</b> Presença de erosão na superfície articular com exposição do osso subcondral.

Modificado do reportado por Borges et al., 2009.

### 2.3. Resultados

Os resultados da contagem celular no sangue total e no CAP no M2, M3 e M4 são apresentados na tabela 2. Os resultados da avaliação artroscópica são mostrados nas tabelas 3 e 4. A figura 9 ilustra as imagens da articulação fêmoro-tíbio-patelar saudável, antes da ruptura do LCCr. As figuras 10, 11, 12 e 13 ilustram as alterações da articulação durante os momentos avaliados. A avaliação artroscópica permitiu um exame detalhado da articulação fêmoro-tíbio-patelar, apesar do pequeno tamanho desta, fato superado pelo tamanho apropriado dos instrumentos.

**Tabela 2.** Valores da média e do desvio padrão das variáveis hematológicas no sangue total e no CAP de coelhos do grupo CAP no M2, M3 e M4.

VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS NO SANGUE TOTAL E NO CAP						
Variável	M2		M3		M4	
	Sangue total	CAP	Sangue total	CAP	Sangue total	CAP
<b>WBC</b> (celsx10 <sup>3</sup> /µl)	8,20 (±1,10) <sup>a</sup>	0,25 (±0,10) <sup>b</sup>	9,70 (±1,45) <sup>a</sup>	0,43 (±0,27) <sup>b</sup>	9,33 (±1,98) <sup>a</sup>	0,32 (±0,22) <sup>b</sup>
<b>RBC</b> (celsx10 <sup>3</sup> /µl)	5,80 (±0,28) <sup>a</sup>	0,09 (±0,02) <sup>b</sup>	5,42 (±0,40) <sup>a</sup>	0,34 (±0,12) <sup>b</sup>	5,75 (±0,34) <sup>a</sup>	0,21 (±0,01) <sup>b</sup>
<b>HCT %</b>	38,83 (±1,23) <sup>a</sup>	37,32 (±0,30) <sup>a</sup>	38,02 (±0,98) <sup>a</sup>	37,10 (±0,02) <sup>a</sup>	37,66 (±1,02) <sup>a</sup>	36,89 (±1,02) <sup>a</sup>
<b>PLT</b> (fragx10 <sup>3</sup> /µl)	172,85 (±25,89) <sup>a</sup>	427,09 (±34,23) <sup>b</sup>	165,88 (±45,89) <sup>a</sup>	323,09 (±22,89) <sup>b</sup>	180,01 (±45,56) <sup>a</sup>	375,09 (±53,99) <sup>b</sup>
<b>LYM</b> (celsx10 <sup>3</sup> /µl)	2,10 (±0,21)	---	1,99 (±0,12)	---	2,45 (±0,34)	---
<b>LYM %</b>	41,67 (±21,04)	---	40,91 (±16,90)	---	41,98 (±17,81)	---
<b>MO</b> (celsx10 <sup>3</sup> /µl)	0,33 (±0,04)	---	0,29 (±0,09)	---	0,27 (±0,08)	---
<b>MO %</b>	5,77 (±2,20)	---	5,23 (±3,48)	---	4,99 (±1,15)	---
<b>GRA</b> (celsx10 <sup>3</sup> /µl)	3,15 (±0,56)	---	3,46 (±0,23)	---	3,01 (±0,12)	---
<b>GRA %</b>	47,23 (±20,89)	---	44,89 (±24,78)	---	49,86 (±21,90)	---
<b>MPV (fl)</b>	5,44 (±0,22) <sup>a</sup>	4,98 (±0,56) <sup>a</sup>	5,81 (±0,51) <sup>a</sup>	5,15 (±1,01) <sup>a</sup>	4,56 (±0,33) <sup>a</sup>	4,45 (±0,98) <sup>a</sup>

WBC: leucócitos; RBC: eritrócitos; HCT: hematócrito; PLT: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; LYM: linfócitos; MO: monócitos; GRA: granulócitos; --- = valor não detectado pelo aparelho. a,b: Medias seguidas de letras distintas diferem significativamente (P<0,05).

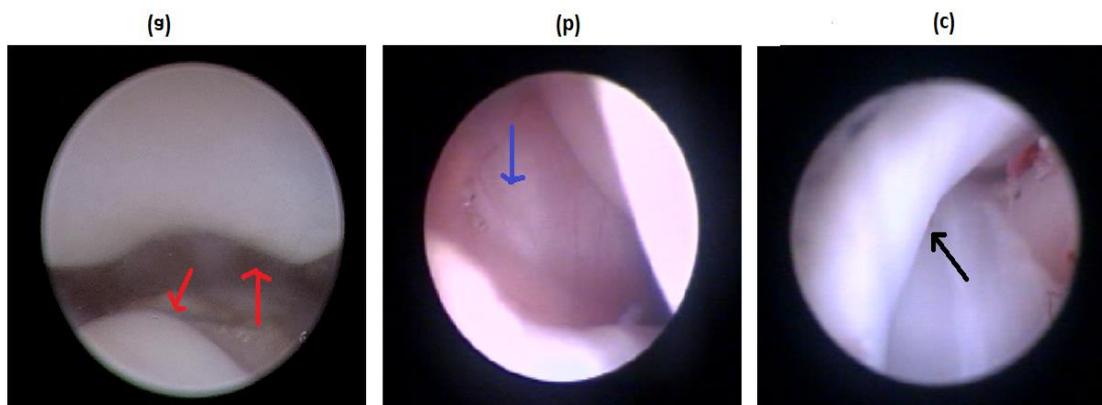
**Tabla 3.** Avaliação artroscópica da membrana sinovial da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e do grupo CAP durante os momentos avaliados.

VILOSIDADES DA MEMBRANA SINOVIAL (média e desvio padrão)		
	GRUPO CONTROL	GRUPO CAP
<b>M1</b>	1 (±0,0) <sup>A1</sup>	1 (±0,0) <sup>A1</sup>
<b>M2</b>	2,5 (±0,7) <sup>A2</sup>	2,6 (±0,5) <sup>A2</sup>
<b>M3</b>	3,2 (±0,3) <sup>A3</sup>	2,9 (±0,2) <sup>A2,3</sup>

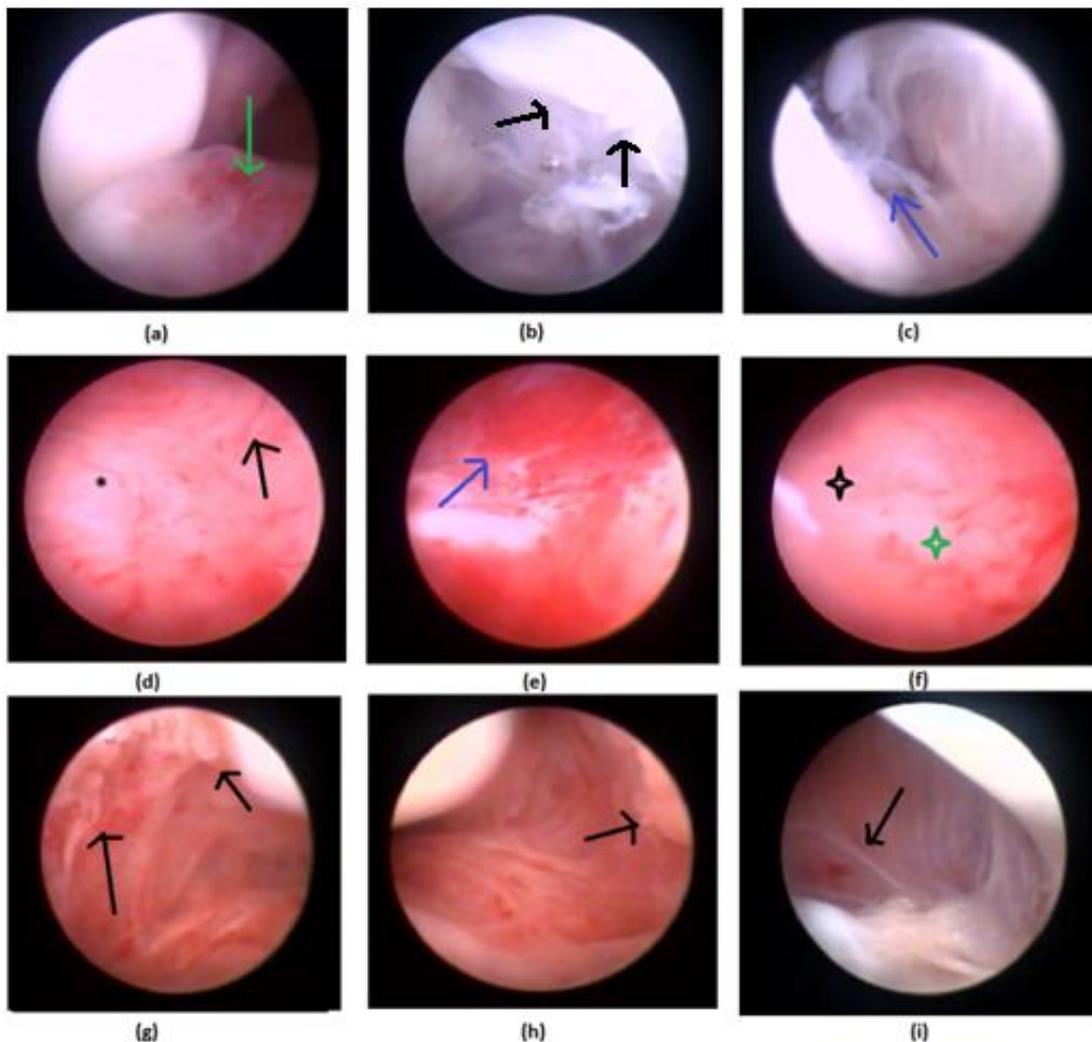
M4	3,5 ( $\pm 0,4$ ) <sup>A3</sup>	3,1 ( $\pm 0,2$ ) <sup>B3</sup>
M5	3,7 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A3</sup>	3,2 ( $\pm 0,2$ ) <sup>B3</sup>
VASCULARIZAÇÃO DA MEMBRANA SINOVIAL (média e desvio padrão)		
	GRUPO CONTROL	GRUPO CAP
M1	1 ( $\pm 0,0$ ) <sup>A1</sup>	1 ( $\pm 0,0$ ) <sup>A1</sup>
M2	1,7 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A2</sup>	1,6 ( $\pm 0,3$ ) <sup>A2</sup>
M3	2,3 ( $\pm 0,3$ ) <sup>A2</sup>	2,2 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A2</sup>
M4	3,3 ( $\pm 0,4$ ) <sup>A3</sup>	2,6 ( $\pm 0,3$ ) <sup>B3</sup>
M5	3,9 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A3</sup>	2,9 ( $\pm 0,3$ ) <sup>B3</sup>
FORMAÇÃO DE CORDÕES FIBROSOS (média e desvio padrão)		
	GRUPO CONTROL	GRUPO CAP
M1	1 ( $\pm 0,0$ ) <sup>A1</sup>	1 ( $\pm 0,0$ ) <sup>A1</sup>
M2	1,3 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A2</sup>	1,3 ( $\pm 0,3$ ) <sup>A2</sup>
M3	1,7 ( $\pm 0,3$ ) <sup>A3</sup>	1,5 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A2</sup>
M4	1,9 ( $\pm 0,1$ ) <sup>A3</sup>	1,6 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A2</sup>
M5	2 ( $\pm 0,0$ ) <sup>A3</sup>	1,6 ( $\pm 0,3$ ) <sup>A2</sup>

<sup>A,B</sup>: Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos;  
<sup>1,2,3</sup>: Números diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa dentro dos grupos.

Na primeira avaliação (M1), antes da ruptura do LCC, todas as articulações estavam saudáveis, apresentando superfícies articulares lisas na patela, nas cartilagens femoral e tibial, membrana sinovial lisa, rósea, com discreta vascularização e sem vilosidades. O LCCr era brilhante, sem vascularização e íntegro. De uma maneira geral, todas as estruturas articulares apresentavam-se saudáveis (Figura 9).



**Figura 9.** Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos no M1 (antes da ruptura): (a) superfície articular da articulação femoropatelar mostrando a superfície lisa da patela e do fêmur (setas vermelhas); (b) membrana sinovial, mostrando sinovia rosada, lisa e sem vascularização ou hiperemia (seta azul); (c) LCCr brilhante e íntegro (seta preta)



**Figura 10.** Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos de ambos os grupos 21 dias após a ruptura do LCCr; M2. (a) erosão na cartilagem articular do côndilo femoral (seta verde); (b) fibrilação na cartilagem articular do côndilo femoral (setas pretas); (c) fibrina na cartilagem articular do côndilo femoral na inserção da membrana sinovial (seta azul); (d) neovascularização na membrana sinovial (asterisco e seta preta); (e) formação de coágulos na membrana sinovial (seta azul); (f) hiperemia (estrela negra) e neovascularização (estrela verde) da membrana sinovial; (g) presença de vilosidades na membrana sinovial (setas pretas); (h) inflamação e hipertrofia das vilosidades da membrana sinovial (seta preta); (i) formação de cordão fibroso na inserção da membrana sinovial (seta preta).

Aos 21 dias após a ruptura do LCCr (M2), os coelhos de ambos os grupos mostravam alterações características da OA. As principais alterações observadas foram erosão e fibrilação da superfície articular, hiperemia e neovascularização da membrana sinovial, hipertrofia das vilosidades e, em alguns casos, formação de coágulos (Figura 10). Também foi possível observar a presença de discretos osteófitos no segmento distal da patela.

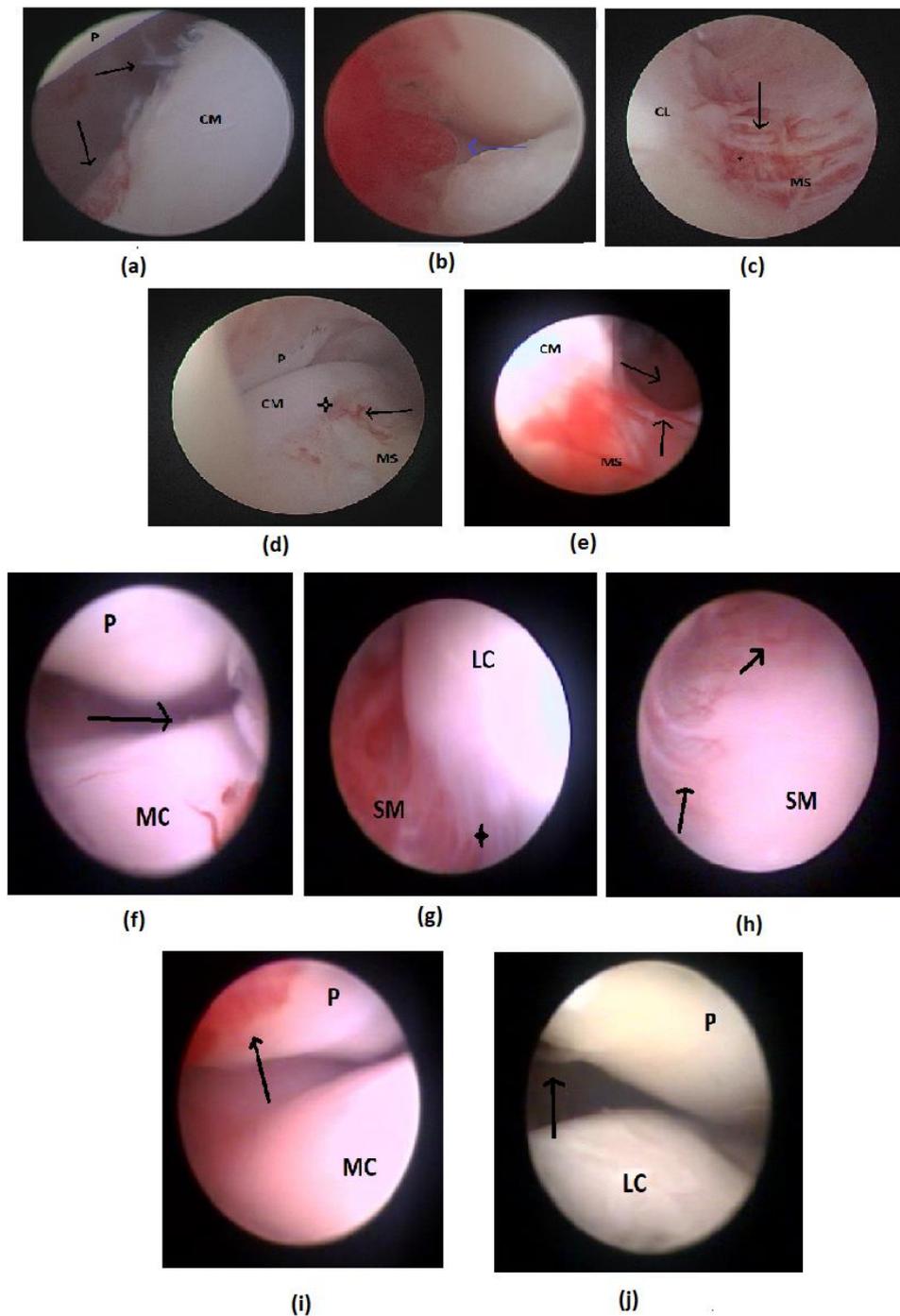
**Tabela 4.** Avaliação artroscópica da cartilagem articular da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e do grupo CAP durante os momentos avaliados.

ALTERAÇÕES DA CARTILAGEM ARTICULAR (média e desvio padrão)		
	GRUPO CONTROL	GRUPO CAP
<b>M1</b>	1 ( $\pm 0,0$ ) <sup>A1</sup>	1 ( $\pm 0,0$ ) <sup>A1</sup>
<b>M2</b>	1,9 ( $\pm 0,4$ ) <sup>A2</sup>	1,8 ( $\pm 0,3$ ) <sup>A2</sup>
<b>M3</b>	2,5 ( $\pm 0,3$ ) <sup>A2</sup>	2,3 ( $\pm 0,4$ ) <sup>A2</sup>
<b>M4</b>	3,3 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A3</sup>	2,9 ( $\pm 0,2$ ) <sup>B3</sup>
<b>M5</b>	3,7 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A3</sup>	3,2 ( $\pm 0,4$ ) <sup>B3</sup>

<sup>A,B</sup>: Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos;

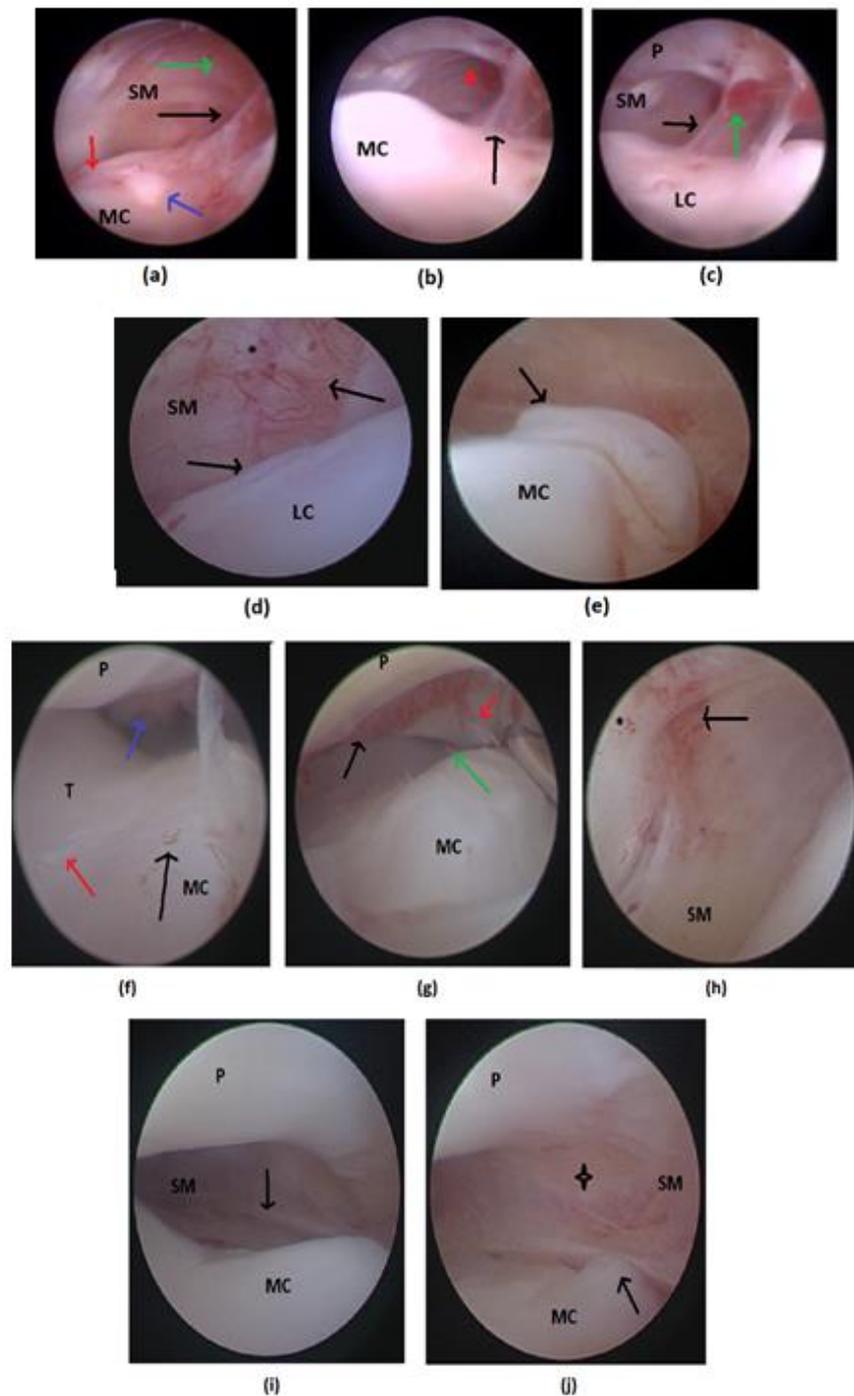
<sup>1,2,3</sup>: Números diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa dentro dos grupos.

Aos 15 dias após a reconstituição do LCCr (M3), verificou-se ao exame artroscópico, sinais evidentes de progressão da OA em ambos os grupos, no entanto, as lesões nos coelhos do grupo CAP apresentavam menor intensidade quando comparadas ao grupo controle (Figura 11). Três coelhos (60%) do grupo CAP mostravam superfície articular mais lisa quando comparados com o grupo controle, sem áreas de fibrilação e com menor formação de cordões fibrosos. A hiperemia e a vascularização na membrana sinovial mostraram-se reduzidas após a aplicação de CAP. Os coelhos do grupo controle apresentavam erosão e fibrilação da cartilagem articular, hipertrofia das vilosidades, formação de cordões fibrosos, hiperemia e neovascularização da membrana sinovial, além de formação de osteófitos periarticulares.



**Figura 11.** Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e CAP 15 dias após a reconstituição do LCCr; M3: (a) fibrilação e erosão articular (setas pretas); (b) hipertrofia das vilosidades; (c) formação de cordões fibrosos (seta preta), hiperemia sinovial (asterisco); (d) neovascularização na inserção da membrana sinovial (seta preta) e erosão da cartilagem articular no côndilo medial (estrela negra); (e) neovascularização e hiperemia na membrana sinovial (setas pretas). MC: côndilo medial; LC: côndilo lateral; SM: membrana sinovial; (f) cartilagem articular da tróclea e patela mostrando fibrilação discreta (seta preta); (g) inserção da membrana sinovial no côndilo lateral, mostrando hiperemia discreta e formação de cordões fibrosos (estrela negra); (h) membrana sinovial mostrando vasos finos e esparços (setas pretas); (i) articulação femoro-patelar com superfície lisa e neovascularização na inserção do tendão patelar (seta preta); (j) articulação femoro-patelar com fibrilação discreta no côndilo lateral e cartilagem patelar. MC: côndilo medial; LC: côndilo lateral; P: patela; SM: membrana sinovial.

No M4, 30 dias após a reconstituição do LCCr e a segunda aplicação de CAP, as imagens mostram a progressão evidente da OA em ambos os grupos, com alterações acentuadas em todas as estruturas da articulação fêmoro-tíbio-patelar. Os animais do grupo controle apresentaram erosão e fibrilação da cartilagem articular, com membrana sinovial hemorrágica, hiperêmica e rugosa. A formação de cordões fibrosos foi mais intensa, formando aderências, com presença de neovascularização e alguns tipos de vilosidades hipertróficas com vasos ingurgitados. Todos os coelhos deste grupo apresentavam entesófitos na inserção do tendão patelar e osteófitos periarticulares no côndilo femoral. Nos coelhos do grupo CAP, verificou-se fibrilação da cartilagem articular em dois animais (40%) nos quais a cartilagem articular mostrava-se com menos brilho, porém sem erosão. A membrana sinovial estava discretamente hiperêmica, com discreta neovascularização e formação de cordões fibrosos. Foram observados alguns osteófitos, vilosidades hipertróficas e, em alguns casos, vasos ingurgitados (Figura 12).

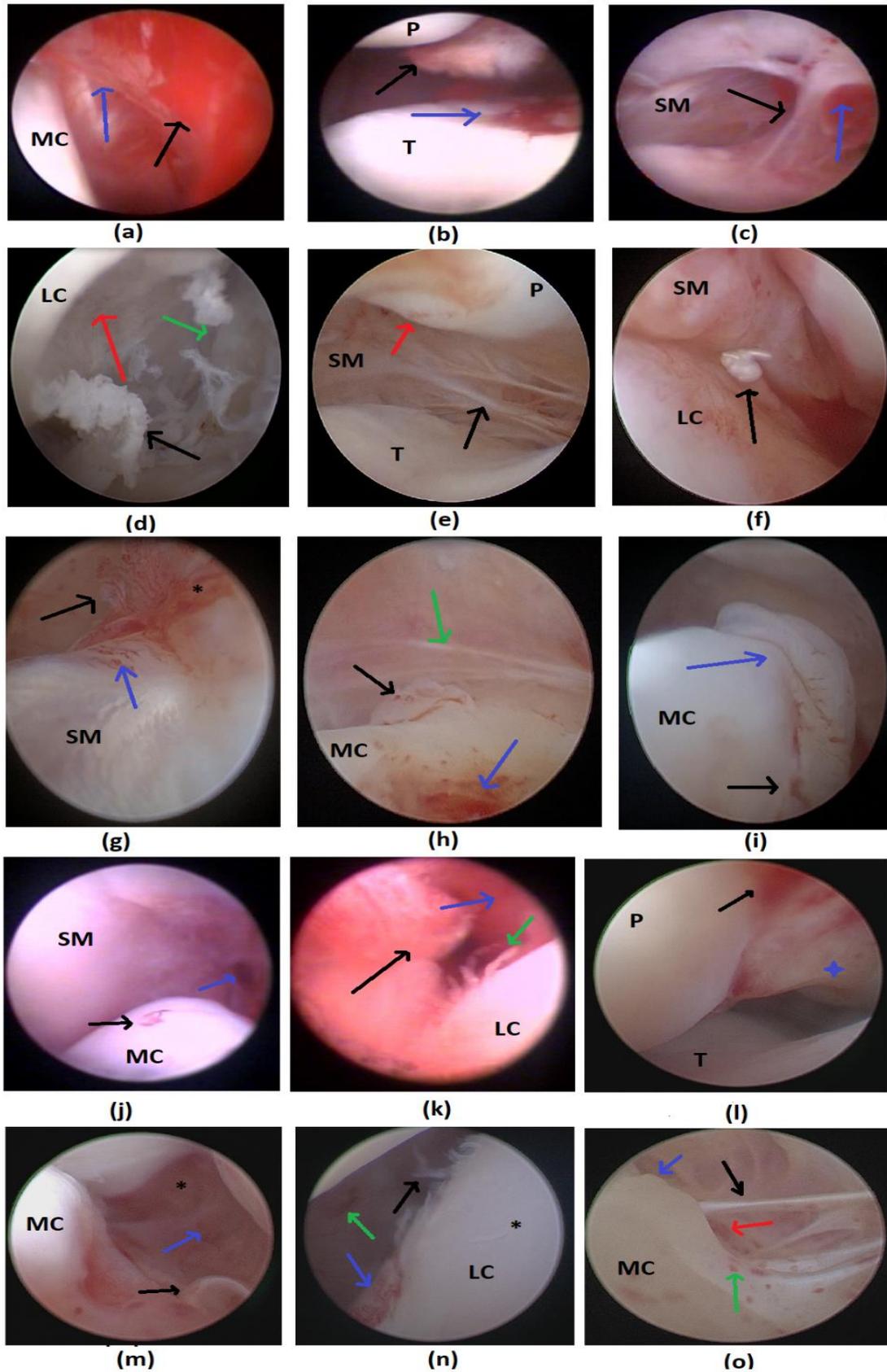


**Figura 12.** Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e CAP 30 dias após a reconstituição do LCCr e 15 dias após a segunda aplicação de CAP; M4: (a) compartimento medial da articulação fêmoro-tíbio-patelar mostrando formação de cordões fibrosos (seta preta), membrana sinovial hiperêmica (seta verde), osteófitos (seta azul) e erosão da cartilagem articular do côndilo medial (seta vermelha); (b) compartimento medial da articulação do joelho mostrando formação de cordões fibrosos (seta preta) e área hemorrágica na membrana sinovial (estrela vermelha); (c) compartimento lateral da articulação fêmoro-tíbio-patelar mostrando cordões fibrosos na membrana sinovial (seta preta), formação de coágulo e hemorragia localizada (seta verde); (d) compartimento lateral mostrando neovascularização moderada da membrana sinovial, vasos ingurgitados (asterisco), fibrilação (seta preta) e irregularidade da cartilagem articular (seta vermelha); (e) compartimento medial mostrando osteófitos na superfície articular do côndilo medial (seta preta); (f) articulação femoro-patelar mostrando neovascularização discreta da cartilagem articular do côndilo medial (seta preta), fibrilação (seta vermelha), vilosidades hipertróficas discretas (seta azul); a cartilagem articular discretamente rugosa; (g) articulação femoro-patelar mostrando fibrilação discreta (seta verde), vilosidades hiperêmicas (seta vermelha), neovascularização e membrana sinovial hiperêmica (seta preta); (h) neovascularização da membrana

sinovial (asterisco) e hiperemia discreta da membrana sinovial (seta preta); (i) articulação femoro-patelar mostrando formação discreta de cordões fibrosos (seta preta); (j) articulação femoro-patelar mostrando formação de cordões fibrosos (estrela negra) e osteófito (seta preta). Observe a membrana sinovial lisa, sem hiperemia e neovascularização. MC: côndilo medial; P: patela; SM: membrana sinovial; T: troclea.

No M5, 60 dias após a reconstituição do LCCr e 30 dias após a terceira e última aplicação de CAP, os sinais de OA foram acentuados no grupo controle, caracterizados por hiperemia intensa, neovascularização, formação de cordões fibrosos, aderências, fibrilação e erosão da cartilagem articular. Vilosidades hipertróficas também foram observadas. A formação de osteófitos no côndilo femoral e na patela foi evidente. Um coelho apresentou exposição óssea subcondral. Nos animais do grupo CAP evidenciou-se a progressão da OA, mostrando lesões com menor intensidade quando comparados ao grupo controle. As principais alterações observadas foram fibrilação e erosão discreta da cartilagem articular, hiperemia discreta e neovascularização da membrana sinovial, vilosidades hipertróficas e formação de cordões fibrosos (Figura 13).

Como esperado, o efeito do CAP se mostrou visível pelo menor grau de intensidade das lesões, como redução da hiperemia e vascularização sinovial e melhor aspecto da cartilagem articular, como observado na avaliação artroscópica. O grupo tratado apresentou um processo degenerativo menos intenso quando comparado ao grupo controle, demonstrando, aparentemente, um efeito clínico benéfico das injeções intra-articulares de CAP.



**Figura 13.** Imagens artroscópicas da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos do grupo controle e CAP 60 dias após a reconstituição do LCCr e 30 dias da terceira e última injeção de CAP M5: (a) compartimento medial da articulação fêmoro-tíbio-patelar mostrando a membrana sinovial hiperêmica (seta azul) e hemorrágica (seta preta); (b) articulação femoro-patelar mostrando proliferação de tecidos (seta preta) na inserção do tendão patelar e erosão

da cartilagem articular com exposição óssea subcondral (seta azul); (c) compartimento medial da articulação fêmoro-tíbio-patelar mostrando formação e aderências de cordões fibrosos (setas pretas) e hiperemia da membrana sinovial (seta azul); (d) compartimento lateral mostrando erosão grave da cartilagem articular (seta vermelha), fibrilação (seta verde) e fragmentos de fibrina livre no interior da articulação (seta preta); (e) articulação femoro-patelar mostrando acentuada formação de cordões fibrosos (seta preta) e entesófitos na patela (seta vermelha); (f) compartimento lateral da articulação fêmoro-tíbio-patelar, mostrando membrana sinovial rugosa e um corpo livre no espaço articular (seta preta); (g) membrana sinovial com neovascularização (asterisco), vilosidades hipertróficas e hemorrágicas (seta preta e azul); (h) compartimento medial da articulação fêmoro-tíbio-patelar mostrando grave erosão da cartilagem articular (seta azul), formação de cordões fibrosos (seta verde) e formação de osteófitos (seta preta); (i) compartimento medial mostrando em detalhes a formação de osteófitos no côndilo medial (seta azul) e neovascularização (seta preta); (j) compartimento medial da articulação fêmoro-tíbio-patelar mostrando neovascularização no côndilo medial (seta preta) e hemorragia e hiperemia da membrana sinovial (seta azul); (k) compartimento lateral da articulação fêmoro-tíbio-patelar, mostrando vilosidades hipertróficas e vascularizadas (seta preta), fibrilação da cartilagem articular do côndilo lateral (seta verde) e membrana sinovial hiperêmica (seta azul); (l) articulação femoro-patelar mostrando a formação de coágulos na inserção do tendão patelar (seta preta) e neoformação tecidual (estrela azul); (m) compartimento medial mostrando erosão da cartilagem articular (seta vermelha), formação de cordões fibrosos (seta preta), hiperemia da membrana sinovial (seta azul) e membrana sinovial rugosa (asterisco); (n) compartimento lateral da articulação fêmoro-tíbio-patelar mostrando fibrilação do côndilo femoral (seta preta), neovascularização da cartilagem articular (seta azul), hemorragia na membrana sinovial (seta verde) e erosão discreta da cartilagem articular (asterisco); (o) compartimento medial mostrando hemorragia da membrana sinovial (seta verde), hiperemia na membrana sinovial (seta vermelha), formação e adesão de cordões fibrosos (seta preta) e formação de osteófitos no côndilo femoral (seta azul).

## 2.4. Discussão

A artroscopia mostrou-se como uma alternativa favorável, minimamente invasiva no acompanhamento das lesões articulares e na avaliação do efeito da terapia em coelhos e, como descrito na literatura (Borges et al., 2008), a recuperação pós-cirúrgica imediata ocorre mais rapidamente, uma vez que o trauma é menor, quando comparado com a abordagem articular convencional.

A artroscopia é uma ferramenta terapêutica e de diagnóstico por imagem caracterizada por sua natureza minimamente invasiva e por sua capacidade de propiciar informações detalhadas que outros exames de imagem não oferecem. Técnicas tradicionais de imagens, como a radiografia, usadas para diagnóstico das alterações articulares não permite a identificação precoce das alterações (Rezende et al., 2006). Como descrito acima, neste experimento foi possível, através da artroscopia, visibilizar as alterações precocemente e com detalhes como a inflamação sinovial e hiperemia, neovascularização, hiperplasia das vilosidades, fibrilação e irregularidades da superfície articular, conforme relatado na literatura (Park et al., 2018; Punke et al., 2009).

Na avaliação artroscópica, foi possível evidenciar a gravidade das lesões decorrentes do processo degenerativo. No grupo controle ficou em evidencia a formação de cordões fibrosos, hiperemia e hipervascularização sinovial e a presença de erosões da cartilagem articular. Esses achados eram esperados devido à ação das enzimas degradativas durante o processo degenerativo (Rezende et al., 2012). Assim mesmo, nos coelhos do grupo CAP foi possível evidenciar lesões menos intensas na artroscopia, isso pode ser explicado pelo efeito protetor deste composto biológico sobre os tecidos articulares, que como observado nas avaliações histológicas, imunohistoquímicas e artroscópicas, diminui a hiperemia sinovial e a degradação da MEC.

A avaliação artroscópica como previsto, permitiu ver a diferença na evolução das lesões entre os dois grupos. Os animais do grupo controle apresentavam lesões mais intensas, com evolução

mais rápida e, conforme relatado por Melo et al (2008), erosão, aderências e hemorragias foram alterações características na progressão da OA. À medida que a OA progride, a cartilagem articular sofre fibrilação, erosão e exposição óssea subcondral, causando dor e perda de função, como observado nos coelhos do grupo controle.

A presença de substâncias inflamatórias nas articulações acometidas pela OA estimula a hiperplasia das vilosidades na membrana sinovial, hipervascularização, hiperemia e em fases mais avançadas pode ser observada a fibrilação da cartilagem articular e a presença de erosões da cartilagem articular, assim como observado neste estudo. Essas lesões são decorrentes da liberação de citocinas inflamatórias e de enzimas degradativas e puderam ser acompanhadas através da artroscopia, assim como descrito por Rezende et al., (2016).

O CAP pode controlar a evolução da OA, não apenas pelo seu conteúdo em FC, mas também por seu baixo conteúdo em leucócitos (Betancourt e Murrell, 2016). Essas células podem auxiliar na redução do processo inflamatório regulando o efeito de neutrófilos, macrófagos e linfócitos durante o processo de cicatrização (López et al., 2014). Conforme observado na avaliação artroscópica, os animais que receberam CAP apresentavam um processo inflamatório menos intenso, com alterações menos graves da cartilagem articular.

## **2.5. Conclusão**

Dos resultados obtidos pode-se concluir que a artroscopia é uma técnica que pode ser empregada no acompanhamento dos processos articulares degenerativos, propiciando avaliações detalhadas, bem como na avaliação do efeito dos tratamentos.

## 2.6. Referências bibliográficas

- BETANCOURT, J.P.; MURRELL, W.D. Leukocyte-poor platelet-rich plasma to treat degenerative meniscal tear: A case report. *J clin orthop trauma*. v. 7s, p.106-109. 2016.
- BORGES, N.F.; REZENDE, C.M.F.; MELO, E.G. et al. Vídeo-artroscopia da articulação fêmoro-tíbio-patelar em cães após secção do ligamento cruzado cranial guiada por artroscopia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. v. 60, n. 5, p.1035-1044. 2008.
- LITTLE, J.P.; BLEEDORN, J.A.; SUTHERLAND, B.J. et al. Arthroscopic Assessment of Stifle Synovitis in Dogs with Cranial Cruciate Ligament Rupture. *Plos One*. v. 9, n. 6, e97329. 2014.
- LÓPEZ, C.; ÁLVAREZ, M.E.; CARMONA, J.U. Temporal Bacteriostatic Effect and Growth Factor Loss in Equine Platelet Components and Plasma Cultured with Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: A Comparative In Vitro Study. *Vet Med Int*. p. 1-8. 2014.
- MELO, E.G.; NUNES, V.A.; REZENDE, C.M.d.F. et al. Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa em cães. Estudo histológico da cartilagem articular e membrana sinovial. *Arq Bras Med Vet Zootec*. v. 60, p. 83-92. 2008.
- REZENDE, C.M.F.; LEME, F.L.; SANTANA, G. et al. Intra-Articular Autologous Platelet Concentrate (APC) in the Treatment of Induced Knee Osteoarthritis (OA) in Rabbits — An Arthroscopic Evaluation. In: BAGARIA, V. (eds): *Arthroplasty a comprehensive review*. London: SE1 9SG, UK. 2016, p. 211-232.
- REZENDE, C.M.F.; MELO, E.G.; MALM, C. et al. Arthroscopical treatment of elbow joint disease. *Arq Bras Med Vet Zootec*. v. 64, p. 9-14. 2012.
- REZENDE, C.M.d.F.; MELO, E.G.; MADUREIRA, N.G. et al. Artroscopia da articulação fêmoro-tíbio-patelar de cão. *Arq Bras Med Vet Zootec*. v. 58, p. 841-848. 2008.
- PUNKE, J.P.; HULSE, D.A.; KERWIN, S.C. et al. Arthroscopic Documentation of Elbow Cartilage Pathology in Dogs with Clinical Lameness without Changes on Standard Radiographic Projections. *Vet Surg*. v. 38, p. 209-212. 2009.
- PARK, J.Y.; JEONG, B.S.; ROH, Y.S. et al. Evaluation of an arthroscopic stifle lever for stifle joint distraction in toy breed dogs. *J Vet Sci*. v. 19, p. 693-698. 2018.
- ROCHAT, M.C. Arthroscopy. *Vet Clin N Am: Small Anim Pract*. v. 31, p. 761-787. 2001.

## CAPITULO 3

### **AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS DA ARTICULAÇÃO FÊMORO-TÍBIO-PATELAR DE COELHOS COM OA INDUZIDA E TRATADOS OU NÃO COM CAP.**

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar por meio da macroscopia e histologia, o efeito do CAP na cápsula sinovial e na cartilagem articular da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos tratados ou não com CAP. Foram usados 30 coelhos de raça Nova Zelândia, machos, adultos jovens, com massa corporal média de 3,0 kg, submetidos à ruptura do ligamento cruzado cranial para indução da OA. Aos 21 dias depois os coelhos foram submetidos à reconstituição do ligamento e foram divididos em dois grupos: grupo CAP e grupo controle com injeção de solução Ringer Lactato. As aplicações foram realizadas imediatamente após a reconstituição do ligamento, aos 15 e aos 30 dias após a reconstituição. Cinco coelhos de cada grupo foram eutanasiados aos 15 dias após a reconstituição, outros cinco aos 30, e os restantes cinco coelhos de cada grupo aos 60 dias após a reconstituição. Fragmentos da cápsula sinovial e da cartilagem articular foram coletadas para fazer avaliação histopatológica do efeito do CAP na articulação. Foi observado que os animais que receberam o CAP apresentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) menor inflamação sinovial, menor proliferação celular e menor degradação da MEC quando comparados com os coelhos que receberam Ringer Lactato. Conclui-se que o CAP exerce um efeito a nível celular sobre os tecidos articulares, diminuindo a inflamação e a degradação e degeneração da MEC, exercendo um efeito benéfico na articulação, o que indica seu emprego seguro como terapia coadjuvante no tratamento da OA.

#### **Introdução**

A OA, sem importar sua causa, é uma doença progressiva, dolorosa e incapacitante. A disponibilidade de tratamentos disponíveis é ampla, porém insatisfatória. O diagnóstico precoce e o monitoramento da progressão da OA persistem como desafio. A OA resulta de uma complexa interação entre fatores bioquímicos e biomecânicos e mudanças envolvendo todos os tecidos da articulação tais como cápsula articular, osso subcondral, ligamentos e meniscos resultando na destruição da cartilagem articular e na perda da função (Rezende et al., 2016).

Devido ao fato de que a OA afeta todos os tecidos da articulação, alguns autores têm sugerido que as mudanças biomecânicas e no metabolismo induzem alterações na cartilagem, mediadas por mudanças na composição do líquido sinovial, da membrana sinovial e dos ligamentos. A avaliação histológica precisa da OA em animais é crítica para avaliar a efetividade dos agentes empregados para prevenir ou reduzir a gravidade da doença (Xinmin e Jian, 2005).

A aplicação intra-articular de CAP tem sido recentemente empregada para tratar diversas condições do sistema musculoesquelético e projeta-se como uma alternativa na terapia coadjuvante da OA. Sua aplicação tem demonstrado que este produto proporciona fatores de crescimento e citocinas capazes de modular o processo de cicatrização e a inflamação do local onde são aplicados (Wasterlain et al., 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar macroscopicamente e histologicamente o efeito do CAP sobre os tecidos da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos com OA induzida e tratados com CAP.

### 3.1.LITERATURA CONSULTADA

As estruturas que compõem a articulação fêmoro-tíbio-patelar cumprem uma ampla diversidade de funções, incluindo o amortecimento das forças que agem sobre a articulação, distribuição do impacto, lubrificação das estruturas e a congruência entre superfícies ósseas. A complexa organização da MEC e dos componentes dos tecidos articulares e as interações bioquímicas e moleculares entre essas estruturas propicia uma função adequada que permite a deambulação. Alterações em algum desses componentes causam ambientes catabólicos dentro das articulações que vão induzindo mudanças degenerativas irreversíveis (Hunter e Eckstein, 2011).

Os tecidos articulares estão compostos principalmente por colágeno, sendo que a cartilagem articular apresenta principalmente, fibras de colágeno tipo II e os outros tecidos como a cápsula sinovial, os ligamentos e tendões e o menisco apresentam fibras colágenas do tipo I e do tipo III. Além do colágeno, é possível encontrar outras substâncias como proteoglicanos, glicosaminoglicanos e ácido hialurônico que em conjunto regulam e equilibram o metabolismo articular (Martel-Pelleter et al., 2008; Dahlgren, 2007).

Após a injúria, desencadeia-se uma cascata de eventos celulares e bioquímicos caracterizada pela liberação de enzimas degradativas e mediadores inflamatórios que alteram a composição estrutural da MEC e dos demais componentes da articulação. Macroscópica e microscopicamente são observadas lesões em todas as estruturas articulares com perda da MEC e dos componentes celulares típicos de cada estrutura. O conjunto de lesões encontradas fornecem uma ideia da intensidade e da gravidade do processo degenerativo, orientando no prognóstico da doença e no tratamento mais adequado da mesma (Dalhgren, 2007).

Em coelhos podem ser observados sinais de aumento na espessura da cartilagem articular, fissuras e erosão da cartilagem às quatro semanas depois da ruptura do LCCr. Efusão sinovial, sinovite, fibrose da cápsula, hipertrofia do ligamento colateral medial, rupturas do menisco e inclusive do ligamento cruzado caudal são indicadores da progressão da alteração. Os osteófitos podem ser observados precocemente, por volta das duas semanas e aparecem principalmente sobre a tíbia, a tróclea e os côndilos femorais (Mathiessen e Conaghan, 2017; Laverty et al., 2010; Bouchgua et al., 2009).

Os avanços biológicos recentes têm permitido desenvolver uma classificação para as alterações teciduais observadas durante a OA em coelhos, em relação à progressão da mesma e tem facilitado a correlação funcional com as mudanças morfológicas das estruturas articulares. Esses sistemas de classificação consideram alterações macroscópicas tais como cor e aparência das estruturas, presença ou não de vilosidades, fibrilação, dentre outras e alterações microscópicas como hiperplasia e hipertrofia celular, proliferação celular, presença de infiltrado inflamatório e de neovascularização (Laverty et al., 2010; Pritzker et al., 2006).

É conhecido que os produtos derivados das plaquetas modulam o processo inflamatório, podem modificar a liberação e produção de fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e estimular a quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, modificando o ambiente onde se encontram e estimulando a regeneração tecidual. Na OA, o CAP tem se mostrado eficiente para diminuir a sinovite, a hipertrofia das vilosidades, a intensidade das lesões da cartilagem, melhorar as propriedades do líquido sinovial e em geral, o ambiente degradativo e inflamatório que predomina durante o processo degenerativo (Almasry et al., 2015; Liu et al., 2014; Osorio-Carmona e Rezende, 2014).

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar macroscopicamente e histopatologicamente os tecidos da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos com OA induzida artroscopicamente pela ruptura do LCCr e tratados com CAP ao longo de 60 dias. Consideraram-se as avaliações macroscópicas e microscópicas dos tecidos tratados com CAP e com ringer lactato e dos membros controle no M3, que não foram submetidos a nenhum procedimento.

### **3.2.MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o nº 63/2014.

Foram usados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, adultos jovens, machos com massa corporal média de 3,0 kg fornecidos pela fazenda experimental Prof. Hélio Barbosa da UFMG. O critério de inclusão dos animais na pesquisa foi seu estado geral saudável e ausência de alterações no sistema locomotor (ossos, articulações, músculos, tendões) confirmados mediante avaliação física, hemograma e bioquímica sanguínea, exame ortopédico e radiográfico nas incidências craniocaudal e médio lateral.

Os animais foram alojados no Centro Experimental do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG em salas adaptadas com gaiolas individuais de tamanho 60 cm x 60 cm x 37 cm, com acesso à água ad libitum e alimentação duas vezes por dia de acordo as necessidades nutricionais específicas.

Os coelhos foram divididos em dois grupos de 15 animais cada. Os animais do grupo I constituíram o controle e receberam injeções intra-articulares de 0,5 mL de solução Ringer Lactato e os animais do grupo II constituíram o tratamento e receberam injeções intra-articulares de 0,5 ml de CAP numa concentração de 1,5 a 2,5 vezes os níveis basais. Cada coelho foi submetido a uma avaliação artroscópica da articulação FTP seguida da ruptura do LCCr (M1) para desencadear o processo degenerativo. Aos 21 dias (M2) os coelhos foram novamente submetidos à avaliação artroscópica seguida da estabilização da articulação FTP com auto enxerto de fáschia lata e aplicação de CAP ou solução de Ringer Lactato segundo o tratamento estabelecido.

Depois da reconstituição do LCCr foram feitas avaliações artroscópicas seriadas aos 15 dias (M3; segunda aplicação dos tratamentos), 30 dias (M4; última aplicação dos tratamentos) e 60 dias (M5).

Antes de cada intervenção, foi feita a medicação pré-anestésica, que consistiu-se da aplicação de midazolam (Cristália, Brasil) e metadona (Cristália, Brasil) na dose de 1 mg / kg por via intramuscular, na indução da anestesia usou-se 15 mg / kg de cetamina e bloqueio anestésico dos nervos ciático e femoral com lidocaína (Cristália, Brasil) sem vasoconstritor na dose de 5 mg / kg e a anestesia foi mantida com isoflurano. As frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial e gases sanguíneos foram monitorados. A analgesia pós-operatória foi feita com tramadol (Teuto-Cristalparma, Brasil), na dose de 1 mg / kg por via subcutânea a cada 12 horas por três dias, a terapia anti-inflamatória com meloxicam (Ourofino, Brasil) na dose de 0,2 mg / kg por via intramuscular a cada 24 horas durante três dias após a seção e a antibioticoterapia com cefalexina na dose de 30 mg / kg a cada 12 horas durante cinco dias. O mesmo tratamento foi realizado após estabilização articular aos 21 dias e depois de cada artroscopia exploratória. A terapia profilática com cefalexina (Aspen-Pharma, Brasil) na dose

de 30 mg / kg por via intravenosa foi administrada trinta minutos antes da estabilização articular e a dosagem foi repetida duas horas após a cirurgia.

Os coelhos foram submetidos à eutanásia conforme os momentos planejados. As eutanásias foram feitas logo após as artroscopias e foram realizadas segundo a recomendação da equipe de anesthesiologistas do hospital veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. Sob anestesia inalatória, foi injetado pela via intravenosa, 10 ml de propofol seguidos de 10 ml de cloreto de potássio. Foi constatado o óbito na visibilização dos parâmetros vitais no monitor do aparelho de anestesia e pela ausculta cardíaca.

Nos momentos M3, M4 e M5, cinco animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia, e imediatamente depois, foram feitos registros fotográficos das articulações para a avaliação macroscópica seguindo-se a coleta de fragmentos da cápsula sinovial que foram fixados em formol tamponado 10% até as respectivas análises. Adicionalmente foram colhidos fragmentos da cartilagem articular e congelados a -80°C até as respectivas análises.

Para a análise histológica as amostras da cápsula foram processadas pela coloração de hematoxilina e eosina (HE) para analisar as alterações morfológicas e estruturais nas células causadas pela OA e pelo CAP. O osso e a cartilagem foram descalcificados e corados pela HE para avaliar a morfologia e a estrutura celular.

### **3.2.1. Processamento cápsula sinovial**

Depois que as amostras foram colhidas, o tecido foi processado rotineiramente conforme o protocolo do laboratório de histopatologia e imuno-histoquímica da Escola de Veterinária da UFMG. Os fragmentos foram dispostos no histotécnico (Leica ASP300 S) e foram submersos uma hora no álcool 70%, seguido de uma hora no álcool 80%, mais uma hora no álcool 90%, duas horas no álcool absoluto, 30 minutos no xilol e finalmente 30 minutos na parafina. Depois deste processo os fragmentos foram emblocados em parafina, cortados em micrótomo (Leica RM2245) numa espessura de 5 µm e montados em lâminas histológicas para posterior coloração.

### **3.2.2. Colorações**

Para avaliar a morfologia e estrutura celular empregou-se a coloração com HE conforme o protocolo do laboratório de histopatologia da Escola de Veterinária da UFMG. As lâminas foram colocadas na estufa (fanem 502-C) a 37°C durante 15 minutos para retirar o excesso de parafina. Seguiu-se o processo de hidratação iniciando com a submersão em xilol durante 25 minutos e posterior submersão em álcool absoluto I durante cinco minutos, submersão em álcool absoluto II por mais 5 minutos, submersão em álcool 90% durante cinco minutos, submersão em álcool 80% durante mais 5 minutos, submersão em álcool 70% durante cinco minutos, submersão em água destilada por três minutos, submersão em hematoxilina durante um minuto e lavadas em água corrente por mais 15 minutos. Depois disso, as lâminas foram submersas em eosina durante dois minutos e lavadas em água corrente para posterior desidratação. A desidratação foi feita mergulhando as lâminas rapidamente em álcool 70%, seguidas de um mergulho rápido em álcoois 80% e 90%, submersão em álcool absoluto I durante 10 minutos, submersão em álcool absoluto II por mais 10 minutos e submersão em xilol por três minutos. Posteriormente as lâminas foram limpadas e montadas com bálsamo Canadá e observadas em microscópio óptico.

### 3.2.3. Processamento cartilagem articular

Para a avaliação histológica do tecido ósseo e da cartilagem articular, os fragmentos foram desprovidos de todo o tecido mole circundante e cada fragmento ósseo foi envolvido em gaze e identificado para descalcificação em solução de ácido fórmico a 24% com citrato de sódio durante 30 dias. As amostras foram dispostas no mesmo recipiente e submersas na solução descalcificadora. A solução foi trocada a cada 48 horas até a comprovação radiográfica completa da descalcificação óssea. Após a descalcificação as amostras foram lavadas por 24 horas em água corrente para então serem desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, absoluto I e II), permanecendo duas horas em cada um deles. Depois da desidratação, os fragmentos foram submersos em xilol durante 40 minutos. Seguidamente os fragmentos de osso foram emblocados em parafina líquida e finalmente foram obtidos cortes de cinco  $\mu\text{m}$  de espessura. As amostras foram coradas com Hematoxilina-Eosina segundo o procedimento padrão para observação por microscopia óptica de luz. A coloração de Hematoxilina-Eosina foi feita conforme o descrito acima anteriormente.

### 3.2.4. Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica da cartilagem articular foi feita conforme as recomendações da OARSI para a análise histopatológica da OA em coelhos (Lavery et al., 2010). Na avaliação macroscópica não foi utilizada a tinta índia ink para preservar o tecido e facilitar a realização dos testes imunohistoquímicos. Foram observadas principalmente alterações na superfície da cartilagem, presença de erosão da cartilagem e a exposição do osso subcondral (Tabela 5).

**Tabela 5.** Sistema de avaliação das alterações macroscópicas da cartilagem articular FTP de coelhos com OA induzida e tratados ou não com CAP.

AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CARTILAGEM ARTICULAR	
SCORE	DESCRIÇÃO
0	Superfície articular lisa apresentando cor normal (branca).
1	Superfície articular rugosa com mínima fibrilação ou uma coloração ligeiramente amarelada.
2	Erosão da cartilagem articular se estendendo até as camadas superficial e/ou média.
3	Erosão da cartilagem articular se estendendo dentro das camadas profundas.
4	Erosão completa da cartilagem articular com exposição do osso subcondral.

Camada superficial: Profundidade de erosão de aproximadamente  $<3$  mm

Camada média: Profundidade de erosão de aproximadamente  $\geq 3$  mm e  $\leq 5$  mm

Camada profunda: Profundidade de erosão de aproximadamente  $\geq 5$  mm e  $\leq 7$  mm

Tidemark e osso subcondral: Profundidade de erosão  $> 7$  mm

Classificação realizada conforme o reportado por Makino et al., 2001.

### 3.2.5. Avaliação microscópica

A avaliação microscópica das estruturas da articulação fêmoro-tíbio-patelar foi feita seguindo as orientações da sociedade internacional de pesquisa em osteoartrose (OARSI) e as recomendações para a avaliação histológica da OA em coelhos sugerida por Lavery et al., 2010.

Para a avaliação microscópica os tecidos da cápsula sinovial foram processados e corados como descrito anteriormente. A cartilagem articular e o osso subcondral foram descalcificados e corados com Hematoxilina e Eosina. Os tecidos foram cortados no plano sagital numa espessura de 5  $\mu\text{m}$  usando um micrótomo (HYRAX M15) com navalha de alto perfil e 3 seções por tecido foram utilizadas para as análises.

### 3.2.5.1. Classificação microscópica das alterações da membrana sinovial

As amostras da membrana sinovial foram coletadas do recesso suprapatelar e da região da inserção da cápsula no côndilo femoral medial, distante do local da punção artroscópica. A avaliação da membrana sinovial foi feita considerando os parâmetros apresentados na tabela 6.

**Tabela 6.** Avaliação e classificação histopatológica das alterações da membrana sinovial da articulação FTP de coelhos com OA induzida e tratados ou não com CAP.

CRITÉRIO AVALIADO	SCORE	DESCRIÇÃO
<b>SINOVIÓCITOS</b>		
<b>Proliferação</b>	0: normal	Uma camada celular
	1: discreta	Até duas camadas celulares de profundidade
	2: moderada	Até quatro camadas celulares de profundidade
	3: acentuada	Mais de quatro camadas celulares de profundidade
<b>Hipertrofia</b>	0: normal	Escamosa
	1: discreta	Cuboidal
	2: moderada	Cilíndrica
	3: acentuada	Cilíndrica com protruções citoplasmáticas
<b>INFILTRADO INFLAMATÓRIO</b>		
<b>Infiltrado linfoplasmocítico</b>	0: ausente	
	1: discreto	< de 2 células
	2: moderado	≥ 2 células, porém < de 4 células
	3: acentuado	≥ 4 células, infiltração difusa
<b>Agregados/folículos linfoplasmocíticos</b>	0: ausente	
	1: único	1
	2: muitos	>1
<b>ESTROMA SINOVIAL</b>		
<b>Hiperplasia das vilosidades</b>	0: normal	Sem vilosidades/ondas suaves
	1: discreta	Hiperplasia focal, vilosidades pequenas
	2: moderada	Hiperplasia multifocal de vilosidades
	3: acentuada	Hiperplasia difusa das vilosidades
<b>Proliferação de fibroblastos/fibrócitos</b>	0: normal	Densidade celular normal
	1: discreta	< de 2 células
	2: moderada	≥ 2 células, porém < de 4 células
	3: acentuada	≥ 4 células
<b>Proliferação de vasos sanguíneos</b>	0: normal	Sem proliferação de vasos sanguíneos
	1: discreta	< de 2 vasos sanguíneos
	2: moderada	≥ 2 vasos sanguíneos, porém < de 4 vasos sanguíneos
	3: acentuada	≥ 4 vasos sanguíneos
<b>Detritos de cartilagem/osso</b>	0: ausente	
	1: poucos	1-3
	2: muitos	>3
<b>Hemosiderose</b>	0: ausente	
	1: poucas células	1-3
	2: muitas células	>3

0: normal; 1: discreta; 2: moderada; 3: acentuada. Classificação realizada conforme o reportado por Laverty et al., 2010.

### 3.2.5.2. Classificação microscópica das alterações na cartilagem articular

A cartilagem articular foi dividida em duas regiões para avaliar as alterações presentes em toda a extensão do tecido. Foi feito um corte sagital no centro do fêmur e da tíbia para dividi-los em duas sub-regiões (côndilo lateral e côndilo medial). O tecido foi descalcificado e processado conforme descrito acima. A avaliação da cartilagem articular foi feita conforme o descrito na tabela 7.

**Tabela 7.** Avaliação e classificação histopatológica das alterações na cartilagem articular da articulação FTP de coelhos com OA induzida e tratados com CAP.

<b>Avaliação da cartilagem articular com Hematoxilina e Eosina</b>	
<b>ESTRUTURA</b>	
<b>SCORE</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
0	Superfície articular lisa
1	Irregularidades na superfície articular
2	Fissuras em <50% da superfície articular por campo
3	Fissuras em ≥50% da superfície articular por campo
4	Erosão de 1/3 da cartilagem articular em <50% da superfície articular por campo
5	Erosão de 1/3 da cartilagem articular em ≥50% da superfície articular por campo
6	Erosão de 2/3 da cartilagem articular em <50% da superfície articular por campo
7	Erosão de 2/3 da cartilagem articular em ≥50% da superfície articular por campo
8	Erosão de profundidade completa da cartilagem em <50% da superfície articular por campo
9	Erosão de profundidade completa da cartilagem em ≥50% da superfície articular por campo
10	Erosão de profundidade completa da cartilagem e da cartilagem calcificada até o osso subcondral em <50% da superfície articular por campo
11	Erosão de profundidade completa da cartilagem e da cartilagem calcificada até o osso subcondral em ≥50% da superfície articular por campo
<b>DENSIDADE DOS CONDRÓCITOS</b>	
<b>SCORE</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
0	Sem diminuição na densidade celular
1	Diminuição focal na densidade celular
2	Diminuição multifocal na densidade celular
3	Diminuição multifocal e confluyente na densidade celular
4	Diminuição difusa da densidade celular
<b>FORMAÇÃO DE AGLOMERADOS</b>	
<b>SCORE</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
0	Normal
1	<4 aglomerados por campo
2	≥ 4 aglomerados, porém < 8 aglomerados por campo
3	≥ 8 aglomerados por campo

Classificação realizada conforme o reportado por Laverty et al., 2010.

### 3.3. Avaliação estatística

Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. Foi feita uma comparação das médias dentro dos grupos, nos diferentes momentos avaliados e entre os grupos no M3, M4 e M5. Os valores da média e desvio padrão obtidos para as variáveis analisadas foram comparados pelo teste de ANOVA para determinar se houve diferenças significativas nos tratamentos empregados. O intervalo de confiança considerado foi de 95%, com diferenças significativas quando  $P < 0,05$

Para as análises estatísticas foram empregados os seguintes testes:

- Teste de student-Newman-Kels para avaliar diferenças estatísticas entre os valores pareados no sangue total e no CAP;
- Teste de Tukey para comparar os valores das médias entre o grupo controle e o grupo CAP;

- Teste de Kruskal-Wallis para determinar a interação entre o grupo e o tempo de avaliação;
- Teste de Friedman para determinar o efeito do tempo em cada um dos grupos.

### 3.4. Resultados

#### 3.4.1. Avaliação macroscópica

Os resultados da avaliação macroscópica são apresentados na Tabela 8 como valores de média e desvio padrão. O tecido mostrou-se preservado, permitindo uma avaliação sem intercorrências metodológicas decorrentes de uso de tinturas como a índia ink. A articulação do membro pélvico esquerdo, saudável, foi utilizada como controle negativo para comparação com as articulações alteradas. Em alguns animais, a tração do enxerto ocasionou luxação lateral da patela, podendo contribuir, discretamente, com o desgaste da cartilagem articular.

A articulação FTP saudável dos coelhos, com seus respectivos componentes é ilustrada na Figura 14.

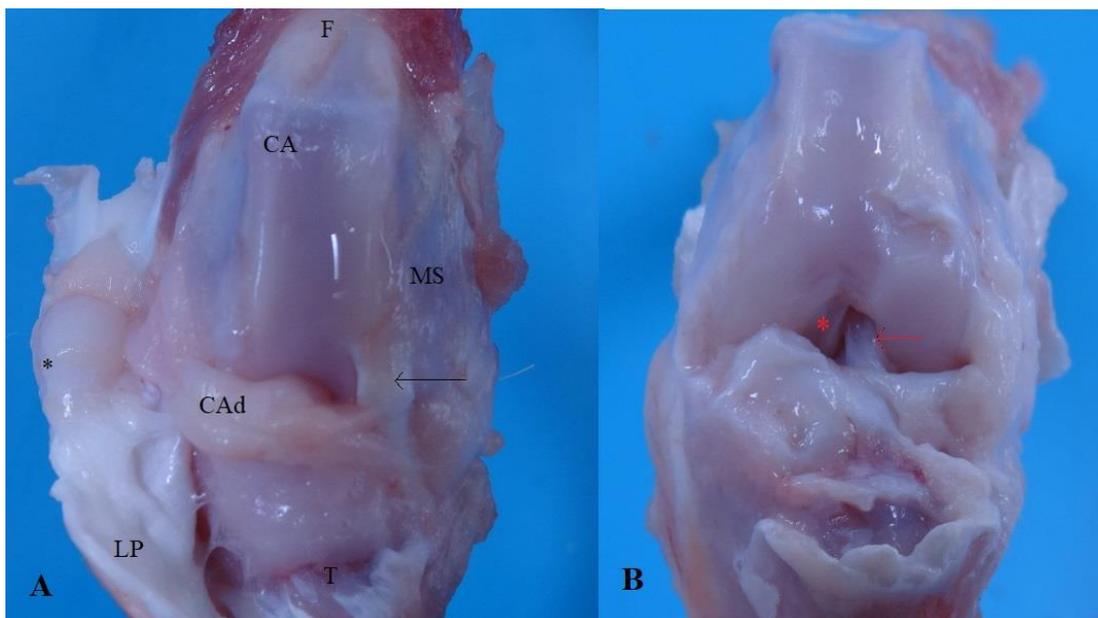
**Tabela 8.** Avaliação macroscópica da cartilagem articular do fêmur e da tíbia de coelhos do grupo controle e do grupo CAP com OA induzida nos momentos avaliados.

AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CARTILAGEM ARTICULAR						
SCORE						
	GRUPO CONTROLE			GRUPO CAP		
	M3	M4	M5	M3	M4	M5
Coelho 1	1	-	-	2	-	-
Coelho 2	1	-	-	1	-	-
Coelho 3	2	-	-	2	-	-
Coelho 4	2	-	-	1	-	-
Coelho 5	2	-	-	1	-	-
Coelho 6	-	2	-	-	1	-
Coelho 7	-	3	-	-	2	-
Coelho 8	-	2	-	-	2	-
Coelho 9	-	3	-	-	1	-
Coelho 10	-	3	-	-	2	-
Coelho 11	-	-	3	-	-	2
Coelho 12	-	-	4	-	-	3
Coelho 13	-	-	4	-	-	3
Coelho 14	-	-	4	-	-	2
Coelho 15	-	-	4	-	-	2
Media e SD	1,6±0,54 <sup>A1</sup>	2,6±0,54 <sup>B1</sup>	3,8±0,89 <sup>C1</sup>	1,4±0,91 <sup>A1</sup>	1,6±0,54 <sup>A2</sup>	2,4±0,54 <sup>B2</sup>

<sup>A,B,C</sup>: Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa (P<0,05) nos momentos avaliados DENTRO de cada grupo.

<sup>1,2</sup>: Números diferentes nas colunas indicam diferença significativa (P<0,05) nos momentos avaliados ENTRE os grupos.

0: normal; 1: discreta; 2: moderada; 3: acentuada.



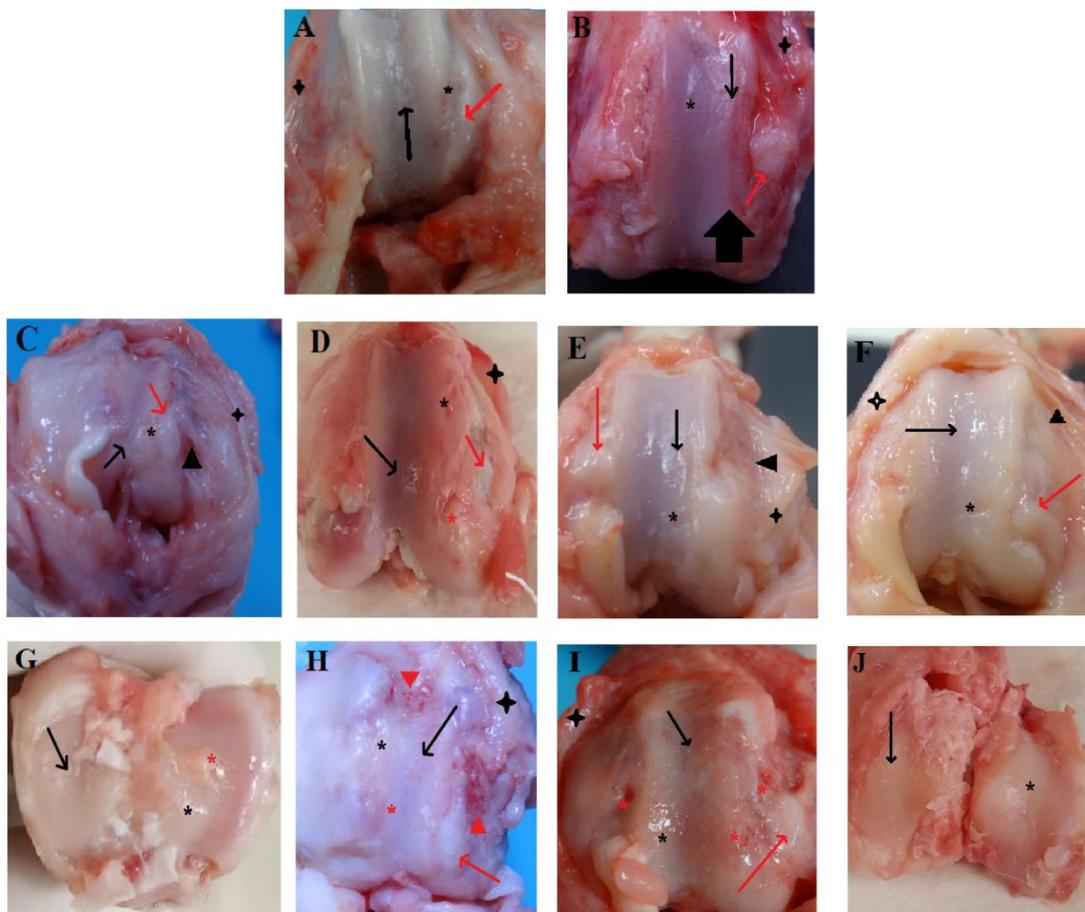
**Figura 14.** Fotografia da articulação FTP do MPE de coelhos. Articulação saudável. **A:** F: Fêmur; T: Tíbia; CA: cartilagem articular; MS: Membrana Sinovial; LP: Ligamento patelar; CAAd: coxim adiposo; \*: Patela; seta: inserção do tendão do músculo extensor digital. **B:** seta vermelha: Ligamento cruzado cranial; \* vermelho: Ligamento Cruzado Caudal. (o ligamento patelar e o coxim adiposo foram retirados para expor os ligamentos. A inserção do tendão do músculo extensor digital foi retirada).

No M3 no grupo controle, foram observadas alterações discretas na cartilagem articular do fêmur e da tíbia incluindo perda de brilho da superfície articular, rugosidade e em três coelhos (60%) observou-se erosões superficiais sem exposição do osso subcondral (Figura 15). No mesmo momento no grupo CAP, observaram-se também alterações envolvendo as superfícies articulares de ambos os ossos, incluindo rugosidades, perda de brilho e discretas alterações na cor, mostrando coloração ligeiramente amarelada. Neste grupo, houve dois animais (40%) com erosão superficial da cartilagem (Figura 15). Quando comparadas as médias de ambos os grupos no M3, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0.05$ ).

No M4 no grupo controle, foi observado o avanço das lesões do processo degenerativo, sendo que todos os animais desse grupo apresentaram rugosidade na superfície articular, erosão da cartilagem articular, presença de osteófitos e cartilagem sem brilho e avermelhada (Figura 15). No mesmo momento no grupo CAP, foi possível observar também o avanço das lesões articulares, porém com menor intensidade quando comparadas com os animais do grupo controle. Neste grupo dois animais (40%) apresentavam superfície articular irregular com perda de brilho e alterações na coloração da mesma (amarelada), enquanto os outros três animais (60%) do grupo apresentaram erosão superficial da cartilagem articular (Figura 15). Os animais deste grupo apresentaram menor fibrilação, menor presença de cordões fibrosos e uma superfície articular mais regular. Quando comparadas as médias de ambos os grupos no M4 foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

No M5 nos animais do grupo controle, foi evidenciada a progressão da OA com a presença de lesões mais acentuadas. Os animais deste grupo apresentaram perda do brilho e da coloração normal da cartilagem, erosões profundas (um animal, 20%) e inclusive erosão com exposição do osso subcondral (quatro animais, 80%) (Figura 15). No mesmo momento, nos animais do grupo CAP, observou-se o avanço, em menor intensidade, das lesões articulares, caracterizadas principalmente pela perda de brilho, pela mudança da cor da cartilagem (avermelhada) e pela presença de erosões superficiais (três coelhos, 60%) e profundas (dois coelhos, 40%) da

superfície articular, porém sem exposição do osso subcondral em nenhum caso (Figura 15). Quando comparadas as médias dos grupos foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15.** Avaliação macroscópica das articulações fêmoro-tíbio-patelar dos coelhos de ambos os grupos nos diferentes momentos avaliados. A (M3), C e D (M4), G e H (M5) grupo controle. B (M3), E e F (M4), I e J (M5) grupo CAP. A: Fêmur de coelho do grupo controle 15 dias após a reconstituição do LCCr mostrando o espessamento da membrana sinovial (estrela preta), erosões superficiais da cartilagem (asterisco), cartilagem articular com rugosidades e sem brilho (seta preta) e osteófitos periarticulares (seta vermelha). B: Fêmur de coelho do grupo CAP 15 dias após a reconstituição do LCCr mostrando o espessamento da membrana sinovial (estrela preta), erosões superficiais da cartilagem (asterisco), cartilagem articular com rugosidades (seta preta fina), osteófitos periarticulares (seta vermelha) e desgaste da borda troclear do côndilo média (seta preta grossa). C e D: Fêmur de coelhos do grupo controle 30 dias após a reconstituição do LCCr mostrando o espessamento da membrana sinovial (estrelas pretas), presença de cordões fibrosos (triângulo), erosão superficial da cartilagem articular (asteriscos pretos), erosão média e profunda da cartilagem articular (asterisco vermelho), rugosidades na superfície da cartilagem articular (setas pretas finas) e presença de osteófitos periarticulares (setas vermelhas). E e F: Fêmur de coelhos do grupo CAP 30 dias após a reconstituição do LCCr mostrando o espessamento da membrana sinovial (estrelas pretas), presença de cordões fibrosos (triângulo), erosões superficiais da cartilagem (asteriscos), rugosidades na superfície da cartilagem articular (setas pretas finas) e presença de osteófitos periarticulares (setas vermelhas). G e H: Tibia e fêmur de coelhos do grupo controle 60 dias após a reconstituição do LCCr mostrando o espessamento da membrana sinovial (estrela preta), erosões superficial e profunda na cartilagem articular (asteriscos pretos e vermelhos), rugosidades na superfície da cartilagem articular (setas pretas finas), erosão profunda com exposição do osso subcondral (triângulos vermelhos) e presença de osteófitos periarticulares (setas vermelhas). I e J: Fêmur e tibia de coelhos do grupo CAP 60 dias após a reconstituição do LCCr mostrando o espessamento da membrana sinovial (estrela preta), erosão superficial e profunda da cartilagem articular, sem exposição do osso subcondral (asteriscos pretos e vermelhos), rugosidades na superfície da cartilagem articular (setas pretas finas) e presença de osteófitos periarticulares (setas vermelhas).

### 3.4.2. Avaliação microscópica

#### 3.4.2.1. Avaliação microscópica da cápsula sinovial

Os resultados da avaliação microscópica da cápsula sinovial com as colorações de hematoxilina e eosina são apresentados na tabela 9. A figura 16 mostra a cápsula sinovial do membro esquerdo, não operado, sem alterações. As figuras 17, 18 e 19, ilustram as alterações observadas na cápsula sinovial dos coelhos de ambos os grupos, durante os momentos avaliados.

**Tabela 9.** Resultados da avaliação microscópica da cápsula sinovial coradas com hematoxilina e eosina em coelhos do grupo controle e do grupo CAP durante o M3, M4 e M5.

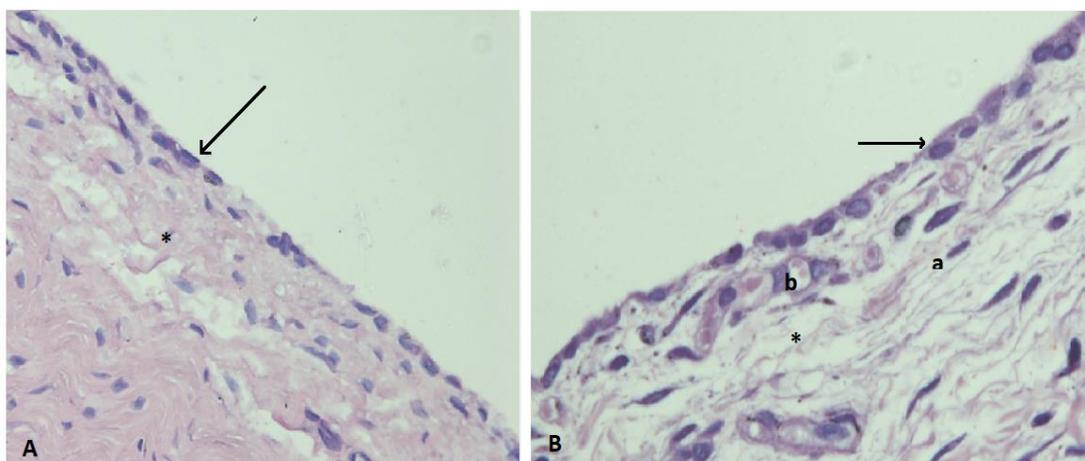
AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA MEMBRANA SINOVIAl							
SINOVIÓVITOS							
		CONTROLE			CAP		
		M3	M4	M5	M3	M4	M5
Proliferação	Coelho 1	1	1	2	1	1	2
	Coelho 2	1	1	2	1	1	1
	Coelho 3	1	2	2	1	1	1
	Coelho 4	2	2	3	1	2	2
	Coelho 5	2	3	3	2	2	2
Hipertrofia	Coelho 1	0	1	2	0	0	1
	Coelho 2	0	2	2	1	1	2
	Coelho 3	1	2	3	0	1	2
	Coelho 4	1	2	3	1	1	1
	Coelho 5	1	3	3	0	1	1
	Média e SD	1±0,66 <sup>1A</sup>	1,9±0,73 <sup>1B</sup>	2,5±0,52 <sup>1C</sup>	0,8±0,63 <sup>1A</sup>	1,1±0,56 <sup>2A</sup>	1,5±0,52 <sup>2B</sup>
INFILTRADO INFLAMATÓRIO							
		CONTROLE			CAP		
		M3	M4	M5	M3	M4	M5
Infiltrado linfoplasmocitário	Coelho 1	1	2	2	0	1	2
	Coelho 2	0	1	2	0	1	2
	Coelho 3	0	2	3	1	2	2
	Coelho 4	1	2	3	0	1	1
	Coelho 5	1	1	3	1	1	1
Agregados/folículos linfoplasmocitários	Coelho 1	0	0	1	0	0	0
	Coelho 2	0	0	0	0	0	0
	Coelho 3	0	0	0	0	0	0
	Coelho 4	1	1	1	0	1	1
	Coelho 5	1	1	1	1	1	1
	Média e SD	0,5±0,52 <sup>1A</sup>	1±0,81 <sup>1B</sup>	1,6±1,17 <sup>1C</sup>	0,3±0,48 <sup>1A</sup>	0,8±0,63 <sup>1B</sup>	1±0,81 <sup>2B</sup>
ESTROMA SINOVIAl							
		CONTROLE			CAP		
		M3	M4	M5	M3	M4	M5
Hiperplasia das vilosidades	Coelho 1	1	2	3	1	1	2
	Coelho 2	1	1	2	1	2	2
	Coelho 3	1	1	2	2	2	2
	Coelho 4	2	2	3	1	1	1
	Coelho 5	2	3	3	1	1	1
Proliferação de fibroblastos/fibrócitos	Coelho 1	1	2	3	1	1	1
	Coelho 2	1	2	2	1	2	2
	Coelho 3	1	2	3	1	2	3
	Coelho 4	2	2	3	1	1	2
	Coelho 5	1	2	2	1	1	1
Proliferação de vasos sanguíneos	Coelho 1	0	1	2	1	1	1
	Coelho 2	1	2	3	0	1	2
	Coelho 3	1	1	3	0	0	1
	Coelho 4	1	2	2	0	1	1
	Coelho 5	0	1	3	1	2	2
Detritos de cartilagem/osso	Coelho 1	0	0	0	0	0	0
	Coelho 2	0	0	0	0	0	0
	Coelho 3	0	1	1	0	0	0
	Coelho 4	0	1	1	0	0	1

	Coelho 5	0	0	0	0	1	1
	Coelho 1	0	0	1	0	0	0
	Coelho 2	0	1	1	0	0	1
	Coelho 3	0	1	1	0	1	0
Hemosiderose	Coelho 4	0	1	1	0	0	0
	Coelho 5	0	1	2	0	1	1
	Média e SD	0,64±0,7 <sub>1A</sub>	1,28±0,79 <sup>1B</sup>	1,88±1,05 <sup>1C</sup>	0,52±0,58 <sup>1A</sup>	0,88±0,72 <sup>2A</sup> <sub>B</sub>	1,12±0,83 <sup>2B</sup>

A,B,C: Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nos momentos avaliados DENTRO de cada grupo.

<sup>1,2</sup>: Números diferentes nas colunas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nos momentos avaliados ENTRE os grupos.

0: normal; 1: discreta; 2: moderada; 3: acentuada.



**Figura 16.** Microfotografia mostrando a aparência da cápsula sinovial de coelhos saudáveis. A) cápsula sinovial mostrando uma única camada de sinoviócitos, com células normais de aparência escamosa (seta preta); camada de tecido fibroso subjacente (asterisco). B) cápsula sinovial de coelho saudável mostrando uma camada fina de sinoviócitos em forma de escama (seta), uma camada de sustentação (asterisco) contendo alguns fibroblastos (a) e poucos vasos sanguíneos (b). A e B: x100 µm.

Ao analisar as imagens microscópicas da cápsula sinovial foram observadas alterações decorrentes do processo degenerativo. Alterações na proliferação celular e hipertrofia dos sinoviócitos foram observadas em todos os momentos avaliados. Em ambos os grupos foram observados infiltrados e agregados linfoplasmocitários. Esses infiltrados foram observados com mais frequência no M5, principalmente nos coelhos do grupo controle.

Foram observadas também alterações do estroma da cápsula sinovial como hiperplasia das vilosidades, proliferação de fibroblastos e de vasos sanguíneos e nos casos mais graves do processo degenerativo, observou-se detritos de cartilagem e osso e hemosiderose na cápsula. Os coelhos do grupo controle, apresentaram as lesões mais acentuadas do estroma quando comparados com os escores no grupo CAP.

Nos animais do grupo controle, no M3, foram observadas alterações discretas na cápsula sinovial compatíveis com o processo degenerativo. Três coelhos (60%) apresentaram proliferação discreta dos sinoviócitos enquanto dois coelhos (40%) apresentaram proliferação moderada destas células (40%). Nesse mesmo momento, dois coelhos (40%) tiveram sinoviócitos com morfologia normal enquanto os outros três animais (60%) mostraram hipertrofia discreta dos sinoviócitos (Figura 17).

Em dois coelhos (40%) do grupo controle não foi observada a presença de infiltrados linfoplasmocitários, enquanto nos outros três animais (60%) foram observados um infiltrado discreto caracterizado por poucas células linfoplasmocíticas. Em três animais deste grupo não foram observados agregados/folículos linfoplasmocíticos enquanto em dois deles (40%) foi observado um único agregado linfoplasmocítico (Figura 17).

Três coelhos (60%) do grupo controle, apresentaram presença discreta de vilosidades enquanto outros dois coelhos (40%) apresentaram presença moderada. Nesse mesmo momento (M3) quatro animais (80%) apresentaram proliferação discreta de fibroblastos e um coelho (20%) mostrou proliferação moderada de fibroblastos. Três coelhos (60%) apresentaram proliferação discreta de vasos sanguíneos no estroma, enquanto em dois coelhos (40%) o tecido apresentou-se normal, sem proliferação de vasos sanguíneos. Em nenhum coelho do grupo controle neste momento, foram observados detritos de cartilagem ou osso e nem presença de hemosiderose (Figura 17).

Neste mesmo momento (M3), nos animais do grupo CAP, também foram observadas alterações discretas causadas pelo avanço da OA. Quatro coelhos (80%) deste grupo apresentaram proliferação discreta dos sinoviócitos e um deles (20%) apresentou proliferação moderada dessas células. Três coelhos (60%) apresentaram morfologia celular normal, enquanto os dois restantes (40%) apresentaram hipertrofia discreta dos sinoviócitos (Figura 17).

Em três animais (60%) do grupo CAP não foram observados sinais de infiltrado linfoplasmocítico, enquanto nos outros dois (40%) observou-se um infiltrado inflamatório discreto. Neste mesmo período, não foi observada a formação de aglomerados/folículos linfoplasmocíticos em quatro coelhos (80%), porém um deles (20%) mostrou a formação de um único agregado inflamatório (Figura 17).

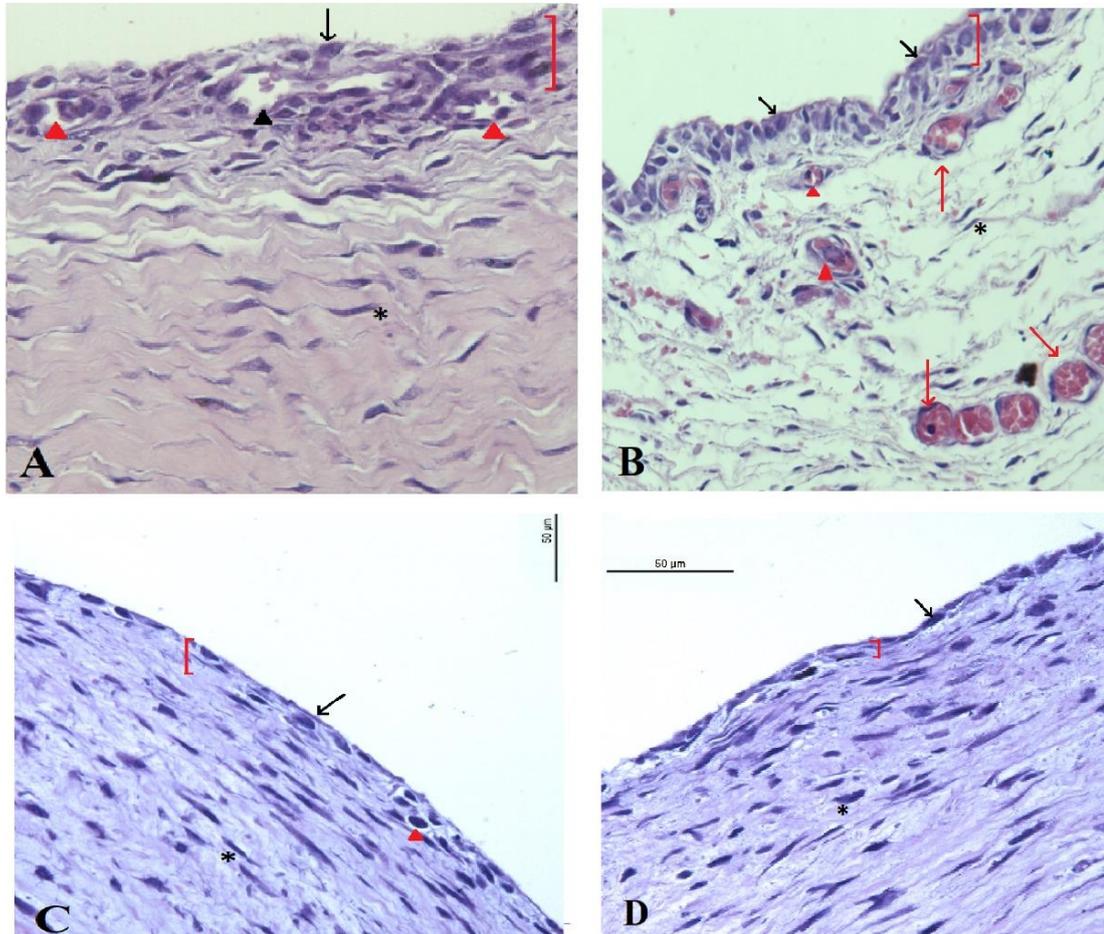
Foi observado em quatro animais deste grupo (80%) hiperplasia discreta das vilosidades e em um animal (20%) hiperplasia moderada das vilosidades da cápsula sinovial. Também foi observado em todos os animais deste grupo (100%) proliferação discreta de fibroblastos. Três animais (60%) apresentaram proliferação discreta de vasos sanguíneos e os outros dois animais (40%) apresentaram o estroma normal (sem vasos sanguíneos). Finalmente, em nenhum animal deste grupo no M3, foram observadas a presença de detritos de cartilagem ou osso ou de hemosiderose (Figura 17).

Quando comparadas as médias dos parâmetros avaliados em ambos os grupos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no M3.

Na avaliação microscópica da cápsula sinovial no M4, foi verificada a evolução do processo degenerativo em ambos os grupos. Proliferação e hiperplasia de sinoviócitos, presença de infiltrados e aglomerados inflamatórios, hipertrofia das vilosidades, proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos e hemosiderose foram as alterações observadas em este momento, sendo mais acentuadas nos animais do grupo controle.

Nos animais do grupo controle, no M4, observou-se proliferação discreta de sinoviócitos em dois animais (40%), proliferação moderada em outros dois (40%) e proliferação acentuada em um dos coelhos (20%). Um coelho (20%) apresentou hipertrofia discreta dos sinoviócitos, três coelhos (60%) apresentaram hipertrofia moderada e um coelho (20%) apresentou hipertrofia acentuada dessas células (Figura 18).

Foi observado nos animais deste grupo que dois coelhos (40%) apresentaram infiltrado linfoplasmocítico discreto e três animais (60%) tiveram infiltrado linfoplasmocítico moderado. Durante a avaliação foi possível verificar que não houve formação de agregados/folículos linfoplasmocíticos em três coelhos (60%), porém dois coelhos (40%) apresentaram um único agregado inflamatório.



**Figura 17.** Microfotografia da avaliação microscópica da cápsula sinovial, corada com hematoxilina e eosina, de coelhos de ambos os grupos no momento 3 (M3). A e B grupo controle. C e D grupo CAP. A) Proliferação discreta dos sinoviócitos, observada pela presença de várias camadas de células (chave vermelha); hipertrofia discreta dos sinoviócitos observada pela presença de células cuboidais (seta preta); presença discreta de infiltrado linfoplasmocítico (triângulo vermelho); presença de um único agregado linfoplasmocitários (triângulo preto); proliferação discreta de fibroblastos (asterisco). B) Proliferação discreta de sinoviócitos (chave vermelha); hipertrofia moderada de sinoviócitos caracterizada pela presença de células cuboidais e cilíndricas (setas pretas); presença discreta de infiltrado linfoplasmocitários (triângulos vermelhos); proliferação discreta de fibroblastos (asterisco) e proliferação moderada de vasos sanguíneos (setas vermelhas). C) Membrana sinovial normal apresentando uma única camada celular de sinoviócitos (chave vermelha); Hipertrofia discreta dos sinoviócitos representada pela presença de poucas células com forma cuboidal (seta preta); presença discreta de infiltrado linfoplasmocitários (triangulo vermelho); densidade de fibroblastos normal no estroma da cápsula (asterisco). D) Membrana sinovial normal apresentando uma única camada celular de sinoviócitos (chave vermelha); Hipertrofia discreta dos sinoviócitos representada pela presença de poucas células com forma cuboidal (seta preta); densidade de fibroblastos normal no estroma da cápsula (asterisco). A, B, C e D: x50  $\mu$ m.

Em dois animais (40%) do grupo controle verificou-se hiperplasia discreta das vilosidades, em outros dois (40%) hiperplasia moderada e em outro animal (20%) hiperplasia acentuada das mesmas. Todos os animais deste grupo (100%) apresentaram proliferação moderada de fibroblastos. Três animais (60%) tiveram proliferação discreta e dois coelhos (40%) proliferação moderada de vasos sanguíneos. Em três coelhos (60%) não foi observada a

presença de detritos de cartilagem ou osso, enquanto em dois coelhos (40%) observou-se a presença de poucos detritos. Um animal (20%) deste grupo não teve presença de hemosiderose e nos outros quatro coelhos (80%) observaram-se poucas células com este acúmulo (Figura 18).

No grupo CAP foi possível observar também o avanço das lesões osteoartríticas, porém em menor intensidade do que as observadas no grupo controle. No M4, três coelhos (60%) deste grupo tiveram proliferação discreta dos sinoviócitos, enquanto dois coelhos (40%) tiveram proliferação moderada. Um coelho (20%) do grupo apresentou morfologia celular normal (forma de escama), enquanto os quatro coelhos restantes (80%) apresentaram hipertrofia discreta dos sinoviócitos.

Quatro animais (80%) do grupo CAP apresentaram um infiltrado linfoplasmocítico discreto enquanto um animal (20%) apresentou infiltrado inflamatório moderado. Em três animais (60%) não foi possível verificar a formação de agregados/folículos linfoplasmocíticos, porém em dois animais (40%) do grupo observou-se a formação de um único agregado (Figura 18).

Neste tempo de observação (M4), foi possível observar em três animais (60%) do grupo hiperplasia discreta das vilosidades e moderada em dois animais (40%). Três coelhos (60%) apresentaram proliferação discreta dos fibroblastos e dois animais (40%) tiveram proliferação moderada dessas células. Um animal (20%) apresentou-se sem proliferação de vasos sanguíneos, três animais (60%) tiveram proliferação discreta e um animal (20%) mostrou proliferação moderada dos vasos sanguíneos no estroma da cápsula articular. Em quatro coelhos (80%) do grupo os detritos de cartilagem ou osso foram ausentes e em um coelho (20%) observou-se poucos detritos. Três coelhos (60%) não apresentaram hemosiderose celular, enquanto dois coelhos (40%) mostraram poucas células com esse pigmento no seu interior (Figura 18).

Quando comparadas as médias no M4 entre o grupo controle e o grupo CAP verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) no parâmetro sinoviócitos e estroma sinovial, porém não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na presença de infiltrado inflamatório.

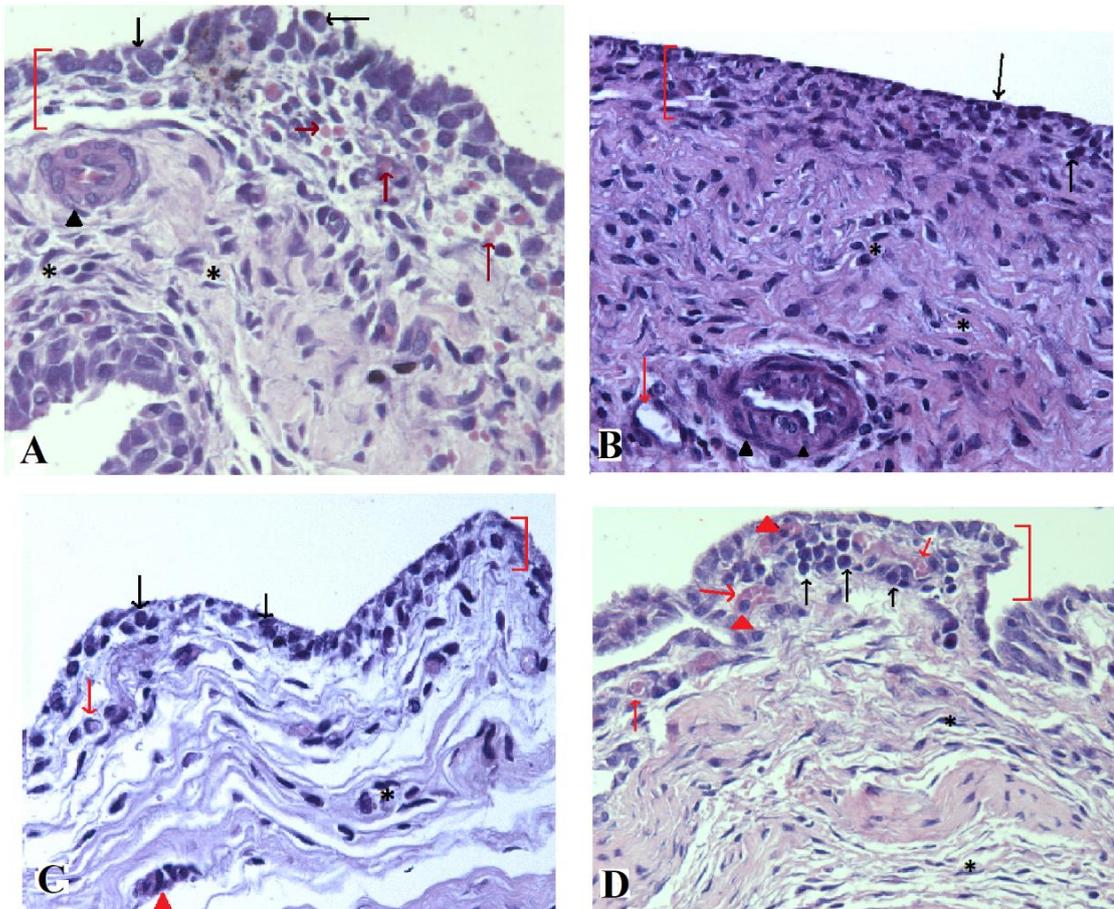
Na avaliação no M5, observou-se a progressão do processo degenerativo, mais intensa nos animais do grupo controle. Alterações associadas à proliferação e hipertrofia celular, presença de infiltrados inflamatórios, hiperplasia das vilosidades, proliferação de vasos sanguíneos, detritos e hemosiderose foram as mais comuns.

Os animais do grupo controle, apresentaram lesões acentuadas na maioria dos parâmetros avaliados. Três coelhos (60%) apresentaram proliferação moderada dos sinoviócitos e dois coelhos (40%) mostraram proliferação acentuada destas células. Dois coelhos (40%) mostraram hipertrofia moderada dos sinoviócitos e os três restantes (60%), hipertrofia acentuada (Figura 19).

Foi observado também nos animais deste grupo a presença de infiltrado inflamatório de moderado a acentuado. Dois animais (40%) apresentaram infiltrado linfoplasmocítico moderado, enquanto três animais do grupo tiveram infiltrado inflamatório acentuado. Neste mesmo momento, foi observado em três animais (60%) do grupo a presença de um único agregado linfoplasmocítico, enquanto nos outros dois animais (40%) não foram observados a presença de agregados inflamatórios.

Na avaliação do estroma sinovial, observaram-se alterações acentuadas no grupo controle. Três animais (60%) do grupo apresentaram hiperplasia acentuada das vilosidades e dois animais

(40%) apresentaram hiperplasia moderada. Três animais (60%) tiveram proliferação acentuada de fibroblastos e os outros dois (40%) apresentaram proliferação moderada dessas células. Três animais (60%) mostraram proliferação acentuada de vasos sanguíneos, enquanto os outros dois coelhos (40%) mostraram proliferação moderada. Não foram observados detritos de cartilagem ou osso em três coelhos (60%), enquanto os outros dois animais do grupo (40%) apresentaram poucos detritos. Em quatro coelhos (80%) do grupo foram vistas poucas células do estroma com hemosiderose e um coelho (20%) apresentou hemosiderose em mais de três células (Figura 19).



**Figura 18.** Microfotografia da avaliação microscópica da cápsula sinovial, corada com hematoxilina e eosina, de coelhos de ambos os grupos no momento 4 (M4). A e B grupo controle. C e D grupo CAP. A) proliferação moderada de sinoviócitos representada pela presença de várias camadas de células (chave vermelha); hipertrofia moderada dos sinoviócitos caracterizada pela presença de células cilíndricas (setas pretas); presença de um único agregado linfoplasmocitário com abundantes células inflamatórias (triângulo preto); proliferação discreta e hipertrofia de fibroblastos (asterisco); presença de algumas células com acúmulo de hemossiderina/hemosiderose (setas marrons). B) Proliferação acentuada de sinoviócitos representada pela presença de várias camadas de células (chave vermelha); hipertrofia discreta e moderada de sinoviócitos, caracterizada pela presença de células cuboidais; presença de um único agregado linfoplasmocitário com abundantes células inflamatórias (triângulo preto); proliferação discreta de vasos sanguíneos (seta vermelha); proliferação discreta e hipertrofia de fibroblastos (asterisco). C) proliferação discreta de sinoviócitos observada pela presença de duas camadas de células (chave vermelha); hipertrofia discreta de sinoviócitos, observada pela presença de células cuboidais (setas pretas); presença moderada de infiltrado linfoplasmocitário, observando-se algumas células inflamatórias (triângulo vermelho); proliferação e hipertrofia discreta de fibroblastos no estroma da cápsula (asterisco); presença normal de vasos sanguíneos (seta vermelha); D) proliferação moderada de sinoviócitos representada pela presença de até quatro camadas celulares (chave vermelha); hipertrofia discreta dos sinoviócitos, caracterizada pela presença de células cuboidais (setas pretas); presença moderada de infiltrado linfoplasmocitário caracterizado pela presença de

algumas células inflamatórias perto dos vasos sanguíneos (triângulo amarelo); proliferação moderada e hipertrofia dos fibroblastos do estroma da cápsula (asterisco); proliferação discreta de vasos sanguíneos (setas vermelhas). A, B, C e D: x50  $\mu$ m.

Nos animais do grupo CAP também foi evidenciada a progressão das alterações degenerativas, porém mostraram um avanço mais lento e conseqüentemente as lesões foram menos intensas. Três coelhos (60%) neste grupo apresentaram proliferação moderada de sinoviócitos, enquanto os dois (40%) restantes mostraram proliferação discreta destas células. Três coelhos apresentaram hipertrofia dos sinoviócitos no M5 enquanto nos dois coelhos restantes (40%) observou-se hipertrofia moderada destas células.

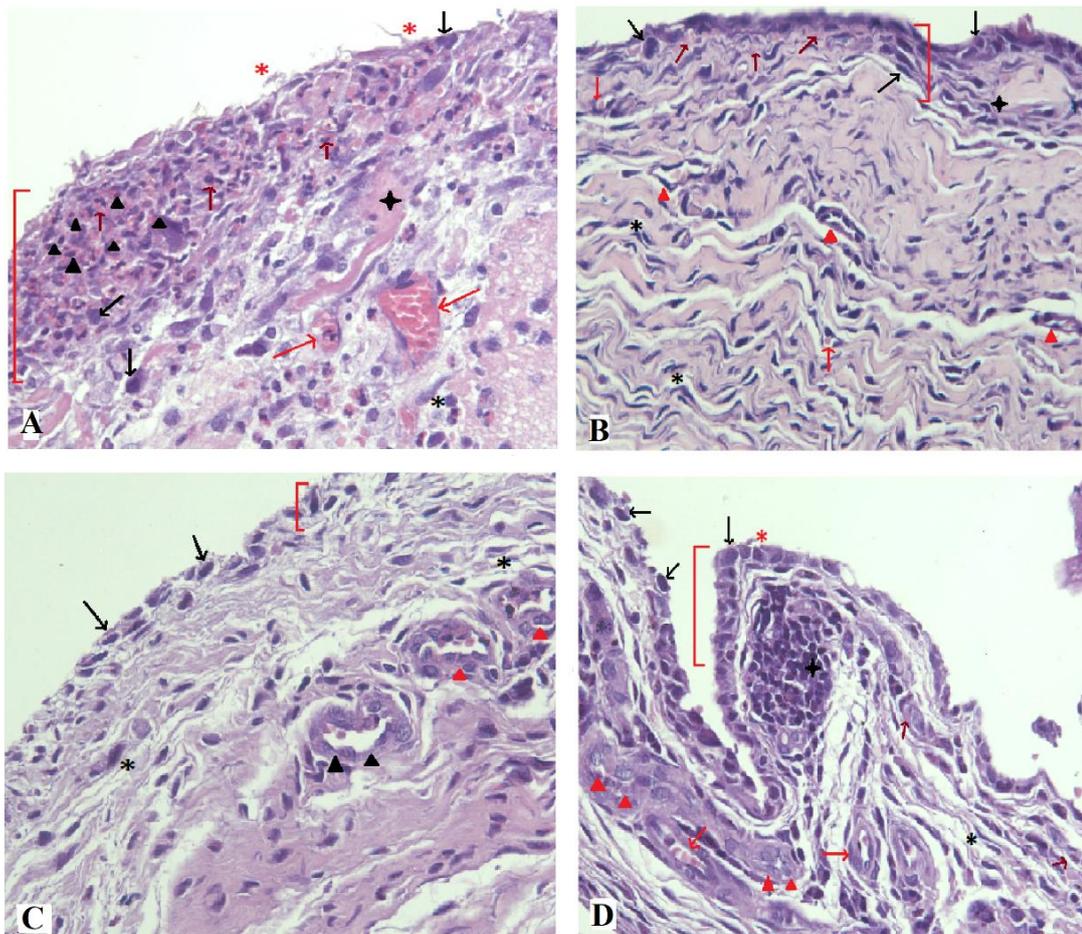
Neste grupo também foram observados infiltrados inflamatórios durante o M5. Em três coelhos (60%) observou-se infiltrado linfoplasmocítico moderado, enquanto que dois (40%) foi observada a presença discreta desses mesmos infiltrados. Foi observada a presença de um único agregado inflamatório em apenas dois animais (40%) deste grupo, enquanto nos outros três coelhos (60%) não foram observados estes infiltrados (Figura 19).

Na avaliação do estroma da cápsula sinovial observou-se que três animais (60%) apresentavam hiperplasia moderada das vilosidades e dois animais (40%) hiperplasia discreta das mesmas. Dois animais (40%) mostravam proliferação discreta de fibroblastos, dois (40%) proliferação moderada e um (20%) proliferação acentuada destas células. Em relação à proliferação dos vasos sanguíneos, verificou-se que três animais (60%) apresentavam proliferação discreta e dois (40%), proliferação moderada dos vasos. Quando avaliada a presença de detritos de cartilagem ou osso no estroma, observou-se a presença de poucos detritos em apenas dois animais (40%). Também a hemossiderose só foi observada em dois animais (40%) do grupo CAP (Figura 19).

Na comparação das médias do grupo controle e do grupo CAP no M5, encontrou-se diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) nos parâmetros avaliados, sugerindo um efeito benéfico do CAP sobre a intensidade das lesões observadas durante a avaliação microscópica e, conseqüentemente, sobre o avanço do processo degenerativo.

Quando foram comparadas as médias dos momentos avaliados dentro do grupo controle observou-se algumas diferenças significativas. Comparando o M3 com o M4 e o M5 verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em todos os parâmetros avaliados. Da mesma forma, essa diferença foi observada também quando comparados o M4 com o M5.

Já no grupo CAP, também foram observadas algumas diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) nos parâmetros avaliados durante os diferentes momentos. Quando comparado o M3 com o M4, não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em relação aos parâmetros sinoviócitos e estroma sinovial; já no parâmetro infiltrado inflamatório constatou-se diferença significativa entre esses dois momentos. Quando comparado o M3 com o M5, houve diferença significativa em todos os parâmetros avaliados. Entre M4 e M5, foi observada diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) no parâmetro sinoviócitos, entretanto, nos parâmetros infiltrado inflamatório e estroma sinovial não se verificou nenhuma diferença estatisticamente significativa.



**Figura 19.** Microfotografia da avaliação microscópica da cápsula sinovial, corada com hematoxilina e eosina, de coelhos de ambos os grupos no momento 5 (M5). A e B grupo controle. C e D grupo CAP. A) proliferação acentuada de sinoviócitos observada pela presença de mais de quatro camadas celulares (chave vermelha); hipertrofia acentuada dos sinoviócitos, aonde é observada a presença de células cilíndricas, algumas com projeções citoplasmáticas (setas pretas); presença acentuada de agregados linfoplasmocitários com abundantes células inflamatórias (triângulos pretos); hiperplasia moderada, multifocal, das vilosidades (asterisco vermelho); proliferação e hipertrofia moderada dos fibroblastos (asterisco preto); proliferação moderada de vasos sanguíneos (setas vermelhas); presença de poucos detritos de cartilagem/osso (estrela preta); presença de hemosiderose em muitas células do estroma da cápsula (setas marrons). B) proliferação moderada dos sinoviócitos com até quatro camadas celulares (chave vermelha); hipertrofia acentuada dos sinoviócitos mostrando células cilíndricas e com projeções citoplasmáticas (setas pretas); presença acentuada de infiltrados linfoplasmocitários apresentando infiltração difusa e muitas células inflamatórias (triângulos vermelhos); proliferação e hiperplasia moderada de fibroblastos (asterisco); proliferação moderada de vasos sanguíneos (setas vermelhas); presença de um único detrito de cartilagem/osso embebido na membrana sinovial (estrela preta); presença de hemosiderose em poucas células do estroma capsular (setas marrons). C) proliferação discreta dos sinoviócitos representada por até duas camadas de células (chave vermelha); hipertrofia moderada dos sinoviócitos, com células cilíndricas (setas pretas); presença moderada de infiltrado linfoplasmocitário com células inflamatórias ao redor dos vasos sanguíneos (triângulos vermelhos); presença de um único agregado linfoplasmocitário (triângulo preto); proliferação e hipertrofia discreta de fibroblastos (asterisco). D) proliferação discreta de sinoviócitos, com até duas camadas celulares (chave vermelha); hipertrofia discreta dos sinoviócitos, apresentando células cuboidais (seta preta); presença discreta de infiltrado linfoplasmocitário com poucas células inflamatórias (triângulo vermelho); presença de um único agregado linfoplasmocitário (estrela preta); hipertrofia discreta das vilosidades (asterisco vermelho); proliferação e hipertrofia discreta dos fibroblastos (asterisco preto); proliferação moderada dos vasos sanguíneos (setas vermelhas); presença de poucas células com hemosiderose (setas marrons).

### 3.4.2.2. Avaliação microscópica da cartilagem articular

Os resultados da avaliação microscópica da cartilagem articular corada com hematoxilina e eosina são apresentados na tabela 10. A figura 20 mostra a cartilagem articular do membro esquerdo, não operado, sem alterações. As figuras 21, 22 e 23, ilustram as alterações observadas na cartilagem articular dos coelhos de ambos os grupos, durante os momentos avaliados.

**Tabela 10.** Resultados da avaliação microscópica da cartilagem articular corada com hematoxilina e eosina de coelhos de ambos os grupos nos diferentes momentos avaliados.

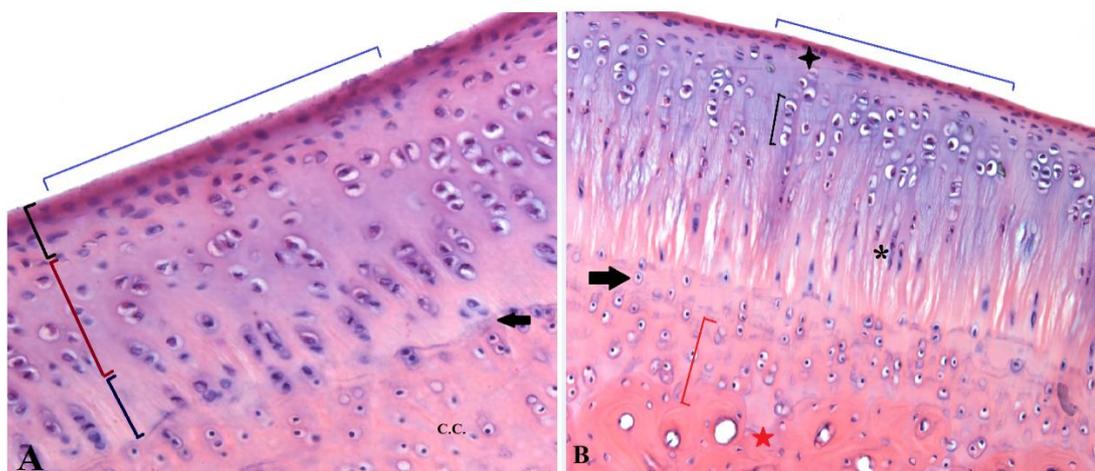
AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA CARTILAGEM ARTICULAR						
ESTRUTURA						
SCORE						
	GRUPO CONTROLE			GRUPO CAP		
	M3	M4	M5	M3	M4	M5
Coelho 1	0	-	-	0	-	-
Coelho 2	1	-	-	0	-	-
Coelho 3	2	-	-	1	-	-
Coelho 4	3	-	-	1	-	-
Coelho 5	4	-	-	2	-	-
Coelho 6	-	1	-	-	0	-
Coelho 7	-	4	-	-	0	-
Coelho 8	-	7	-	-	2	-
Coelho 9	-	7	-	-	4	-
Coelho 10	-	8	-	-	4	-
Coelho 11	-	-	10	-	-	0
Coelho 12	-	-	8	-	-	5
Coelho 13	-	-	8	-	-	5
Coelho 14	-	-	7	-	-	7
Coelho 15	-	-	7	-	-	7
Média e SD	2,0±1,58 <sup>A1</sup>	5,4±2,88 <sup>B1</sup>	8,0±1,22 <sup>C1</sup>	0,8±0,83 <sup>A1</sup>	2,0±2,0 <sup>B2</sup>	4,8±2,86 <sup>B2</sup>
DENSIDADE DOS CONDROCITOS						
SCORE						
	GRUPO CONTROLE			GRUPO CAP		
	M3	M4	M5	M3	M4	M5
Coelho 1	1	-	-	0	-	-
Coelho 2	1	-	-	0	-	-
Coelho 3	1	-	-	0	-	-
Coelho 4	1	-	-	1	-	-
Coelho 5	2	-	-	2	-	-
Coelho 6	-	1	-	-	0	-
Coelho 7	-	1	-	-	0	-
Coelho 8	-	1	-	-	1	-
Coelho 9	-	2	-	-	1	-
Coelho 10	-	2	-	-	2	-
Coelho 11	-	-	2	-	-	1
Coelho 12	-	-	3	-	-	1
Coelho 13	-	-	3	-	-	2
Coelho 14	-	-	4	-	-	2
Coelho 15	-	-	4	-	-	3
Média e SD	1,2±0,44 <sup>A1</sup>	1,4±0,54 <sup>B1</sup>	3,2±0,83 <sup>C1</sup>	1,2±0,44 <sup>A1</sup>	0,8±0,83 <sup>B2</sup>	1,8±0,83 <sup>B2</sup>
FORMAÇÃO DE AGLOMERADOS						
SCORE						
	GRUPO CONTROLE			GRUPO CAP		
	M3	M4	M5	M3	M4	M5
Coelho 1	1	-	-	1	-	-
Coelho 2	1	-	-	1	-	-
Coelho 3	1	-	-	1	-	-

Coelho 4	1	-	-	1	-	-
Coelho 5	1	-	-	1	-	-
Coelho 6	-	1	-	-	0	-
Coelho 7	-	2	-	-	0	-
Coelho 8	-	2	-	-	0	-
Coelho 9	-	2	-	-	1	-
Coelho 10	-	3	-	-	1	-
Coelho 11	-	-	1	-	-	1
Coelho 12	-	-	2	-	-	1
Coelho 13	-	-	2	-	-	2
Coelho 14	-	-	3	-	-	2
Coelho 15	-	-	3	-	-	2
<b>Média e SD</b>	<b>1,0±0,0<sup>A1</sup></b>	<b>2,0±0,7<sup>B1</sup></b>	<b>2,2±0,83<sup>B1</sup></b>	<b>1,0±0,0<sup>A1</sup></b>	<b>0,4±0,54<sup>B2</sup></b>	<b>1,6±0,54<sup>B2</sup></b>

A,B,C: Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ( $P<0,05$ ) nos momentos avaliados DENTRO de cada grupo.

<sup>1,2</sup>: Números diferentes nas colunas indicam diferença significativa ( $P<0,05$ ) nos momentos avaliados ENTRE os grupos.

Na avaliação microscópica no M3, foram observadas diversas alterações decorrentes do processo degenerativo em ambos os grupos. As principais alterações observadas nesse momento foram irregularidades na superfície articular, incluindo fissuras e erosão das camadas superficiais da cartilagem, diminuição da densidade dos condrócitos e formação de aglomerados de condrócitos (Figura 21).



**Figura 20.** Microfotografia da cartilagem articular de coelhos saudáveis corada com hematoxilina e eosina. A) superfície articular do fêmur lisa e sem alterações evidentes (chave azul); diferentes zonas da cartilagem articular: zona superficial (chave preta), zona intermedia (chave marrom), zona profunda (chave azul escura). Não há um limite definido entre estas três zonas. Tidemark (seta preta); cartilagem calcificada (C.C.) B) Superfície articular da tíbia lisa e sem alterações evidentes (chave azul); organização dos condrócitos dentro da cartilagem articular; na zona superficial é possível observar condrócitos pequenos e em poucas camadas (estrela preta), na zona intermédia a densidade dos condrócitos é maior, os mesmos são de maior tamanho e se organizam em fileiras (chave preta) e na zona profunda a densidade e o tamanho diminuem, porem a organização é similar á observada na zona intermédia (asterisco). Na cartilagem calcificada, que serve de ancoragem ao osso subcondral, observa-se condrócitos com menor tamanho e maior densidade, distribuídos uniformemente pelo estroma do tecido (chave vermelha). Zona de transição/união entre a cartilagem calcificada e o osso subcondral (estrela vermelha). A e B: x100 µm.

Neste momento, os animais do grupo controle mostravam lesões de maior intensidade quando comparados com os animais do grupo CAP. Observou-se nos coelhos do grupo controle, que um animal (20%) não apresentou irregularidades ao longo da superfície articular, um animal (20%) apresentou irregularidades na superfície articular, um animal (20%) apresentou fissuras em menos de 50% da superfície articular, um animal (20%) apresentou fissuras em mais de 50%

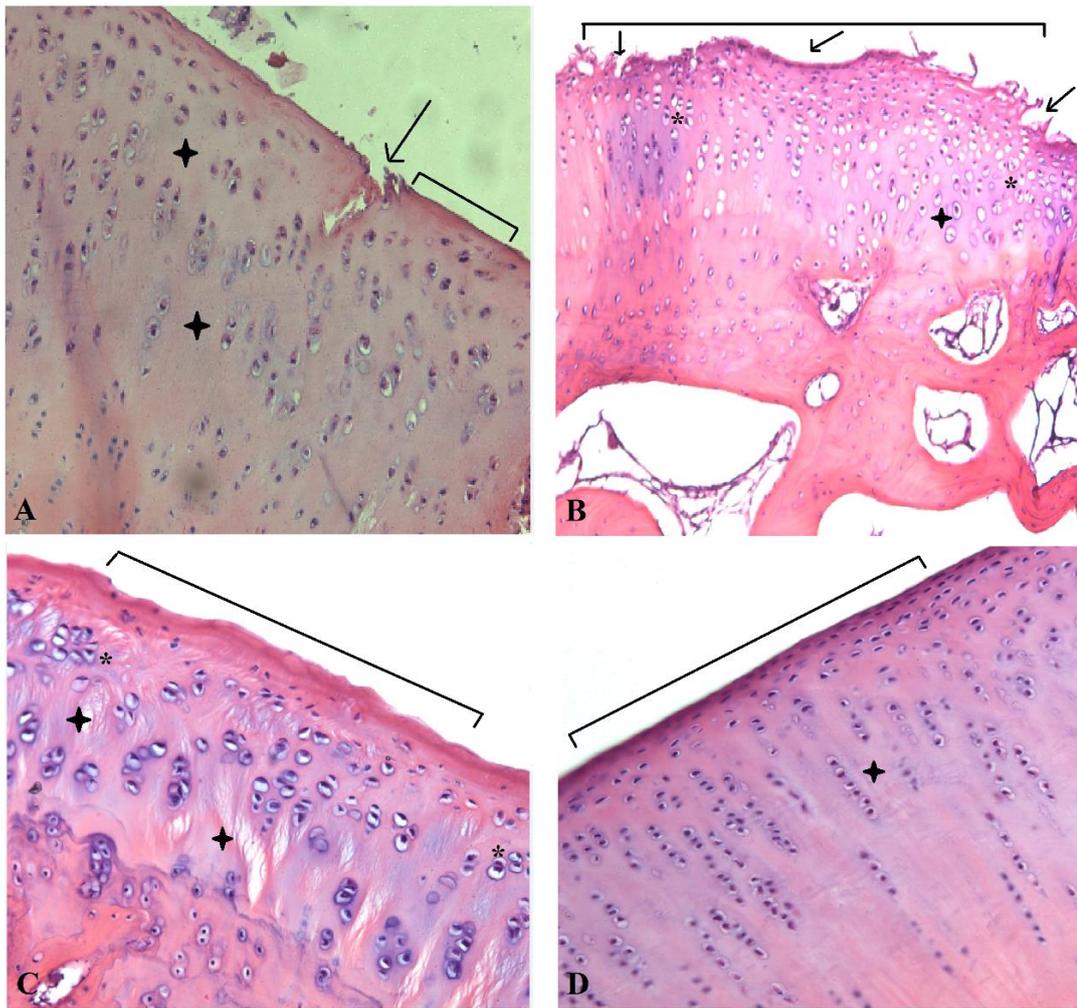
da superfície articular e um animal (20%) apresentou erosão de um terço da cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular (Figura 21).

Quatro animais do grupo controle (80%), no M3, apresentaram diminuição focal da densidade celular, enquanto um deles (20%) apresentou diminuição multifocal na densidade celular. Foi observado também em todos os animais deste grupo (100%) a formação de menos de quatro aglomerados de condrócitos (Figura 21).

Nos animais do grupo tratado com o CAP observou-se também lesões decorrentes da ruptura do LCCr. Neste grupo verificou-se que dois animais (40%) apresentavam uma superfície articular lisa, em dois animais (40%) observou-se a presença de irregularidades da superfície da cartilagem articular e em um animal (20%) havia fissuras em mais de 50% da superfície articular. Nenhum animal neste grupo, no momento avaliado, apresentou erosão da cartilagem articular (Figura 21).

No grupo CAP, três animais (60%) não mostravam diminuição na densidade celular dos condrócitos. Apenas em um animal (20%) verificou-se uma diminuição focal na densidade celular de condrócitos e, em um animal (20%) diminuição multifocal na densidade celular. Neste grupo também foi observada a formação de agregados de condrócitos, sendo que todos os animais do grupo (100%) apresentaram formação de menos de 4 aglomerados de condrócitos (Figura 21).

Quando comparadas as médias de ambos os grupos no M3, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, embora os animais do grupo CAP apresentaram melhores escores durante a avaliação em relação à estrutura da cartilagem.



**Figura 21.** Microfotografia da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos corada com hematoxilina e eosina no momento 3 (M3). A e B grupo controle. C e D grupo CAP. A). superfície articular lisa, com praticamente nenhuma irregularidade (chave preta); fissura na cartilagem articular em menos de 50% da cartilagem articular (seta preta); diminuição multifocal da densidade celular dos condrócitos (estrela preta). B) superfície articular com irregularidades, fissuras em mais de 50% da superfície articular e erosão em 1/3 da cartilagem articular (chave preta e setas pretas); diminuição focal da densidade dos condrócitos (estrela preta). Observa-se também uma alteração na organização e disposição dos condrócitos nas diferentes zonas. Formação de menos de 4 aglomerados de condrócitos (asteriscos). C). superfície articular com irregularidades, porém sem fissuras e sem erosão (chave preta); diminuição multifocal da densidade dos condrócitos (estrela preta); formação de menos de 4 aglomerados de condrócitos (asteriscos). D). superfície articular lisa, sem irregularidades, fissuras ou erosão (chave preta); densidade celular preservada (estrela preta). Não foi observada formação de aglomerados de condrócitos nessa imagem. A organização dos condrócitos e o tamanho dos mesmos nas imagens dos coelhos do grupo CAP permanece sem alterações. A, B, C e D: x50  $\mu$ m.

No M4, 30 dias após a reconstituição do LCCr, observou-se o avanço das alterações decorrentes do processo degenerativo articular, principalmente nos coelhos do grupo controle, que tiveram lesões mais acentuadas e de progressão mais rápida. Dentre as principais alterações observadas em ambos os grupos se destacam as irregularidades da superfície articular, fissuras da cartilagem e erosão superficial e profunda da cartilagem. Adicionalmente foi observada uma diminuição multifocal e confluyente na densidade celular e formação de aglomerados de condrócitos.

Nos animais do grupo controle observou-se uma evolução mais rápida e com das lesões degenerativas na cartilagem articular mais acentuadas. Um dos coelhos deste grupo (20%)

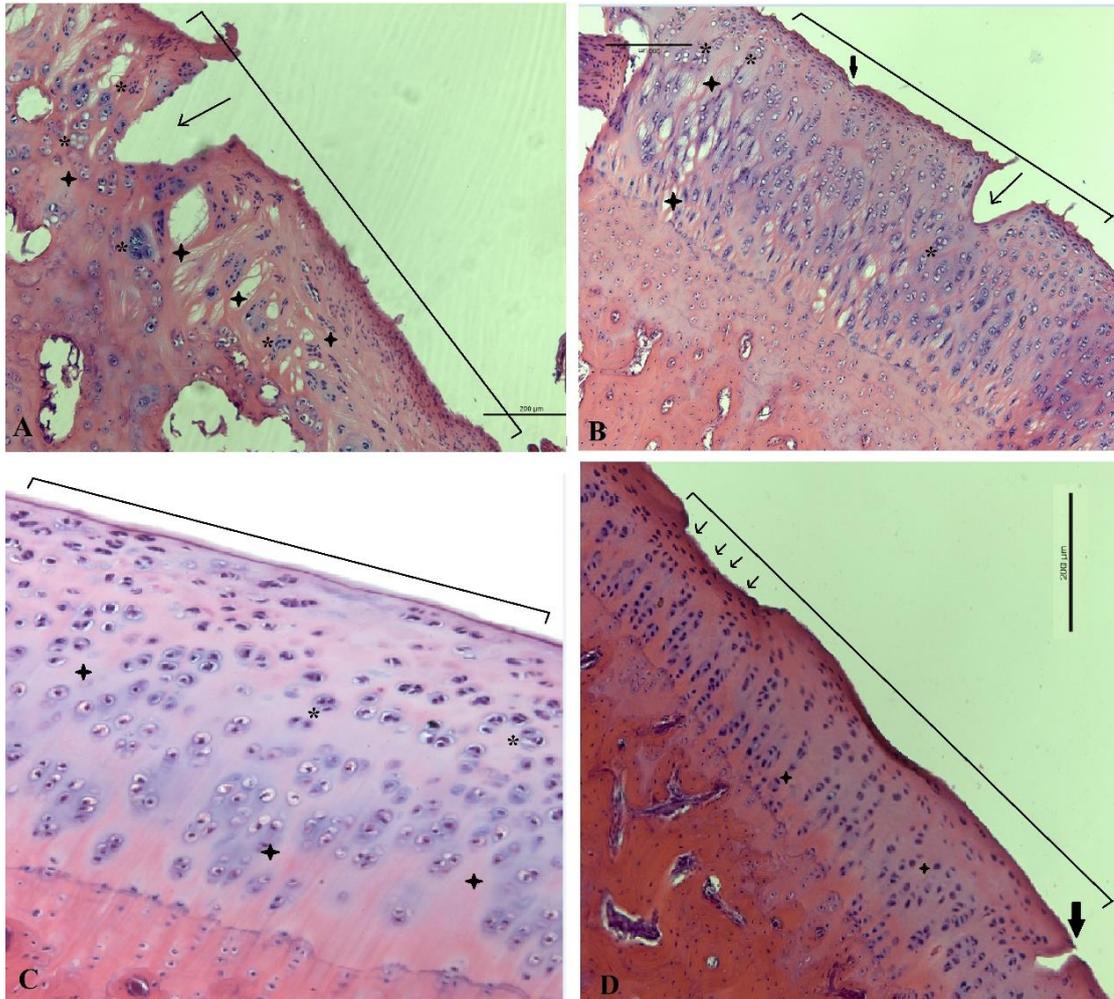
apresentou irregularidades na superfície articular, um animal (20%) apresentou erosão de um terço da cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular, dois animais (40%) mostraram erosão de dois terços da cartilagem articular em mais de 50% da superfície articular e um coelho (20%) apresentou erosão de profundidade completa da cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular (Figura 22).

Além das alterações na estrutura da cartilagem articular no M4, foi também observado nos coelhos do grupo controle, alterações na densidade celular e na formação de aglomerados. Dois animais deste grupo (40%) apresentaram diminuição focal na densidade celular da cartilagem, enquanto três animais (60%) apresentaram diminuição multifocal da densidade celular. Um dos animais (20%) apresentou formação de menos de 4 aglomerados, três animais (60%) formação de mais de quatro e menos de 8 aglomerados e um coelho (20%) apresentou formação de mais de 8 aglomerados de condrócitos (Figura 22).

No grupo CAP, no M4, também foi observada a progressão das alterações degenerativas na articulação, porém essa progressão foi mais lenta quando comparada com os animais do grupo controle e as lesões apresentaram-se em menor intensidade. Dois animais (40%) do grupo apresentaram uma superfície articular lisa, sem irregularidades, um animal (20%) apresentou fissuras em menos de 50% da superfície articular e dois animais (40%) apresentaram erosão em um terço da cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular. Nenhum animal deste grupo apresentou erosão completa da cartilagem articular neste momento (Figura 22).

Em relação às outras variáveis avaliadas microscopicamente no M4, no grupo CAP, foram observadas também alterações sugestivas da progressão da OA. Dois coelhos (40%) apresentaram densidade celular normal, dois animais (40%) apresentaram diminuição focal na densidade celular e um animal (20%) apresentou diminuição multifocal na densidade celular da cartilagem articular. Em três animais (60%) do grupo não foi observada a formação de aglomerados de células e os dois restantes (40%) apresentaram formação de menos de quatro aglomerados de condrócitos (Figura 22).

Quando comparadas as médias de ambos os grupos no M4, observou-se diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) em todos os parâmetros avaliados nesse momento.



**Figura 22.** Microfotografia da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos corada com hematoxilina e eosina no momento 4 (M4). A e B grupo controle. C e D grupo CAP. A) superfície articular irregular (chave preta); erosão profunda da superfície da cartilagem articular em menos de 50% da superfície (seta preta); diminuição multifocal na densidade dos condrócitos nas diferentes zonas da cartilagem articular (estrelas pretas) observa-se também desorganização dos condrócitos; formação de mais de quatro e menos de oito aglomerados de condrócitos (asteriscos). B) superfície articular com irregularidades (chave preta) e fissura em menos de 50% da superfície articular (seta grossa); erosão em um terço da cartilagem articular em menos de 50% da superfície (seta fina); diminuição focal na densidade dos condrócitos na zona intermédia e profunda da cartilagem (estrelas pretas); formação de menos de quatro aglomerados de condrócitos (asteriscos). C) superfície articular lisa, sem irregularidades (chave preta); discreta diminuição focal de condrócitos na zona intermédia e profunda da cartilagem (estrela preta); formação de menos de quatro aglomerados de condrócitos (asteriscos). D) superfície articular irregular (chave preta) com fissuras em menos de 50% da superfície articular (seta grossa) e erosão de um terço da cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular (setas finas); densidade de condrócitos normal (estrelas pretas) e sem formação de agregados de condrócitos.

No M5 a evolução das lesões degenerativas foi mais evidente e com lesões mais intensas nos coelhos do grupo controle quando comparados com os coelhos do grupo CAP. Dentre as principais alterações, foram observadas erosão de profundidade completa da cartilagem, inclusive até o osso subcondral, diminuição multifocal, confluyente e difusa dos condrócitos e formação de aglomerados.

Os animais do grupo controle mostraram uma progressão mais rápida das lesões degenerativas. No M5, um dos animais (20%) deste grupo mostrou lesões intensas com erosão de profundidade completa na cartilagem, comprometendo inclusive a cartilagem calcificada e o osso subcondral em menos de 50% da superfície articular, dois animais (40%) apresentaram erosão de

profundidade completa na cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular e os outros dois coelhos (40%) apresentaram erosão de dois terços da cartilagem articular em mais de 50% da superfície articular (Figura 23).

Neste grupo, no M5, também foram observadas alterações na densidade celular e foi verificada a formação de vários aglomerados. Um animal (20%) apresentou diminuição multifocal na densidade celular, dois animais (40%) apresentaram diminuição multifocal e confluyente na densidade celular e dois coelhos (40%) mostraram diminuição difusa da densidade celular na cartilagem articular. Um coelho (20%) mostrou formação de menos de 4 aglomerados, dois coelhos (40%) apresentaram mais de 4, porém menos de 8 aglomerados celulares e os dois restantes (40%) mostraram formação de mais de 8 aglomerados de condrócitos (Figura 23).

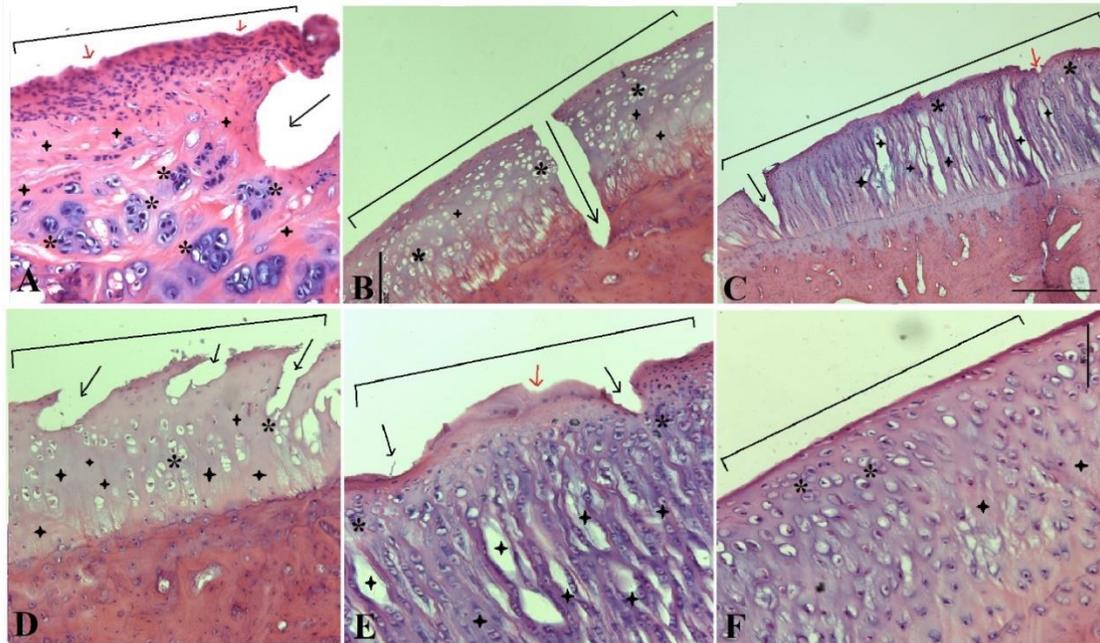
Nos animais do grupo tratado com CAP no M5, também ficou evidenciada a progressão do processo degenerativo. Embora as lesões tenham avançado, elas tiveram menor intensidade do que as observadas nos animais do grupo controle. Nenhum animal deste grupo apresentou exposição do osso subcondral. Um animal deste grupo (20%) apresentou a superfície articular lisa e sem fissuras, dois animais (40%) apresentaram erosão em um terço da cartilagem articular em mais de 50% da superfície articular e dois animais (40%) apresentaram erosão de dois terços da cartilagem articular em mais de 50% da superfície articular.

Alterações na densidade celular da cartilagem e na formação de aglomerados de condrócitos também foram observadas nos coelhos do grupo CAP. Dois coelhos (40%) apresentaram diminuição focal na densidade celular, dois coelhos (40%), diminuição multifocal na densidade dos condrócitos e um coelho (20%) apresentou diminuição multifocal e confluyente na densidade celular. Neste grupo, em dois animais (40%) foram observados menos de quatro aglomerados celulares e nos outros três coelhos (60%) observou-se entre quatro e oito aglomerados de condrócitos (Figura 23).

Quando comparados os valores das médias de ambos os grupos no M5, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) em todos os parâmetros avaliados, sugerindo novamente um efeito benéfico do CAP na articulação dos coelhos que receberam este produto, caracterizado por um avanço mais lento das alterações degenerativas e uma menor intensidade das mesmas.

Quando comparadas as médias dentro do grupo controle, observou-se diferença estatisticamente significativa nos valores da estrutura e da densidade celular no M3, M4 e M5. No parâmetro de formação de aglomerados, observou-se diferença significativa quando comparados o M3 com o M4 e M5, porém não houve diferença entre o M4 e M5.

Comparando as médias dentro do grupo CAP, observou-se diferença estatisticamente significativa nos parâmetros estrutura, densidade celular e formação de aglomerados no M3 em relação ao M4 e ao M5. Porém, quando comparadas as médias do M4 e do M5, não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros avaliados.



**Figura 23.** Microfotografia da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos corada com hematoxilina e eosina no momento 5 (M5). A, B e C, grupo controle. D, E e F, grupo CAP. A). Superfície articular irregular (chave preta), com fissuras discretas (setas vermelhas) e erosão em dois terços da cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular (seta preta), diminuição multifocal e confluyente da densidade dos condrócitos na zona intermédia (estrela preta), formação de mais de oito aglomerados de condrócitos. B).superfície articular lisa, sem irregularidades nem fissuras (chave preta), presença de erosão de profundidade completa, incluindo a cartilagem calcificada e o osso subcondral, em menos de 50% da superfície articular (seta preta), diminuição multifocal da densidade dos condrócitos na zona intermédia e profunda (estrelas pretas), formação de quatro até oito aglomerados de condrócitos (asteriscos). C) superfície articular com algumas irregularidades (chave preta), com fissuras em menos de 50% da superfície articular (seta vermelha) e erosão em dois terços da cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular (seta preta), diminuição difusa da densidade dos condrócitos em todas as zonas da cartilagem articular (estrelas pretas), formação de menos de quatro aglomerados de condrócitos (asteriscos). D) superfície articular irregular (chave preta) com erosão de um terço da cartilagem articular em mais de 50% da superfície articular (setas pretas), diminuição multifocal e confluyente da densidade dos condrócitos nas zonas intermedia e profunda da cartilagem (estrelas pretas), formação de menos de quatro aglomerados de condrócitos (condrócitos). E). superfície articular com algumas irregularidades (chave preta), presença de fissuras em menos de 50% da cartilagem articular (seta vermelha) e erosão em um terço da cartilagem articular em menos de 50% da superfície articular (seta preta), diminuição multifocal da densidade dos condrócitos na zona intermédia da cartilagem (estrelas pretas), formação de menos de quatro aglomerados de condrócitos (asterisco). F). superfície articular lisa e sem irregularidades (chave preta), discreta diminuição focal dos condrócitos na zona intermédia (asterisco), formação de menos de quatro aglomerados de condrócitos. A, B, C, D, E e F: x50 µm.

### 3.5. Discussão

Como esperado, observaram-se lesões decorrentes do processo degenerativo nos animais de ambos os grupos. Na avaliação macroscópica, os animais do grupo controle apresentaram lesões mais intensas no decorrer do tempo, iniciando com fissuras e erosões superficiais e progredindo para formação de osteófitos periarticulares e erosões profundas com exposição do osso subcondral. Os animais do grupo CAP, tiveram lesões mais discretas, sendo que as alterações foram limitadas a rugosidade e fissuras da cartilagem que evoluíram para formação de osteófitos e erosões superficiais. Lesões na cápsula sinovial e na cartilagem são características do processo degenerativo e a progressão e intensidade das lesões no tempo aumentam com a liberação de substâncias inflamatórias e degradativas (Ivirico et al., 2017).

A presença de fissuras, erosões na cartilagem e osteófitos periarticulares em ambos os grupos já era esperada, devido à presença da OA. A literatura (Dahlgren, 2007; Hashimoto et al., 2002)

cita que é comum observar a formação de novo tecido conectivo na forma de osteófitos periarticulares, além das alterações de degradação da MEC da cartilagem articular. A menor intensidade de lesões no grupo CAP, principalmente nos momentos mais tardios do estudo, sugere algum efeito benéfico do produto.

Os resultados histológicos observados neste estudo, incluindo a presença de fibrilação e erosão da cartilagem, além da infiltração de células inflamatórias na membrana sinovial evidenciam ou sugerem a ação das citocinas inflamatórias. Após uma lesão inicial na articulação parte dos condrócitos e fragmentos da MEC são liberados no líquido sinovial e os condrócitos e células da membrana sinovial começam a produzir e sintetizar mediadores inflamatórios como citocinas, quimosinas, fatores angiogênicos, metaloproteinases, dentre outros, que desenvolvem um importante papel na degradação adicional da MEC (Ostojic et al., 2017; Martel-Pelletier et al., 2008).

No grupo controle houve uma proliferação e hipertrofia dos sinoviócitos, acompanhada da infiltração de células inflamatórias. Adicionalmente, com a progressão da OA, houve proliferação de vasos sanguíneos e hipertrofia dos fibroblastos, sugerindo que na medida que o processo degenerativo avança, a ação das enzimas degradativas e das citocinas inflamatórias é intensificada. Os reportes da literatura, indicam que após alterações na bioquímica ou biomecânica da articulação, a liberação de citocinas e enzimas degradativas acelera as lesões que tomam lugar durante a OA (Martel-Pelletier et al., 2008).

Já nos coelhos do grupo CAP, observaram-se lesões menos intensas na cápsula e na cartilagem articular, caracterizadas pela menor hipertrofia dos sinoviócitos e infiltrado inflamatório, pela menor degradação da MEC e maior densidade dos condrócitos. O uso de produtos derivados das plaquetas modula o processo inflamatório nos tecidos aonde é aplicado, além de estimular a síntese de MEC e a diferenciação e proliferação celular (Mehrabani et al., 2019).

Nesta pesquisa e, em consonância com outros estudos (Hunter e Eckstein, 2011), 21 dias após a ruptura do LCCr, alterações precoces degenerativas como sinovite, hiperemia e hipertrofia das vilosidades, já se faziam presentes, reafirmando mais uma vez o efeito da instabilidade articular no desencadeamento do processo articular degenerativo. O processo degenerativo apresenta diferenças segundo o momento evolutivo da mesma, mostrando, na fase aguda, um processo mais típico da inflamação como sinovite e hipervascularização, seguido do surgimento de osteófitos, como observado neste estudo, com redução gradativa da inflamação na fase crônica e manifestação das alterações degenerativas caracterizadas pela presença de plasmócito na membrana sinovial e liberação de substâncias degradativas que causam destruição da MEC (Korchi et al., 2019; Laverty et al., 2010).

Como era de se esperar, as alterações histológicas características da OA estiveram presentes ao longo do estudo em todos os grupos, caracterizadas principalmente pela proliferação celular, neovascularização e hipertrofia dos sinoviócitos, mais frequentes no grupo controle e aos 60 dias de observação (M5). As lesões mais acentuadas no grupo controle ao longo do estudo mostradas pela acentuada proliferação das vilosidades, dos fibroblastos, dos sinoviócitos e de vasos sanguíneos, achados frequentes e contínuos nos animais deste grupo, reforçam a ação benéfica do CAP no grupo tratado. Mathiessen e Conaghan (2017) relatam aumento na vascularização, hipertrofia de sinoviócitos e proliferação dos fibroblastos, principalmente nas fases iniciais do processo degenerativo.

Apesar da evolução do processo degenerativo e da presença de infiltrados e agregados linfoplasmocitários em ambos os grupos, as lesões menos intensas nos animais do grupo CAP sugerem que mesmo 30 dias após a última aplicação, ainda há efeito favorável do produto no meio articular. Mathiessen e Conaghan (2017) relatam na OA, uma sinovite caracterizada pela abundante inflamação acompanhada de hipertrofia e hiperplasia sinovial, como observado neste estudo. A inflamação sinovial crônica, como já citado na literatura (Bouchgoua et al., 2009; Sato et al., 2007), resulta em hiperplasia das células que revestem a membrana sinovial, crescimento de pequenos novos vasos sanguíneos e infiltração de células inflamatórias ao redor dos vasos sanguíneos.

As lesões como proliferação e hipertrofia dos sinoviócitos, infiltração e formação de agregados inflamatórios, hipertrofia das vilosidades e proliferação de fibroblastos, menos acentuadas no grupo CAP, assemelham-se aos resultados reportados por Almasry et al., (2015) após o uso intra-articular de PRP em ratos com OA induzida. Os autores observaram uma camada fina de sinoviócitos, sem infiltração inflamatória e sem proliferação de fibroblastos. Pode-se deduzir dos resultados um efeito benéfico do CAP, apesar da concentração mais baixa de plaquetas em relação ao PRP.

Os achados desta pesquisa são semelhantes aos reportados na literatura (Saito et al., 2009), sendo que houve menor inflamação sinovial, menor hipertrofia dos sinoviócitos, menor vascularização e proliferação de células inflamatórias, menor degradação da MEC da cartilagem e maior densidade dos condrócitos nos animais do grupo CAP em relação ao grupo controle. Em um modelo de osteoartrose experimental em ratos, Khatab et al. (2018) observaram que depois de aplicações intra-articulares de PRP, os animais que receberam o tratamento apresentavam uma membrana sinovial mais fina e com tendência a apresentar menos lesões da cartilagem articular.

Os produtos derivados das plaquetas têm sido frequentemente avaliados para determinar seu efeito nas alterações do sistema musculoesquelético. Estudos recentes reportaram que, depois de aplicações de PRP tanto *in vitro* quanto *in vivo*, as substâncias liberadas pelas plaquetas, regularam a secreção de outras substâncias inflamatórias e degradativas por parte dos condrócitos e sinoviócitos (Andia e Maffulli, 2013; Van Buul et al., 2011). Os resultados desta pesquisa mostram, 15 dias após a primeira aplicação do CAP, menor inflamação sinovial, acompanhada de menor vascularização da membrana sinovial que se manteve ao longo do tempo avaliado. Adicionalmente, a degradação da cartilagem no grupo CAP foi menor, uma vez que a densidade dos condrócitos e a estrutura da MEC apresentaram alterações mínimas graças ao efeito regulador do CAP. Mesmo 30 dias após a terceira aplicação o efeito favorável estava presente. Dos resultados surgem as perguntas sobre o tempo de duração deste efeito, se ele é dependente do grau de OA, se este efeito será permanente, uma vez que a viabilidade celular foi melhorada pelo efeito do CAP. São perguntas a serem respondidas.

As alterações menos acentuadas nos animais do grupo CAP, como menor grau de sinovite, menor hiperplasia e hipertrofia dos sinoviócitos e dos condrócitos, menor inflamação da membrana sinovial e menor formação de aglomerados dos condrócitos é devido ao efeito do CAP. Como mencionado na literatura (Moussa et al., 2017; Pritzker et al., 2006), após a aplicação de CAP ou de PRP ocorre a liberação dos grânulos contidos nas plaquetas e a disponibilização no meio, de uma série de fatores de crescimento e moléculas reguladoras capazes de modular a síntese da MEC, diferenciação celular, angiogênese e outros processos que favorecem a cicatrização tecidual e a reparação da cartilagem.

A menor degradação da MEC e menor alteração celular observada no grupo CAP pode ser explicada pela ação dos fatores de crescimento, principalmente o PDGF, que auxilia na regulação da síntese da MEC, além de inibir a síntese e liberação de substâncias inflamatórias como interleucinas e citocinas. Na cartilagem articular, numerosos fatores de crescimento atuam em conjunto para regular o desenvolvimento e a homeostase da cartilagem ao longo da vida. Estes fatores de crescimento anabólicos podem estimular a síntese de colágeno, proteoglicanos, agrecanos e colágeno tipo II, diminuindo a degradação do tecido (Osorio-Carmona e Rezende, 2014; Fortier et al., 2011).

A avaliação histopatológica neste estudo, mostrou após a aplicação de CAP, uma menor degradação da MEC, manifestada por menor presença de fissuras, de erosões e fibrilação da cartilagem articular, densidade de condrócitos similar ao normal e menor formação de aglomerados, possivelmente devido à menor síntese e liberação de citocinas inflamatórias e de substâncias degradativas no espaço articular e na cartilagem. Liu e colaboradores (2014) relataram que, após o uso de PRP em coelhos para tratar defeitos condrais, as células da cartilagem apresentaram maior proliferação, além de maior síntese da MEC e concluíram que o PRP foi eficiente para restaurar a cartilagem danificada além de mitigar o avanço da OA.

O estudo de Saito et al. (2009) demonstrou que após aplicação intra-articular de PRP com microesferas de hidrogel biodegradáveis foi possível controlar a progressão da OA induzida em articulações de coelhos. Os autores observaram que o PRP estimulou a síntese de glicosaminoglicanos e proteoglicanos pelos condrócitos, aumentando assim a síntese da MEC. Como observado também nesta pesquisa, a progressão da OA foi controlada após as aplicações do CAP, resultado suportado pelos achados histológicos, nos quais a MEC da cartilagem e a membrana sinovial mostravam menor grau de alterações degenerativas.

O emprego do CAP mostrou-se eficiente para reduzir a inflamação, a neovascularização, a formação de cordões fibrosos na membrana sinovial, a fibrilação e erosão da cartilagem articular e alteração nos condrócitos, como observado na avaliação histológica. Estes resultados se assemelham ao reportado na literatura (Korchi et al., 2019; Mehrabani et al., 2019; Moussa et al., 2017), nos quais após o uso de PRP em alterações musculoesqueléticas, constatou-se um efeito condroprotetor desse composto biológico, além de regular a inflamação e a hipervascularização em articulações com OA.

Os resultados obtidos permitem inferir que o efeito do CAP vai além do alívio da dor e que este exerce um efeito mais profundo, caracterizado pela diminuição do processo inflamatório, a diminuição da neovascularização, da fibrose, menor proliferação celular tanto na membrana sinovial quanto na cartilagem articular, e menor degradação da MEC. Esses resultados se assemelham aos reportados na literatura (Osorio-Carmona et al., 2017; Rezende et al., 2016; Yin et al., 2016), onde vários autores relatam uma melhora significativa dos sinais clínicos e moleculares da OA após aplicações de produtos derivados das plaquetas

### **3.6. Conclusões**

Dos resultados desta pesquisa pode-se concluir que o concentrado autólogo de plaquetas tem ação celular benéfica sobre os tecidos articulares, com efeito que se prolonga até 30 dias após sua aplicação. O CAP se constitui, portanto numa alternativa eficiente como coadjuvante no tratamento da OA. Mais estudos são necessários para avaliar a duração do efeito do CAP e seu efeito em fases mais crônicas da doença.

### 3.7. Referências Bibliográficas

ALMASRY, S.M.; SOLIMAN, H.M.; EL-TARHOUNY, S.A. et al. Platelet rich plasma enhances the immunohistochemical expression of platelet derived growth factor and vascular endothelial growth factor in the synovium of the meniscectomized rat models of osteoarthritis. *Ann Anat.* v. 197, p. 38-49. 2015.

ANDIA, I.; MAFFULLI, N. Platelet-Rich Plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nat. Ver. Rheumatol.* v. 9, p. 721-730. 2013.

BOUCHGUA, M.; ALEXANDER, K.; CARMEL, E.N. et al. Use of routine clinical multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis part II: bone mineral density assessment. *Osteoarthr Cartil.* v. 17, p. 197-204. 2009.

DAHLGREN, L. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. *Clin Tech Equine Pract.* v. 6, p. 168-173. 2007.

FORTIER, L.A.; BARKER, J.U.; STRAUSS, E.J. et al. The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res.* v. 469, p. 2706-2715. 2011.

HASHIMOTO, S.; CREIGHTON-ACHERMANN, L.; TAKAHASHI, K. et al. Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* v. 10, p. 180-187. 2002.

HUNTER, D.J.; ECKSTEIN, F. From joint anatomy to clinical outcomes in osteoarthritis and cartilage repair: summary of the fifth annual osteoarthritis imaging workshop. *Osteoarthr Cartil.* v. 19, p. 1263-1269. 2011.

KHATAB, S.; VAN BUUL, G.M.; KOPS, N. et al. Intra-articular Injections of Platelet-Rich Plasma Releasate Reduce Pain and Synovial Inflammation in a Mouse Model of Osteoarthritis. *Am. J. Sport. Med.* v. 46, n. 4, p. 977-986. 2018.

KORCHI, A.M.; CENGARLE-SAMAK, A.; OKUNO, Y. et al., Inflammation and Hypervascularization in a Large Animal Model of Knee Osteoarthritis: Imaging with Pathohistologic Correlation. *J. Vasc. Interv. Radiol.* v. 30, n. 7, p. 1116-1127. 2019.

LAVERTY, S.; GIRARD, C.A.; WILLIAMS, J.M. et al. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthr Cartil.* v. 18, p. S53-S65. 2010.

LIU, J.; SONG, W.; YUAN, T. et al. A Comparison between Platelet-Rich Plasma (PRP) and Hyaluronate Acid on the Healing of Cartilage Defects. *Plos One.* v. 9, n. 5, p. 1-6. 2014.

MAKINO, T.; FUJIOKA, H.; KUROSAKA, M et al. Histologic analysis of the implanted cartilage in an exact-fit osteochondral transplantation model. *Arthroscopy.* v. 17, n. 7, p. 747-751. 2001.

MARTEL-PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; PELLETIER, J.P. et al. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* v. 22, n. 2, p. 351-384. 2008.

- MATHIESSEN, A.; CONAGHAN, P.G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther.* v.19, p. 18-27. 2017.
- MEHRABANI, D.; SEGHATCHIAN, J.; ACKER, J.P. Platelet rich plasma in treatment of musculoskeletal pathologies. *Transfus. Apher. Sci.* v. 58, n. 6, p. 1-11. 2019.
- MOUSSA, M.; LAJEUNESSE, D.; HILAL G. et al. Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res.* v. 352, p. 146-156. 2017.
- OSORIO-CARMONA, E.; SANTANA, G.C.; CASTRO-VARON, J.A. et al. Efeito precoce do concentrado autólogo de plaquetas sobre a osteoartrose induzida em coelhos: Níveis plasmáticos de PDGF e TGF- $\beta$ 1 e seu potencial como biomarcadores. *Vet. Zootec.* v. 11, n. 1, p. 96-115. 2017.
- OSORIO-CARMONA, E. REZENDE, C.M.F. Osteoartrose: aspectos clínicos e novas perspectivas terapêuticas baseadas na terapia regenerativa. *Vet Zootec.* v. 8, n. 2, p. 49-71. 2014.
- OSTOJIC, M.; SOLJIC, V.; VUKOJEVIC, K. et al. Immunohistochemical Characterization of Early and Advanced Knee Osteoarthritis by NF- $\kappa$ B and iNOS Expression. *J. Orthop. Res.* v. 35, p. 1990-1997. 2017.
- PRITZKER, K.P.H.; GAY, S.; JIMENEZ, S.A. et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthr Cartil.* v. 14, p. 13-29. 2006.
- REZENDE, C.M.F.; LEME, F.L.; SANTANA, G. et al. *Intra-Articular Autologous Platelet Concentrate (APC) in the Treatment of Induced Knee Osteoarthritis (OA) in Rabbits — An Arthroscopic Evaluation.* In: BAGARIA, V. (eds): *Arthroplasty a comprehensive review.* London: SE1 9SG, UK. 2016, pp. 211-232.
- SAITO, M.; TAKAHASHI, K.A.; ARAI, Y. et al. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clin. Exp. Rheumatol.* v. 27, p. 201-207. 2009.
- SATO, J.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M. et al. Expression of interleukin 8 in synovial tissues in patients with internal derangement of the temporomandibular joint and its relationship with clinical variables. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 103, p. 467-474. 2007.
- VAN BUUL, G.M.; KOEVOET, W.L.M.; KOPS, N. et al. Platelet-Rich Plasma Release Inhibits Inflammatory Processes in Osteoarthritic Chondrocytes. *Am. J. Sport. Med.* v. 39, n. 11, p. 2362-2370. 2011.
- WASTERLAIN, A.S.; BRAUN, H.J.; DRAGOO, J.L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper Tech Orthop.* v. 22, p. 33-42. 2012.
- XINMIN, Y.; JIAN, H. H. Treatment of temporomandibular joint osteoarthritis with viscosupplementation and arthrocentesis on rabbit model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 100, n. 3, p. e35-e38. 2005.

YIN, W.; XU, H.; SHENG, J. et al. Comparative evaluation of the effects of platelet-rich plasma formulations on extracellular matrix formation and the NF- $\kappa$ B signaling pathway in human articular chondrocytes. *Mol. Med. Rep.* v. 15, p. 2940-2948. 2017.

YIN, W.J.; XU, H.T.; SHENG, J.G. et al. Advantages of Pure Platelet-Rich Plasma Compared with Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma in Treating Rabbit Knee Osteoarthritis. *Med Sci Monit.* v. 22, p. 1280-1290. 2016.

## CAPÍTULO 4

### AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA CÁPSULA SINOVIAL E DA CARTILAGEM ARTICULAR DE COELHOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA E TRATADOS OU NÃO COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS

#### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar por meio da imuno-histoquímica, o efeito do concentrado autólogo de plaquetas sobre a OA induzida em coelhos e identificar a secreção das citocinas interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) e do fator de crescimento derivado das plaquetas AA (PDGF-AA). Foram utilizados 30 coelhos machos, adultos jovens, saudáveis, da raça Nova Zelândia, com massa corporal média de 3,0kg, submetidos à ruptura do ligamento cruzado cranial indução da osteoartrose (OA). Aos 21 dias depois, os coelhos foram submetidos à reconstituição do ligamento e foram divididos em dois grupos: grupo CAP e grupo controle com injeção de solução Ringer Lactato. As injeções intra-articulares foram realizadas imediatamente após a reconstituição do ligamento, aos 15 e aos 30 dias após a reconstituição. Cinco coelhos de cada grupo foram eutanasiados aos 15 dias após a reconstituição, outros cinco aos 30, e os restantes cinco coelhos de cada grupo aos 60 dias após a reconstituição. Fragmentos da cápsula sinovial e da cartilagem articular foram coletados para avaliação imuno-histoquímica e detecção de liberação de citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento. Foi observado nos animais que receberam o CAP imunomarcagem significativamente ( $p < 0,05$ ) menor de interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ), de fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), da proteína morfogenética 2 (BMP-2) e maior imunomarcagem de PDGF na membrana sinovial quando comparados com os coelhos que receberam Ringer Lactato. Observou-se na cartilagem dos animais que receberam o CAP imunomarcagem significativamente ( $p < 0,05$ ) menor de IL-1 $\beta$  e de TNF $\alpha$  e maior imunomarcagem de BMP-2 e PDGF quando comparados com os animais do grupo controle. Os resultados levam a concluir que o CAP regula a inflamação e a degradação da MEC por meio da diminuição da síntese e expressão de citocinas inflamatórias e da liberação e expressão de PDGF, fator de crescimento essencial para a regeneração da cartilagem e para a síntese da MEC. O CAP pode, portanto, ser empregado com segurança e como terapia coadjuvante no tratamento da OA.

#### Introdução

A osteoartrose é uma condição limitante e dolorosa que leva à degeneração dos tecidos articulares. Alguns fatores predisponentes como traumatismos, doenças pré-existentes e algumas doenças infecciosas que acometem as articulações, podem levar a alterações degenerativas na cartilagem e na cápsula articular que progridem até a perda da função. A ausência de um tratamento eficiente para deter o avanço das lesões ainda permanece como desafio e baseia-se no controle das alterações inflamatórias, bem como das lesões degenerativas (Moussa et al., 2017).

Devido à falta de opções terapêuticas, diferentes pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de se obter um produto eficiente para deter a degradação da matriz extracelular dos componentes da articulação. Produtos de origem biológico como derivados de plaquetas, células tronco e alguns biomateriais oferecem, atualmente, as melhores alternativas e os

melhores resultados, quando comparados com os produtos convencionais (Khatlab et al., 2018; Bavaresco et al., 2008).

A eficiência dos tratamentos disponíveis é avaliada com base na melhora dos sintomas clínicos dos pacientes com OA. Diminuição da dor, da inflamação e melhora da função das articulações acometidas, encontram-se entre os principais parâmetros avaliados (Bland, 2015). Embora a melhora dos sintomas clínicos seja de grande importância para avaliar a eficácia dos tratamentos, é necessário também a avaliação molecular dos mesmos, para melhor entender as interações no ambiente articular e como estes podem alterar a síntese e liberação das diferentes substâncias envolvidas na fisiopatologia da doença (Kuyinu et al., 2016).

Com o avanço das técnicas moleculares e a disponibilidade de novos kits de laboratório, aumentou-se a possibilidade de conhecer com mais detalhes a fisiopatogenia da OA e as moléculas envolvidas na degradação da MEC durante a evolução da doença. O conhecimento das principais alterações moleculares, inclusive nas fases iniciais da doença, permitirá desenvolver opções terapêuticas mais eficazes, com base em evidências, facilitando assim, a identificação das moléculas envolvidas na degradação da cartilagem e auxiliando a reconhecer como as células do tecido respondem a estes estímulos e aos tratamentos (Kuyinu et al., 2016).

Assim, esta pesquisa teve como objetivo, avaliar por meio da imuno-histoquímica, o efeito do concentrado autólogo de plaquetas sobre a OA induzida em coelho e identificar se a secreção das citocinas interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) e do fator de crescimento derivado das plaquetas AA (PDGF-AA) pelos sinoviócitos e condrócitos das articulações acometidas é influenciada pelo concentrado autólogo de plaquetas.

#### **4.1. LITERATURA CONSULTADA**

A OA é a desordem musculoesquelética mais comum em mamíferos, causa alterações graves na deambulação e altos custos em tratamentos. Embora a prevalência da doença seja alta e tenha um grande impacto na saúde dos animais domésticos, a fisiopatologia da doença é pouco conhecida, e, conseqüentemente, os tratamentos atualmente disponíveis são ineficientes para modificar o curso da doença (Rashid e Kwoh, 2019).

Os animais acometidos pela OA mostram degeneração progressiva da cartilagem articular, formação de osteófitos, remodelação do osso subcondral, sinovite e infiltração de células inflamatórias na cápsula sinovial. As alterações em todos os tecidos articulares e a interação entre elas, culminam perpetuando as lesões e acelerando a progressão da OA (Chien et al., 2020).

A membrana sinovial contém células residentes tais como macrófagos, fibroblastos, sinoviócitos, células de músculo liso, alguns poucos vasos sanguíneos e algumas células não residentes como células inflamatórias e células plasmáticas. Estas células, durante a evolução da OA, apresentam algumas alterações que ocasionam a liberação de mediadores inflamatórios que implicam na progressão das alterações (Ostojic et al., 2017).

As principais alterações observadas durante o processo degenerativo são mediadas pelos sinoviócitos, fibroblastos da membrana sinovial, condrócitos e por células inflamatórias que chegam ao local após o início das lesões (Malfait, 2016). A interação entre as substâncias inflamatórias, e as vias de sinalização que regulam a síntese dessas moléculas, causam um

aumento na regulação de collagenases, agrecanases e outras substâncias que induzem um aumento na regulação dos genes que codificam proteínas capazes de degradar a MEC da cartilagem (Haslauer et al., 2013).

As citocinas inflamatórias, dentre elas a família de interleucina 1, estão diretamente associadas com a imunidade inata e com os processos inflamatórios. A principal citocina dessa família é a IL-1 $\beta$ . Esta molécula desenvolve um papel fundamental na resposta inflamatória local e em respostas sistêmicas agudas. Adicionalmente, essa molécula estimula a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias como o TFN- $\alpha$ . Altos níveis dessas citocinas estão associados com danos teciduais e refletem a gravidade da inflamação. A expressão de altos níveis de IL-1 $\beta$  pode ser encontrada na membrana sinovial, na cartilagem, no osso subcondral e no líquido sinovial de pacientes com OA (Chien et al., 2020; Nasi et al., 2017; Wojdasiewicz et al., 2014).

Outras moléculas importantes na fisiopatologia da OA são as chamadas proteínas morfogenéticas ósseas. Essas proteínas fazem parte da superfamília do TGF- $\beta$  e participam ativamente do desenvolvimento de alguns órgãos. Recentemente, as BMP's têm sido empregadas em muitos estudos pré-clínicos e clínicos para explorar seu potencial osteoindutivo e condrogénico em modelos animais e doenças humanas. Particularmente a BMP-2 e a BMP-7 tem recebido especial atenção devido aos seus efeitos favoráveis no tratamento de defeitos ósseos e da cartilagem (Scarfi, 2016).

As BMP's, principalmente a BMP-2, podem regular a diferenciação e proliferação de osteoblastos e condrócitos. Essa proteína pode induzir a formação de cartilagem e osso de acordo com a sua concentração no tecido. Embora as proteínas morfogenéticas tenham efeitos benéficos sobre os tecidos articulares e possam induzir a diferenciação celular, tem sido reportado também alguns efeitos deletérios dessa molécula, principalmente quando em altas doses. Dentre os principais efeitos tem sido relatado uma acentuada resposta inflamatória local e a formação óssea heterotópica, o que poderia induzir a degradação da cartilagem e a formação de osteófitos em articulações com OA (Katagiri, e Watabe, 2020; Scarfi, 2016).

Além das citocinas inflamatórias e das BMP's, outras substâncias importantes durante o processo degenerativo e que interagem com os tecidos articulares, são os fatores de crescimento, que possuem a capacidade de estimular a angiogênese, proliferação e diferenciação celular, mitogênese, quimiotaxia, dentre outras características. Os principais fatores de crescimento envolvidos no metabolismo celular são o PDGF, o TGF, o VEGF, o FGF e o IGF (Broughton II et al., 2006).

Dentre os fatores de crescimento, recebe atenção especial, o PDGF, secretado pelos grânulos das plaquetas e por algumas células como macrófagos, condrócitos, sinoviócitos e fibroblastos. Esse fator de crescimento em particular, é capaz de estimular a proliferação e diferenciação de condrócitos e atua dentro das articulações estimulando a síntese da MEC e a síntese de colágeno e proteoglicanos (Ornetti et al., 2016; Werner e Grose, 2003).

Como observado por meio de análises imuno-histoquímicas, durante as fases iniciais da OA tem-se maior infiltração de células inflamatórias, maior proliferação de vasos sanguíneos e maior número de células produzindo citocinas inflamatórias (Benito et al., 2005).

Outras pesquisas que avaliaram a expressão de substâncias inflamatórias na cartilagem e no líquido sinovial de articulações de coelhos com osteoartrose induzida, comprovaram que os condrócitos podem expressar a IL-1 $\beta$  e a MMP-13 12 semanas após o início do processo

degenerativo e que, estas mesmas citocinas podem estar presentes no líquido sinovial perpetuando as lesões (Huang et al., 2017).

Devido à falta de tratamento eficiente para as lesões degenerativas articulares, tem sido desenvolvidas algumas alternativas biológicas baseadas na terapia celular e regenerativa. Dentre essas opções, os concentrados de plaquetas se destacam como uma nova alternativa, pois possui altos níveis de fatores de crescimento e outras substâncias capazes de modular o processo de regeneração (Kon et al., 2010).

Considerando isto, os produtos derivados das plaquetas podem ser eficientes para controlar a inflamação sinovial e a degradação da cartilagem, uma vez que podem diminuir a síntese e liberação de substâncias inflamatórias que estimulam a degradação da cartilagem (Kon et al., 2010).

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o nº 63/2014.

Foram usados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, adultos jovens, machos com massa corporal média de 3,0 kg fornecidos pela fazenda experimental Prof. Hélio Barbosa da UFMG. O critério de inclusão dos animais na pesquisa foi seu estado geral saudável e ausência de alterações no sistema locomotor (ossos, articulações, músculos, tendões) confirmados mediante avaliação física, hemograma e bioquímica sanguínea, exame ortopédico e radiográfico nas incidências craniocaudal e médio lateral.

Os animais foram alojados no Centro Experimental do Hospital Veterinário departamento da UFMG em salas adaptadas com gaiolas individuais de tamanho 60 cm x 60 cm x 37 cm com acesso à água ad libitum e alimentação duas vezes por dia de acordo as necessidades nutricionais específicas.

Os coelhos foram divididos em dois grupos de 15 animais cada. Os animais do grupo I constituíram o controle e receberam injeções intra-articulares de 0,5 mL de solução Ringer Lactato e os animais do grupo II constituíram o tratamento e receberam injeções intra-articulares de 0,5 ml de CAP numa concentração de 1,5 a 2,5 vezes os níveis basais. Cada coelho foi submetido a uma avaliação artroscópica da articulação FTP seguida da ruptura do LCCr (M1) para desencadear o processo degenerativo. Aos 21 dias (M2) os coelhos foram novamente submetidos à avaliação artroscópica seguida da estabilização da articulação FTP com auto enxerto de fásia lata e aplicação de CAP ou solução de Ringer Lactato segundo o tratamento estabelecido. Quinze dias após a reconstituição do LCCr (M3), foi feita uma nova artroscopia exploratória, seguindo-se imediatamente a segunda aplicação de CAP nos animais de ambos os grupos. Neste momento, 15 dias após a aplicação de CAP, cinco coelhos de cada grupo foram eutanasiados, para coleta de material para a avaliação imuno-histoquímica. Aos 30 dias após a reconstituição do ligamento (M4), foi feita a artroscopia seguida da última aplicação de CAP. Cinco coelhos de cada grupo foram eutanasiados para a avaliação imuno-histoquímica aos 30 dias de estudo. Aos 60 dias após a reconstituição do ligamento (M5), foi feita a última avaliação artroscópica nos coelhos restantes, seguindo-se a eutanásia dos mesmos para a avaliação imuno-histoquímica. Imediatamente após a eutanásia dos animais, foram coletados fragmentos da cápsula sinovial, seguindo-se a fixação em formol tamponado 10% até

as respectivas análises. Fragmentos da cartilagem foram também coletados e congelados a -80°C até as respectivas análises.

Antes de cada intervenção, foi feita a medicação pré-anestésica, que consistiu-se da aplicação de midazolam (Cristália, Brasil) e metadona (Cristália, Brasil) na dose de 1 mg / kg por via intramuscular, na indução da anestesia usou-se 15 mg / kg de cetamina e bloqueio anestésico dos nervos ciático e femoral com lidocaína (Cristália, Brasil) sem vasoconstritor na dose de 5 mg / kg e a anestesia foi mantida com isoflurano. As frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial e gases sanguíneos foram monitorados. A analgesia pós-operatória foi feita com tramadol (Teuto-Cristalpharma, Brasil), na dose de 1 mg / kg por via subcutânea a cada 12 horas por três dias, a terapia anti-inflamatória com meloxicam (Ourofino, Brasil) na dose de 0,2 mg / kg por via intramuscular a cada 24 horas durante três dias após a seção e a antibioticoterapia com cefalexina na dose de 30 mg / kg a cada 12 horas durante cinco dias. O mesmo tratamento foi realizado após estabilização articular aos 21 dias e depois de cada artroscopia exploratória. A terapia profilática com cefalexina (Aspen-Pharma, Brasil) na dose de 30 mg / kg por via intravenosa foi administrada trinta minutos antes da estabilização articular e a dosagem foi repetida duas horas após a cirurgia.

O sacrifício dos animais foi realizado conforme a recomendação da equipe de anesthesiologistas do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. Sob anestesia inalatória, foi injetado pela via intravenosa 10 ml de propofol seguidos de 10 ml de cloreto de potássio. Foi constatado o óbito na visibilização dos parâmetros vitais no monitor do aparelho de anestesia e pela ausculta cardíaca.

#### **4.2.1. Processamento das amostras e análise imuno-histoquímica**

Para a análise imuno-histoquímica foram utilizados os anticorpos primários anti-PDGF AA (ab9701, abcam. 1:250), anti-TNF- $\alpha$  (TFN706-V2903, bioreagents. 1:250), anti-IL- $\beta$ 1 (PAA563Rb51, cloud-clone corp. 1:250), anti-BMP-2 (ab6285, abcam. 1:200) para se determinar a expressão dessas citocinas na superfície da cartilagem articular e na membrana sinovial dos coelhos.

Os tecidos utilizados como controle positivo e negativo durante o processamento variaram dependendo do anticorpo utilizado. Como controle positivo, foram utilizados fragmentos de pele para o PDGF AA, tumor mamário para o TNF- $\alpha$ , pâncreas para a IL-1 $\beta$  e pulmão para a BMP-2.

Após a coleta das amostras, o tecido foi processado rotineiramente conforme o protocolo do laboratório de histopatologia e imuno-histoquímica da Escola de Veterinária da UFMG. Os fragmentos foram dispostos no histotécnico (LEICA ASP300 S) e submersos uma hora no álcool 70%, seguido de uma hora no álcool 80%, mais uma hora no álcool 90%, duas horas no álcool absoluto, 30 minutos no xilol e finalmente 30 minutos na parafina. Depois desse processo os fragmentos foram emblocados em parafina e cortados em micrótomo (LEICA RM2245) numa espessura de 5  $\mu$ m. Os cortes foram montados em lâminas polarizadas para imuno-histoquímica para posterior processamento.

As lâminas obtidas foram então dispostas na estufa (FANEM 502C) a 60°C durante 20 minutos para diminuir a quantidade de parafina, foram posteriormente submersas durante 15 minutos em xilol I, 10 minutos no xilol II, 5 minutos no álcool absoluto I, 5 minutos no álcool II, 5 minutos no álcool 90%, 5 minutos no álcool 80%, 5 minutos no álcool 70%, sendo em seguida

submersas por 10 minutos na água destilada. Depois da hidratação do tecido procedeu-se à recuperação antigênica, para isso, as lâminas foram dispostas na panela de vapor a 98°C submersas em solução tampão citrato pH 6,0 durante uma hora. Após este tempo, deixou-se esfriar as lâminas à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes com solução de PBS pH 7,0, seguindo-se o bloqueio da peroxidase endógena. Para isso, preparou-se uma solução de peróxido de hidrogênio (1,5 ml de peróxido de hidrogênio em 3,5 ml de PBS estéril) e cobriu-se o tecido nas lâminas com a solução preparada durante 40 minutos. Depois deste período, foram feitas três lavagens com PBS e as lâminas foram secadas. O passo seguinte consistiu no bloqueio das reações inespecíficas, para o qual foram adicionados 0,5 g de leite em pó a 20 ml de PBS. A solução preparada foi aquecida durante dez minutos no micro-ondas e depois o tecido foi coberto com a solução preparada, deixando agir por trinta minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. Terminado o tempo de incubação, foram feitas três lavagens com PBS. Após as lavagens, o tecido foi incubado com o anticorpo primário específico diluído, a ser avaliado (PDGF: diluição 1:250; BMP-2: 1:200; TNF- $\alpha$ : 1:250; IL-1 $\beta$ : 1:250) em câmara úmida, durante 16 horas a 4°C. Neste momento, as lâminas controle negativo foram incubadas com solução de PBS no lugar do anticorpo primário. Transcorridas as 16 horas da incubação, as lâminas foram novamente lavadas três vezes com PBS e o excesso do PBS foi retirado. Imediatamente depois foram adicionadas quatro gotas de biotina sobre o tecido e deixou-se em incubação durante 20 minutos. Transcorrido esse tempo, as lâminas foram novamente lavadas três vezes com PBS, retirou-se o excesso do mesmo e foram adicionadas quatro gotas de avidina sobre o tecido, deixando reagir durante 10 minutos. Em seguida os cortes foram lavados três vezes com PBS, retirou-se o excesso e foram adicionados 60  $\mu$ l do cromógeno revelador DAB, deixando-o agir durante cinco minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada e submersas na mesma solução durante dez minutos. Depois da submersão na água destilada, iniciou-se a desidratação do tecido, sendo as lâminas submersas em hematoxilina durante 10 segundos e lavadas na água corrente. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em álcool 70%, 80% e 90%. Seguidamente, as lâminas foram submersas em álcool absoluto I durante cinco minutos, álcool absoluto II durante mais cinco minutos, xilol I durante 5 minutos e em xilol II durante mais 5 minutos. Depois do processamento as lâminas foram montadas e avaliadas sob microscopia de luz óptica.

Os critérios empregados para a avaliação imuno-histoquímica foram baseados na intensidade da imunomarcção citoplasmática observada nos condrócitos e nos sinoviócitos. Foram consideradas unicamente as células que apresentaram coloração marrom citoplasmática. A tabela 11 ilustra os critérios considerados para avaliar a intensidade da imunomarcção.

**Tabela 11.** Parâmetros considerados para a avaliação imuno-histoquímica dos tecidos da articulação fêmoro-tíbio-patelar de coelhos com osteoartrose experimental tratados ou não com CAP durante os momentos avaliados.

<b>AValiação IMUNOHISTOQUÍCA DA CARTILAGEM E DA MEMBRANA SINOVIAL</b>		
<b>ANTICORPO AVALIADO</b>	<b>CRITÉRIO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
<b>ANTI-IL1<math>\beta</math></b>	<b>0: normal</b>	< de 2 células marcadas por campo avaliado
	<b>1: discreta</b>	$\geq$ a 2 células, porém < de 4 células marcadas por campo avaliado
	<b>2: moderada</b>	$\geq$ a 4 células, porém < de 8 células marcadas por campo avaliado
	<b>3: acentuada</b>	> de 8 células marcadas por campo avaliado.
<b>ANTI-TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>0: normal</b>	< de 2 células marcadas por campo avaliado
	<b>1: discreta</b>	$\geq$ a 2 células, porém < de 4 células marcadas por campo avaliado
	<b>2: moderada</b>	$\geq$ a 4 células, porém < de 8 células marcadas por campo avaliado
	<b>3: acentuada</b>	> de 8 células marcadas por campo avaliado.

<b>ANTI-BMP2</b>	<b>0: normal</b>	< de 2 células marcadas por campo avaliado
	<b>1: discreta</b>	≥ a 2 células, porém < de 4 células marcadas por campo avaliado
	<b>2: moderada</b>	≥ a 4 células, porém < de 8 células marcadas por campo avaliado
	<b>3: acentuada</b>	> de 8 células marcadas por campo avaliado.
<b>ANTI-PDGF</b>	<b>0: normal</b>	< de 2 células marcadas por campo avaliado
	<b>1: discreta</b>	≥ a 2 células, porém < de 4 células marcadas por campo avaliado
	<b>2: moderada</b>	≥ a 4 células, porém < de 8 células marcadas por campo avaliado
	<b>3: acentuada</b>	> de 8 células marcadas por campo avaliado.

Classificação realizada conforme o reportado por Xu et al., 2009.

### 4.3 Análises estatística

Para as análises estatísticas foram empregados os seguintes testes:

- Teste de student-Newman-Kels para avaliar diferenças estatísticas entre os valores pareados no sangue total e no CAP;
- Teste de Tukey para comparar os valores das médias entre o grupo controle e o grupo CAP;
- Teste de Kruskal-Wallis para determinar a interação entre o grupo e o tempo de avaliação;
- Teste de Friedman para determinar o efeito do tempo em cada um dos grupos.

### 4.4. Resultados

Os resultados da avaliação imuno-histoquímica são apresentados na tabela 12. As figuras 24 e 25 ilustram a cápsula sinovial e a cartilagem articular respectivamente, sem alterações, com poucas células marcadas. As figuras 26, 27 e 28 ilustram a cápsula sinovial no M3, M4 e M5 respectivamente, com as células marcadas pelos respectivos anticorpos.

Nos animais do grupo controle observou-se um aumento acentuado da secreção das citocinas inflamatórias ao longo dos momentos avaliados. Contrário as citocinas inflamatórias, nos animais desse grupo, a secreção do PDGF não teve um aumento significativo durante os momentos avaliados.

Já nos animais do grupo CAP, foi observado uma tendência oposta à observada nos coelhos do grupo controle. No grupo CAP verificou-se uma diminuição progressiva da síntese e secreção de citocinas inflamatórias ao longo dos dias avaliados. Já na avaliação do PDGF, foi observado um aumento progressivo na síntese e secreção desse fator de crescimento por parte dos sinoviócitos e dos condrócitos, ajudando a diminuir a degradação da MEC e da inflamação da cápsula sinovial.

**Tabela 12.** Resultados da avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial e cartilagem articular de coelhos do grupo CAP e do grupo controle no M3, M4 e M5.

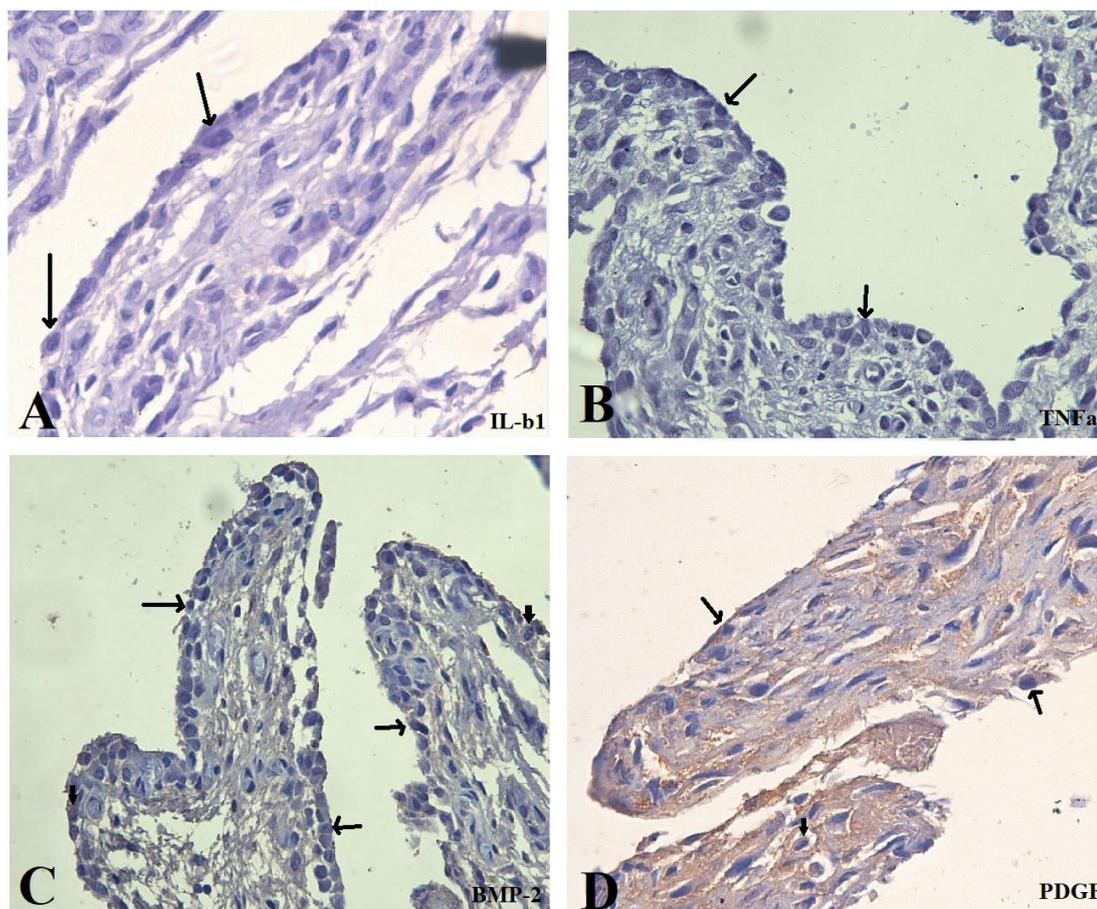
AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA							
CÁPSULA SINOVIAL							
ANTICORPO		SCORE					
		GRUPO CONTROLE			GRUPO CAP		
		M3	M4	M5	M3	M4	M5
ANTI-IL1 $\beta$	Coelho 1	0	1	2	0	0	0
	Coelho 2	0	1	3	0	0	0
	Coelho 3	1	1	3	1	0	1
	Coelho 4	1	2	3	1	1	1
	Coelho 5	1	2	3	1	1	1
	Media e SD	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	1,4 $\pm$ 0,44 <sup>B1</sup>	2,8 $\pm$ 0,44 <sup>C1</sup>	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	0,4 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>B2</sup>
	Coelho 1	0	1	2	0	0	1
Coelho 2	0	1	2	0	0	1	
Coelho 3	0	1	3	1	0	1	
Coelho 4	1	1	3	1	1	2	
Coelho 5	1	2	3	1	1	2	
Media e SD	0,4 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	1,2 $\pm$ 0,44 <sup>B1</sup>	2,6 $\pm$ 0,54 <sup>C1</sup>	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	0,4 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	1,4 $\pm$ 0,44 <sup>B2</sup>	
ANTI-BMP2	Coelho 1	0	0	1	0	0	1
	Coelho 2	0	0	1	0	0	1
	Coelho 3	1	1	2	0	1	1
	Coelho 4	1	1	2	1	1	1
	Coelho 5	1	1	2	1	1	2
	Media e SD	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	1,6 $\pm$ 0,54 <sup>B1</sup>	0,4 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	1,2 $\pm$ 0,54 <sup>B1</sup>
	Coelho 1	0	0	1	0	1	2
Coelho 2	0	0	1	0	1	2	
Coelho 3	0	1	1	1	2	3	
Coelho 4	1	1	2	1	2	3	
Coelho 5	1	1	2	1	3	3	
Media e SD	0,4 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	1,4 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	0,6 $\pm$ 0,54 <sup>A1</sup>	1,8 $\pm$ 0,83 <sup>B2</sup>	2,6 $\pm$ 0,54 <sup>B2</sup>	
CARTILAGEM ARTICULAR							
ANTICORPO		SCORE					
		GRUPO CONTROLE			GRUPO CAP		
		M3	M4	M5	M3	M4	M5
ANTI-IL1 $\beta$	Coelho 1	0	1	2	0	0	1
	Coelho 2	0	1	3	0	0	1
	Coelho 3	1	2	3	0	1	1

	3						
	Coelho 4	1	2	3	1	1	2
	Coelho 5	1	2	3	1	1	2
	Média e SD	0,6±0,54 <sup>A1</sup>	1,6±0,54 <sup>B1</sup>	2,8±0,44 <sup>C1</sup>	0,4±0,54 <sup>A1</sup>	0,6±0,54 <sup>A2</sup>	1,4±0,54 <sup>B2</sup>
ANTI-TNF- $\alpha$	Coelho 1	0	2	2	0	0	1
	Coelho 2	0	2	2	0	0	1
	Coelho 3	1	2	3	0	0	1
	Coelho 4	1	3	3	0	1	2
	Coelho 5	1	3	3	1	1	2
	Média e SD	0,6±0,54 <sup>A1</sup>	2,4±0,54 <sup>B1</sup>	2,6±0,54 <sup>B1</sup>	0,2±0,44 <sup>A1</sup>	0,4±0,54 <sup>A2</sup>	1,4±0,54 <sup>B2</sup>
ANTI-BMP2	Coelho 1	0	1	2	0	1	1
	Coelho 2	0	2	2	0	1	1
	Coelho 3	0	2	2	0	2	2
	Coelho 4	1	2	3	1	2	2
	Coelho 5	1	3	3	1	3	3
	Média e SD	0,4±0,54 <sup>A1</sup>	2,0±0,70 <sup>B1</sup>	2,4±0,54 <sup>B1</sup>	0,4±0,54 <sup>A1</sup>	1,8±0,83 <sup>B1</sup>	1,8±0,83 <sup>B1</sup>
ANTI-PDGF	Coelho 1	1	1	1	1	2	2
	Coelho 2	1	1	1	1	2	3
	Coelho 3	1	1	2	1	2	3
	Coelho 4	1	2	2	2	2	3
	Coelho 5	2	2	2	2	3	3
	Média e SD	1,2±0,44 <sup>A1</sup>	1,4±0,54 <sup>A</sup> <sub>B1</sub>	1,6±0,54 <sup>B1</sup>	1,4±0,54 <sup>A1</sup>	2,2±0,44 <sup>B2</sup>	2,8±0,44 <sup>C2</sup>

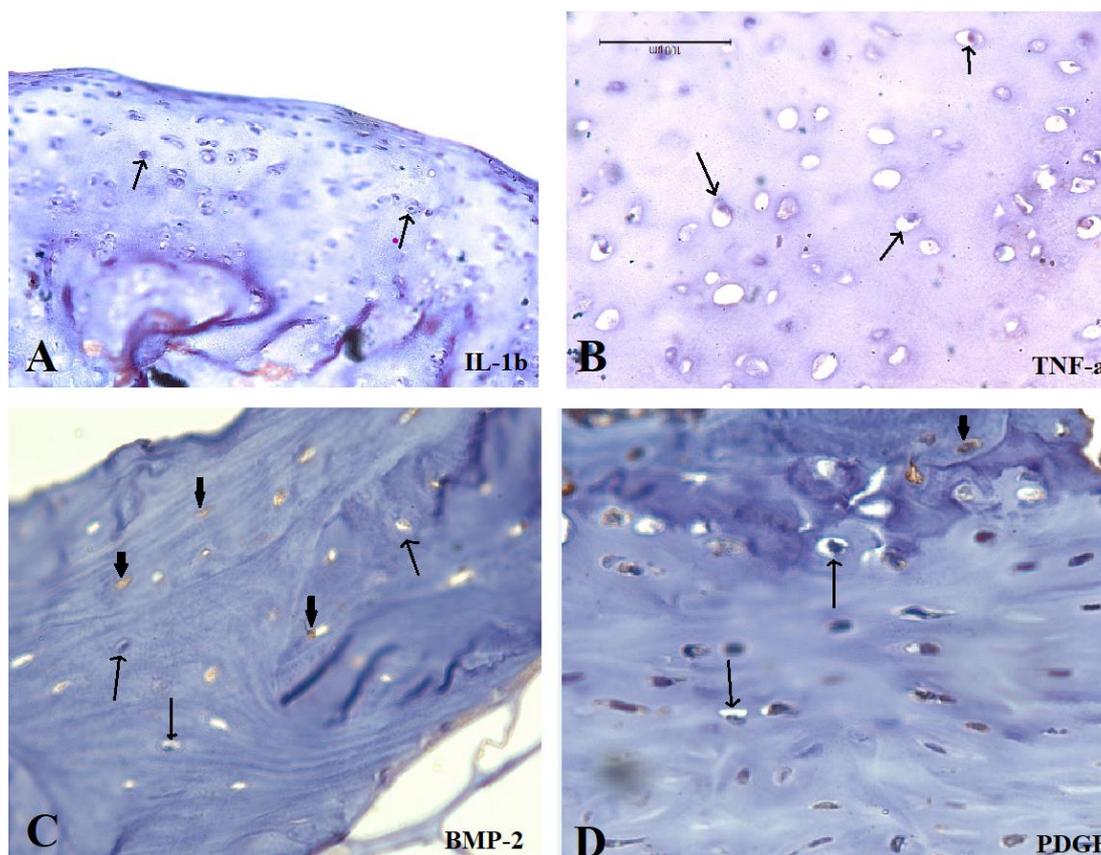
A,B,C: Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nos momentos avaliados DENTRO de cada grupo.

<sup>1,2</sup>: Números diferentes nas colunas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nos momentos avaliados ENTRE os grupos.

0: normal; 1: discreta; 2: moderada; 3: acentuada



**Figura 24.** Avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial de coelhos com articulações saudáveis e sem alterações (x100). A) Anticorpo anti-IL-1 $\beta$ : Sinoviócitos da membrana sinovial sem imunomarcção citoplasmática (setas pretas). B) Anticorpo anti-TNF $\alpha$ : Sinoviócitos da membrana sinovial com aparência normal e sem imunomarcção citoplasmática (setas pretas). C) anticorpo anti-BMP2: Sinoviócitos da membrana sinovial com imunomarcção normal, apresentando células sem imunomarcção (setas finas). D) Anticorpo anti-PDGF: Sinoviócitos da membrana sinovial apresentando células sem imunomarcção (setas finas).



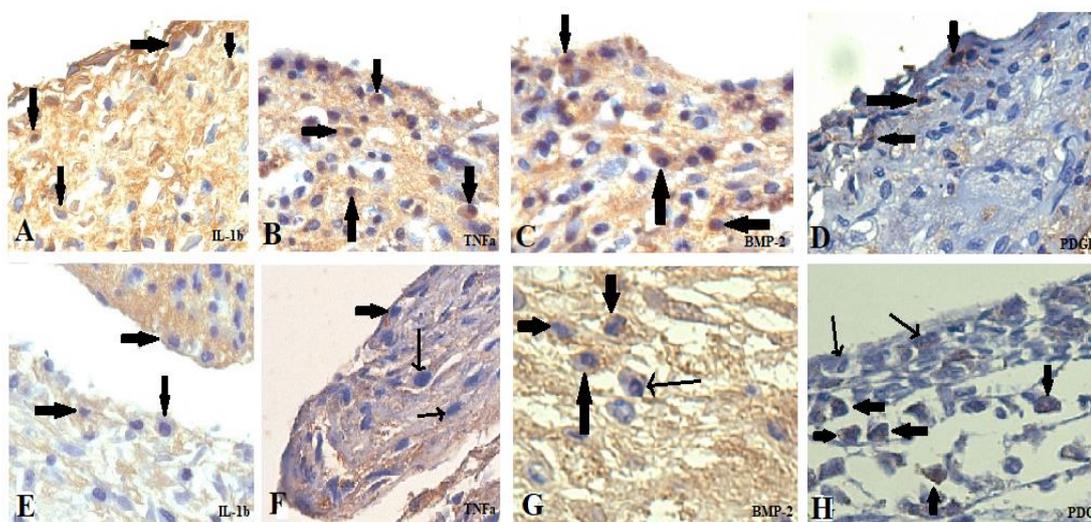
**Figura 25.** Avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular de coelhos com articulações saudáveis e sem alterações. (x100). A) Anticorpo anti-IL-1 $\beta$ : Superfície articular lisa, com condrócitos sem imunomarcção citoplasmática (setas finas). B) Anticorpo anti-TNF- $\alpha$ : condrócitos da zona intermedia sem imunomarcção citoplasmática (setas finas). C). Anticorpo anti-BMP2: Observa-se condrócitos das diferentes zonas articulares com imunomarcção citoplasmática normal (setas grossas) e outros sem imunomarcção (setas finas). D). Anticorpo anti-PDGF: Observa-se condrócitos da zona superficial com imunomarcção normal (menos de duas células marcadas por campo) (seta grossa) e outros condrócitos sem imunomarcção (setas finas).

Na cápsula sinovial do membro não operado (Figura 24), isto é, o controle, verificou-se um tecido saudável com imunomarcção normal dos anticorpos avaliados. Na cartilagem articular do membro não operado, observou-se um tecido com estrutura normal, sem alterações e com imunomarcção normal dos anticorpos avaliados. O anticorpo anti IL-1 $\beta$ , imunomarcado durante processos inflamatórios, não foi observado na cartilagem articular. O anticorpo anti-TNF $\alpha$  também não teve imunomarcção nas articulações saudáveis, como observado na figura 24. Os anticorpos BMP-2 e PDGF apresentaram pouca imunomarcção, como acontece em articulações saudáveis.

#### 4.4.1. Avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial

No M3 (15 dias após a primeira aplicação de CAP), foram observadas alterações compatíveis com o processo degenerativo em ambos os grupos. A imunomarcção dos anticorpos foi observada em ambos os grupos, com intensidade similar, mas as citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e o TGF- $\alpha$  foram secretadas pelos sinoviócitos dos coelhos do grupo controle em maior quantidade. O PDGF e a BMP-2 foram secretadas em maior intensidade pelos sinoviócitos dos coelhos do grupo CAP (Figura 26).

Nos coelhos do grupo controle, observou-se na cápsula articular, uma imunomarcação de normal a discreta das citocinas inflamatórias, da BMP-2 e do PDGF. Quando avaliada a IL-1 $\beta$ , dois coelhos do grupo (40%) apresentaram menos de duas células marcadas no seu citoplasma e os outros três (60%) apresentaram de duas a quatro células marcadas. Quanto ao TNF- $\alpha$ , observou-se que três coelhos (60%) apresentaram menos de dois sinoviócitos marcados, enquanto os dois restantes (40%) apresentaram de duas a quatro sinoviócitos marcados (tabela 12; figura 26). Observou-se na avaliação da BMP-2 que dois coelhos (60%) tiveram uma imunomarcação normal, com menos de duas células expressando a molécula e os outros três coelhos (60%) apresentaram uma imunomarcação discreta, com mais de duas células, porém menos de 4 células marcadas. Na quantificação do PDGF, três coelhos (60%) apresentaram imunomarcação normal, com menos de duas células marcadas e os outros dois (40%), imunomarcação discreta, com mais de duas, porém menos de quatro células marcadas.

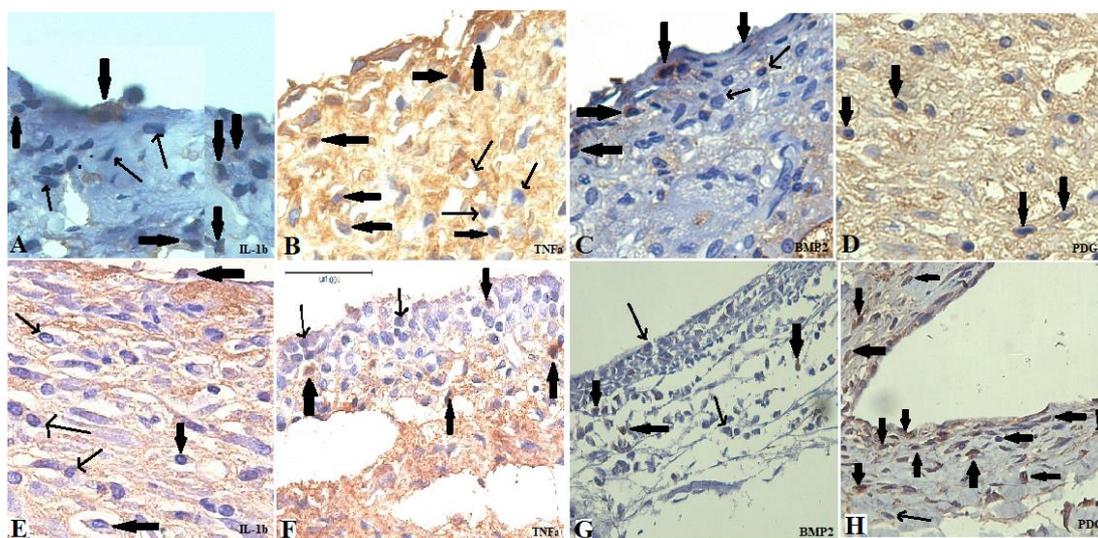


**Figura 26.** Avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial de coelhos de ambos os grupos no momento 3 (M3; x100). A, B, C e D: grupo controle. E, F, G e H: grupo CAP. I, J, K e L: cartilagem articular de coelhos do grupo controle. M, N, O e P: cartilagem articular de coelhos do grupo CAP. A) Sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática discreta para a IL-1 $\beta$  (setas grossas). B) Sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática discreta para o TNF- $\alpha$  (setas grossas). C) Sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática discreta para a BMP-2 (setas grossas). D) sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática discreta para o PDGF. E) Sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática discreta para IL-1 $\beta$  (setas grossas). F) sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática normal para o TNF- $\alpha$  (seta grossa) e algumas células normais (setas finas). G) Sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática discreta para a BMP-2 (setas grossas) e uma célula sem imunomarcação (seta fina). H) Sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática moderada para o PDGF (setas grossas) e alguns sinoviócitos sem imunomarcação (setas finas).

Na cápsula sinovial dos coelhos do grupo CAP observou-se também imunomarcação citoplasmática normal a discreta dos sinoviócitos. Para a IL-1 $\beta$ , dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcação citoplasmática normal, enquanto três coelhos (60%) apresentaram imunomarcação citoplasmática discreta. Para o TNF- $\alpha$ , dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcação citoplasmática normal e os outros três coelhos (60%) apresentaram imunomarcação citoplasmática discreta. Na avaliação da BMP-2, observou-se que três coelhos (60%) apresentaram imunomarcação citoplasmática normal e dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcação citoplasmática discreta. Para o PDGF, dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcação citoplasmática normal e os três restantes (60%) tiveram imunomarcação citoplasmática discreta (tabela 12; figura 26).

Quando comparadas as médias dos valores obtidos em ambos os grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, porém os coelhos do grupo CAP apresentaram melhores escores em todos os anticorpos avaliados.

No M4 (30 dias após a segunda aplicação de CAP), foi evidenciado o aumento na expressão celular dos diferentes anticorpos avaliados em ambos os grupos. Foram registrados aumento na secreção da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  nos coelhos de ambos os grupos, porém a presença dessas substâncias foi significativamente maior nos coelhos do grupo controle. A BMP-2 e o PDGF apresentaram níveis de secreção similares aos observados no M3 nos coelhos do grupo controle enquanto houve um aumento significativo dessas duas moléculas nos coelhos do grupo CAP.



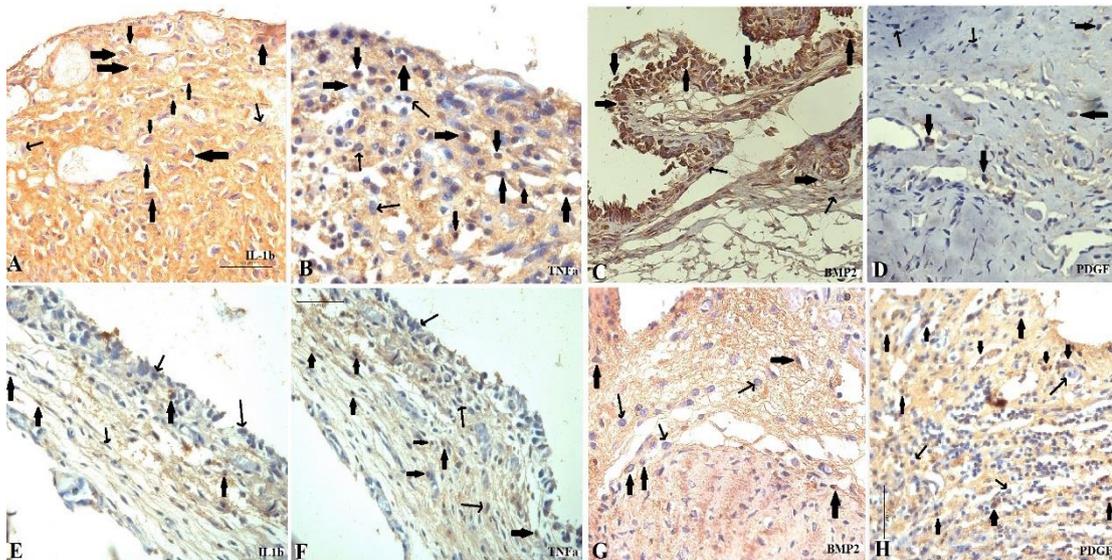
**Figura 27.** Avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial de coelhos de ambos os grupos no momento 4 (M4; x100). A, B, C e D: grupo controle. E, F, G e H: grupo CAP. A) sinoviócitos e alguns fibroblastos com imunomarcação citoplasmática moderada para IL-1 $\beta$  (setas grossas) e alguns fibroblastos e sinoviócitos sem imunomarcação (setas finas). B) Sinoviócitos e macrófagos com imunomarcação citoplasmática e extracelular moderada para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e alguns sinoviócitos sem nenhuma imunomarcação (setas finas). C) Sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática discreta para a BMP-2 (setas grossas) e alguns sinoviócitos sem imunomarcação (setas finas). D) Sinoviócitos, fibroblastos e macrófagos com imunomarcação citoplasmática e extracelular discreta para o PDGF (setas grossas). E) fibroblasto e macrófago com imunomarcação citoplasmática e extracelular normal para a IL-1 $\beta$  (setas grossas) e alguns macrófagos e sinoviócitos sem imunomarcação (setas finas). F) Sinoviócitos com imunomarcação citoplasmática discreta para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e alguns sinoviócitos sem imunomarcação (setas finas). G) Sinoviócitos e fibroblastos com imunomarcação citoplasmática discreta para a BMP-2 (setas grossas) e alguns sinoviócitos e fibroblastos sem imunomarcação (setas finas). H) Sinoviócitos e fibroblastos com imunomarcação citoplasmática acentuada para o PDGF (setas grossas) e alguns fibroblastos sem imunomarcação (setas finas).

Nos coelhos do grupo controle, no M4, foi verificado um aumento na excreção da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$ , enquanto a BMP e o PDGF mantiveram os níveis de secreção constantes, indicando que nos animais deste grupo, o processo inflamatório e degenerativo continuou avançando, e a excreção de fatores de crescimento se manteve baixa. Para a IL-1 $\beta$ , foi observado que três coelhos (60%) tiveram imunomarcação citoplasmática discreta nos sinoviócitos e fibroblastos, enquanto dois coelhos (40%) apresentou imunomarcação citoplasmática moderada nessas células. Na avaliação do TNF- $\alpha$ , foi observado que quatro coelhos (80%) apresentaram sinoviócitos e fibroblastos com imunomarcação citoplasmática discreta e um coelho (20%) apresentou imunomarcação citoplasmática moderada. Para a BMP-2 foi observado em dois coelhos (40%) imunomarcação citoplasmática normal e, nos três coelhos (60%) restantes imunomarcação citoplasmática discreta. Já para o PDGF, dois animais do grupo (40%) tiveram

imunomarcção citoplasmática e extracelular normal, enquanto três animais (60%) apresentaram imunomarcção citoplasmática e extracelular discreta (Figura 27).

Nos coelhos do grupo CAP, no mesmo momento, evidenciou-se uma diminuição na secreção das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por parte dos sinoviócitos, fibroblastos e macrófagos da cápsula sinovial, enquanto a BMP-2 e o PDGF apresentaram aumentos significativos da secreção. Para a IL-1 $\beta$ , observou-se imunomarcção citoplasmática e extracelular normal em três coelhos (60%), enquanto dois (40%) coelhos mostraram imunomarcção citoplasmática e extracelular discreta. observou-se que três coelhos (60%) apresentaram imunomarcção citoplasmática normal para o TNF- $\alpha$ , enquanto dois (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta. Na avaliação da BMP-2, foi observado que dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática normal, enquanto três coelhos (60%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta. Quanto ao PDGF, dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática e extracelular discreta, dois (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática e extracelular moderada e um coelho (20%) apresentou imunomarcção citoplasmática e extracelular acentuada (Figura 27).

As médias obtidas entre os grupos no M4, mostraram diferença estatisticamente significativa somente na expressão de PDGF. Para os demais anticorpos avaliados, não foi observada nenhuma diferença estatística.



**Figura 28.** Avaliação imuno-histoquímica da cápsula sinovial de coelhos de ambos os grupos no momento 5 (M5; x100). A, B, C e D, grupo controle. E, F, G e H, grupo CAP. A) Sinoviócitos, fibroblastos e macrófagos apresentando imunomarcção citoplasmática e extracelular acentuada para a IL-1 $\beta$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). B) Sinoviócitos e fibroblastos apresentando imunomarcção citoplasmática e extracelular acentuada para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). C) Sinoviócitos apresentando imunomarcção citoplasmática e extracelular moderada para a BMP-2 (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). D) Sinoviócitos e macrófagos apresentando imunomarcção citoplasmática discreta para o PDGF (setas grossas) e alguns fibroblastos sem imunomarcção (setas finas). E) Sinoviócitos e fibroblastos apresentando imunomarcção citoplasmática discreta para a IL-1 $\beta$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). F) Sinoviócitos, macrófagos e fibroblastos apresentando imunomarcção citoplasmática moderada para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). G) Sinoviócitos, fibroblastos e macrófagos apresentando imunomarcção citoplasmática moderada para a BMP-2 (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). H) Sinoviócitos, fibroblastos e macrófagos mostrando imunomarcção citoplasmática acentuada para o PDGF (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas).

No M5, isto é, 30 dias da terceira e última aplicação dos tratamentos, foi observado no grupo controle um aumento na expressão das citocinas inflamatórias e da BMP-2. Já para o PDGF, não se verificou aumento significativo da secreção neste tempo (tabela 12; figura 28). Houve imunomarcacão moderada para a IL-1 $\beta$  em um animal (20%), enquanto nos outros quatro (80%) verificou-se imunomarcacão acentuada. Para o TNF- $\alpha$ , ocorreu imunomarcacão moderada em dois animais (40%) e imunomarcacão acentuada nos outros três (60%). Na avaliação da BMP-2, observou-se que dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcacão discreta, enquanto os outros três (60%) apresentaram imunomarcacão moderada. Quanto a secreção do PDGF, foi observado imunomarcacão discreta em quatro animais (80%) e moderada em um (20%).

Neste mesmo momento (M5), nos coelhos do grupo CAP, observou-se que os níveis das citocinas inflamatórias permaneceram praticamente iguais quando comparados com o M4 (30 dias de açã do CAP), já a BMP-2 teve um aumento discreto na secreção e o PDGF um aumento significativo na secreção. Para a IL-1 $\beta$ , dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcacão normal e três animais (60%), imunomarcacão discreta. O TNF- $\alpha$  mostrou imunomarcacão discreta em três coelhos (60%) e imunomarcacão moderada em dois (40%). Já para a BMP2, foi observado que quatro coelhos (80%) apresentaram imunomarcacão discreta, enquanto um único coelho (20%) apresentou imunomarcacão moderada. O PDGF mostrou imunomarcacão moderada em dois coelhos (40%) e imunomarcacão acentuada nos três restantes (Figura 28).

Neste momento, nos coelhos do grupo controle a secreção de citocinas inflamatórias continuou aumentando, o que intensificou a sinovite, a neovascularizacão e a degradacão da MEC. Neste grupo, a síntese e secreção de fatores de crescimento anabólicos foram discretas, explicando a pouca regeneracão do tecido.

A comparacão entre as médias obtidas de ambos os grupos neste momento, mostrou diferenças estatisticamente significativas em relacão aos anticorpos IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PDGF. Embora essa diferença não tenha sido observada na comparacão entre as médias do anticorpo BMP2, verificou-se que, quantitativamente, a secreção desta substância foi menor nos coelhos do grupo CAP.

Quando comparados os valores das médias dentro dos grupos, observou-se que no grupo controle houve diferença estatisticamente significativa em alguns momentos. Para a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  houve diferença estatisticamente significativa no M5 ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o M3 e o M4 e diferença significativa quando comparado o M4 com o M3 ( $p < 0,05$ ). Para a BMP e o PDGF não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados o M3 com o M4, porém quando comparado o M5 com os outros dois momentos avaliados, foi possível evidenciar uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Dentro do grupo CAP também foi possível observar diferenças significativas nos momentos. Para a IL-1 $\beta$  e o TNF $\alpha$  observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no M5 quando comparado com o M3 e o M4, porém não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado o M3 com o M4. Para a BMP-2 não foram observadas diferencas estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) quando comparados o M3 e o M4, mas quando comparado o M5 com os outros dois momentos observaram-se diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Para o PDGF foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado o M3 com o M4 e o M5, porém quando comparados o M4 e o M5, não foram observadas diferencas significativas ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4.2. Avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular

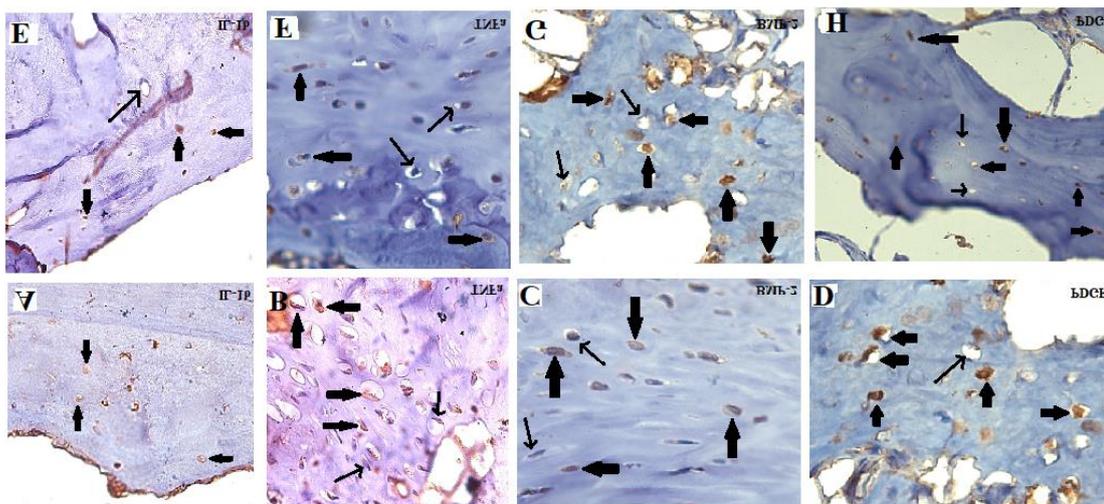
Os resultados da avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular são apresentados na tabela 12. As figuras 29, 30 e 31 mostram os resultados da avaliação da cartilagem articular no M3, M4 e M5 respectivamente. Na avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular ficou evidenciada como a aplicação do CAP pode influenciar tanto o processo inflamatório quanto o processo degenerativo na articulação. Uma menor secreção de citocinas inflamatórias e uma maior secreção do PDGF, foram características observadas no grupo CAP, enquanto no grupo controle, o avanço da OA foi característico nos momentos avaliados.

No momento três, foram observadas alterações na cartilagem articular, evidenciando a instauração da OA, causada pela liberação de citocinas inflamatórias. Os condrócitos apresentaram maior liberação das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$ . Já a BMP-2 e o PDGF apresentaram um incremento na liberação, como uma resposta as lesões instauradas (Figura 29).

Na avaliação da cartilagem articular nos coelhos do grupo controle, no M3, observaram-se evidências associadas ao avanço do processo degenerativo. Dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática normal para a IL-1 $\beta$  e três (60%) tiveram imunomarcção citoplasmática discreta. O TNF- $\alpha$  mostrou imunomarcção citoplasmática normal em dois coelhos (40%) e imunomarcção citoplasmática discreta nos outros três (60%). Para a BMP-2, três coelhos (60%) apresentaram imunomarcção citoplasmática normal e os dois restantes (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta. Já na avaliação do PDGF, quatro (80%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta e um (20%) apresentou imunomarcção citoplasmática moderada (tabela 12; figura 29).

Nesse mesmo momento (M3), nos coelhos do grupo CAP, observou-se também alterações moleculares associadas à OA., Três coelhos do grupo (60%) apresentaram imunomarcção normal para a IL-1 $\beta$ , enquanto os dois coelhos (40%) restantes, apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta. Em quatro coelhos (80%) houve imunomarcção citoplasmática normal para o TNF- $\alpha$ , enquanto um coelho (20%) apresentou imunomarcção citoplasmática discreta. Na avaliação da BMP-2, foi observado imunomarcção citoplasmática normal em três coelhos (60%), enquanto os outros dois coelhos (40%) apresentaram uma imunomarcção discreta. Para o PDGF, observou-se que dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta e os outros três coelhos (60%) apresentaram imunomarcção moderada (Figura 29).

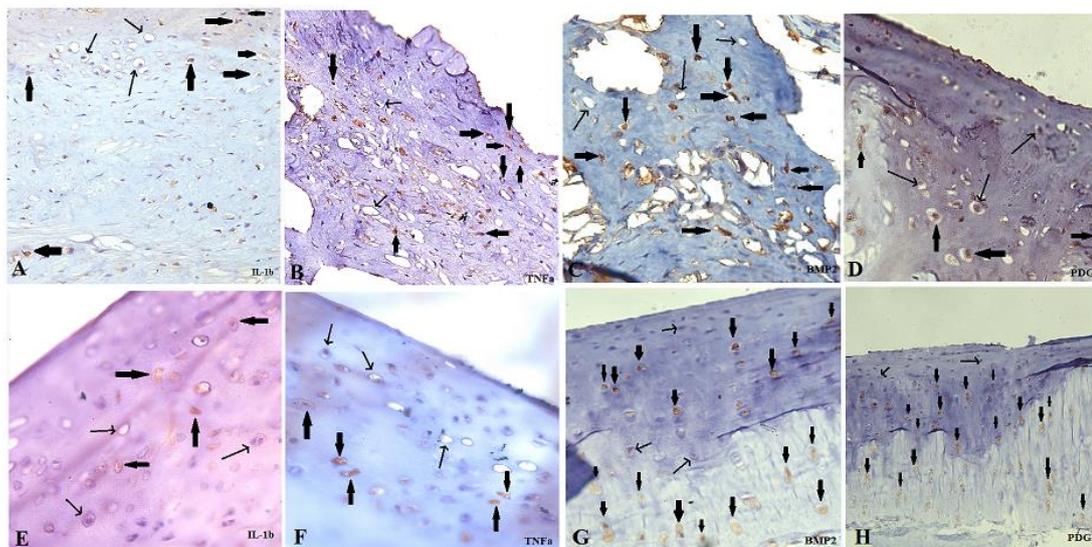
Quando comparadas as médias dos valores obtidos em ambos os grupos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, porém os coelhos do grupo CAP apresentaram melhores scores em todos os anticorpos avaliados.



**Figura 29.** Avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos no momento 3 (M3; x100). A, B, C e D: coelhos do grupo controle. E, F, G e H: coelhos do grupo CAP. A) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para a IL-1 $\beta$  (setas grossas). B) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). C). condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para a BMP-2 (setas grossas) e outras células sem imunomarcção (setas finas). D) condrócitos com imunomarcção citoplasmática moderada para o PDGF (setas grossas) e células sem imunomarcção (seta fina). E) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para a IL1- $\beta$  (setas grossas) e um condrócitos sem imunomarcção (seta fina). F) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e um condrócitos sem imunomarcção (setas finas). G) condrócitos com imunomarcção citoplasmática moderada para a BMP-2 (setas grossas) e condrócitos sem imunomarcção (setas finas). H) condrócitos com imunomarcção citoplasmática moderada para o PDGF (setas grossas) e condrócitos sem imunomarcção (setas finas).

No momento 4, houve aumento na secreção de citocinas inflamatórias nos coelhos do grupo controle e um discreto aumento na secreção da BPM-2 e do PDGF em relação ao M3. Já nos coelhos do grupo CAP, observou-se uma diminuição na secreção de moléculas inflamatórias na cartilagem articular e um aumento significativo na secreção da BMP-2 e do PDGF pelos condrócitos (Figura 30).

Nos coelhos do grupo controle, no M4, a IL-1 $\beta$  mostrou imunomarcção citoplasmática discreta em dois coelhos (40%) e moderada em três (60%). Para o TNF- $\alpha$  foi observado imunomarcção citoplasmática moderada em três coelhos (60%) e imunomarcção citoplasmática acentuada em dois (40%). Na avaliação da BMP-2 verificou-se em um coelho (20%) imunomarcção citoplasmática discreta, em três (60%) secreção citoplasmática moderada e um coelho (20%), imunomarcção citoplasmática acentuada. O PDGF mostrou imunomarcção citoplasmática discreta em três coelhos (60%), enquanto os outros dois (40%) apresentaram uma imunomarcção citoplasmática moderada (Figura 30).



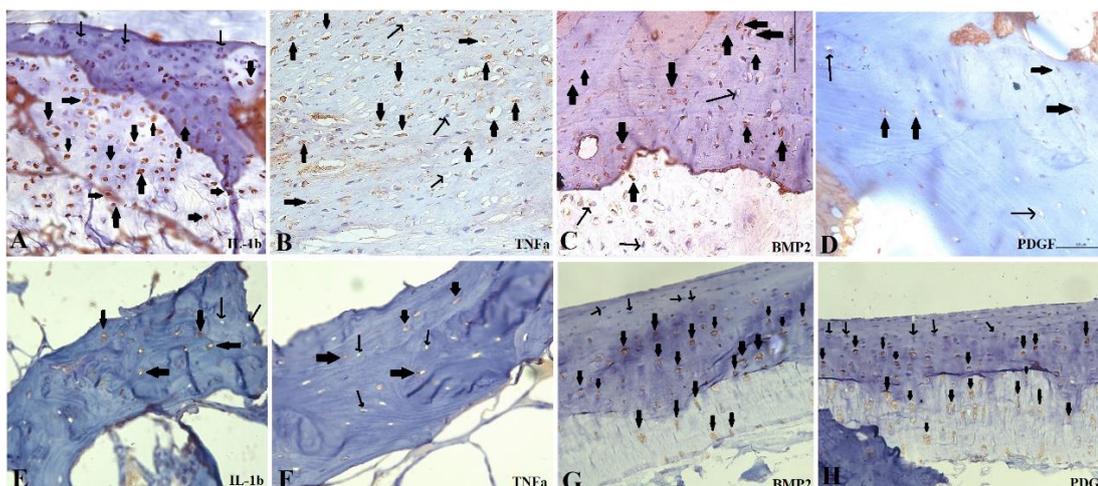
**Figura 30.** Avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos durante o momento 4 (M4; x100). A, B, C e D: coelhos do grupo controle. E, F, G e H: coelhos do grupo CAP. A) condrócitos com imunomarcção citoplasmática moderada para a IL-1 $\beta$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). B) condrócitos com imunomarcção citoplasmática moderada para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). C) condrócitos com imunomarcção citoplasmática acentuada para a BMP-2 (setas grossas) e outras células sem imunomarcção (setas finas). D) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para o PDGF (setas grossas) e células sem imunomarcção (seta fina). E) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para a IL-1 $\beta$  (setas grossas) e um condrócitos sem imunomarcção (seta fina). F) condrócitos com imunomarcção citoplasmática moderada para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e um condrócitos sem imunomarcção (setas finas). G) condrócitos com imunomarcção citoplasmática acentuada para a BMP-2 (setas grossas) e condrócitos sem imunomarcção (setas finas). H) condrócitos com imunomarcção citoplasmática acentuada para o PDGF (setas grossas) e condrócitos sem imunomarcção (setas finas).

Já nos coelhos do grupo CAP, nesse mesmo momento (M4), a IL-1 $\beta$  mostrou imunomarcção citoplasmática normal em dois coelhos (40%) e discreta em três (60%). Na avaliação do TNF- $\alpha$  foi observado que três coelhos (60%) do grupo apresentaram imunomarcção citoplasmática normal, enquanto dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta dessa citocina. Em relação á BMP-2, observou-se que dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta, dois coelhos apresentaram imunomarcção citoplasmática moderada e um coelho apresentou imunomarcção citoplasmática acentuada. Finalmente, na avaliação do PDGF, quatro coelhos (80%) apresentaram imunomarcção citoplasmática moderada e um coelho (20%) apresentou imunomarcção citoplasmática acentuada (Figura 30).

Quando comparadas as médias neste momento, verificou-se diferença estatisticamente significativa para a secreção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PDGF. Não houve diferença significativa na expressão de BMP2.

Na avaliação imuno-histoquímica durante o momento 5 (30 dias após a terceira aplicação de CAP), observou-se a tendência de progressão do processo degenerativo em ambos os grupos. No grupo controle, observou-se o aumento da secreção das citocinas inflamatórias avaliadas, enquanto no grupo CAP, essas citocinas foram liberadas em menor quantidade.

O PDGF, no grupo controle, caracterizou-se por ter uma secreção mais discreta, enquanto no grupo CAP, esse fator de crescimento foi secretado de forma acentuada.



**Figura 31.** Avaliação imuno-histoquímica da cartilagem articular de coelhos de ambos os grupos durante o momento 5 (M5; x100). A, B, C e D: coelhos do grupo controle. E, F, G e H: coelhos do grupo CAP. A) condrócitos com imunomarcção citoplasmática acentuada para a IL-1 $\beta$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). B) condrócitos com imunomarcção citoplasmática acentuada para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e algumas células sem imunomarcção (setas finas). C) condrócitos com imunomarcção citoplasmática acentuada para a BMP-2 (setas grossas) e outras células sem imunomarcção (setas finas). D) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para o PDGF (setas grossas) e células sem imunomarcção (seta fina). E) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para a IL1- $\beta$  (setas grossas) e outros condrócitos sem imunomarcção (seta fina). F) condrócitos com imunomarcção citoplasmática discreta para o TNF- $\alpha$  (setas grossas) e outros condrócitos sem imunomarcção (setas finas). G) condrócitos com imunomarcção citoplasmática acentuada para a BMP-2 (setas grossas) e condrócitos sem imunomarcção (setas finas). H) condrócitos com imunomarcção citoplasmática acentuada para o PDGF (setas grossas) e condrócitos sem imunomarcção (setas finas).

Nos animais do grupo controle, no momento 5, foi evidenciada a rápida progressão do processo degenerativo. Neste grupo, um animal (20%) apresentou imunomarcção citoplasmática moderada, enquanto os quatro coelhos restantes (80%) apresentaram imunomarcção citoplasmática acentuada para a IL-1 $\beta$ . O TNF- $\alpha$  mostrou imunomarcção citoplasmática moderada em dois coelhos (40%) e acentuada em três (60%). Já na avaliação do BMP-2, foi observado que três animais (60%) apresentaram imunomarcção citoplasmática moderada, enquanto dois animais (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática acentuada. Finalmente, na avaliação do PDGF, observou-se que dois animais (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta, enquanto os três coelhos restantes, apresentaram imunomarcção citoplasmática moderada (Figura 31).

Nos animais do grupo CAP também foram observadas alterações compatíveis com o avanço da OA. Observou-se neste grupo, imunomarcção citoplasmática discreta para a IL-1 $\beta$ , em três animais (60%), enquanto os outros dois (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática moderada. Para o TNF- $\alpha$ , foi observado que três animais (60%) apresentaram imunomarcção citoplasmática discreta, enquanto os dois animais restantes (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática e extracelular moderada. Na avaliação da BMP-2, observou-se que dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática e extracelular discreta, dois coelhos (40%) apresentaram imunomarcção citoplasmática e extracelular moderada e um coelho (20%) apresentou imunomarcção citoplasmática e extracelular acentuada. Finalmente, na avaliação do PDGF, foi observado que um animal (20%) apresentou imunomarcção citoplasmática moderada, enquanto os outros quatro animais (80%) apresentaram imunomarcção citoplasmática acentuada (Figura 31).

Quando comparadas as médias obtidas em ambos os grupos no M5, observou-se diferença estatisticamente significativa para a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e o PDGF ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença significativa para a BMP-2.

Quando comparadas as medias obtidas dentro dos grupos, observou-se no grupo controle que, para a IL-1 $\beta$ , houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o M3 com o M4 e o M5 e entre o M4 e o M5 ( $p < 0,05$ ). Para o TNF, houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as médias do M3 com o M4 e o M5 ( $p < 0,05$ ), porém quando comparadas as médias do M4 com o M5, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Na comparação das médias para a BMP-2, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa no M3 em relação aos outros dois momentos avaliados ( $p < 0,05$ ), porém quando comparado o M4 com o M5, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Finalmente, na comparação das médias para o PDGF, foi observado que não houve diferença significativa quando comparado o M3 com o M4 e o M4 com o M5 ( $p > 0,05$ ), mas houve diferença significativa quando comparado o M3 com o M5.

Na comparação entre as médias dentro do grupo CAP, foram observadas também algumas diferenças significativas. Para a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparadas as médias do M3 e o M4, porém, quando comparadas as médias do M3 e o M5 e do M4 e o M5, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Para a BMP-2, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as médias do M3 com o M4 e o M5, mas não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparadas as médias do M4 com o M5. Nas médias obtidas para o PDGF nos momentos avaliados, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em todos os momentos.

#### **4.5. Discussão**

Como observado nos resultados desta pesquisa, o avanço do processo degenerativo evidenciou o aumento na secreção de citocinas inflamatórias nos animais do grupo controle. Esse resultado confirma os achados na avaliação histopatológica, demonstrando que uma maior expressão de IL-1 $\beta$  e de TNF $\alpha$ , causa um aumento na presença de infiltrados inflamatório na cápsula e aumenta a degradação da cápsula sinovial.

A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , por serem citocinas inflamatórias e estar envolvidas no catabolismo celular, praticamente não são expressadas em articulações saudáveis. Já a BMP-2 e o PDGF são substâncias que estão envolvidas no anabolismo dos tecidos articulares, por isso, em articulações saudáveis e em equilíbrio eles são sintetizados e expressados também em poucas quantidades, assim como observado nesta pesquisa.

A maior expressão das citocinas inflamatórias que se manteve ao longo do estudo, nos animais do grupo controle é uma resposta esperada e compatível com a evolução do processo degenerativo, apesar de estabilizada a articulação, esse aumento da expressão das citocinas justifica a inflamação da sinovia, a neovascularização, a proliferação celular e a degradação da MEC. Estes resultados são semelhantes aos de Huang et al., (2017) que observaram nos coelhos portadores de OA maior expressão de IL-1 $\beta$  e MMP-13 em fases iniciais do processo degenerativo, mantidos até as 12 semanas de avaliação.

A alta expressão da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  nos coelhos do grupo controle, é um achado similar ao reportado por Benito et al (2005), que demonstraram maiores níveis dessas citocinas em animais

com OA. Adicionalmente, esses autores demonstraram que animais com OA apresentam maior vascularização e infiltração celular, o que contribui com a degradação dos componentes da articulação, assim como foi observado nos coelhos desse grupo.

A inflamação sinovial e a degradação da MEC da cartilagem são mediadas principalmente pela IL-1 $\beta$  e pelo TNF- $\alpha$ , que atuam pela síntese e liberação de moléculas como colagenases, agreganases e outras proteínas que degradam os componentes da cartilagem. Os níveis mais baixos destas citocinas no grupo CAP, nesta pesquisa, e a melhor condição da cartilagem mostram a importância do controle destes elementos na articulação. Esse aumento da secreção do PGDF e a diminuição da secreção das citocinas inflamatórias, é justificado pela aplicação intra-articular do CAP. O intervalo de aplicação curto, também ajuda a manter concentrações locais altas, aumentando mais ainda o efeito protetor desse composto biológico. Chien et al., (2020) e Haslauer et al., (2013) relataram que a diminuição nos níveis dessas citocinas diminui a degeneração da cartilagem e que as próprias células residentes nesses tecidos são as responsáveis pela produção e sínteses de mediadores inflamatórios. Nesse contexto, é importante ressaltar que o concentrado de plaquetas pode desenvolver um papel fundamental no controle da secreção e liberação dessas citocinas inflamatórias, ajudando a melhorar o microambiente articular.

Contrário ao reportado por Nasi et al., (2017) de que a IL-1 $\beta$  não é um fator chave nas alterações decorrentes do processo degenerativo, outros relatos de literatura (Chien et al., 2020; Huang et al., 2017), e nosso trabalho, mostram que a IL-1 $\beta$  possui um importante papel na degradação da cartilagem articular, uma vez que induz acentuado processo inflamatório que acarreta a destruição da MEC. As diferenças nesses resultados, podem ser devidas ao modelo utilizado por Nasi et al., (2017), no qual a OA foi causada pela meniscectomia e não pela ruptura do LCCr.

A redução desta ação inflamatória será favorável no controle da OA, como observado nos coelhos do grupo CAP que, ao contrário do grupo controle, mostraram menor liberação de citocinas inflamatórias, inclusive com diminuição da expressão dessas substâncias ao longo do tempo. Tanto os sinoviócitos quanto os condrócitos tiveram menor expressão dessas substâncias, contribuindo assim, para a proteção da MEC da membrana sinovial e da cartilagem articular. Esses achados são semelhantes ao observado por Kon et al., (2010), que relataram diminuição da sensibilidade dolorosa e melhora da função articular após aplicações intra-articulares de PRP, fato atribuído ao seu efeito anti-inflamatório.

De forma semelhante, também a expressão da BMP-2 pelos sinoviócitos, condrócitos, fibroblastos e macrófagos, com aumento gradativo ao longo do tempo em ambos os grupos, foi maior nos animais do grupo controle. Este achado pode ter influenciado a formação de osteófitos e a perpetuação do processo inflamatório, como já relatado por Katagiri e Watabe (2016), e por Scarfi (2016), segundo os quais, os níveis altos dessa proteína podem estimular a formação de osso heterotópico e aumentar a presença e a gravidade da inflamação.

Embora ambos grupos tenham mostrado valores crescentes na expressão da BMP-2, esta foi também menor nos animais do grupo CAP, principalmente por parte dos sinoviócitos. Isso sugere que o CAP pode modular a expressão dessa substância por parte das células locais, favorecendo assim, a redução da inflamação dos tecidos, a redução dos efeitos de degradação da MEC e da formação de osteófitos. Segundo Katagiri e Watabe (2016) e por Scarfi (2016), quanto menor for a quantidade desta proteína no tecido, menor será o processo inflamatório e maior será a resposta favorável das células.

Nos animais do grupo controle, observou-se que a expressão do PDGF se manteve discreta em todos os momentos avaliados, diminuindo quase completamente a reparação dos tecidos articulares. Isso pode ser causado devido à alta concentração de citocinas inflamatórias, que inibem a síntese e secreção de fatores anabólicos por parte dos sinoviócitos e condrócitos. Aumento na concentração de citocinas inflamatórias e enzimas degradativas acentua a degradação da MEC e piora as alterações estruturais e inflamatórias (Benito et al., 2015).

A ação do CAP se mostra também em relação ao PDGF, cujos valores médios de expressão se mostraram significativamente mais altos nos animais do grupo CAP em relação aos do grupo controle, cujo aumento não foi expressivo. Isto indica que o CAP induz a liberação e síntese dessa substância pelas células residentes da cartilagem articular e da membrana sinovial após a ativação das plaquetas e a degranulação das mesmas. Ha et al., (2019) mostraram em seus estudos que os produtos derivados das plaquetas possuem uma maior concentração de fatores de crescimento anabólicos, como o PDGF, que além de atuar por se só, podem estimular sua própria síntese e liberação pelos macrófagos, sinoviócitos e condrócitos presentes no tecido.

Após a aplicação do CAP, foi possível verificar menor expressão de citocinas inflamatórias, inclusive nas fases tardias deste experimento, assim mesmo, observou-se imunomarcagem aumentada para o PDGF que iniciou após a primeira aplicação e se manteve ao longo dos momentos avaliados. Esse controle do processo inflamatório influenciou os resultados da avaliação histológica, na qual, os coelhos do grupo CAP apresentaram menor hipertrofia dos sinoviócitos, menor proliferação de vasos sanguíneos, menor presença de alterações da cartilagem e maior densidade dos condrócitos.

O processo de cicatrização e reparação tecidual consiste numa complexa interação entre fatores bioquímicos e biomecânicos e mediadores que auxiliam o tecido a recuperar suas propriedades. O PDGF desenvolve um papel crítico durante esse processo de cicatrização/reparação, pois interage com as células do tecido local para induzir proliferação e diferenciação celular, favorecendo assim, a produção de colágeno e de outros componentes do tecido (Broughton II et al. 2006). Como observado nesta pesquisa, o CAP libera grandes quantidades de PDGF, que age na cartilagem e melhora a capacidade de recuperação deste tecido, estimulando os condrócitos a secretar mais PDGF, contribuindo, portanto, para a melhora da qualidade natural deste tecido ao longo do tempo.

Outra observação interessante, é que, mesmo após 30 dias da última aplicação de CAP intra-articular, a expressão e secreção do PDGF permaneceu alta e constante ao longo do tempo, sugerindo que este produto pode estimular e regular a síntese do PDGF pelos condrócitos e sinoviócitos mesmo quatro semanas após cessar a aplicação exógena do CAP. O PDGF é capaz de estimular a sua própria síntese e pode induzir células como macrófagos, monócitos e fibroblastos a sintetizar sua liberação e a de outros fatores de crescimento (Ornetti et al., 2016; Werner e Grose, 2003). É preciso, entretanto, estudos continuados e mais longos para acompanhar a duração deste efeito e avaliar o momento mais adequado para novas aplicações do produto.

Nenhuma das opções terapêuticas disponíveis atualmente oferece um resultado totalmente satisfatório, pois além de não impedir o avanço das alterações, podem induzir efeitos secundários prejudiciais às articulações (Bland, 2015). A terapia regenerativa e os biomateriais são atualmente as melhores alternativas, e embora não consigam deter o avanço da OA, eles proporcionam um microambiente ideal para a regeneração articular (Khatab et al., 2018; Bavaresco et al., 2008). Como observado nesta pesquisa, o CAP diminui a expressão das

citocinas inflamatórias, que exercem efeito nocivo sobre as células da cartilagem e da membrana sinovial, ao mesmo tempo que induz a expressão de fatores de crescimento para regular a síntese de MEC.

Sem dúvida, outro achado importante nesta pesquisa, é que o CAP é capaz de diminuir a degradação da cartilagem articular, não só pela diminuição na expressão dos mediadores inflamatórios, mas também pela secreção de fatores de crescimento que estimulam a regeneração tecidual. Segundo Moussa et al., (2011), os produtos derivados de plaquetas diminuem a apoptose dos condrócitos e aumentam a expressão de marcadores anti-inflamatórios.

#### **4.6. Conclusões**

Dos resultados obtidos pode-se concluir que o CAP possui um efeito regulador do processo inflamatório que tem lugar na OA e que sua ação favorável se mantém mesmo após encerrada a administração exógena do CAP.

#### 4.7. Referências bibliográficas

- BAVARESCO, V.P.; GARRIDO, L.; BATISTA, N.A. et al. Mechanical and Morphological Evaluation of Osteochondral Implants in Dogs. *Artif Organs*. v. 32, n. 4, 2008.
- BENITO, M.J.; VEALE, D.J.; FITZGERALD, O. et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis*. v. 64, p. 1263-1267. 2005.
- BLAND, S. Canine Osteoarthritis and Treatments: A Review. *Vet Sci Dev*. v. 5, p. 84-89. 2015.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. et al. The Basic Science of Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg*. v. 117, (Suppl.): 12S. 2006.
- CHIEN, S.Y.; TSAI, C.H.; LIU, S.C. Noggin Inhibits IL-1 $\beta$  and BMP-2 Expression, and Attenuates Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Destruction in Experimental Osteoarthritis. *Cells*. v. 9, p. 927-948. 2020.
- HA, C.W.; PARK, Y.B.; JANG, J.W. et al. Variability of the Composition of Growth Factors and Cytokines in Platelet-Rich Plasma From the Knee With Osteoarthritis. *Arthroscopy*. v. 35, n. 10, p. 2878-2884. 2019.
- HASLAUER, C.M.; ELSAID, K.A.; FLEMING, B.C. et al. Loss of extracellular matrix from articular cartilage is mediated by the synovium and ligament after anterior cruciate ligament injury. *Osteoarthr Cartil*. v. 21, p. 1950-1957. 2013.
- HUANG, Y.; XU, H.; GUO, C. Expressions of interleukin-1 beta and matrix metalloproteinase-13 in articular cartilage and synovial fluid of osteoarthritis model in rabbits. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*. v. 38, n. 4, p. 507-511. 2017.
- KATAGIRI, T.; WATABE, T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol*. v. 8, p. 1-27. 2016.
- KHATAB, S.; Van BULL, G.M.; KOPS, N. Intra-articular Injections of Platelet-Rich Plasma Releasate Reduce Pain and Synovial Inflammation in a Mouse Model of Osteoarthritis. *AJSM*. v. 46, n. 4, 2018.
- KON, E.; BUDA, R.; FILARDO, G. et al. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee. Surg. Sports. Traumatol. Arthrosc*. v.18, p. 472-479. 2010.
- KUYINU, E.L.; NARAYANAN, G.; NAIR, L.S. et al. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res*. v. 11, n. 19, p. 1-27. 2016.
- MALFAIT, A.M. Osteoarthritis year in review 2015: biology. *Osteoarthr Cartil*. v. 24, p. 21-26. 2016.
- MOUSSA, M.; LAJEUNESSE, D.; HILAL, G. et al. Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res*. v. 352, p. 146-156, 2017.

- NASI, S.; EA, H.K.; SO, A. et al. Revisiting the role of interleukin-1 pathway in osteoarthritis: Interleukin-1 $\alpha$  and-1 $\beta$ , and NLRP3 inflammasome are not involved in the pathological features of the murine meniscectomy model of osteoarthritis. *Front. Pharmacol.* v. 8, p. 1-12. 2017.
- ORNETTI, P.; NOURISSAT, G.; BERENBAUM, F. et al. Does platelet-rich plasma have a role in the treatment of osteoarthritis?. *Joint. Bone. Spine.* v. 83, p. 31-36. 2016.
- OSTOJIC, M.; SOLJIC, V.; VUKOJEVIC, K. et al. Immunohistochemical Characterization of Early and Advanced Knee Osteoarthritis by NF-kB and iNOS Expression. *J. Orthop. Res.* v. 35, p. 1990-1997. 2017.
- RASHID, H.; KWOH, C.K. Should Platelet-Rich Plasma or Stem Cell Therapy Be Used to Treat Osteoarthritis?. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* v. 45, p. 417-438. 2019.
- SCARFI, S. Use of bone morphogenetic proteins in mesenchymal stem cell stimulation of cartilage and bone repair. *World J Stem Cells.* v. 8, n. 1, p. 1-12. 2016.
- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol. Rev.* v. 83, p. 835-870. 2003.
- WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł.A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediat. Inflamm.* v. 2014, p. 1-19. 2014.
- XU, L.; POLUR, I.; LIM, C. et al. Early-onset osteoarthritis of mouse temporomandibular joint induced by partial discectomy. *Osteoarthr Cartil.* v. 17, n. 7, p. 917-922. 2009.

## CAPÍTULO 5

### QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO PDGF E DO TGF- $\beta$ 1 EM COELHOS COM OA INDUZIDA E TRATADOS OU NÃO COM CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS (CAP)

#### Resumo

O objetivo deste estudo foi quantificar por meio do teste ELISA, os níveis do TGF- $\beta$ 1 e do PDGF no plasma de coelhos com osteoartrose induzida pela ruptura do LCCr e tratados ou não com CAP. Foram usados 30 coelhos de raça Nova Zelândia, machos, adultos jovens, com massa corporal média de 3,0 kg, submetidos à ruptura do ligamento cruzado cranial guiado por videoartroscopia, para indução da OA. Aos 21 dias depois os coelhos foram submetidos à reconstituição do ligamento e foram divididos em dois grupos: grupo CAP e grupo controle com injeção de solução Ringer Lactato. As aplicações intra-articulares foram realizadas imediatamente após a reconstituição do ligamento, aos 15 e aos 30 dias após a reconstituição. Em todos estes momentos e imediatamente antes da injeção intra-articular, foram feitas as avaliações artroscópicas para acompanhar a evolução da OA e a resposta ao tratamento. Imediatamente antes dos procedimentos cirúrgicos foram coletados 2 ml de sangue para obtenção de plasma e quantificação dos níveis do TGF- $\beta$ 1 e do PDGF. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos nas concentrações de TGF- $\beta$ 1 em nenhum dos momentos avaliados após as aplicações dos tratamentos. Diferença estatisticamente significativa se mostrou na concentração plasmática do PDGF no M5 nos animais do grupo CAP quando comparados com os do grupo controle. Os resultados sugerem que o CAP pode exercer um efeito regulador na síntese e liberação desses fatores de crescimento em animais com AO, mostrando sua ação favorável no tratamento da enfermidade.

#### Introdução

A osteoartrose ou doença articular degenerativa é a alteração musculo-esquelética mais prevalente em mamíferos, incapacitante e que leva a diminuição da qualidade de vida, principalmente em animais idosos. Na OA, uma alteração comum para a qual não existe tratamento eficaz, há degradação da matriz extracelular (MEC) que leva a inflamação sinovial e perda da cartilagem articular, culminando com disfunção locomotora (Shi et al., 2019; Krupkova et al., 2018).

As alterações que ocorrem durante o avanço da doença são mediadas por uma variedade de fatores biomecânicos e bioquímicos. Nesse contexto, além da instabilidade causada pela ruptura de estruturas como ligamentos e tendões a ação de moléculas como citocinas, metaloproteinases e fatores de crescimento tem um papel fundamental no surgimento e progressão das alterações (Nixon et al., 2018; Osorio-Carmona e Rezende, 2014).

Dentre os fatores de crescimento envolvidos no metabolismo articular e que tem um papel importante na patogenia da OA, destaca-se a super família do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). O TGF- $\beta$  possui três subtipos que agem principalmente na regulação do metabolismo articular, síntese de prostaglandinas e estimulam a atividade de síntese dos condrócitos, porém estão também implicados na sinovite, formação de osteófitos e na progressão da OA. Já o PDGF estimula a

síntese de proteoglicanos, de DNA pelos condrócitos e tem atividade mitogênica e quimiotática (Schmidt et al., 2006).

O CAP é conhecido por possuir altas concentrações de fatores de crescimento e de citocinas anti-inflamatórias que podem atuar na regeneração de feridas (Monteiro et al., 2009). Considerando a atividade dos fatores de crescimento, os níveis intra-articulares e plasmáticos dessas moléculas são importantes como possíveis preditores da progressão, da resposta aos tratamentos instaurados e do prognóstico. Assim, o objetivo do presente estudo foi quantificar por meio do teste ELISA, os níveis do TGF- $\beta$ 1 e do PDGF no plasma de coelhos com osteoartrose induzida pela ruptura do LCCr e tratados ou não com CAP.

## 5.1. LITERATURA CONSULTADA

Na OA ocorre uma inflamação sinovial que conduz a uma degradação enzimática da MEC mediada por condrócitos e sinoviócitos, o que ocasiona degradação da cartilagem, dor e perda de função (Rezende et al., 2016; Osorio-Carmona e Rezende, 2014). Além da degradação enzimática, algumas citocinas e substâncias pró-inflamatórias como interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e metaloproteinases da matriz (MMP) induzem a degradação do colágeno, de proteoglicanos e glicosaminoglicanos promovendo sinovite, perda progressiva e irreversível de cartilagem articular e esclerose do osso subcondral (Smit et al., 2019; Haslauer et al., 2013; Burrage et al., 2006).

Dois dos principais fatores de crescimento, O TFG e o PDGF atuam tanto no anabolismo quanto no catabolismo articular e são responsáveis por uma variedade de situações na cartilagem saudável e naquela com OA (Schmidt et al., 2006; Burton-Wurster et al., 2003). O TGF é responsável pela síntese de prostaglandinas e pela atividade sintética dos condrócitos, mas este fator de crescimento está implicado também na sinovite, formação de osteófitos e progressão da OA. O PDGF é sintetizado por uma variedade de células e tem efeito mitogênico e quimiotático para células de origem mesenquimal, incluindo fibroblastos, condrócitos e osteoblastos. É relatado também que o PDGF estimula a síntese de proteoglicanos e estimula a síntese de DNA de todas as células nas diferentes regiões da cartilagem e menisco (Civinini et al., 2013; Schmidt et al., 2006).

O CAP é um produto autólogo que consiste em um aumento da concentração de plaquetas suspensas em pequena quantidade de plasma e que pode ser obtido por diferentes métodos (Perazzi et al., 2013; Mazzuco et al., 2008). As plaquetas são importantes para hemostasia e são uma fonte de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos, o TGF- $\beta$ 1, o PDGF, o fator angiogênico derivado das plaquetas e vários outros (Urits et al., 2019; Yamaguchi et al., 2012). Fatores de crescimento são importantes para cicatrização de feridas e processos biológicos como quimiotaxia, neovascularização e síntese de matriz extracelular. Assim, os produtos derivados das plaquetas são utilizados para melhorar a cicatrização de tecidos, vascularização de enxertos e regeneração óssea (Carmona et al., 2011; Kon et al., 2011).

O TGF- $\beta$ 1 é um fator de crescimento multifuncional que desempenha um papel crítico no desenvolvimento, homeostase e reparo da cartilagem. Uma alteração na sinalização de TGF- $\beta$ 1 foi associada a uma variedade de distúrbios relacionados à cartilagem, incluindo gota, lúpus, artrite reumatóide e osteoartrite (Finsson et al., 2012; Van der Kraan et al., 2009; Davidson et al., 2007). Também tem sido relatado que esse fator de crescimento pode estimular a síntese de colágeno tipo II e a inibição da secreção da IL-1 $\beta$  e do TNF $\alpha$ , ajudando a diminuir o processo inflamatório e a degradação da MEC. Embora esse fator de crescimento tenha efeitos benéficos

conhecidos, ele também pode estimular a formação de osteófitos e a remodelação do osso subcondral, causando efeitos negativos nas articulações doentes (Shen et al., 2014; Bush e Beier, 2013).

Na cartilagem saudável, esse fator de crescimento regula a condrogênese e a proliferação e diferenciação de células condroprogenitoras, inibem a calcificação da cartilagem, a invasão vascular, a diferenciação osteoblástica e a ossificação (Onyekwelu et al., 2009). Adicionalmente, o TGF- $\beta$ 1 previne a degradação das proteínas da MEC aumentando a produção dos inibidores de proteases, evita os efeitos catabólicos da IL-1 e do TNF- $\alpha$  na degradação da cartilagem (Van der Kraan et al., 2009; Davidson et al., 2007).

Pesquisas recentes sugerem que na OA as isoformas 1, 2 e 3 do TGF- $\beta$  são sobreguladas e foi observado que na cartilagem articular de humanos acometidos pela OA os níveis deste fator de crescimento encontram-se diminuídos quando comparados com a cartilagem de indivíduos saudáveis (Wu et al., 2007; Verdier et al., 2005). Observou-se também que os níveis de mRNA estão diminuídos na OA e que os níveis do TGF- $\beta$ 3 se mostram abaixo do normal durante a progressão da doença de ocorrência natural e na OA induzida (Davidson et al., 2006; Boumediene et al., 1998).

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o nº 63/2014.

Foram usados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, adultos jovens, machos com massa corporal média de 3,0 kg. O critério de inclusão dos animais na pesquisa foi seu estado geral saudável e ausência de alterações no sistema locomotor confirmados mediante avaliação física, hemograma e bioquímica sanguínea, exame ortopédico e radiográfico nas incidências ventrodorsal e médio lateral. Os animais foram alojados no Centro Experimental do Hospital Veterinário departamento da UFMG em salas adaptadas com gaiolas individuais de tamanho 60 cm x 60 cm x 37 cm com acesso à água ad libitum e alimentação duas vezes por dia de acordo as necessidades nutricionais específicas.

Os animais foram submetidos à avaliação artroscópica da articulação FTP direita seguida da ruptura do LCCr sob visibilização artroscópica (Karl Storz., Tuttlingen, Alemanha). Decorridos 21 dias, os coelhos foram encaminhados para a segunda avaliação artroscópica da articulação, seguindo-se imediatamente a estabilização articular com auto-enxerto de fásia lata guiado por videoartroscopia e aplicação de CAP ou solução Ringer Lactato (Sanobiol, São Paulo, Brasil) intra-articular. Os animais foram mantidos nas respectivas gaiolas individuais sob supervisão diária, sem imobilização do membro operado.

Após a estabilização articular, os coelhos foram divididos em dois grupos de 15 animais de acordo com o tratamento. Os animais do grupo I constituíram o grupo controle e receberam 0,5 ml de solução Ringer Lactato intra-articular e os animais do grupo II constituíram o grupo CAP que receberam 0,5 ml intra-articular. Foram estabelecidos cinco momentos experimentais de acordo com os procedimentos realizados.

A avaliação artroscópica da articulação foi a primeira intervenção em todos os momentos. No M1 foi feita a ruptura do ligamento, no M2 a reconstituição do ligamento e a primeira aplicação do CAP ou solução de ringer lactato, no M3 foi feita a segunda aplicação dos tratamentos e no

M4, a terceira e última aplicação dos tratamentos, no M5 foi feita a última reavaliação artroscópica das articulações.

Antes de cada intervenção, foi feita a medicação pré-anestésica, que consistiu-se da aplicação de midazolam (Cristália, Brasil) e metadona (Cristália, Brasil) na dose de 1 mg / kg por via intramuscular, na indução da anestesia usou-se 15 mg / kg de cetamina e bloqueio anestésico dos nervos ciático e femoral com lidocaína (Cristália, Brasil) sem vasoconstritor na dose de 5 mg / kg e a anestesia foi mantida com isoflurano. As frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial e gases sanguíneos foram monitorados. A analgesia pós-operatória foi feita com tramadol (Teuto-Cristalpharma, Brasil), na dose de 1 mg / kg por via subcutânea a cada 12 horas por três dias, a terapia anti-inflamatória com meloxicam (Ourofino, Brasil) na dose de 0,2 mg / kg por via intramuscular a cada 24 horas durante três dias após a seção e a antibioticoterapia com cefalexina na dose de 30 mg / kg a cada 12 horas durante cinco dias. O mesmo tratamento foi realizado após estabilização articular aos 21 dias e depois de cada artroscopia exploratória. A terapia profilática com cefalexina (Aspen-Pharma, Brasil) na dose de 30 mg / kg por via intravenosa foi administrada trinta minutos antes da estabilização articular e a dosagem foi repetida duas horas após a cirurgia.

### **5.2.1. Coleta e armazenamento das amostras de plasma**

Para a obtenção do plasma foram coletados dois ml de sangue da artéria auricular central que foram depositados em tubos contendo EDTA (BD S.A., Juiz de Fora, Brasil) (ácido etilenodiamino tetra-acético 1,5%. 2mg/ml de sangue) e posteriormente acondicionadas em ependorfes estéreis e divididos em duas alíquotas iguais para se proceder à dosagem de TGF- $\beta$ 1 e PDGF respectivamente. Após a coleta do sangue, todas as amostras foram mantidas sobre refrigeração (2-8°C) durante três meses, até o momento do processamento.

### **5.2.2. Amostras de plasma para determinação do PDGF**

A alíquota de sangue foi submetida à centrifugação (centrífuga minispin plus., São Paulo, Brasil) durante 30 minutos numa rotação de 3000 rpm (rotor F-45-12-11, 120V/60Hz), para obtenção do plasma. O sobrenadante dos tubos foi coletado, acondicionado em tubos ependorf estéril e armazenado sob refrigeração a 2-8°C durante três meses para sua posterior dosagem do PDGF.

### **5.2.3. Amostras de plasma para determinação do TGF- $\beta$ 1**

Para obtenção do plasma procedeu-se à centrifugação (centrífuga minispin plus., São Paulo, Brasil) das amostras de sangue durante 20 minutos na rotação de 3000 rpm (rotor F-45-12-11, 120V/60Hz). Coletou-se o sobrenadante e acondicionou-o em tubos ependorf. O plasma foi congelado e estocado a -20°C durante três meses, até o processamento.

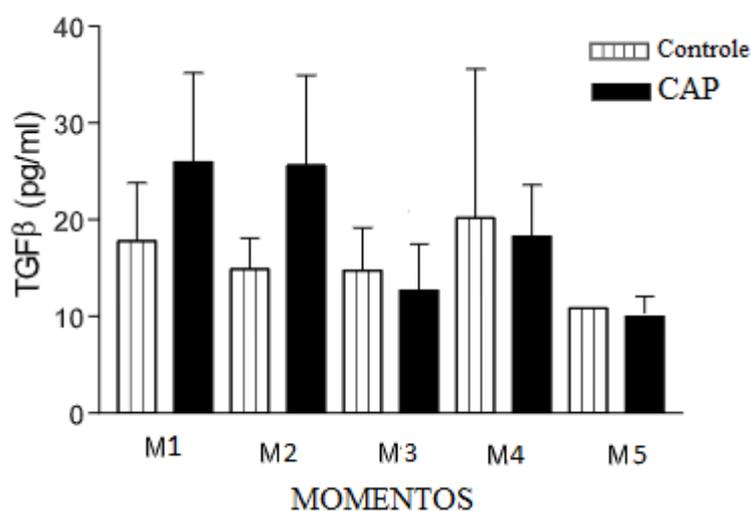
### **5.2.4. Quantificação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e PDGF**

A determinação das concentrações de TGF- $\beta$ 1 e PDGF foram realizadas por meio de ensaios imuno-enzimáticos de ELISA, utilizando-se kits comerciais específicos para coelhos e de referência MBS 165545 (PDGF) MBS817924 (TGF- $\beta$ 1), respectivamente (MyBioSource LTDA., California, USA). As amostras foram analisadas seguindo as recomendações do fabricante. O teste ELISA foi realizado em duplicata utilizando um leitor de ELISA multiskan FC (ThermoScientific, Massachusetts, USA).

### 5.3. Resultados

As concentrações plasmáticas dos fatores de crescimento nos momentos avaliados são apresentadas nas figuras 32 e 33. A amostra de um dos coelhos no M3 estava hemolisada e foi descartada, mantendo para esse animal 3 amostras para as análises (coelho eutanasiado no M4, aos 30 dias após a reconstituição do LCCr).

No grupo controle, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de TGF- $\beta$ 1 em nenhum dos momentos avaliados. Os valores de TGF- $\beta$ 1 diminuíram no M2 e no M3 quando comparados aos valores antes da ruptura do LCCr (M1), aumentaram novamente 30 dias após a reconstituição do ligamento (M4), mas diminuíram novamente 60 dias após a reparação do LCCr (Figura 32).



**Figura 32.** Concentrações plasmáticas do TGF- $\beta$ 1 nos momentos avaliados (M1, M2, M3, M4, M5).

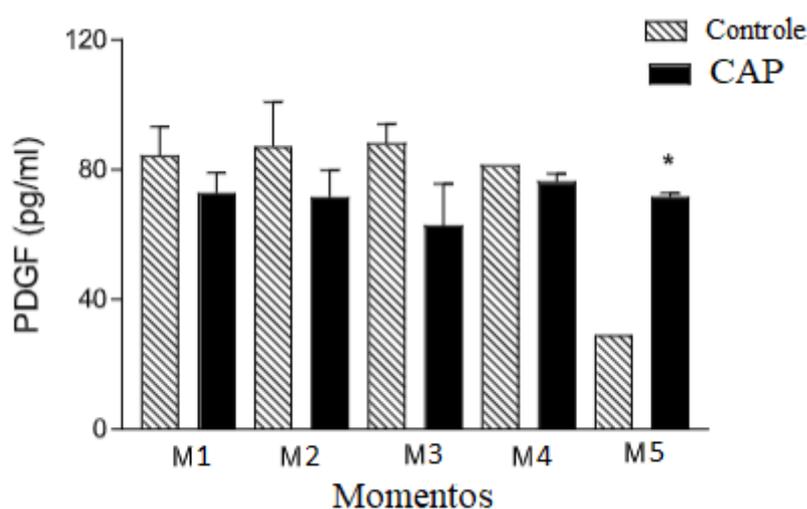
No grupo CAP, houve um comportamento semelhante nos níveis plasmáticos do TGF- $\beta$ 1 nos tempos avaliados. Os valores do TGF- $\beta$ 1 permaneceram praticamente os mesmos após a ruptura do LCCr (M2) quando comparados com o M1 e mostraram uma diminuição 15 dias após a reconstituição do LCCr quando já tinha ocorrido uma aplicação de CAP (M3), no entanto, 15 dias após a segunda aplicação de CAP (M4), os níveis plasmáticos mostraram um aumento, para posteriormente, diminuir novamente em M5, 30 dias após a última aplicação do CAP (Figura 32).

Comparando as concentrações plasmáticas do TGF- $\beta$ 1 entre os grupos, os coelhos do grupo CAP apresentaram valores mais altos na concentração plasmática em M1 e M2, que foram os momentos de instauração do processo degenerativo e quando não tinham sido feitas aplicações dos tratamentos mas não se verificou diferença estatisticamente significativa nesses momentos. Também não foram observadas diferenças na concentração plasmática entre M3, M4 e M5.

As concentrações plasmáticas do PDGF no grupo controle apresentaram baixa variação entre os momentos avaliados e permaneceram praticamente constantes até 30 dias após a reconstituição do LCCr (M4), no entanto, 60 dias após a reparação do ligamento, a concentração plasmática de PDGF diminuiu significativamente quando comparada aos demais momentos (Figura 33). Essa observação pode ser devida a que nos coelhos do grupo controle, o processo degenerativo foi mais intenso, com predomínio de um ambiente catabólico, que se intensificou

na medida que as lesões foram ficando mais crônicas, e conseqüentemente, as substâncias inflamatórias podem ter diminuído a síntese e secreção desse fator de crescimento.

Os animais do grupo CAP mostraram um comportamento semelhante. As concentrações de PDGF permaneceram com alterações discretas até 30 dias após a reconstituição do LCCr, sem diferença significativa nesses momentos; no entanto, no M5, 60 dias após o reparo ligamentar e 30 dias após a última aplicação do CAP, as concentrações plasmáticas do PDGF ainda se mostravam altas, porém sem diferença significativa quando comparada aos outros momentos, mostrando uma liberação sustentada desse fator de crescimento a longo prazo (Figura 33). Esse resultado indica que mesmo após trinta dias da última aplicação do CAP, os níveis desse fator de crescimento se mantiveram constantes, devido à síntese e secreção deste pelos sinoviócitos e condrócitos, fato que não foi observado nos animais do grupo controle.



**Figura 33.** Concentrações plasmáticas do PDGF nos momentos avaliados (M1, M2, M3, M4, M5).

Quando comparada a concentração plasmática de PDGF entre os grupos, não foram observadas diferenças significativas em M1, M2 e M4, mas diferenças significativas foram observadas no M3 e no M5 (Figura 33), mostrando que nos animais do grupo CAP houve uma liberação constante do PDGF pelas células da membrana sinovial e da cartilagem articular inclusive 60 dias após a avaliação.

#### 5.4. Discussão

A literatura (Perazzi et al., 2013; Monteiro et al., 2009; Mazzucco et al., 2008) sugere uma concentração de três a cinco vezes os níveis basais de plaquetas para se considerar um produto derivado de plaquetas como plasma rico em plaquetas. Neste estudo, entretanto, foi obtida uma concentração média de duas vezes, o que levou a considerar o produto obtido como concentrado autólogo de plaquetas e não plasma rico em plaquetas. A concentração reduzida de plaquetas presente no CAP em relação às plaquetas concentradas no PRP pode ter influenciado a quantidade de fatores de crescimento presentes no produto nesta pesquisa, fato que pode ter influenciado os resultados da concentração plasmática dos fatores de crescimento entre os grupos.

A diferença significativa apenas na concentração plasmática do PDGF no M5 quando comparados os grupos deste estudo, se deve à liberação deste fator de crescimento após a aplicação do CAP, que se manteve constante, mesmo após 30 dias de sua aplicação. A alta

expressão deste fator de crescimento em articulações acometidas por artrite reumatoide ou OA é mencionado por Pohlers et al., (2006). Segundo os autores isto pode auxiliar na remodelação da MEC nessas condições.

As lesões observadas na OA são causadas por uma variedade de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. Essas citocinas degradam as fibras de colágeno na matriz cartilaginosa e estimulam um processo inflamatório que finalmente leva à falência articular (Finsson et al., 2012). No entanto, algumas citocinas e fatores de crescimento têm dupla função na evolução da OA. Algumas IL como IL-6, IL-10, e os fatores de crescimento como TGF- $\beta$ 1, IGF, dentre outros, estão envolvidos no metabolismo articular e apresentam variada gama de efeitos positivos e negativos na OA (Civinini et al., 2013). Nesta pesquisa, os valores plasmáticos relativamente baixos de TGF- $\beta$ 1 podem sugerir regulação dos níveis deste fator de crescimento pelo CAP, minimizando seus efeitos deletérios e maximizando os efeitos benéficos. A melhora da condição articular foi observada na avaliação artroscópica, quando se verificou redução da inflamação sinovial, menor formação de osteófitos, menos fibrilação e erosão da cartilagem articular. Essas observações permitem inferir que, esta relativa liberação dos fatores de crescimento teve efeito benéfico e que o uso do CAP deve ser uma alternativa no tratamento da OA). É um método simples, de fácil execução e que oferece benefícios

O CAP é um produto autólogo caracterizado por contribuir com grande quantidade de fatores de crescimento capazes de modular o processo de cicatrização (Perazzi et al., 2013). Esses fatores de crescimento podem sintetizar a MEC e reduzir o processo inflamatório, como observado em coelhos deste experimento. A ação positiva do CAP se mostrou pela redução da neovascularização e da hiperemia da membrana sinovial, assim como pela menor presença de osteófitos e de cordões fibrosos nos tempos M3, M4 e M5. Estes resultados sugerem a ação dos fatores de crescimento no controle do processo articular degenerativo, mostrando-se o CAP como uma alternativa clínica favorável, econômica e de fácil realização, uma vez que o método aqui utilizado foi o denominado método simples com centrifugação única. Esta facilidade favorece seu emprego na rotina clínica.

O CAP auxilia no controle da degradação da cartilagem articular, mas mesmo favorecendo a redução da velocidade de progressão da OA, ele não é capaz de impedir as alterações articulares causadas pelo processo degenerativo. Sua ação é minimizar os efeitos causados pela OA, favorecer a homeostasia local e promover, dentro do possível algum grau de recuperação articular, dependendo da fase de evolução do processo e da intensidade do mesmo (Monteiro et al., 2009). Os coelhos do grupo tratado mostravam, ao exame artroscópico, uma membrana sinovial lisa, sem hiperemia, achados que podem ser entendidos como controle do processo inflamatório, como observado por Rezende et al (2016).

A ausência de diferença significativa entre os grupos em relação as concentrações plasmáticas do TGF- $\beta$ 1, sugere que o CAP não pode exercer um efeito regulador sobre este FC. O TGF- $\beta$ 1 tem dupla função no metabolismo articular. Ele pode estimular a formação de osteófitos, a liberação de ILs, de TNF- $\alpha$  e contribuir para o processo inflamatório. No entanto, pode também estimular a angiogênese, quimiotaxia, diferenciação celular e outras ações benéficas. É possível que o CAP não possa regular a síntese e os níveis deste FC e atenuar seus efeitos colaterais (Shen et al., 2014; Bush e Beier, 2013).

Por outro lado, o aumento significativo dos níveis plasmáticos do PDGF no grupo CAP ao longo do tempo, inclusive 60 dias após a reconstituição do LCCr (30 dias após a última aplicação), sugere que este produto pode liberar e estimular a produção deste FC e manter sua

ação ao longo do tempo. O PDGF é caracterizado por estimular a migração celular, proliferação de fibroblastos e diferenciação celular e conseqüentemente, pode favorecer o reparo da cartilagem, estimular a síntese de MEC e de proteoglicanos ((Pohlers et al., 2006). Isto pode explicar a melhor condição clínica observada durante a artroscopia nos animais do grupo CAP.

A OA causa graves alterações nas estruturas articulares. São relatados perda de componentes da MEC, fibrilação da cartilagem, inflamação sinovial, diminuição da síntese de colágeno e outras alterações, como dor e alteração óssea subcondral (Civinini et al., 2013). Nesta pesquisa, as alterações articulares decorrentes do processo degenerativo como fibrilação e erosão da cartilagem articular, neovascularização, hipertrofia das vilosidades e sinovite foram avaliadas em detalhes e sequencialmente pela artroscopia, conforme relatado por Rezende et al (2016). A artroscopia é uma alternativa para o acompanhamento dos processos articulares e do efeito de terapias instituídas, como mostrado neste trabalho.

### **5.5. Conclusões**

Dos resultados obtidos pode-se concluir que o CAP não pode regular os níveis plasmáticos do TGF- $\beta$ 1 ao longo do tempo e que esse composto biológico pode ajudar a manter uma liberação mais prolongada do PDGF inclusive após 30 dias da última aplicação do CAP.

## 5.6. Referencias bibliográficas

BOUMEDIENE, K.; CONROZIER, T.; MATHIEU, P. et al. Decrease of cartilage transforming growth factor- $\beta$  receptor II expression in the rabbit experimental osteoarthritis potential role in cartilage breakdown. *Osteoarthr Cartil.* v. 6, n. 2, p. 146-149. 1998.

BURRAGE, P.S.; MIX, K.S.; BRINCKERHOFF, C.E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci A J Virtual Libr.* v. 11, p. 529-543. 2006.

BUSH, J.R.; BEIER, F. TGF- $\beta$  and osteoarthritis—the good and the bad. *Nat Med.* v. 19, n. 6, p. 1-3. 2013.

BLANEY-DAVIDSON, E.N.; VITTEERS, E.L.; VAN DER KRAAN, P.M. et al. Expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) and the TGF $\beta$  signalling molecule Smad-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis.* v. 65, n. 11, p. 1414-1421. 2006.

CIVININI, R.; NISTRÌ, L.; MARTINI, C. Growth factors in the treatment of early osteoarthritis. *Clin Cases Miner Bone Metab.* v. 10, n. 1, p. 26-29. 2013.

DAVIDSON, E.B.; VAN DER KRAAN, P.; VAN DER BERG, W. TGF- $\beta$  and osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* v. 15, n. 6, p. 597-604. 2007.

FINNISON, K.W.; CHI, Y.; BOU-GHARIOS, G. et al. TGF- $\beta$  signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front Biosci.* S4, p. 251-268, 2012.

HASLAUER, C.M.; ELSAID, K.A.; FLEMING, B.C. et al. Loss of extracellular matrix from articular cartilage is mediated by the synovium and ligament after anterior cruciate ligament injury. *Osteoarthr Cartil.* v. 21, p. 1950-1957. 2013.

KON, E.; MANDELBAUM, B.; BUDA, R. et al. Platelet-Rich Plasma Intra-Articular Injection Versus Hyaluronic Acid Viscosupplementation as Treatments for Cartilage Pathology: From Early Degeneration to Osteoarthritis. *Arthroscopy.* v. 11, n. 27, p. 1490-1501. 2011.

KRUPKOVA, O.; SMOLDERS, L.; WUERTZ-KOZAK, K. et al. The Pathobiology of the Meniscus: A Comparison Between the Human and Dog. *Front. Vet. Sci.* v. 5, p. 1-15. 2018.

MAZZUCO, L.; BALBO, V.; CATTANA, E. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex®. *Vox Sang.* v. 94, p. 202-208. 2008.

MONTEIRO, S.; LEPAGE, O.; THEORET, C. Effect of platelet rich plasma (PRP) on the repair of wounds on the distal limb in horses. *Am J Vet Res.* v. 70, n. 2, p. 277-282. 2009.

ONYEKWELU, I.; GOLDRING, M.B.; HIDAKA, C. Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. *J Cell Biochem.* v. 107, n. 3, p. 383-92. 2009.

OSORIO-CARMONA, E.; REZENDE, C.M.F. Osteoartrose: aspectos clínicos e novas perspectivas terapêuticas baseadas na terapia regenerativa. *Vet Zootec.* v. 8, p. 49-71. 2014.

PERAZZI, A.; BUSETTO, R.; MARTINELLO, T. et al. Description of a double centrifugation tube method for concentrating canine platelets. *BMC Vet Res.* v. 9, p. 146-153. 2013.

POHLERS, D.; HUBER, R.; UKENA, B. et al. Expression of Platelet-Derived Growth Factors C and D in the Synovial Membrane of Patients With Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* v. 54, n. 3, p. 788-794. 2006.

REZENDE, C.M.F.; LEME, F.P.; SANTANA, G.C.; OSORIO-CARMONA, E.; CASTRO-VARÓN, J.A. *Intra-Articular Autologous Platelet Concentrate (APC) in the Treatment of Induced Knee Osteoarthritis (OA) in Rabbits — An Arthroscopic Evaluation.* In *Arthroplasty a comprehensive review*, 1st ed.; Bagaria, V., Eds.; Intech: Verna, Suiza, 2016; pp. 211-232.

SHEN, J.; LI, S.; CHEN, D. TGF- $\beta$  signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Res.* v. 2, p. 1-7. 2014.

SMIT, Y.; MARAIS, H.J.; THOMPSON, P.N. et al. Clinical findings, synovial fluid cytology and growth factor concentrations after intra-articular use of a platelet-rich product in horses with osteoarthritis. *JSAVA.* v. 90, p. a1721-a1730. 2019.

VAN DER KRAAN, P.M.; DAVIDSON, B.E.N.; BLOM, A. et al. TGF- $\beta$  signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthr Cartil.* v. 17, n. 12, p. 1539-1545. 2009.

VERDIER, M.P.; SEITE, S.; GUNTZER, K. et al. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor  $\beta$  isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int.* v. 25, n. 2, p. 118-124. 2005.

WU, J.; LIU, W.; BEMIS, A. et al. Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* v. 56, n. 11, p. 3675-3684. 2007.

## CONCLUSÕES GERAIS

Dos resultados obtidos nesta pesquisa pode -se concluir que:

- Dos resultados desta pesquisa pode-se concluir que o concentrado autólogo de plaquetas tem ação celular benéfica sobre os tecidos articulares, com efeito que se prolonga até 30 dias após sua aplicação. O CAP se constitui, portanto numa alternativa eficiente como coadjuvante no tratamento da OA. Mais estudos são necessários para avaliar a duração do efeito do CAP e seu efeito em fases mais crônicas da doença.
- Dos resultados obtidos pode-se concluir que o CAP possui um efeito regulador do processo inflamatório que tem lugar na OA e que sua ação favorável se mantém mesmo após encerrada a administração exógena do CAP.
- Dos resultados obtidos pode-se concluir que a artroscopia é uma técnica que pode ser empregada no acompanhamento dos processos articulares degenerativos, propiciando avaliações detalhadas, bem como na avaliação do efeito dos tratamentos.
- Dos resultados obtidos pode-se concluir que o CAP não pode regular os níveis plasmáticos do TGF- $\beta$ 1 ao longo do tempo e que esse composto biológico pode ajudar a manter uma liberação mais prolongada do PDGF inclusive após 30 dias da última aplicação do CAP.
- Conclui-se que, o CAP possui um efeito protetor na articulação manifestado da seguinte forma:
  - Na membrana sinovial, causa uma menor proliferação e hiperplasia dos sinoviócitos, ao tempo que diminui a presença de infiltrado inflamatório, a proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos e a presença de detritos no estroma da membrana sinovial. Adicionalmente, esse composto biológico diminui o aparecimento de irregularidades, fissuras e erosões da cartilagem articular, mantém a densidade dos condrócitos e evita a formação de aglomerados e a apoptose destas células da cartilagem. Os resultados obtidos na avaliação histológica são reforçados pelos resultados da avaliação imunohistoquímica. O uso do CAP diminuiu a expressão de citocinas inflamatórias por partes dos sinoviócitos e dos condrócitos, explicando a menor inflamação da membrana e a menor degradação da MEC da cartilagem articular. Esse resultado é potencializado pela alta expressão de PDGF por parte dessas mesmas células durante todos os momentos avaliados, que ajudaria na mitogênese, quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células na membrana sinovial e na síntese de MEC na cartilagem articular. Além dos resultados microscópicos e celulares, esses efeitos benéficos foram observados na avaliação artroscópica. Os animais do grupo CAP apresentaram lesões significativamente menos intensas durante os momentos avaliados, assim, a menor hipervascularização, hiperemia, formação de cordões fibrosos na cápsula, menor fibrilação, presença de osteófitos e erosão da cartilagem articular nos coelhos desse grupo, está claramente suportada pela menor expressão de citocinas inflamatórias observada na avaliação imunohistoquímica e pela maior expressão de PDGF durante

o período avaliado. O efeito do CAP observado durante a artroscopia é evidentemente comprovado na correlação dos achados histológicos.

Finalmente, os altos níveis plasmáticos do PDGF encontrados durante este experimento, justificam a menor intensidade das lesões observadas na articulação dos coelhos. Embora tenha sido possível observar uma concentração constante do PDGF e seja possível ver o efeito regulador do CAP sobre esse fator de crescimento, a quantificação dos níveis dos fatores de crescimento a nível local (no líquido sinovial), esclareceria ainda mais os efeitos desse composto biológico na articulação, inclusive de outros fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ 1.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Sem dúvida a OA representa ainda uns dois maiores desafios terapêuticos da ortopedia humana e veterinária. As mudanças estruturais e moleculares que acontecem nos tecidos afetados levam invariavelmente à degeneração da cartilagem articular e à perda da função. Tratamentos disponíveis atualmente são somente paliativos e não impedem o avanço da doença.

É importante considerar a natureza multifatorial da OA e que no seu desenvolvimento fatores catabólicos, enzimáticos, bioquímicos e inflamatórios devem ser considerados na hora de selecionar o tratamento mais adequado para os pacientes. O objetivo principal do tratamento da OA é o controle da dor, a recuperação da função do membro e a desaceleração ou impedimento do avanço das alterações degenerativas.

Embora nenhum medicamento disponível consiga ter os efeitos desejados no tratamento da OA, tem sido empregadas diversas opções, que mostram efeitos clínicos benéficos, numa tentativa de fazer uma abordagem multimodal com mais eficiência terapêutica. A terapia regenerativa mostra-se como uma alternativa eficiente e segura que promete resultados melhores quando comparada com os medicamentos convencionais.

O CAP/PRP conhecido e utilizado amplamente em diversas áreas da saúde, possui fatores intrínsecos capazes de regular, modular e modificar o processo inflamatório que ocorre após alguma lesão no sistema musculoesquelético. A presença de fatores de crescimento e citocinas pró e anti-inflamatórias que interagem com as moléculas do tecido onde é aplicado, garantem uma abordagem mais completa e consoante com as alterações moleculares fisiopatológicas que tem lugar durante o processo degenerativo.

As interações entre o CAP/PRP e o meio onde é aplicado, levam a modificações no processo inflamatório, auxiliando no controle da inflamação, da dor crônica e estimula mudanças no padrão da expressão genética articular. Esse composto biológico estimula a produção de GAG, proteoglicanos e colágeno, que são moléculas fundamentais para o adequado funcionamento articular e ajuda a preservar a integridade da cartilagem articular.

Conhecendo o efeito molecular e celular que o CAP/PRP possui, espera-se que no futuro seja possível desenvolver produtos com alguns fatores de crescimento específicos, concentrando os mesmos em quantidades suficientes para que exerçam mais efeitos anabólicos e anti-inflamatórios e seja possível potencializar os efeitos já conhecidos deste composto biológico.

Outro ponto que, espera-se seja resolvido com outras pesquisas, está relacionado com a frequência de aplicações do CAP, se só um protocolo de três aplicações é suficiente e qual seu efeito em fases mais crônicas e graves da doença, em qual intervalo deveria refazer o protocolo. Embora o CAP tenha muitos efeitos benéficos, ele também pode causar efeitos prejudiciais que podem agravar o quadro clínico tratado.

Outras pesquisas são necessárias para desvendar se o CAP/PRP consegue regenerar as lesões osteocondrais observadas na OA. Este produto é realmente eficiente para modificar a expressão genética e estimular a síntese de cartilagem estrutural e morfologicamente funcional ou quais são os fatores que influenciam ou potencializam seu efeito? A associação do CAP/PRP com células tronco mesenquimais ajudariam a regenerar a cartilagem? São perguntas que precisam ser respondidas.