

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

João Paulo Gonçalves dos Santos

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE LESÃO CONDILAR FOCAL NO CÔNDILO
FEMORAL MEDIAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE TRATAMENTO COM
CARTILAGEM FRAGMENTADA EM RATOS WISTAR**

Juiz de Fora
2025

João Paulo Gonçalves dos Santos

**Avaliação do tratamento de lesão condral focal no côndilo femoral medial em
modelo experimental de tratamento com cartilagem fragmentada em ratos
Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde. Área de concentração: Medicina

Orientador: Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Valdeci Manoel de Oliveira

Juiz de Fora

2025

Santos, João Paulo Gonçalves dos .

Avaliação do tratamento de lesão condral focal no côndilo femoral medial em modelo experimental de tratamento com cartilagem fragmentada em ratos Wistar / João Paulo Gonçalves dos Santos. -- 2025.

100 f. : il.

Orientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar

Coorientador: Valdeci Manoel de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2025.

1. Cartilagem. 2. Osteoartrite. 3. Modelos animais. 4. Glicosaminoglicanos. 5. Engenharia tecidual. I. Aguiar, Jair Adriano Kopke de, orient. II. Oliveira, Valdeci Manoel de, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA



ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO
STRICTO SENSU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Nº PPG: 03/2025

Formato da Defesa: () presencial () virtual (X) híbrido

Ata da sessão (X) pública () privada referente à defesa da (X) dissertação () tese intitulada **Avaliação do tratamento de lesão condral focal no cômulo femoral medial em modelo experimental de tratamento com cartilagem fragmentada em ratos Wistar**, para fins de obtenção do título de (X) mestra(e) () doutor(a) em SAÚDE, área de concentração **Pesquisa em Experimentação Animal**, pelo(a) discente JOAO PAULO GONCALVES DOS SANTOS (matrícula 120200012 - início do curso em 15/02/2023), sob orientação do Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar e coorientação do Prof. Dr. Valdeci Manoel de Oliveira.

Aos 14 dias do mês de março do ano de 2025, às 9 horas, de forma híbrida no Anfiteatro do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), reuniu-se a Banca examinadora da (X) dissertação () tese em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação, conforme a seguinte composição:

| Titulação Prof(a) Dr(a) / Dr(a) | Nome | Na qualidade de: | Vínculo Institucional |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|
| Prof. Dr. | Jair Adriano Kopke de Aguiar | Orientador e Presidente da Banca | UFJF |
| Prof. Dr. | Valdeci Manoel de Oliveira | Coorientador | UFJF |
| Profa. Dra. | Flávia de Paoli | Membro titular interno | UFJF |
| Prof. Dr. | José Leonardo Rocha de Faria | Membro titular externo | Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) |
| Profa. Dra. | Valquíria Pereira de Medeiros | Suplente interno | UFJF |
| Prof. Dr. | Pedro Luiz Rodrigues Guedes | Suplente externo | Faculdade de Ciências Médicas de Três Rios - Suprema |

*Na qualidade de (opções a serem escolhidas):

- Membro titular interno
- Membro titular externo
- Membro titular externo e Coorientador(a)
- Orientador(a) e Presidente da Banca
- Suplente interno
- Suplente externo
- Orientador(a)
- Coorientador(a)

*Obs: Conforme §2º do art. 54 do Regulamento Geral da Pós-graduação stricto sensu, aprovado pela Resolução CSPP/UFJF nº 28, de 7 de junho de 2023, "estando o(a) orientador(a) impedido(a) de compor a banca, a presidência deverá ser designada pelo Colegiado".

AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Tendo o(a) senhor(a) Presidente declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, o(a) discente procedeu à apresentação de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-graduação Stricto sensu e foi submetido(a) à arguição pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado:

(X) APROVADO

() REPROVADO, conforme parecer circunstanciado, registrado no campo Observações desta Ata e/ou em documento anexo, elaborado pela Banca Examinadora

() APROVADO CONDICIONALMENTE, sendo consenso da banca de que esta ata é provisória e condicional

Novo título da Dissertação/Tese (só preencher no caso de mudança de título):

Observações da Banca Examinadora caso haja necessidade de anotações gerais sobre a dissertação/tese e sobre a defesa, as quais a banca julgue pertinentes

Banca de defesa de forma híbrida e todos os membros da banca e o discente acompanharam a sessão em sua integralidade

Descrição de todas as condicionalidades para a aprovação (só preencher no caso de Aprovação Condicional):

Nada mais havendo a tratar, o(a) senhor(a) Presidente declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos(as) senhores(as) membros da Banca Examinadora e pelo(a) discente, atestando ciência do que nela consta.

INFORMAÇÕES

Para fazer jus ao título de mestre(a)/doutor(a), a versão final da dissertação/tese, considerada Aprovada, devidamente conferida pela Secretaria do Programa de Pós-graduação, deverá ser tramitada para a PROPP, em Processo de Homologação de Dissertação/Tese, dentro do prazo de de 60 ou 90 dias, para discentes aprovados condicionalmente, a partir da data da defesa. Após o envio dos exemplares definitivos, o processo deverá receber homologação e, então, ser encaminhado à CDARA.

Se as condições descritas nesta ata não forem atestadamente atendidas dentro do prazo de 90 dias, a aprovação condicional será convertida em reprovação.

Esta Ata de Defesa é um documento padronizado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Observações excepcionais feitas pela Banca Examinadora poderão ser registradas no campo disponível acima ou em documento anexo, desde que assinadas pelo(a) Presidente(a).

Esta Ata de Defesa somente poderá ser utilizada como comprovante de titulação se apresentada junto à Certidão da Coordenadoria de Assuntos e Registros Acadêmicos da UFFJ (CDARA) atestando que o processo de confecção e registro do diploma está em andamento.



Documento assinado eletronicamente por **José Leonardo Rocha de Faria, Usuário Externo**, em 14/03/2025, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Paulo Gonçalves dos Santos, Usuário Externo**, em 14/03/2025, às 20:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Adriano Kopke de Aguiar, Professor(a)**, em 17/03/2025, às 22:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valdeci Manoel de Oliveira, Professor(a)**, em 17/03/2025, às 22:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavia de Paoli, Professor(a)**, em 18/03/2025, às 08:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2252158** e o código CRC **35298474**.

Dedico este trabalho à minha esposa, que me estimula a ser melhor todos os dias, a meus filhos, por serem minha maior inspiração para seguir avançando e a meus pais, que sempre me inspiraram na busca incessante por conhecimento e qualificação.

AGRADECIMENTOS

Essa dissertação representa a conclusão de mais uma etapa de uma vida acadêmica que não começou e nem termina aqui e só tenho a agradecer a tantas pessoas que contribuíram tanto nessa trajetória até este momento.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois sem Ele eu nada seria. Sua Graça me conduz desde o primeiro dia da minha vida e, tenho certeza, caminha a meu lado em todos os momentos, sem me desamparar jamais.

À minha esposa, Beatriz, por me incentivar sempre, muitas vezes colocando o meu sonho até mesmo antes dos seus e não me permitindo jamais desistir. Não chegaria até aqui sem o seu amor e apoio incondicional.

Aos meus filhos, Guilherme e Mariana, cujos sorrisos iluminam até os dias mais nebulosos e que são a minha força para ajudar a construir um mundo melhor todos os dias.

Aos meus pais, Edwaldo e Fatima, que desde cedo me ensinaram o valor da Educação e o amor pela UFJF e nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos acadêmicos e pessoais.

Ao meu orientador, Prof. Jair Aguiar, o grande norteador dessa dissertação, por todo o conhecimento compartilhado, toda sabedoria e compreensão nas mais diversas etapas desse estudo.

Ao meu coorientador, Prof. Valdeci Manoel, pelo estímulo à realização dessa qualificação, pelo companheirismo em todos os momentos e pelos ensinamentos de cirurgia animal.

À UFJF, minha *alma mater*, por me fornecer suas instalações e seu altamente qualificado material humano como apoio imensurável e por me permitir exercer a docência, parte fundamental do meu propósito de vida.

Aos colegas da Iniciação Científica que estiveram comigo nessa jornada durante todas as etapas e sem a ajuda dos quais esse projeto não seria possível: Vitor, Laura, Pedro Victor e Pedro Dutra, muito obrigado pela parceria de trabalho e por tudo que pude aprender com vocês.

Aos professores e funcionários do CBR-UFJF que me acolheram carinhosamente, me ensinaram tudo sobre experimentação animal e me auxiliaram durante todo o experimento de maneira tão gentil.

Aos professores, funcionários e colegas do Laboratório de Glicoconjugados e do Departamento de Morfologia pela paciência com alguém não tão adaptado a frascos e microscópios e por tornarem tudo mais fácil e leve.

A meus alunos, por serem meu grande estímulo para seguir galgando degraus em minha vida acadêmica, me estimulando a me tornar cada dia mais qualificado e preparado para que eles possam também ser mais capacitados para exercer a mudança na sociedade.

Por fim, a lista de agradecimentos é enorme e eu, poderia ser injusto de esquecer alguns nomes que, sem dúvida, merecem ser lembrados. Deixo meu registro de muito obrigado a todos os amigos que me deram força ao longo dessa jornada, que me deram orientações que, podem ter parecido pequenas, mas foram muito valiosas e a todos que se alegraram ao meu lado nessa etapa. Cada um de vocês é muito importante para mim e tem sua participação em minha vida e nessa obra!

“But ever since the dawn of civilization, people have not been content to see events as unconnected and inexplicable. They have craved an understanding of the underlying order in the world. Today we still yearn to know why we are here and where we came from. Humanity’s deepest desire for knowledge is justification enough for our continuing quest. And our goal is nothing less than a complete description of the universe we live in.” (Hawking, 1988, p.9)

RESUMO

SANTOS, João Paulo Gonçalves dos. **Avaliação do tratamento de lesão condral focal no côndilo femoral medial em modelo experimental de tratamento com cartilagem fragmentada em ratos Wistar.** 2025, 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2025.

Introdução: As patologias da cartilagem articular são atualmente a principal causa de incapacidade globalmente e diversos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de reduzir sua ocorrência e sintomas, sendo os modelos animais fundamentais na transição dos achados *in vitro* para o uso *in vivo*. **Objetivos:** Descrever e validar um modelo experimental animal de tratamento de lesões condrais em ratos Wistar. **Metodologia:** estudo experimental com 96 ratos machos da linhagem Wistar, divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento. Todos os animais foram submetidos a lesões condrais bilateralmente em joelhos, sendo um dos joelhos utilizado como controle e o outro tratado utilizando cartilagem fragmentada coberta com fásia muscular ou membrana indutora de colágeno e adição ou não de Hidrogel Biocompósito de Colágeno. Os animais foram avaliados quanto a parâmetros clínicos (peso, marcha e amplitude de movimento), hematológicos e bioquímicos e quanto à excreção urinária de glicosaminoglicanos por eletroforese em gel de agarose e quanto ao grau de regeneração da cartilagem em cortes histológicos realizados após eutanásia. **Resultados:** Não houve diferença estatística na marcha dos animais independente do tratamento realizado ($p=0,50$). A amplitude de movimento de extensão piorou nos joelhos não tratados ($0,35\pm 1,75$ vs. $3,75\pm 5,48$; $p<0,001$), enquanto nos joelhos tratados houve aumento da amplitude de movimento de extensão no período de seguimento pós cirurgia ($0,42\pm 2,01$ vs. $0,00\pm 0,00$; $p<0,001$). A variação do peso dos ratos ao longo do tempo foi diferente entre os grupos de tratamento em função do tempo de seguimento. Na análise hematológica e bioquímica, foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nos leucócitos ($F_{3,92} = 10,441$; $p < 0,001$), linfócitos ($F_{3,92} = 5,039$; $p = 0,003$), segmentados ($F_{3,92} = 2,882$; $p = 0,042$), ALT ($F_{3,92} = 4,130$; $p = 0,009$), creatinina ($F_{3,92} = 8,568$; $p < 0,001$), albumina ($F_{3,92} = 4,290$; $p = 0,007$) e proteínas totais ($F_{3,92} = 9,873$; $p < 0,001$). A excreção de glicosaminoglicanos foi similar entre os grupos, com maior excreção uma semana após a cirurgia. A análise histológica evidenciou regeneração da cartilagem com melhores resultados com uso da membrana indutora de colágeno. **Conclusão:** O modelo

animal proposto mostrou-se válido para análise de tratamento de lesões condrais, sendo reprodutível e de baixo custo, corroborado pela análise histológica, bioquímica e clínica.

Palavras-chave: Cartilagem. Osteoartrite do joelho. Modelos animais. Hidrogéis. Glicosaminoglicanos. Eletroforese em gel de ágar. Histologia. Regeneração tecidual dirigida. Engenharia tecidual.

ABSTRACT

SANTOS, João Paulo Gonçalves dos. **Evaluation of the treatment of focal chondral lesion in the medial femoral condyle in an experimental model using fragmented cartilage in Wistar rats.** 2025, 100p. Dissertation (Master's) – Faculty of Medicine, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2025

Introduction: Articular cartilage pathologies are currently the leading cause of global disability, and numerous studies are being developed in an attempt to reduce their occurrence and symptoms. Animal models are fundamental in transitioning findings from *in vitro* to *in vivo* use. **Objectives:** Describe and validate an experimental animal model for the treatment of chondral lesions in Wistar rats. **Methods:** This experimental study involved 96 male Wistar rats, divided into four groups according to the treatment. All animals underwent bilateral chondral lesions in their knees, with one knee used as a control and the other treated with minced cartilage covered with fascia or collagen-inducing membrane and addition or not of Collagen Biocomposite Hydrogel. The animals were evaluated for clinical parameters (weight, gait, and range of motion), hematological and biochemical parameters, and urinary excretion of glycosaminoglycans by agarose gel electrophoresis, as well as the degree of cartilage regeneration in histological sections performed after euthanasia. **Results:** There was no statistical difference in the gait of the animals regardless of the treatment performed ($p=0.50$). The range of motion in extension worsened in untreated knees (0.35 ± 1.75 vs. 3.75 ± 5.48 ; $p<0.001$), while in treated knees, there was an increase in the range of motion in extension during the post-surgery follow-up period (0.42 ± 2.01 vs. 0.00 ± 0.00 ; $p<0.001$). The weight variation of the rats over time differed between the treatment groups depending on the follow-up time. In the hematological and biochemical analysis, statistical differences were observed between the groups in leukocytes ($F_{3,92} = 10.441$; $p < 0.001$), lymphocytes ($F_{3,92} = 5.039$; $p = 0.003$), segmented cells ($F_{3,92} = 2.882$; $p = 0.042$), ALT ($F_{3,92} = 4.130$; $p = 0.009$), creatinine ($F_{3,92} = 8.568$; $p < 0.001$), albumin ($F_{3,92} = 4.290$; $p = 0.007$), and total proteins ($F_{3,92} = 9.873$; $p < 0.001$). The excretion of glycosaminoglycans was similar between the groups, with higher excretion one week after surgery. Histological analysis showed cartilage regeneration with better results using collagen-inducing membrane. **Conclusion:** The proposed animal model proved to be valid for analyzing the treatment of chondral

lesions, being reproducible and low-cost, corroborated by histological, biochemical, and clinical analysis.

Keywords: Cartilage. Knee osteoarthritis. Animal models. Hydrogels. Glycosaminoglycans. Agarose gel electrophoresis. Histology. Directed tissue regeneration. Tissue engineering.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | – Composição da cartilagem e suas camadas..... | 23 |
| Figura 2 | – Proteoglicanos da Cartilagem..... | 24 |
| Figura 3 | – Alterações fisiopatológicas da cartilagem articular..... | 25 |
| Figura 4 | – Classificação de Outerbridge..... | 28 |
| Figura 5 | – Histologia da cartilagem articular de camundongos..... | 30 |
| Figura 6 | – Escores de avaliação da regeneração da cartilagem..... | 33 |
| Figura 7 | – Mecanismos de ação dos hidrogéis..... | 36 |
| Figura 8 | – Divisão dos grupos de tratamento e eutanásia..... | 48 |
| Figura 9 | – Acesso parapatelar medial ao joelho..... | 49 |
| Figura 10 | – Luxação lateral da patela com exposição dos côndilos femorais..... | 49 |
| Figura 11 | – Confeção da lesão da cartilagem com auxílio de retífica..... | 51 |
| Figura 12 | – Aplicação da membrana de colágeno sobre a lesão..... | 52 |
| Figura 13 | – Punção cardíaca após eutanásia..... | 53 |
| Gráfico 1 | – Análise comparativa da marcha dos animais..... | 63 |
| Gráfico 2 | – Análise da amplitude de movimento dos joelhos..... | 64 |
| Figura 14 | – Painéis de eletroforese do grupo F1..... | 69 |
| Figura 15 | – Painéis de eletroforese do grupo M1..... | 69 |
| Figura 16 | – Painéis de eletroforese do grupo F2..... | 70 |
| Figura 17 | – Painéis de eletroforese do grupo M2..... | 70 |
| Figura 18 | – Painel global de eletroforeses..... | 71 |
| Figura 19 | – Corte histológico de joelho controle em animal eutanasiado em quatro semanas..... | 73 |
| Figura 20 | – Corte histológico de joelho controle em animal eutanasiado em oito semanas..... | 74 |
| Figura 21 | – Corte histológico de joelho controle em animal eutanasiado em doze semanas..... | 74 |
| Figura 22 | – Corte histológico de joelho tratado do grupo F2 em animal eutanasiado em quatro semanas..... | 75 |
| Figura 23 | – Corte histológico de joelho tratado do grupo F2 em animal eutanasiado em oito semanas..... | 75 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 24 | – Corte histológico de joelho tratado do grupo F2 em animal eutanasiado em doze semanas..... | 76 |
| Figura 25 | – Corte histológico de joelho tratado do grupo M2 em animal eutanasiado em quatro semanas..... | 76 |
| Figura 26 | – Corte histológico de joelho tratado do grupo M2 em animal eutanasiado em oito semanas..... | 77 |
| Figura 27 | – Corte histológico de joelho tratado do grupo M2 em animal eutanasiado em doze semanas..... | 77 |
| Gráfico 3 | – Escore de Wakitani..... | 78 |
| Gráfico 4 | – Escore de Pineda..... | 78 |
| Figura 28 | – Painel de lâminas histológicas dos joelhos dos animais..... | 79 |
| Figura 29 | – Inibição da resposta auto-imune articular pelo colágeno tipo II..... | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | | | |
|----------|---|--|----|
| Tabela 1 | – | Escore de Pineda | 32 |
| Tabela 2 | – | Escore de Wakitani..... | 34 |
| Tabela 3 | – | Peso médio dos animais em gramas de cada grupo no pré-cirúrgico e no pós-cirúrgico imediato..... | 61 |
| Tabela 4 | – | Análise do peso dos animais em média \pm desvio-padrão..... | 62 |
| Tabela 5 | – | Variáveis bioquímicas dos animais..... | 66 |
| Tabela 6 | – | Valores de referência da colônia de ratos Wistar do CBR-UFJF..... | 67 |
| Tabela 7 | – | Coefficiente de correlação intraclasses (CCI) aleatório de duas vias e intervalo de confiança de 95% da concordância absoluta interobservador..... | 79 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| ACI | Técnica de Condrócitos Implantáveis |
| ADM | Amplitude de movimento |
| AIA | Injeção de antígeno específico |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AMIC | Condrogênese autóloga induzida por matriz |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| BMSC | <i>Bone marrow stem-cells</i> |
| CBR-UFJF | Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora |
| CEUA | Comitê de Ética em Experimentação Animal |
| CHCM | Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média |
| CS | Condroitin sulfato |
| DMMB | 1,9-dimetilmetileno |
| DS | Dermatan sulfato |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGA | Acetato de etilglicol |
| FA | Fosfatase alcalina |
| GAG | Glicosaminoglicano |
| GlcN | Glucosamina |
| HBC | Hidrogel Biocompósito de Colágeno |
| HCM | Hemoglobina Corpuscular Média |
| HS | Heparan sulfato |
| ICB-UFJF | Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora |
| ICRS | <i>International Cartilage Regeneration Society</i> |
| KS | Keratan sulfato |
| MEC | Matriz extracelular |
| MIE | Membro inferior esquerdo |
| OA | Osteoartrite |
| PDA | Polidimetilacrilamida |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |

| | |
|-----|--------------------------|
| PG | Proteoglicano |
| VCM | Volume corpuscular médio |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 22 |
| 2.1 | CARTILAGEM ARTICULAR..... | 22 |
| 2.2 | OSTEOARTRITE | 24 |
| 2.3 | LESÕES CONDRAIS..... | 26 |
| 2.4 | MODELOS ANIMAIS | 29 |
| 2.5 | CARTILAGEM FRAGMENTADA EM MODELOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> | 31 |
| 2.6 | HIDROGÉIS..... | 34 |
| 2.6.1 | Hidrogel Biocompósito de Colágeno | 36 |
| 2.7 | MEMBRANA DE COLÁGENO | 37 |
| 2.8 | EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs)..... | 38 |
| 3 | OBJETIVOS | 39 |
| 4 | MATERIAIS | 40 |
| 4.1 | ETAPA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL..... | 40 |
| 4.1.1 | Animais..... | 40 |
| 4.1.2 | Instrumentais cirúrgicos | 40 |
| 4.1.3 | Materiais de uso único por procedimento cirúrgico | 40 |
| 4.1.4 | Medicamentos e compostos químicos | 41 |
| 4.1.5 | Equipamentos e <i>Softwares</i> | 42 |
| 4.2 | ETAPA LABORATORIAL – EXTRAÇÃO DE GAGs URINÁRIOS..... | 43 |
| 4.2.1 | Reagentes e compostos químicos | 43 |
| 4.2.2 | Equipamentos | 43 |
| 4.3 | ETAPA LABORATORIAL – ANÁLISE HISTOLÓGICA..... | 44 |
| 4.3.1 | Reagentes e compostos químicos | 44 |
| 4.3.2 | Equipamentos e <i>Softwares</i> | 45 |
| 4.4 | ETAPA LABORATORIAL – ANÁLISE BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA..... | 45 |
| 4.4.1 | Reagentes e compostos químicos | 45 |
| 4.4.2 | Equipamentos e <i>Softwares</i> | 45 |
| 5 | METODOLOGIA..... | 47 |
| 5.1 | ETAPA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL..... | 47 |
| 5.1.1 | Procedimento cirúrgico..... | 47 |
| 5.1.2 | Avaliação clínica..... | 52 |
| 5.1.3 | Gaiola metabólica..... | 52 |

| | |
|---|----|
| 5.1.4 Eutanásia | 52 |
| 5.2 ETAPA LABORATORIAL..... | 54 |
| 5.2.1 Análise hematológica e bioquímica | 54 |
| 5.2.2 Extração dos GAGs urinários..... | 54 |
| 5.2.3 Eletroforese em gel de agarose | 56 |
| 5.2.4 Preparação histológica..... | 58 |
| 6 RESULTADOS | 60 |
| 6.1 MODELO CIRÚRGICO EXPERIMENTAL DE LESÃO CONDRAL EM RATOS WISTAR..... | 60 |
| 6.2 ANÁLISE CLÍNICA E BIOMECÂNICA..... | 60 |
| 6.3 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE PESO..... | 61 |
| 6.4 ANÁLISE DA MARCHA..... | 62 |
| 6.5 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE AMPLITUDE DE MOVIMENTO..... | 63 |
| 6.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA..... | 65 |
| 6.7 ANÁLISE DE EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS URINÁRIOS | 67 |
| 6.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA | 72 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 81 |
| 8 CONCLUSÃO | 90 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 91 |

1 INTRODUÇÃO

As patologias da cartilagem articular, sobretudo a osteoartrite (OA), são atualmente a principal causa de incapacidade globalmente. Estima-se que haja 300 milhões de pessoas no mundo convivendo com a doença e seu custo anual estimado supera os 300 bilhões de dólares. (Abramoff & Caldera, 2019)

Diante dessa distribuição global, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de reduzir a ocorrência da OA e seus principais sintomas, como dor e perda de função, acelerando a busca por estratégias que promovam reparo ou regeneração da cartilagem com o desenvolvimento da engenharia de tecidos, especialmente nos últimos 20 anos (Christensen *et al.*, 2015; Pipino *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2023)

Durante o processo de teste e introdução de novos tratamentos na prática clínica, estudos em modelos animais são fundamentais na transição dos achados *in vitro* para o uso *in vivo*. Diversos modelos animais vêm sendo utilizados para estudo das lesões cartilaginosas, cada um com suas particularidades e benefícios específicos. (Chu *et al.*, 2010)

Em nossa Universidade, contamos com o apoio do Centro de Biologia da Reprodução (CBR-UFJF), o maior biotério de nossa região, em que são realizados diversos experimentos animais diariamente para análise de processos patológicos e desenvolvimento de tratamentos clínicos e cirúrgicos nas mais diversas áreas. Em nosso estudo, desenvolvemos e validamos um modelo animal para tratamento de lesões condrais focais em ratos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus*) do CBR-UFJF.

Outro fator importante do nosso estudo é a presença do Hidrogel Biocompósito de Colágeno (HBC), produzido no Laboratório de Glicoconjugados do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFJF). Os hidrogéis vem sendo utilizados de forma cada vez mais frequente como *scaffolds* para regeneração tecidual da cartilagem e esse composto, fabricado na nossa própria Universidade, foi introduzido na nossa análise. Além do hidrogel utilizamos uma membrana indutora de colágeno como *scaffold* e avaliamos a sinergia entre eles.

Com a validação de nosso modelo, adicionamos uma ampla gama de possibilidades de pesquisa de tratamentos para cartilagem a serem realizados na nossa Universidade e em colaboração com outros centros de pesquisa, o que nos permitirá

avançar cada vez mais no desenvolvimento de terapias que beneficiem os pacientes com osteoartrite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

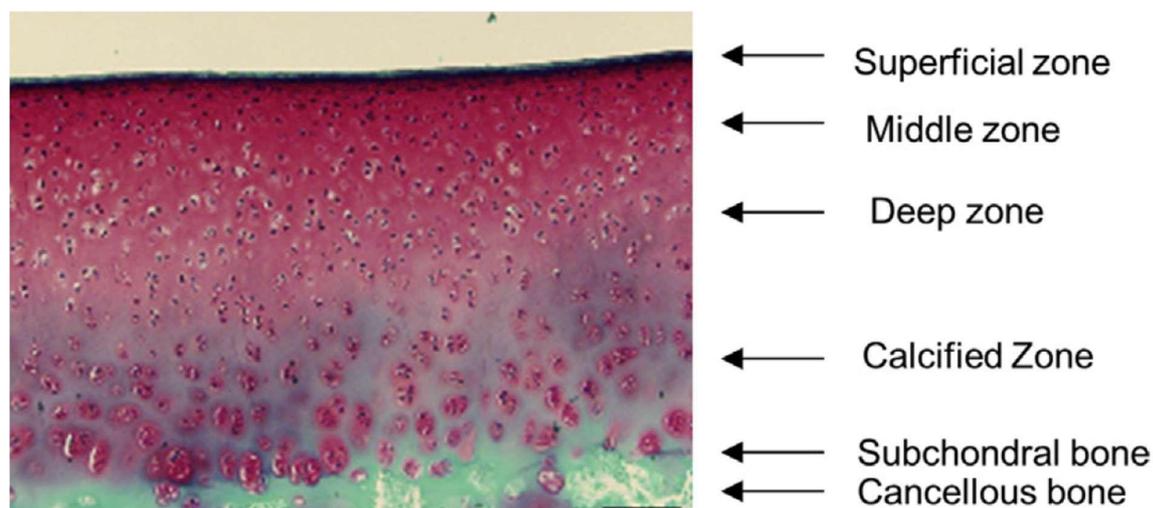
2.1 CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular, classificada como hialina, é um tecido conjuntivo especializado, avascular e desprovido de terminações nervosas que recobre as extremidades dos ossos nas articulações diartrodiais. Ela facilita o deslizamento e movimento dos ossos, reduzindo o atrito, e permite a absorção de impactos nas articulações (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). A cartilagem sadia apresenta superfície brilhante, lisa e densa. (Carballo *et al.*, 2017)

Esse tecido é formado por escassa população de células, os condrócitos, que produzem e mantêm uma abundante e complexa matriz extracelular. As propriedades singulares desse tecido se devem à composição de sua matriz, formada por alta concentração de proteoglicanos (PGs), principalmente agregam, dispostos em meio a uma intrincada rede de fibras de colágeno tipo II (Venn, 1979; Carballo *et al.*, 2017). Essas moléculas apresentam alto grau de organização, que difere da superfície da cartilagem até suas zonas mais profundas, próximas ao osso subcondral. A cartilagem articular pode ser dividida em quatro zonas com diferentes estruturas: a zona 1 ou superficial é mais fina e apresenta fibras colágenas em orientação tangencial, possui baixa concentração de PGs, e seus condrócitos são alongados, alinhados paralelamente à superfície articular. Essa zona está em contato direto com o líquido sinovial e é responsável pela maioria das propriedades biomecânicas que permitem com que a cartilagem resista às forças de tensão e compressão quando a articulação se desloca no movimento (Jasin, 1995); a zona 2 ou intermediária possui condrócitos esféricos ou ovais dispostos aleatoriamente, e as fibras de colágeno apresentam-se menos organizadas. Na zona 3 ou profunda, os condrócitos são mais volumosos e esféricos e encontram-se dispostos em colunas, perpendicularmente à superfície articular, o que também ocorre com as fibras de colágeno. Nas zonas intermediária e profunda, os condrócitos são metabolicamente mais ativos. A zona 4 ou calcificada é a mais distante da superfície articular e possui poucos condrócitos. Essa zona separa física e mecanicamente a cartilagem hialina do osso subcondral, e tem como função ancorar a cartilagem ao osso (Cohen *et al.*, 1998; Martel-Pelletier *et al.*, 2008). A concentração de colágeno é maior na zona superficial, diminuindo em 20% nas zonas superficial e profunda, enquanto a

concentração de proteoglicanos é menor na zona superficial, aumentando em cerca de 50% nas zonas mais profundas (Figura 1) (Carballo *et al.*, 2017)

Figura 1 – Composição da cartilagem e suas camadas

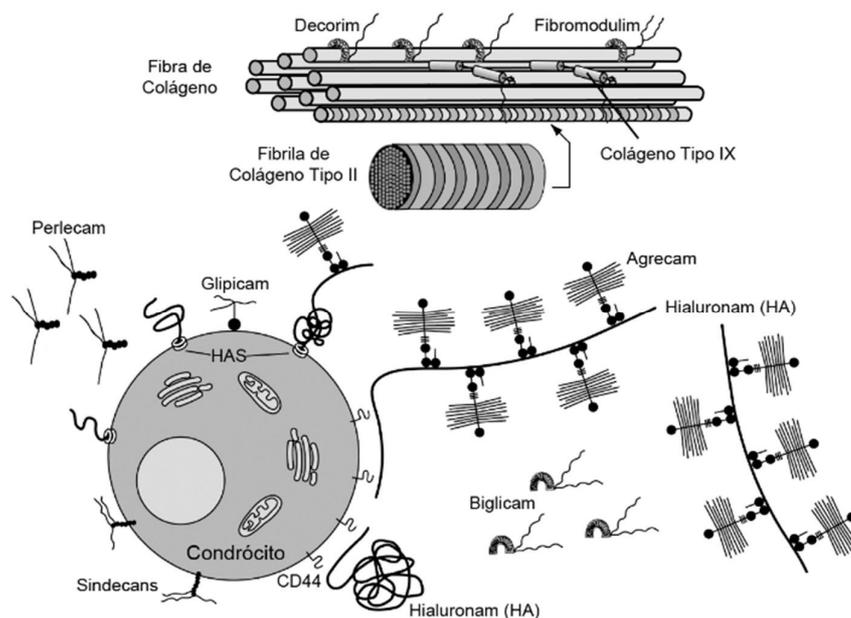


Fonte: Carballo *et al.*, 2017

Em termos de peso, a cartilagem é constituída em sua maior parte por água e sais minerais. O conteúdo de água atinge cerca de 80% na zona superficial e diminui gradualmente ao longo das camadas mais profundas do tecido, chegando a aproximadamente 65% na zona profunda. Conforme já mencionado, os componentes macromoleculares mais abundantes que compõem a matriz extracelular da cartilagem articular são colágeno tipo II e o PG agregam (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). No entanto, estão presentes também outras proteínas, como a COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*) e outros tipos de colágeno, e ainda outros PGs, como decorim, biglicam, fibromodulim, perlecan, CD44, sindecans e glipicans (Knudson & Knudson, 2001). A Figura 2 apresenta um esquema contendo os principais PGs da cartilagem.

Para análise histológica, a cartilagem articular é bem avaliada pelo método Safranin-O/*Fast green*. A zona superficial tipicamente é corada pelo *Fast green*, não respondendo à Safranina e exibe uma fina camada de fibras colágenas com células alongadas e arranjadas em orientação tangencial. Na camada média, a coloração pela Safranina mostra células redondas ou ovóides com distribuição aleatória, enquanto na zona profunda elas estão distribuídas em pequenas colunas. (Carballo *et al.*, 2017)

Figura 2 – Proteoglicanos da cartilagem



Fonte: (Knudson e Knudson, 2001), adaptado

2.2 OSTEOARTRITE

Vários tipos de lesões e doenças podem afetar as articulações diartrodiais, como bursite, luxação ou entorse e artrite. Essa última, a inflamação articular, se destaca, causando dor, enrijecimento e efusão articular (Ambrose *et al.*, 2024).

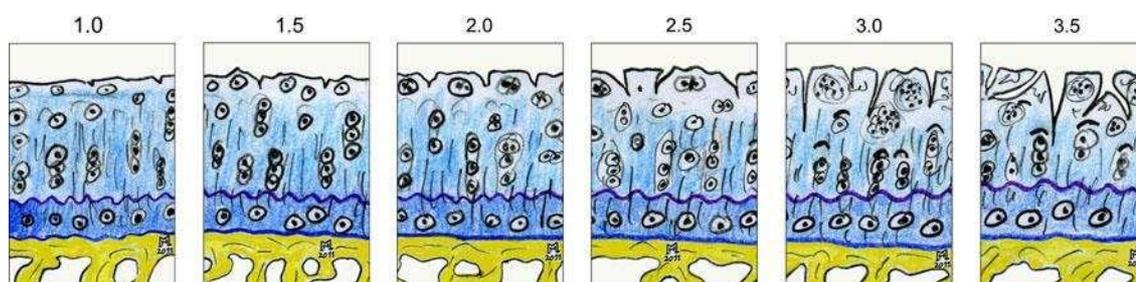
Osteoartrite (OA) é a forma mais comum de artrite e uma das principais doenças crônicas que afeta o homem e outros animais, como cavalo. (Richardson & Loinaz, 2007) A incidência da doença é alta em pessoas com mais de 65 anos, sendo responsável por grande impacto socioeconômico, pois é uma das maiores causas de dor e problemas relacionados à mobilidade e perda funcional e acomete principalmente os joelhos, quadris, coluna cervical e lombar, as articulações interfalanganas das mãos e pés, e ainda os pulsos, ombros e tornozelos, sendo a OA de joelho a segunda mais frequente (Jordan *et al.*, 2003).

Nos Estados Unidos estimava-se, em 2006, que 20 milhões de pessoas eram afetadas pela OA (Clegg *et al.*, 2006). Em 2024, esse número aumentou para 32,5 milhões ou um a cada sete adultos (Ambrose *et al.*, 2024). No Brasil, a OA atinge cerca

de 4% da população e apresenta a maior incidência (57,5%) entre as doenças articulares (Senna *et al.*, 2004). Estimativas mais recentes apontam cerca de 300 milhões de indivíduos afetados globalmente (James *et al.*, 2018)

A degradação e perda da cartilagem articular ocupam posição central na fisiopatologia da OA. A Figura 3 apresenta as principais alterações histopatológicas que acometem a cartilagem articular ao longo da evolução da OA. Nas primeiras etapas, há um aumento no conteúdo de condroitin sulfato (CS) e na velocidade de síntese de PGs, enquanto nas etapas mais avançadas da doença observa-se queda na síntese e concentração de CS. Ocorre digestão da matriz da cartilagem com surgimento de fissuras verticais (Madry *et al.*, 2012).

Figura 3 – Principais alterações histopatológicas que ocorrem na cartilagem articular ao longo da evolução da OA. O grau 1 é caracterizado por distorção moderada da superfície e edema da cartilagem. No grau 2 perde-se pequenas porções da superfície da cartilagem e formam-se fissuras que se estendem para zona superficial. Nessa fase os condrócitos se aglomeram em clusters, como resultado de divisão celular. Fissuras verticais que penetram na zona média da cartilagem são observadas no grau 3, quando é também observada desorganização dos condrócitos e evidências de morte celular. O grau 4 é caracterizado por erosão da cartilagem articular.



Fonte: Madry *et al.*, 2012.

A OA de joelhos é a segunda mais comum, atrás somente da OA de mãos e punhos, sendo mais comum no sexo feminino. (Litwic *et al.*, 2013) A incidência em populações americanas e europeias é semelhante, em torno de 20% dos indivíduos com 45 anos de idade e em torno de 40% dos indivíduos com mais de 80 anos (Bijlsma *et al.*, 2007), sendo ainda maior em países em desenvolvimento. Estatísticas chinesas evidenciam uma incidência até 3 vezes maior e com incidência maior em populações rurais comparadas às urbanas. (Fransen *et al.*, 2011)

2.3 LESÕES CONDRAIS

Lesões condrais são provocadas por degradação da cartilagem articular, em resposta a estímulos metabólicos, genéticos, vasculares e traumáticos, sendo subdivididas de acordo com a espessura acometida, que vão desde microlesão, lesão condral, até lesão osteocondral envolvendo todas as camadas da cartilagem articular e atingindo o osso subcondral. (Cavalcanti Filho *et al.*, 2011) Em pacientes que apresentam cartilagem saudável, ocorrem principalmente após lesões traumáticas, microtraumas repetitivos e em joelhos instáveis ou com desvio angulares. Apesar de algumas lesões condrais serem assintomáticas, elas podem evoluir com degeneração da cartilagem e osteoartrose. (Gabbi Filho *et al.*, 2023)

As lesões condrais e osteocondrais representam um desafio para o cirurgião ortopédico devido ao seu grau mínimo de regeneração (Buckwalter *et al.*, 2005; Guermazi *et al.*, 2017) e vem sendo mais diagnosticadas devido ao seu melhor entendimento e à melhor qualidade dos exames de imagem disponíveis no meio médico, como a maior disponibilidade da ressonância magnética de alta resolução. (Widuchowski *et al.*, 2007; Flanigan *et al.*, 2010)

As principais queixas dos pacientes sintomáticos acometidos com este tipo de lesão são dor e edema articular de repetição (Flanigan *et al.*, 2010; Montgomery *et al.*, 2014). Alguns pacientes podem se apresentar com sintomas de bloqueio mecânico principalmente se houver um fragmento condral ou osteocondral livre na articulação (Guermazi *et al.*, 2017; Krych *et al.*, 2020).

Ao diagnosticarmos uma lesão condral, devemos classificá-la no tipo da lesão e no tamanho dela. As alterações macroscópicas foram classificadas por Outerbridge (Figura 4), porém a classificação da Internacional Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society (ICRS) tem sido a mais utilizada recentemente (Brittberg & Winalski, 2003; Spahn *et al.*, 2009). Grau 0: normal, Grau I: lesões condrais superficiais, com amolecimento ou pequenas fissuras, Grau II: Lesões mais profundas com menos de 50% de profundidade, Grau III: lesões com mais de 50% de profundidade, Grau IV: lesão osteocondral.

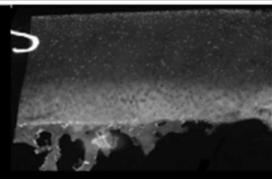
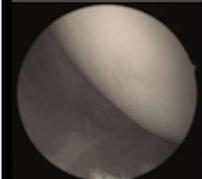
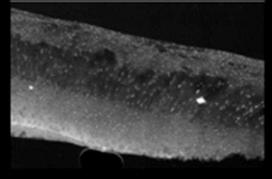
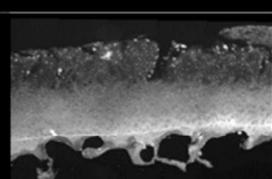
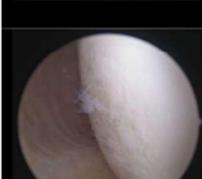
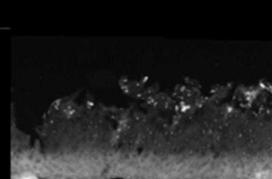
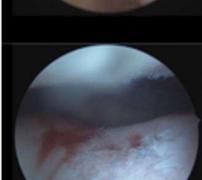
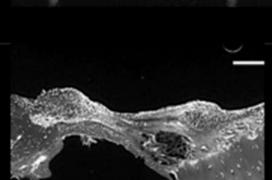
Schreiner e colaboradores sugeriram um algoritmo para divisão das estratégias cirúrgicas para o tratamento das lesões da cartilagem articular baseada em três “Rs”:

reparo, restauração ou regeneração. (Schreiner *et al.*, 2020) As técnicas de reparo da cartilagem têm como objetivo induzir a formação de tecido no local do defeito condral ou osteocondral através da estimulação de células locais e/ou do implante de células, biológicos e/ou *scaffolds* no defeito, sendo as mais comuns a microfratura e o transplante autólogo de condrócitos. As técnicas de restauração são aquelas definidas como procedimentos que substituem um defeito condral ou osteocondral com cartilagem hialina funcional e osso subcondral, sendo o enxerto osteocondral autólogo e o transplante osteocondral alógeno as técnicas que se enquadram sob essa definição. Já as técnicas de regeneração compreendem métodos de intervenção que resultam na recapitulação da cartilagem hialina funcional e do osso subcondral.

Para o tratamento de lesões menores que 2 cm² o tratamento padrão ouro é a mosaicoplastia, sendo a micro ou nanofratura uma opção viável. (Orth *et al.*, 2015) Para lesões maiores que 2 cm², o uso de aloenxerto e a técnica de condrócitos autólogos implantáveis (ACI) são as mais utilizadas. (Riboh *et al.*, 2017) No entanto, ambas possuem desvantagens, devido à baixa disponibilidade de tecidos de banco de tecidos, (Zouzias & Bugbee, 2016) e ao alto custo da técnica ACI, que necessita de dois procedimentos cirúrgicos e de expansão de células de condrócitos em laboratório superespecializado. (Aurich *et al.*, 2017; Everhart *et al.*, 2019)

Recentemente, a utilização de tecido condral fragmentado vem sendo utilizado como opção cirúrgica para realização do tratamento cirúrgico de lesões osteocondrais (Christensen *et al.*, 2015; Salzman *et al.*, 2017)

Figura 4: Classificação de Outerbridge

| Outerbridge Classification | Description | Arthroscopic findings | Histopathologic findings |
|----------------------------|--|--|---|
| 0 | Cartilage intact |  |  |
| I | Superficial lesions |  |  |
| II | Lesions extending down to <50% of cartilage depth |  |  |
| III | Defects extending down >50% of cartilage depth |  |  |
| IV | Complete cartilage loss with defect through the subchondral bone |  |  |

Note: The histologic images are displayed with the cartilage facing upward and the subchondral bone downward.

Fonte: (Mederake *et al.*, 2024, adaptado)

Esta técnica consiste em utilizar cartilagem autóloga fragmentada ou particulada (“*minced cartilage*”, “*particulate cartilage*” ou “*cartilage chips*”), implantando-a diretamente na lesão condral ou osteocondral cobrindo cerca de 80% da área da lesão osteocondral (Salzmann *et al.*, 2017). Os fragmentos são fixados com cola de fibrina podendo ser cobertos ou não com uma membrana de colágeno ou periósteo. (Schneider *et al.*, 2021). A fragmentação induz a reparação através da ativação de condrócitos na migração,

proliferação e diferenciação. (Ossendorff *et al.*, 2023). Deve ser realizada de forma rápida, evitando esmagar a cartilagem, o que reduziria a viabilidade celular. Quanto menor o tamanho do fragmento, maior o potencial de proliferação e diferenciação dos condrócitos. (Ossendorff *et al.*, 2023) As técnicas de fixação descritas envolvem: plasma rico em plaquetas, cola de fibrina, membranas e uma combinação entre elas. Apresenta como vantagens ser um procedimento em um único estágio e que transplanta condrócitos e matriz extracelular, podendo ser totalmente realizado por via artroscópica, rápido e atrativo economicamente. (Salzmann *et al.*, 2017). Entretanto, é limitado pelo tamanho do defeito. (Schneider *et al.*, 2021)

2.4 MODELOS ANIMAIS

O grande impacto econômico da osteoartrite levou a uma busca por drogas e tratamentos que possam minimizar os impactos da doença na qualidade de vida dos indivíduos. Em virtude das diversas apresentações clínicas da mesma, vários modelos que induzem a osteoartrite através de dano direto à cartilagem, seja pela criação de lesões focais (Lind *et al.*, 2008) ou pela injeção de agentes condrotóxicos (Clements *et al.*, 2009) foram testados em modelos animais.

Nos últimos anos, o interesse no tratamento de lesões focais aumentou exponencialmente, com o desenvolvimento da engenharia de tecidos voltada para a cartilagem. Para o desenvolvimento de novos *scaffolds* e terapias, o uso de modelos animais *in vivo* é uma etapa fundamental para compreensão dos efeitos de terapias testadas primariamente *in vitro* antes da translação para estudos clínicos em humanos.

O tamanho da articulação e a espessura da cartilagem são dois fatores importantes a se analisar para testar a viabilidade dos modelos. Diversas espécies vêm sendo utilizadas desde então: camundongos, ratos, coelhos, cães, cabras, porcos e cavalos se destacam como os modelos mais viáveis, de acordo com suas particularidades.

Os modelos em equinos possuem características que se assemelham bastante aos humanos: capacidade baixa de regeneração e lesões de tamanho e profundidade similares, além de atividade atlética, possibilidade de controle de carga, porém com alto custo associado (Chu *et al.*, 2010; Boyce *et al.*, 2013).

Os modelos com uso de roedores (camundongos e ratos) são custo-efetivos e amplamente utilizados. Suas principais limitações estão relacionadas ao pequeno tamanho da articulação e a presença de uma cartilagem menos espessa.

Nos camundongos, essa cartilagem é extremamente fina, constituída de apenas uma fina camada de células, o que pode conduzir a um erro de interpretação na regeneração de lesões de pequeno diâmetro. (Figura 5)

Figura 5 – Imagem de um corte histológico de fêmur distal de camundongo, destacando a cartilagem articular muito fina, consistindo de finas e poucas camadas de células.



Fonte: Chu *et al.*, 2010

O modelo animal em ratos tem a mesma vantagem econômica dos modelos em camundongos, porém o maior tamanho da articulação aumenta a viabilidade e reprodutibilidade dos estudos com defeitos focais. Também é um modelo adequado para teste iniciais in vivo de características do processo degenerativo e do perfil de segurança de novos *scaffolds* e polímeros. (Ferretti *et al.*, 2006). A cartilagem articular dos ratos é mais espessa que a dos camundongos, porém menos espessa que a cartilagem humana, podendo ser mais fácil de lesionar, porém mais fácil de reparar.

2.5 CARTILAGEM FRAGMENTADA EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

A técnica de cartilagem fragmentada foi descrita, em sua primeira geração, por Albrecht e colaboradores em 1983, com uso de 75 joelhos de 46 coelhos. Os autores compararam defeitos não tratados a defeitos tratados com cartilagem fragmentada e uso de cola de fibrina por um período de até 40 semanas e concluíram que, enquanto não houve formação de cartilagem hialina no primeiro grupo, no segundo havia proliferação de condrócitos e a cartilagem se assemelhava a uma cartilagem “juvenil”, com abundante suprimento de oxigênio e nutrientes, comparável à cartilagem antes do fechamento da placa fisária (Albrecht *et al.*, 1983).

Lu e colaboradores realizaram em 2006 um experimento com o uso de cartilagem fragmentada retirada de humanos e bovinos submetida a meio de cultura e posterior implantação em camundongos e bodes. Na primeira fase, realizada *in vitro*, a proliferação de condrócitos foi escassa nos primeiros dias, se intensificando a partir de 3 semanas e se tornando uniforme a partir de 6 semanas. Nos camundongos, o tecido foi colocado junto à cavidade torácica e evidenciou a formação de novas populações de condrócitos e formação de matriz cartilaginosa. Nos bodes, a implantação foi na região troclear e, após 6 meses os defeitos estavam preenchidos por cartilagem hialina que demonstrava completa integração ao osso subcondral (Lu *et al.*, 2006).

Matsushita e colaboradores, em 2019, utilizaram 56 coelhos japoneses, que foram submetidos a lesão condral focal de 6x4mm confeccionada por *drilling* e retirada dos fragmentos de cartilagem, que foram cultivados *in vitro*, assim como realizada cultura de condrócitos isolados. 38 coelhos foram tratados com uso de cartilagem fragmentada ou cultura de condrócitos isolados e, em ambos, adicionado gel atelocolágeno. *In vitro*, a proliferação de condrócitos foi significativamente maior nos grupos que utilizaram cartilagem fragmentada. Após a eutanásia dos animais, os joelhos foram analisados de acordo com a aparência macroscópica e histologicamente e avaliados de acordo com o escore de Pineda (1992) (Tabela 1), evidenciando uma melhora significativa nos grupos que utilizaram cartilagem fragmentada (Matsushita *et al.*, 2019).

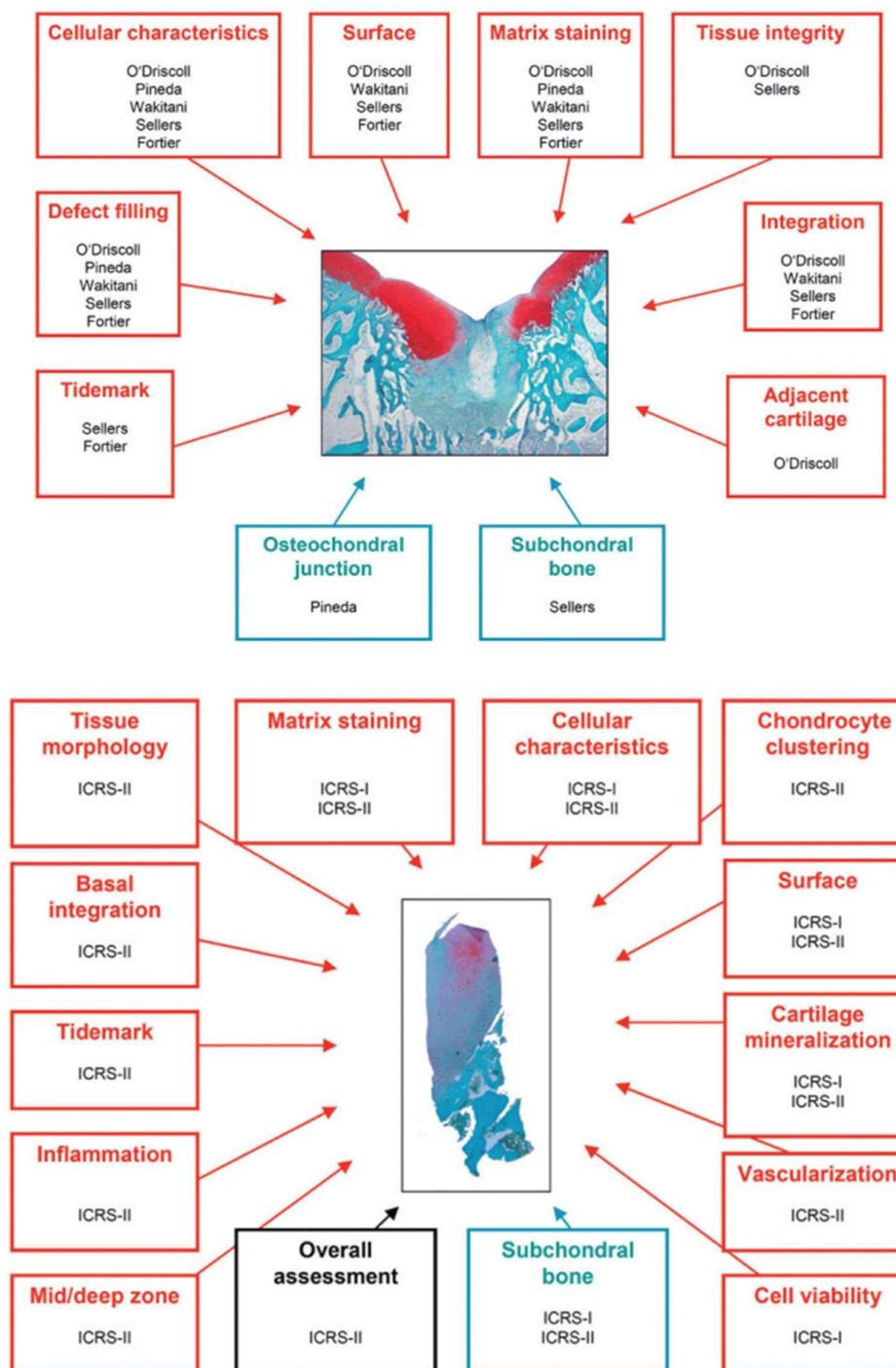
Tabela 1 – Escore de Pineda

| | |
|---|---|
| Filling of defect | |
| 125 % | 1 |
| 100 % | 0 |
| 75 % | 1 |
| 50 % | 2 |
| 25 % | 3 |
| 0 % | 4 |
| Reconstruction of osteochondral junction | |
| Yes | 0 |
| Almost | 1 |
| Not close | 2 |
| Matrix staining | |
| Normal | 0 |
| Reduced staining | 1 |
| Significantly reduced staining | 2 |
| Faint staining | 3 |
| No stain | 4 |
| Cell morphology | |
| Normal | 0 |
| Most hyaline and fibrocartilage | 1 |
| Mostly fibrocartilage | 2 |
| Some fibrocartilage, but mostly nonchondrocytic cells | 3 |
| Nonchondrocytic cells only | 4 |

Fonte: Pineda, 1992, adaptado

Além do escore de Pineda existem diversos escores descritos para avaliar a regeneração tecidual da cartilagem e estes são subdivididos em escores elementares: Pineda (1992) e Wakitani (1994) (Tabela 2) e; escores complexos: O’Driscoll (1986), Sellers (1997), Fortier (2022), ICRS-I (2001) e ICRS-II (2010). Os estudos não evidenciaram diferença na confiabilidade e reprodutibilidade entre os escores elementares e complexos. (Orth *et al.*, 2012; Ostegaard *et al.*, 1999; Moojen *et al.*, 2002). Esses sistemas abordam diferentes aspectos da cartilagem, porém alguns critérios são comuns à maioria deles - Figura 6. (Orth *et al.*, 2016)

Figura 6 – Aspectos da cartilagem abordados nos principais escores elementares e complexos;



Fonte: Orth *et al.*, 2016

Tabela 2 – Escore de Wakitani

| | |
|--|---|
| Cell morphology | |
| Hyaline cartilage | 0 |
| Mostly hyaline cartilage | 1 |
| Mostly fibrocartilage | 2 |
| Mostly non-cartilage | 3 |
| Non-cartilage only | 4 |
| Matrix staining (metachromasia) | |
| Normal (compared with host adjacent cartilage) | 0 |
| Slightly reduced | 1 |
| Markedly reduced | 2 |
| No metachromatic stain | 3 |
| Surface regularity (total smooth area compared with entire area of cartilage defect) | |
| Smooth (> 3/4) | 0 |
| Moderate (> 1/2 - 3/4) | 1 |
| Irregular (1/4 - 1/2) | 2 |
| Severely irregular (< 1/4) | 3 |
| Thickness of cartilage (compared with that of surrounding cartilage) | |
| > 2/3 | 0 |
| 1/3 - 2/3 | 1 |
| <1/3 | 2 |
| Integration of donor with host adjacent cartilage | |
| Both edges integrated | 0 |
| One end integrated | 1 |
| Neither edge integrated | 2 |

Fonte: Wakitani, 1994, adaptado

2.6 HIDROGÉIS

As estratégias de reparo para lesões focais evoluíram significativamente nos últimos anos. Apesar de alguns resultados promissores, ainda apresentam diversas limitações em relação à qualidade da cartilagem formada (Vega *et al.*, 2018)

A busca por biomateriais que possam permitir o reparo da cartilagem com qualidade levou a um grande interesse no desenvolvimento de hidrogéis para utilização em engenharia tecidual. (Balakrishnan and Banerjee, 2011).

Hidrogéis são constituídos de redes polímeros tridimensionais altamente porosos a nível molecular, permitindo a difusão de solutos e nutrientes. Permitem a associação de diferentes tipos celulares, como condrócitos e células-tronco e o ajuste de diversos parâmetros: polímeros, densidade, propriedades mecânicas e biológicas que podem aumentar sua utilidade no reparo tecidual (Spiller *et al.*, 2011). A engenharia tecidual vem utilizando novas tecnologias no desenvolvimento dos hidrogéis, como melhora do *crosslink* através de redes de polímeros mais estáveis,

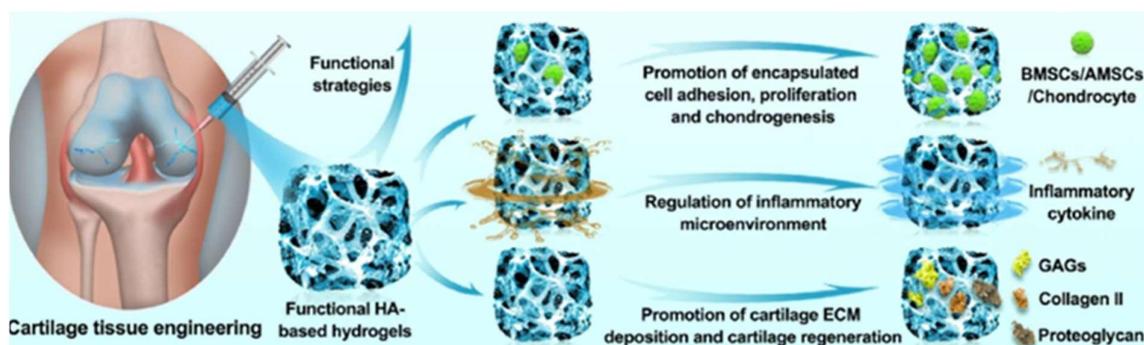
impressão 3D e melhor incorporação de sinalizadores e reguladores biológicos (Vega, *et al.*, 2018). Atenção especial vem sendo conferida na engenharia de tecidos aos gradientes presentes em tecidos naturais, cujas propriedades regulam a morfologia e comportamento celular, exercendo papel fundamental na reconstrução tecidual. Pulsos eletromagnéticos e padronização óptica já foram testados para mimetizar o ambiente celular, mas ainda são tecnologias pouco acessíveis e de alto custo. (Yu *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023)

O efeito dos hidrogéis na formação de neocartilagem já foi demonstrado em alguns estudos, que indicaram que hidrogéis com colágeno tipo II em sua composição induzem mais condrogênese em comparação com hidrogéis de colágeno tipo I. (Lu *et al.*, 2010; Nehrer *et al.*, 1997).

Os hidrogéis podem ser utilizados como *scaffolds* acelulares ou com materiais celulares. Independente da estratégia, o hidrogel deve integrar com os tecidos adjacentes para permitir a produção de cartilagem. O hidrogel ideal deve obedecer às seguintes características: (1) oferecer componentes que mimetizem o *crosslink* entre osso e cartilagem e gelificação adequada; (2) regular a condrogênese de células-tronco (BMSCs) da medula óssea; (3) regular osteogênese por ossificação endocondral das BMSCs; (4) permitir integração cartilagem-osso e; (5) permitir reparo e regeneração *in situ* da cartilagem e osso subcondral. (Hua *et al.*, 2022)

Os hidrogéis disponíveis no mercado auxiliam no reparo tecidual da cartilagem através de adesão, proliferação e condrogênese de células-tronco encapsuladas, regulando o microambiente inflamatório no local da lesão e promovendo deposição de matriz extracelular, GAGs, proteoglicanos e colágeno tipo II. (Wang *et al.*, 2023) (Figura 7)

Figura 7 – Mecanismos de ação dos hidrogéis



Fonte: Wang *et al.*, 2023, adaptado

2.6.1 Hidrogel Biocompósito de Colágeno

O hidrogel utilizado em nosso estudo foi desenvolvido no Laboratório de Glicoconjugados do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (ICB-UFJF) partindo da metodologia segundo Sawkins e colaboradores (2013) modificado, diferenciando o tipo de ácido empregado na etapa de digestão enzimática da matriz extracelular (MEC) de cartilagem descelularizada.

Foi estipulado que a concentração final de colágeno no hidrogel seria de 10 mg/mL. Portanto, para isso, foi determinada que a proporção de colágeno tipo II para colágeno tipo I seria de 1:10.

Tomando como base a dosagem de colágeno do tecido descelularizado, foi calculado que para obter 1 mg/mL de colágeno tipo II era preciso digerir enzimaticamente 17 mg de MEC descelularizada. Assim, 17 mg de MEC descelularizada foi digerida em 1 mL de ácido acético 0,5M com pepsina na proporção de 1:10, a 37°C por 96 horas ou até que nenhum pedaço de matriz esteja visível. Em seguida, 9 mg de colágeno tipo I extraído de tendão bovino foram adicionados à esta solução de matriz e homogeneizado.

O presente biomaterial é termossensível e, portanto, sua gelificação ocorre por mudança de temperatura e, ainda, por mudança de pH. Para isso, a solução de MEC e colágeno tipo I foi neutralizada (pH 7,0 a 7,6) com NaOH 5M utilizando 1/11 do volume da digestão e com PBS 10x, 1/9 do volume da digestão, momento em que

denominamos de pré-gel. O pré-gel foi gelificado, de fato, a 37°C em incubadora pelo tempo necessário.

2.7 MEMBRANA DE COLÁGENO

O tratamento de lesões condrais focais sintomáticas classicamente se dividiu em técnicas de estimulação da medular óssea, como as microfraturas e as técnicas de implantação de condrócitos autólogos (ACI) para defeitos maiores. Mais recentemente, foi introduzida uma membrana acelular de colágeno tipo I/III associada às microfraturas, cunhando o termo “condrogênese autóloga induzida por matriz” (AMIC). Suas vantagens seriam uma possível estabilização do coágulo indutor da condrogênese no defeito após microfratura e melhora no reparo da cartilagem.

Nessa técnica, o defeito é preparado com a remoção de corpos livres, desbridamento das bordas da lesão, produzindo bordas regulares. Após esse passo, são realizadas as microfraturas e a membrana é moldada e cortada de acordo com o tamanho do defeito condral e acoplada, sendo fixada com suturas ou cola de fibrina. Algumas membranas de colágeno estão disponíveis no mercado, sendo a mais utilizada e consagrada com o nome comercial de Chondro-Gide®, de propriedade da empresa Geistlich®.

Gao e colaboradores realizaram uma revisão sistemática analisando se os resultados clínicos da AMIC eram superiores ou similares aos da microfratura isolada e à técnica ACI e se aspectos específicos do procedimento (p. ex. tipo de fixação da membrana) influenciavam no resultado clínico final. 28 estudos foram incluídos na revisão final, porém poucos estudos realizavam a comparação entre as técnicas, tornando difícil traçar um paralelo entre os diferentes tratamentos (Gao *et al.*, 2019). No único estudo comparando AMIC e ACI, ambas as técnicas tiveram resultados similares. (Mancini *et al.*, 2014)

Em relação à técnica de fixação das membranas, a cola de fibrina, em teoria, pode selar as perfurações do osso subcondral induzidas pelas microfraturas e interferir na migração de células mesenquimais pluripotentes para o defeito. (Brittberg *et al.*, 1997) A fixação com suturas fornece a melhor fixação para o *scaffold*, mas exige um procedimento com artrotomia, enquanto a fixação com cola de fibrina pode ser feita por

via completamente artroscópica. (Sadlik *et al.*, 2017). Apesar dessas diferenças, nenhum estudo ainda foi capaz de afirmar que exista diferença no resultado clínico final entre essas técnicas de fixação.

2.8 EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs)

Como resultado do processo de degradação da cartilagem articular, seus principais componentes – colágeno, proteoglicanos e outras proteínas pode gerar subprodutos que podem ser detectados no sangue, no líquido sinovial ou na urina. Esses marcadores podem ajudar a quantificar o status da doença e sua identificação pode acelerar a descoberta de drogas modificadoras da história natural da doença.

A cartilagem contém alta concentração de glicosaminoglicanos (GAGs), especialmente condroitin sulfato (CS) e heparan sulfato (HS). A maioria dos GAGs presentes na urina tem origem sistêmica, predominantemente CS em mamíferos. Apesar disso, o CS não se encontra presente no trato urinário (Pereira *et al.*, 2004; de Lima *et al.*, 2005). Ademais, Michellacci e colaboradores demonstraram que CS administrado em ratos é rapidamente excretado na urina (Michellacci *et al.*, 1992), tornando o CS um importante marcador de doença articular.

O padrão-ouro para a detecção e quantificação dos glicosaminoglicanos urinários é a eletroforese em gel de agarose, conforme descrito por Michellacci. (Michellacci, 1989; Baccarin, 2012). As amostras de urina devem ser diluídas, submetidas à coluna de Q-Sepharose e precipitadas em álcool antes de reconstituídas e submetidas à eletroforese em lâmina com gel de agarose.

Baccarin e colaboradores analisaram a excreção urinária de cavalos atléticos, comparando animais saudáveis com animais com osteoartrite e os efeitos da administração de CS e glucosamina (GlcN). A excreção urinária de GAGs foi aumentada nos animais com osteoartrite, incluindo aqueles com osteoartrite leve. O tratamento com CS + GlcN levou a aumento prolongado da excreção de CS e KS, postulando que essa excreção reflete o *turnover* dos proteoglicanos da matriz. (Baccarin *et al.*, 2012)

3 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo principal descrever um modelo animal de tratamento de lesão condral focal do côndilo femoral medial, realizado em ratos da linhagem Wistar, com uso de cartilagem fragmentada.

Como objetivos secundários, avaliamos a eficácia dos tratamentos na regeneração da cartilagem articular e as alterações bioquímicas durante o processo e avaliamos o efeito do hidrogel biocompósito de colágeno e da membrana de colágeno no processo de regeneração.

4 MATERIAIS

4.1 ETAPA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

4.1.1 Animais

Foram utilizados 96 ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), entre seis e oito semanas de vida, todos provenientes do Centro de Biologia da Reprodução, da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF) (Juiz de Fora, MG, Brasil)

4.1.2 Instrumentais cirúrgicos

Estão listados todos os materiais necessários para a realização de cada procedimento cirúrgico, intercambiáveis entre os procedimentos e não descartáveis.

- Broca 2mm de diâmetro (Western®, São Paulo, SP, Brasil)
- Cabo de bisturi (Rhosse®, Ribeirão Preto, SP, Brasil)
- Caixas individuais (ALESCO®, Monte-Mor, SP, Brasil)
- Caixas para cada grupo de 4 animais (ALESCO®, Monte-Mor, SP, Brasil)
- Cisalha reta (Rhosse®, Ribeirão Preto, SP, Brasil)
- Pinça anatômica (Rhosse®, Ribeirão Preto, SP, Brasil)
- Pipetas (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Placa de Petri (Sigma-Aldrich Co.®, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Tesoura de Íris (Rhosse®, Ribeirão Preto, SP, Brasil)

4.1.3 Materiais de uso único por procedimento cirúrgico

Os artigos a seguir são materiais de consumo que foram utilizados durante cada procedimento, sendo necessárias novas unidades a cada procedimento, sendo implantáveis ou não. Inclui também materiais necessários para a manutenção dos animais durante o tempo do experimento, também de uso único e materiais utilizados na eutanásia dos animais.

- Agulha hipodérmica 30x8mm (Becton-Dickinson®, Curitiba, PR, Brasil)
- Fios Nylon 5.0 Ethicon® (Johnson & Johnson®, Raritan, NJ, Estados Unidos)
- Frasco coletor universal 80mL (Firstlab®, Pinhais, PR, Brasil)
- Gaze hidrófila 13 fios (AMED S/A®, Curvelo, MG, Brasil)
- Lâmina de bisturi n° 11 (Descarpack®, São Gonçalo, RJ, Brasil)
- Lâmina de bisturi n° 15 (Descarpack®, São Gonçalo, RJ, Brasil)
- Luvas de procedimento (Descarpack®, São Gonçalo, RJ, Brasil)
- Maravalha (JR Maravalha®, Conchal, SP, Brasil)
- Membrana indutora de colágeno Chondro-Gide® (Geistlich®, Wolhusen, Suíça)
- Ração Nuvilab® (Quimtia S/A®, Colombo, PR, Brasil)
- Seringa de plástico 10mL (Becton-Dickinson®, Curitiba, PR, Brasil)
- Tubo criogênico (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Tubo para centrifugação tipo Eppendorf 1,5mL (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Tubos para centrifugação tipo Falcon 15mL (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos)

4.1.4 Medicamentos e compostos químicos

Todos os compostos a seguir foram utilizados durante ou logo após o procedimento cirúrgico, para assepsia, anestesia e/ou analgesia do paciente, bem como para tratamento da lesão.

- Álcool etílico líquido 70% Asseptgel® (Start Química®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Cloreto de sódio 0,9% (Baxter®, Deerfield, IL, Estados Unidos)
- Cloridrato de Cetamina 10% Cetamin® (Syntec®, Barueri, SP, Brasil)
- Cloridrato de Xilazina 2% Xilazin® (Syntec®, Barueri, SP, Brasil)
- Formaldeído (ACS Científica®, Sumaré, SP, Brasil)
- Hidrogel Biocompósito de Colágeno do Laboratório de Glicoconjugados da UFJF (Juiz de Fora, MG, Brasil)

- Isoflurano 100% Syntec® (Syntec®, Barueri, SP, Brasil)
- Meloxicam 0,2% Flamavet® (Agener União®, São Paulo, SP, Brasil)
- Oxigênio (O₂) em cilindro (White Martins®, Contagem, MG, Brasil)

4.1.5 Equipamentos e Softwares

Todos os equipamentos a seguir foram utilizados durante o procedimento cirúrgico ou para manutenção dos animais durante o experimento, sendo parte do material permanente do CBR-UFJF ou foram utilizados para a análise clínica e estatística.

- Celular Samsung® Galaxy S23® com câmera (Samsung®, Suwon, Coreia do Sul)
- Equipamento de anestesia veterinária EZ-AF9000 Auto Flow System® (E-Z Systems®, Palmer, PA, Estados Unidos)
- Estante climatizada a 22±2°C (ALESCO®, Monte-Mor, SP, Brasil)
- Gaiola metabólica com coletor de urina e fezes (Tecniplast®, Buguggiate, Itália)
- Mamadeira para ingesta hídrica com medidor (Tecniplast®, Buguggiate, Itália)
- Microretífica Western R-60® (Western®, São Paulo, SP, Brasil)
- Notebook ASUS Vivobook GO 15® (ASUS®, Taipei, Taiwan)
- Pacote Office 365 (Microsoft®, Redmond, WA, Estados Unidos)
- Placa aquecida (Peco Services Ltd®, Brough, Reino Unido)
- Software SPSS® versão 21.0 (IBM-SPSS Inc.®, Chicago, IL, Estados Unidos)
- Transferidor (Staedtler®, Barueri, SP, Brasil)
- Tubo de coleta para sorologia Vacuette® (Greiner Bio-One®, Americana, SP, Brasil)
- Tudo EDTA K2 para hemograma (Labor Import®, Itajaí, SC, Brasil)
- Tubos de ensaio de vidro (Sigma-Aldrich Co.®, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- ULT Freezer Forma -86C Thermo Scientific® (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos)

4.2 ETAPA LABORATORIAL – EXTRAÇÃO DE GAGs URINÁRIOS

4.2.1 Reagentes e compostos químicos

- Ácido acético glacial PA (Êxodo Científica®, Sumaré, SP, Brasil)
- Agarose (Bio-Rad Laboratories Inc.®, Hercules, CA, Espanha)
- Água destilada
- Álcool isopropílico (Ascencio Indústria e Comércio®, Novo Horizonte, SP, Brasil)
- Azul de toluidina (Sigma-Aldrich Co.®, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Benzina retificada (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.®, Indaiatuba, SP, Brasil)
- Brometo de N-cetil-N-N-N-trimetilamônio (Cetavlon 0,5%) – (Aldrich Chemical Co. ® Milwaukee, WI, Estados Unidos)
- Cloreto de sódio cristalizado (Quimibrás Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Álcool etílico absoluto 99,8% (Halogenn®, São Paulo, SP, Brasil)
- Hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec Química Fina®, Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Mistura de padrões condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato (Laboratório de Glicoconjugados do ICB-UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil)
- Propilenodiamina (Sigma-Aldrich Co.®, St. Louis, MO, Estados Unidos)
- Q-sepharose *Fast Flow* (Bio-Rad Laboratories Inc.®, Richmond, CA, Estados Unidos)

4.2.2 Equipamentos

- Agitador de soluções AP 56 (Phoenix®, Araraquara, SP, Brasil)
- Centrífuga Excelsa Baby modelo 208N® (Fanem®, Guarulhos, SP, Brasil)
- Colunas para cromatografia de troca iônica com suporte
- Cuba de eletroforese de acrílico

- Dessecador de vidro
- Fonte de eletroforese ISCO MODEL 494® (ISCO®, Bend, OR, Estados Unidos)
- Freezer Bosch® a -20°C (Bosch®, Curitiba, PR, Brasil)
- Lâminas de vidro de 1 mm de espessura, dimensões de 10x7,5cm (Geo-Química Ltda.®, São Paulo, SP, Brasil)
- Tubo para centrifugação tipo Eppendorf 1,5mL (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Tubos para centrifugação tipo Falcon 15mL (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos)

4.3 ETAPA LABORATORIAL – ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica foi realizada no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, com preparação histológica, descalcificação e coloração utilizando os seguintes reagentes e equipamentos:

4.3.1 Reagentes e compostos químicos

- Ácido nítrico (Alphatec®, São Bernardo do Campo, SP, Brasil)
- Água destilada
- Álcool absoluto (Êxodo Científica®, Sumaré, SP, Brasil)
- Corante Verde Luz (Vetec Química Fina®, Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Formaldeído (ACS Científica®, Sumaré, SP, Brasil)
- Hematoxilina (Quimibrás Indústrias Químicas®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- Parafina (Alphatec®, São Bernardo do Campo, SP, Brasil)
- Corante Safranina-O (Hartman-Leddon®, Filadélfia, PA, Estados Unidos)
- Xilol (Alphatec®, São Bernardo do Campo, SP, Brasil)

4.3.2 Equipamentos e Softwares

- Estufa a 60°C (Max Labor®, Presidente Prudente, SP, Brasil)
- Lâminas para microscopia 26x76mm (Perfecta®, São Paulo, SP, Brasil)
- Lamínulas (Perfecta®, São Paulo, SP, Brasil)
- Microscópio óptico Olympus® DP73 (Olympus®, Tóquio, Japão)
- Micrótopo manual (Lupetec®, São Carlos, SP, Brasil)
- Placa resfriadora (Lupetec®, São Carlos, SP, Brasil)
- Software Olympus cellSens Dimension® (Olympus®, Tóquio, Japão)

4.4 ETAPA LABORATORIAL – ANÁLISE BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA

A análise bioquímica e hematológica foi realizada no laboratório do CBR-UFJF, utilizando os seguintes reagentes e equipamentos:

4.4.1 Reagentes e compostos químicos

- Amostras de soro para realização dos testes bioquímicos
- Reagente bioquímico de Albumina (Roche®, Basiléia, Suíça)
- Reagente bioquímico de ALT (Roche®, Basiléia, Suíça)
- Reagente bioquímico de AST (Roche®, Basiléia, Suíça)
- Reagente bioquímico de Creatinina (Roche®, Basiléia, Suíça)
- Reagente bioquímico de Fosfatase alcalina (Roche®, Basiléia, Suíça)
- Reagente bioquímico de Proteínas totais (Roche®, Basiléia, Suíça)
- Reagente bioquímico de Ureia (Roche®, Basiléia, Suíça)

4.4.2 Equipamentos e Softwares

- Centrífuga Heraeus Megafuge 16R Thermo Scientific® (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Equipamento automatizado Cobas c111 (Roche®, Basiléia, Suíça)

- Analisador automatizado de uso veterinário poch-100iV Diff (Sysmex®, São José dos Pinhais, PR, Brasil)
- Microscopia óptica para leitura de leucócitos Olympus® BX41 (Olympus®, Tóquio, Japão)

5 METODOLOGIA

5.1 ETAPA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

5.1.1 Procedimento cirúrgico

Trata-se de um estudo experimental com utilização de 96 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), entre 6-8 semanas de vida, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. O estudo foi protocolado e previamente aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora. (010/2022-CEUA UFJF).

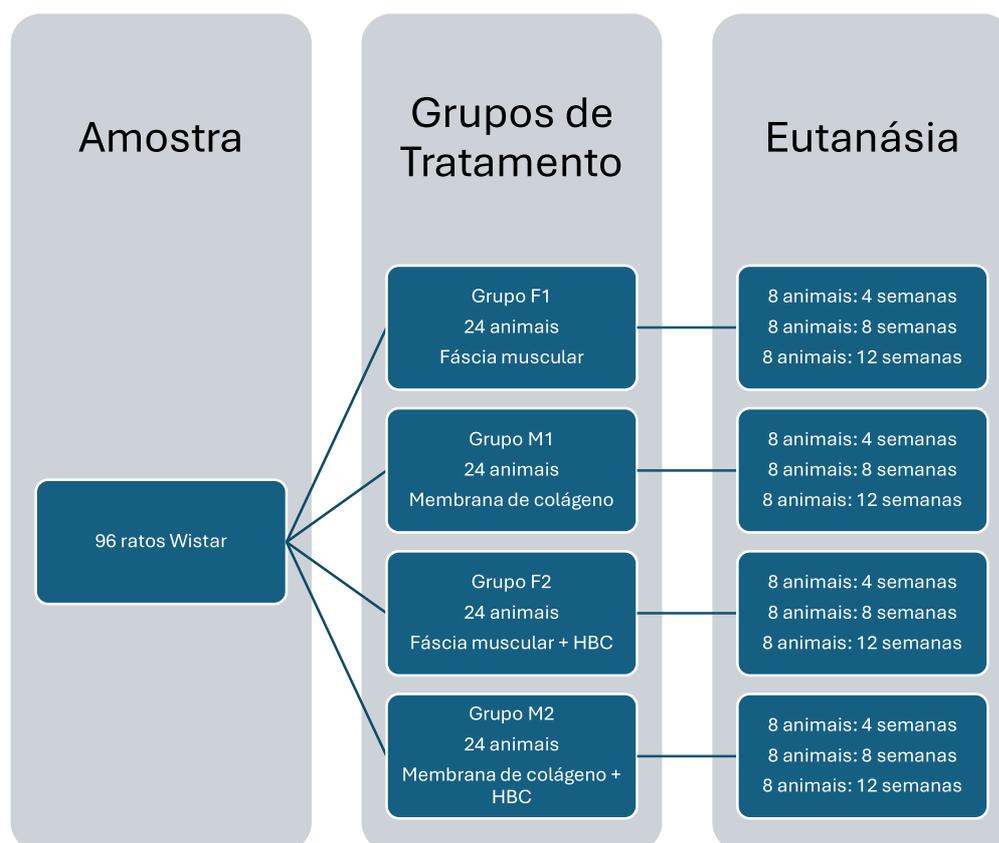
Foi desenvolvido um modelo animal de cirurgia, baseado no modelo proposto por Matsushita *et al.* e realizado em coelhos japoneses, com realização de lesão condral focal no côndilo femoral e tratamento com cartilagem fragmentada (Matsushita, 2019). Algumas adaptações foram realizadas no modelo inicial para permitir a realização do procedimento em ratos.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 04 grupos com 24 animais cada, conforme a disponibilidade do biotério do CBR-UFJF e cada grupo foi subdividido em três subgrupos de acordo com o tempo entre a cirurgia e a eutanásia, que ocorreu após 4, 8 ou 12 semanas do primeiro procedimento. O joelho direito foi definido por protocolo como o joelho controle, e todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico neste lado, com a confecção de uma lesão condral de 2mm de diâmetro. No joelho esquerdo, além do procedimento cirúrgico para confecção da lesão, cada grupo foi submetido a um tratamento diferente. Em todos os grupos foi utilizada a cartilagem fragmentada, coberta com fáschia muscular (grupos F1 e F2) ou membrana de colágeno (grupos M1 e M2) e adição do HBC nos grupos F2 e M2. (Figura 8)

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados entre janeiro e dezembro de 2023 nas Salas de Experimentação Animal do CBR-UFJF, onde os animais foram mantidos durante todo o experimento em caixas individuais, forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C com administração de água filtrada e a ração Nuvilab® *ad libitum*.

Para o procedimento, o animal foi submetido a anestesia intraperitoneal com cetamina 10% (90mg/kg) associada a xilazina 2% (10mg/kg). Após a anestesia, foi realizada tricotomia na região inferior do abdome e em ambos os membros inferiores, sendo o rato posicionado em decúbito dorsal, submetido a anestesia inalatória com isoflurano e mantido em placa aquecida e com oxigenação a 2L/min durante todo o procedimento, com proteção ocular com gaze úmida.

Figura 8 – Divisão dos animais em grupos de tratamento e de eutanásia



Fonte: elaborado pelo autor

A assepsia do joelho direito foi realizada com álcool 70° e feita uma incisão longitudinal mediana, com o joelho em extensão, de aproximadamente 5cm de comprimento, seguida de dissecação do tecido subcutâneo, com exposição da região anterior do joelho. A abertura da cápsula articular do joelho foi realizada por via parapatelar medial (Figura 9) e com auxílio de uma pinça de dissecação a patela foi luxada lateralmente. A seguir, o joelho foi fletido em 90°, permitindo a exposição de ambos os côndilos femorais. (Figura 10)

Figura 9 – acesso parapatelar medial



Figura 10 – luxação lateral da patela com exposição dos côndilos femorais



Com uma boa exposição do côndilo femoral medial foi realizada uma lesão circunferencial na sua área de carga, com uma broca de 2mm de diâmetro e com profundidade até a exposição do osso subcondral, com auxílio de uma retífica de baixa rotação (Western®). (Figura 11) Com o auxílio da mesma broca, foram retirados fragmentos de cartilagem de uma área doadora do mesmo joelho, extra-articular, na região intercondilar do fêmur. Os fragmentos de cartilagem retirados do local da lesão e da área doadora foram transportados a uma placa de Petri com cloreto de sódio 0,9% e separados de outros tecidos não-cartilaginosos.

Figura 11 – confecção da lesão com retífica e broca de 2mm



Na sequência, uma seção de aproximadamente 3x3mm da fáscia lateral da coxa do animal próxima ao joelho foi retirada. Em seguida, foi realizada a redução da articulação femoropatelar e a cápsula articular foi suturada com fio não-absorvível de nylon 5-0. O procedimento é encerrado com a sutura da pele com o mesmo fio de sutura.

A seguir, o mesmo procedimento de assepsia foi realizado no joelho esquerdo e o joelho incisado longitudinalmente em sua face anterior, seguido de acesso parapatelar medial à articulação e luxação lateral da patela, da mesma forma realizada em joelho esquerdo. Assim como no joelho contralateral, foi realizada a flexão com exposição da área de carga do côndilo medial e *drillagem* da lesão com mesmo diâmetro e profundidade bem como retirada de tecido cartilágneo da região intercondilar extra-articular do joelho esquerdo. Todos os fragmentos retirados foram transportados à placa de Petri com cloreto de sódio 0,9% e retirados tecidos não-cartilaginosos que estejam aderidos.

Na etapa seguinte, fragmentos de cartilagem foram colocados como enxerto preenchendo pelo menos 75% da área original da lesão. A partir deste ponto, o procedimento cirúrgico se diferenciou entre os grupos, de acordo com o tratamento utilizado. No grupo F1, a lesão foi coberta com o fragmento de fáscia retirado da coxa

do animal e essa fásia foi suturada ao joelho com suturas de fio não-absorvível 5.0. No grupo F2, a cartilagem fragmentada foi recoberta por um fragmento de membrana precursora de colágeno de origem animal (Chondro-Gide®, Geistlich®), também suturada ao local com nylon 5-0. (Figura 12). Nos grupos M1 e M2, junto aos fragmentos de cartilagem foi adicionado o HBC, produzido no Laboratório de Glicoconjugados da UFJF, antes da cobertura da lesão com fásia (M1) ou membrana de colágeno (M2).

Figura 12 – aplicação da membrana Chondro-Gide® sobre a lesão



Por fim, a articulação patelofemoral foi reduzida e a cápsula articular suturada com fio não-absorvível, bem como a pele. O procedimento completo em ambos os joelhos foi realizado com tempo médio de 20 a 30 minutos. Não houve intercorrências durante os procedimentos.

A seguir, os animais foram levados para sala de recuperação anestésica, ficando em observação, por um técnico especializado e pelos cirurgiões que realizaram o ato cirúrgico. Analgesia pós-operatória foi realizada com meloxicam 4mg/kg a cada 24h durante 3 dias.

5.1.2 Avaliação clínica

Os animais foram avaliados, no primeiro dia pós-operatório quanto ao peso e no 3º dia pós-operatório quanto à amplitude de movimento e marcha. A marcha era avaliada visualmente, pelo mesmo pesquisador em todos os animais e eram verificadas a presença de claudicação e a capacidade do animal em apoiar o membro e sustentar carga. A amplitude de movimento também foi analisada pelo mesmo observador. O animal era colocado com restrição mecânica dos membros dianteiros e avaliada a amplitude de ambos os joelhos da flexão máxima até a extensão máxima e retornando para flexão máxima de forma passiva. Nova avaliação de todos esses parâmetros foi realizada no dia da eutanásia, antes da mesma.

5.1.3 Gaiola metabólica

Em cada subgrupo, quatro animais foram colocados em gaiola metabólica uma semana após a cirurgia e três dias antes da eutanásia. Os animais foram mantidos na gaiola, em cada um dos dois períodos, com água filtrada *ad libitum* e em jejum calórico por período de 12 horas, sendo coletada toda urina do animal nesse período e quantificada a ingesta hídrica. 1mL de urina de cada animal foi retirado e armazenado em um tubo para centrifugação de 1,5mL. O restante foi armazenado em freezer do CBR a -80°C para avaliação da excreção de GAGs, até o momento da análise, que foi realizada no Laboratório de Glicoconjugados do ICB-UFJF.

5.1.4 Eutanásia

Em cada grupo, um terço dos animais foi eutanasiado após 4 semanas do procedimento, um terço após 8 semanas e um último terço após 12 semanas. A eutanásia ocorreu por sobredosagem da associação de anestésicos dissociativos (cetamina em dose dobrada + xilazina) e após constatada a ausência de reflexos após a anestesia, os animais foram submetidos à exsanguinação por punção cardíaca subxifoide (Figura 13), com análise bioquímica com marcadores hepáticos (alanina

aminotransferase – ALT e aspartato aminotransferase – AST), função renal (ureia e creatinina), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais e albumina e análise hematológica além da retirada da articulação dos joelhos de ambas as pernas.

Dos 96 joelhos obtidos, 48 foram conservados em tubos com formaldeído 10% e 48 foram submetidos a congelação a -80°C , para utilização posterior. Em cada subgrupo, escolhidos de forma aleatória, ambos os joelhos de 4 animais foram enviados para avaliação histológica, realizada no Departamento de Morfologia do ICB-UFJF.

Figura 13 – punção cardíaca após eutanásia para coleta de sangue



5.2 ETAPA LABORATORIAL

5.2.1 Análise hematológica e bioquímica

O sangue coletado através da punção cardíaca foi armazenado em dois tubos. Uma alíquota foi armazenada no tubo EDTA e realizado o hemograma no dia da coleta, através do analisador automatizado de uso veterinário. A leitura dos leucócitos específicos foi realizada por microscopia óptica através da confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo e coloração pelo corante panóptico.

O sangue coletado em outro tubo e coagulado foi colocado na centrífuga para separação do soro, que foi utilizado nas análises, que foram realizadas com equipamento automatizado Cobas e uso de reagentes ALT, AST, uréia, creatinina, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina.

5.2.2 Extração dos GAGs urinários

Como os animais apresentaram grande variação de volumes urinários nas amostras coletadas, todas as urinas foram diluídas para termos amostras homogêneas de 50mL cada.

O protocolo de extração de GAGs urinários começou com a cromatografia de troca iônica utilizando coluna de 5 centímetros de resina *Q-Sepharose*.

Primeiramente, a coluna foi sanitizada lavando-se com 10 vezes o volume da coluna (50mL) de água destilada, seguidos por 5 volumes de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5M e, em seguida, com 10 volumes de água destilada exaustivamente. A ativação da coluna foi realizada com 10 volumes de cloreto de sódio (NaCl) 1M por 2 minutos, seguida de 10 volumes de água destilada.

As amostras de 50 mL de urina foram então adicionadas, passando cada uma delas 3 vezes na coluna de resina de *Q-Sepharose*, descartando-se o eluato. Esse procedimento permitiu que os íons de carga negativa dos GAGs se ligassem à resina. Após esse passo, foi realizada lavagem com 3 volumes de água destilada (15mL),

descartando o eluato, seguida por 3 volumes de NaCl 0,5M, também descartando o eluato, e, finalmente, 3 volumes de NaCl 1M. Este último eluato, que contém a presença de GAGs foi recolhido e a ele foi adicionado 1mL de NaCl 2M.

A seguir, foi realizada a etapa de precipitação, onde esse eluato, sob agitação constante, recebe a precipitação de etanol absoluto em três vezes o seu volume (totalizando 48mL), que foi realizada gota a gota sob agitação lenta para evitar a precipitação de NaCl. A presença do solvente orgânico retira a camada de solvatação do GAG, tornando-o apolar. A mistura foi mantida em congelamento por 16 horas a -20°C.

As amostras foram centrifugadas por 20 minutos (Excelsa Baby Fanen), o sobrenadante foi descartado e o tubo mantido de cabeça para baixo para evitar a ressuspensão do precipitado. O tubo foi levado ao dessecador e colocado a vácuo por um dia.

Realizamos um processo controlado de ressuspensão: foram adicionados 20 microlitros de água destilada, seguidos de agitação e adição de mais 20 microlitros de água destilada, seguidos de nova agitação. Dessa solução final, com volume de 40 microlitros, 20 foram retirados e transportados para novo tubo de centrifugação. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, resultando em 2 tubos com 40 microlitros cada. Em um deles foram adicionados mais 20 microlitros de água destilada, resultando um volume final de 60 microlitros. Esse tubo de centrifugação foi novamente agitado, centrifugado e levado ao dessecador, enquanto o segundo tubo foi mantido para conservação de amostra. Após esse período as amostras foram novamente mantidas em -20°C.

Em virtude da baixa excreção de GAGs por animal, realizamos a análise através de um *pool* de amostras, adicionando a um único tubo de centrifugação todas as urinas obtidas em um mesmo momento (primeira semana ou pré-eutanásia) dos animais de um mesmo subgrupo (divididos de acordo com tratamento e tempo até a eutanásia), resultando em 24 *pools* de amostras, cada par representando um subgrupo, com uma amostra após uma semana do procedimento e outra pré-eutanásia. Todos esses *pools* foram enviados ao dessecador e conservados em -20° por um período mínimo de 24 horas.

5.2.3 Eletroforese em gel de agarose

5.2.3.1 Preparação das lâminas e cuba de eletroforese

A eletroforese em gel de agarose foi realizada conforme descrita por Dietrich (1977) com uso de polidimetilacrilamida (PDA) 0,05M.

Inicialmente, higienizamos as lâminas para a remoção de impurezas que possam interferir na qualidade da eletroforese. Esse processo envolveu a lavagem e a deposição das lâminas em água destilada, assegurando a eliminação de contaminantes superficiais.

Após a higienização, as lâminas foram secas completamente e, em seguida, imersas em álcool isopropílico. Este passo é crucial para a desidratação completa e a remoção de resíduos orgânicos, garantindo uma superfície limpa e uniforme para a aplicação do gel.

Para criar um nível líquido nas lâminas, realizamos a deposição de uma camada de gel base composto por ágar no recipiente em que o material foi confeccionado, gerando uma camada inicial e proporcionando a uniformidade necessária para as subseqüentes etapas de aplicação do gel de PDA.

Em seguida, preparamos a mistura de PDA com agarose, através da dissolução de 2,4 gramas de agarose em 480 mL de PDA a uma concentração de 0,5 mol. Essa mistura foi homogeneizada completamente para garantir a dispersão uniforme da agarose.

As lâminas foram retiradas do álcool isopropílico e deixadas secar com apoio, assegurando que estavam completamente livres de solventes antes da aplicação do gel de agarose.

Sobre as lâminas secas e já depositadas no recipiente com nível líquido, despejamos cuidadosamente 180 mL da mistura de PDA e agarose preparada previamente, evitando a formação de bolhas e garantindo uma camada uniforme sobre as lâminas.

Finalmente, o restante da mistura de PDA e agarose foi despejado na cuba de eletroforese.

Após a polimerização em temperatura ambiente da solução de PDA, a cuba foi transportada para a geladeira e mantida a -20°C por 24 horas.

5.2.3.2 *Preparação final das amostras*

No dia seguinte, as lâminas foram preparadas conforme padrão com 10 *spots* para as amostras. Em nosso estudo, o primeiro *spot* de cada lâmina foi sempre preenchido com a mistura padrão de CS, DS e HS, sendo o segundo *spot* deixado vazio e os últimos 8 preenchidos com uma amostra cada.

Os tubos para centrifugação de 1,5mL devidamente preparados foram retirados da geladeira e realizada nova ressuspensão com 5 microlitros de água destilada e novamente agitados. Após a agitação, a amostra de 5 microlitros foi introduzida no *spot* para difusão no gel de agarose. Após preenchida a lâmina com 8 amostras diferentes, a solução padrão foi a última a ser inserida e a sua difusão observada para, após esse passo, ser realizado o fechamento dos *spots* e a eletroforese.

A cuba de eletroforese, já produzida no dia anterior agora com gel polímero de PDA foi preparada com solução-tampão PDA 0,05M em suas laterais e benzina retificada em sua região central até que essa última ficasse em contato com a tampa da caixa. A cuba foi resfriada continuamente durante a eletroforese, para evitar sobreaquecimento durante o processo.

5.2.3.3 *Eletroforese*

A eletroforese foi então realizada no Laboratório de Glicoconjugados do ICB-UFJF, com uma fonte de eletroforese ISCO MODEL 494, sob carga de 100 volts. Esse processo levou em torno de 70 minutos a cada lâmina. Durante o processo, os GAGs, que possuem carga negativa migram do polo negativo para o polo positivo da cuba.

Após a realização da eletroforese, a lâmina foi retirada e mantida em uma caixa com Cetavlon 0,5% durante pelo menos 12 horas.

Após esse passo, foi realizada a coloração da lâmina com corante EGA, produzido previamente no laboratório. O corante EGA é composto por azul de toluidina 0,1%, ácido acético 1% e etanol 50% e agitado durante 2 horas em sala escura. A aplicação do corante se deu durante tempo médio de 12 a 15 minutos e com agitação suave do recipiente com a lâmina.

Logo a seguir, as lâminas foram submetidas ao descorante EGA, composto por etanol 50% e ácido acético 1%. A aplicação do descorante se deu até a visualização da distinção das bandas de CS, DS e HS na solução padrão.

5.2.4 Preparação histológica

Para a análise morfológica, os joelhos foram dissecados e fixados em formaldeído 10%, seguido de descalcificação com ácido nítrico 5% por 48h. Após a descalcificação, o material foi encaminhado para o processamento histológico rotineiro. Cortes com espessura de 4 micrômetros foram realizados em micrótomo manual e, em seguida, desparafinizados e hidratados.

As lâminas foram então coradas por um protocolo de coloração Safranin-O + *Fast Green*. Esses corantes são utilizados na análise histológica de tecido cartilaginoso, em que os proteoglicanos são corados em tom avermelhado pela safranina e o tecido ósseo é corado de verde pelo corante *fast green*.

Iniciando a coloração, as lâminas foram coradas por 7 minutos na Hematoxilina Férrica Modificada de Weigert. Após os 7 minutos, retirou-se o corante e as lâminas foram colocadas em água corrente por 10 minutos para diferenciação.

Em seguida, as lâminas foram coradas em solução de safranina 0,1% por 4 minutos e lavadas em água corrente. Após, as lâminas foram coradas utilizando solução de 0,02% de *Fast Green* por 2 minutos, lavadas em água corrente e, após secas, montadas com Entelan.

Finalizando o protocolo de Safranin-O + *Fast Green*, o material de análise foi submerso em solução 0,02% de *Fast Green*, assim ficando por 2 minutos. O excesso de corante foi descartado e retirado das lâminas com o uso de água corrente e a desidratação do material realizada sem o auxílio de substâncias secantes, para um melhor resultado. Após a secagem as lâminas foram montadas.

As lâminas com os joelhos dos grupos F2 e M2 (tratados e controles) foram analisados por quatro observadores independentes, de forma cega, através microscopia óptica (Olympus® DP73), com objetiva com aumento em 10x e auxílio do *software* Olympus® cellSens Dimension, com análise das seguintes variáveis: Morfologia celular, coloração da matriz extracelular, reconstrução da junção osteocondral, preenchimento do defeito, espessura da cartilagem, regularidade da superfície e integração do tecido implantando com a cartilagem adjacente. Essas variáveis compõem os escores de Pineda e/ou Wakitani e após obtenção delas foi calculado o escore de cada lâmina. Uma vez que os estudos não demonstraram diferença significativa entre os escores simples e complexos, optamos pelos escores de Pineda e Wakitani pela facilidade de sua aplicação. (Pineda *et al.*, 1992; Wakitani *et al.*, 1994).

6 RESULTADOS

6.1 MODELO CIRÚRGICO EXPERIMENTAL DE LESÃO CONDRAL EM RATOS WISTAR

Ratos Wistar, machos, com 6 a 8 semanas de vida, foram submetidos a procedimento cirúrgico para o desenvolvimento de lesão condral, em ambos os joelhos, conforme descrito em Métodos (5.1.1). Este procedimento foi analisado e aprovado pela CEUA-UFJF (Protocolo 010/2022). Inicialmente, foi definido que os diferentes tipos de tratamento só seriam realizados nos joelhos esquerdos, enquanto os joelhos direitos permaneceriam com a lesão (controle).

O tempo médio para realização do procedimento cirúrgico completo foi em torno de 20 a 30 minutos. Não foram observadas intercorrências durante o procedimento cirúrgico. Entretanto, um animal (1,04%) evoluiu para óbito no pós-operatório imediato, provavelmente por superaquecimento da placa aquecedora. Somente três (3) animais (3,13%) apresentaram deiscência da ferida cirúrgica no joelho direito durante o período de experimentação. Um animal (1,04%) apresentou infecção de sítio cirúrgico, verificada pela secreção purulenta na ferida cirúrgica do joelho direito associada a sinais flogísticos. Não foram observadas outras complicações.

No pós-operatório imediato, os animais, mantidos em caixas individuais, foram pesados (primeiro dia pós-operatório) e a marcha foi avaliada até o terceiro dia, pelo mesmo examinador. A amplitude máxima de movimento de flexão e extensão dos joelhos foi analisada somente ao terceiro dia.

6.2 ANÁLISE CLÍNICA E BIOMECÂNICA

Para a análise biomecânica foram avaliados os seguintes parâmetros: variação de peso, variação de marcha e variação de amplitude de movimento. No que tange à variação de peso, o ganho pode simbolizar menor movimentação do animal durante seu ciclo de vigília bem como a perda pode sinalizar processo patológico sistêmico

concomitante. A marcha é um dos principais parâmetros para avaliação da dor dos animais, sendo que sua alteração por conta do processo degenerativo em si é um achado tardio. A diminuição da amplitude de movimento é um sintoma mais precoce da osteoartrite. (Dixon *et al.*, 2010)

6.3 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE PESO

O peso médio inicial apresentou pouca variabilidade entre os diferentes grupos e no primeiro dia pós-operatório o peso manteve-se estável – Tabela 3.

Tabela 3 – Peso médio dos animais em gramas de cada grupo no pré-cirúrgico e no pós-cirúrgico imediato

| | F1 | M1 | F2 | M2 | Média |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Pré-Cirúrgico | 272,19±18,26 | 270,54±12,26 | 276,04±9,87 | 268,25±14,80 | 271,16±14,28 |
| 1º dia pós-op | 270,83±20,99 | 272,83±14,90 | 272,48±10,19 | 263,65±15,80 | 269,95±16,37 |
| Variação de Peso (Média) | -1,36 | +2,29 | -3,56 | -4,6 | -1,21 |

Fonte: elaborado pelo autor (2025)

Podemos observar que, com exceção do grupo M1, os demais apresentaram perda de peso após procedimento cirúrgico. Entretanto, em virtude da pouca variabilidade dos pesos nesse primeiro momento, nossa análise do peso concentrou-se nas variações de peso durante o tempo de evolução do experimento, com pontos de corte a cada quatro semanas.

As médias e o desvio-padrão ajustados, bem como a variação percentual do ganho de peso dos diferentes grupos, estão apresentados na Tabela 4.

A Análise de Covariância (ANCOVA) mostrou que havia relacionamento entre os escores do peso do primeiro dia após a cirurgia e o peso após a eutanásia ($F_{1,83} = 84,764$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,50$).

Tabela 4 – Média \pm desvio-padrão do peso de ratos submetidos a diferentes tratamentos e tempos de seguimento até a eutanásia.

| Tratamentos | Tempo de Seguimento | Peso 1 dia após cirurgia (g) | Peso após eutanásia (g) | Δ (%) |
|-----------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| Fáscia sem Hidrogel | 4 sem (n=8) | 269,95 | 314,66 \pm 16,17 ^a | 16,6% |
| | 8 sem (n = 8) | | 328,29 \pm 16,10 ^b | 21,6% |
| | 12 sem (n = 8) | | 321,54 \pm 16,10 ^b | 19,1% |
| Fáscia com Hidrogel | 4 sem (n = 8) | | 295,52 \pm 16,08 ^a | 9,5% |
| | 8 sem (n = 8) | | 302,15 \pm 16,03 ^a | 11,9% |
| | 12 sem (n = 8) | | 323,09 \pm 16,05 ^b | 19,7% |
| Membrana sem Hidrogel | 4 sem (n = 8) | | 298,89 \pm 16,04 ^a | 10,7% |
| | 8 sem (n = 8) | | 325,16 \pm 16,10 ^b | 20,5% |
| | 12 sem (n = 8) | | 346,06 \pm 16,04 ^{b,c} | 28,2% |
| Membrana com Hidrogel | 4 sem (n = 8) | | 296,32 \pm 16,04 ^a | 9,8% |
| | 8 sem (n = 8) | | 324,68 \pm 16,35 ^b | 20,3% |
| | 12 sem (n = 8) | | 325,57 \pm 16,13 ^b | 20,6% |

(sem: semanas; letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos, $p < 0,05$, pelo teste post-hoc de Bonferroni).

Houve um efeito de interação significativo entre os grupos de tratamento e o tempo de seguimento até a eutanásia, mostrando diferenças estatísticas depois que os escores de peso pós-cirurgia foram controlados ($F_{6,83} = 2,971$; $p = 0,011$; $\eta^2 = 0,18$). Isso indica que a variação do peso dos ratos ao longo do tempo foi diferente entre os grupos de tratamento em função do tempo de seguimento. A análise *post-hoc* não mostrou diferença estatística no ganho de peso dos ratos entre os tratamentos para o mesmo tempo de seguimento. Os resultados mostram que, independentemente do tratamento realizado, há um ganho de peso dos ratos em torno de 10% na 4ª semana e de 20% na 8ª semana após a cirurgia, seguido por uma estabilização do peso entre a 8ª e a 12ª semana, exceto nos ratos que realizaram o tratamento com Membrana Sem Gel, onde se observou um aumento de peso linear em torno de 10% a cada 4 semanas.

6.4 ANÁLISE DA MARCHA

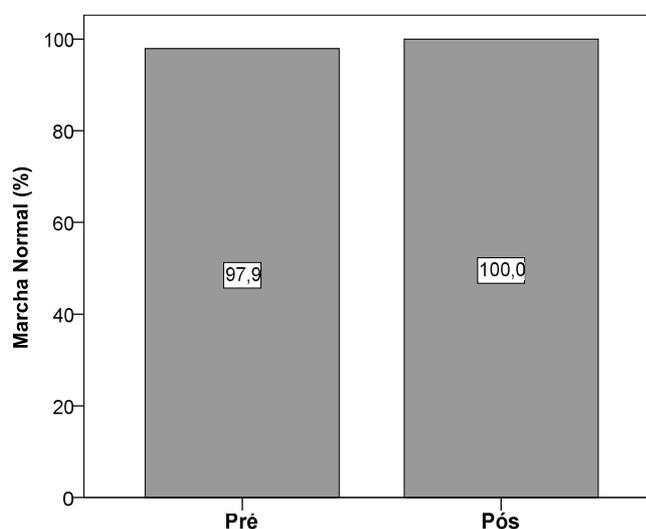
A marcha dos animais foi analisada de forma subjetiva, pesquisando a presença ou não de claudicação em algum dos membros submetidos a cirurgia. Em

nossa análise da marcha nos três primeiros dias após o procedimento, dois animais apresentaram claudicação no membro inferior esquerdo e, no momento da eutanásia, todos os animais apresentavam marcha normal.

O teste estatístico de McNemar (análise de dados dicotômicos pareados) mostrou que, independentemente do tratamento realizado, não houve diferença estatística na marcha dos ratos na comparação pré (3 dias após a cirurgia) e pós (antes da eutanásia), apesar de todos terem apresentado marcha normal após os tratamentos cirúrgicos ($p = 0,50$) – Gráfico 1.

Gráfico 1 – Comparação da porcentagem de ratos com marcha normal (ausência de claudicação) nos primeiros dias após tratamento cirúrgico e no momento da eutanásia.

Pré: 3 dias após a cirurgia; Pós: antes da eutanásia



Fonte: elaborado pelo autor (2025)

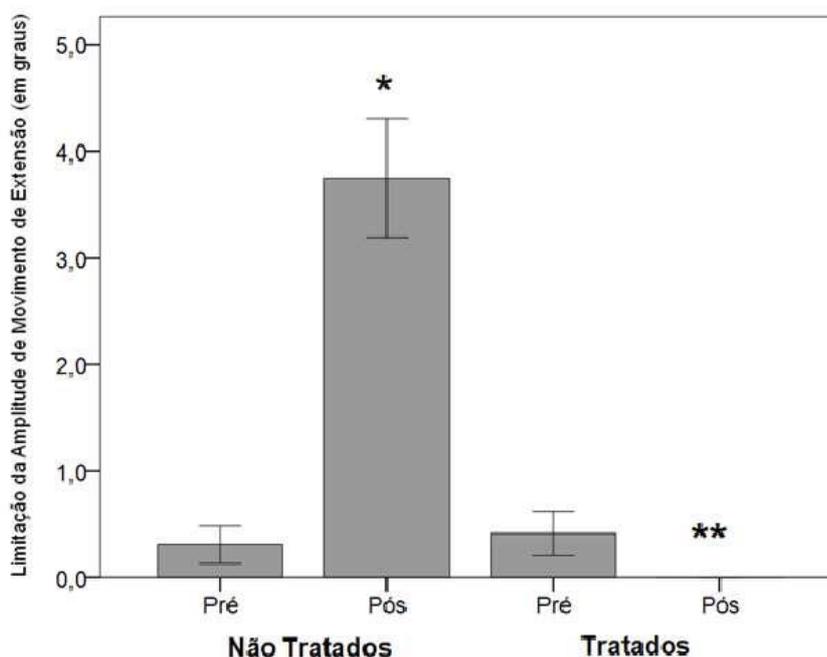
6.5 ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE AMPLITUDE DE MOVIMENTO

A amplitude de movimento foi analisada considerando-se a extensão máxima, que foi definida como 0° e a flexão máxima dos joelhos, considerando-se 135° no plano sagital. Observamos flexão dos joelhos mantidas em todos os joelhos analisados, tratados ou não. A extensão máxima apresentou-se limitada em dois pontos de nossa análise: no pós-operatório imediato e no dia da eutanásia, sendo esses dois pontos utilizados para nossa estatística.

No primeiro momento, a extensão máxima esteve limitada em 10° nos joelhos controle de três animais e nos joelhos tratados de quatro animais (2 animais do grupo F2 e 2 animais do grupo M2). Na análise da eutanásia, não foi encontrada limitação nos joelhos tratados, porém houve limitação em 33 joelhos-controle, com valores até 20°. (10,91±2,87)

Na comparação dos joelhos dos ratos tratados e não tratados, independentemente do tratamento realizado, o teste t de Student pareado na comparação dos valores pré e pós mostrou que a amplitude de movimento de extensão piorou nos joelhos não tratados (0,35±1,75 vs. 3,75±5,48; p<0,001). Por outro lado, nos joelhos tratados houve aumento da amplitude de movimento de extensão no período de seguimento pós cirurgia (0,42±2,01 vs. 0,00±0,00; p<0,001) – Gráfico 2.

Gráfico 2 – Média ± erro-padrão da amplitude de movimento de extensão de ratos tratados (joelho esquerdo) e não tratados (joelho direito) nos momentos pré (3 dias após cirurgia ou controle) e pós (antes da eutanásia) (n = 96). (*diferença estatística, p<0,001; **diferença estatística, p=0,04).



Fonte: elaborado pelo autor (2025)

6.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA

Em relação às variáveis bioquímicas, não houve efeito estatístico para o fator tempo de seguimento até a eutanásia (4, 8 ou 12 semanas), de modo que os tratamentos foram comparados entre si por meio de uma ANOVA de um caminho. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Não houve diferença estatisticamente significativa na análise hematológica da série vermelha: hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Na série branca, foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nos leucócitos ($F_{3,92} = 10,441$; $p < 0,001$), linfócitos ($F_{3,92} = 5,039$; $p = 0,003$) e segmentados ($F_{3,92} = 2,882$; $p = 0,042$), sem diferença nos monócitos e eosinófilos. Maiores valores de leucócitos foram observados em tratamentos sem a presença de hidrogel quando comparados aos tratamentos com hidrogel. Os ratos submetidos ao tratamento fáschia com gel apresentaram menores valores de linfócitos em relação aos demais tratamentos.

Na análise bioquímica, ALT ($F_{3,92} = 4,130$; $p = 0,009$), creatinina ($F_{3,92} = 8,568$; $p < 0,001$), albumina ($F_{3,92} = 4,290$; $p = 0,007$) e proteínas totais ($F_{3,92} = 9,873$; $p < 0,001$) apresentaram-se com diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Maiores valores de ALT foram observados em ratos tratados com membrana em relação à fáschia. Os ratos submetidos ao tratamento membrana sem gel apresentaram menores valores de creatinina. Por fim, tratamentos com gel resultaram em maiores valores de proteínas totais em relação a tratamentos sem gel. Não houve diferença em AST, ureia e fosfatase alcalina (FA). – Tabela 5. Os valores de referência dos animais da colônia do CBR coletados entre 2022 e 2024 com animais de aproximadamente 90 dias de vida encontram-se disponíveis na Tabela 6. Tais valores podem não representar de forma fidedigna a colônia, pois trata-se de poucos animais e a amostragem definitiva ainda encontra-se em processo de coleta.

Tabela 5 – Variáveis bioquímicas obtidas de ratos após eutanásia que foram submetidos a diferentes tratamentos (n = 96).

| Variáveis | Tratamentos | | | |
|-------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Fáscia sem Gel | Fáscia com Gel | Membrana sem Gel | Membrana com Gel |
| Hemácias | 8877±571 | 8872±355 | 9121±304 | 8970±275 |
| Hematócrito | 46,4±2,8 | 46,1±2,0 | 47,1±1,4 | 46,7±1,8 |
| Hemoglobina | 16,2±0,9 | 16,1±0,8 | 16,5±0,5 | 15,9±0,6 |
| VCM | 52,3±1,5 | 51,9±0,9 | 51,7±1,0 | 52,1±1,2 |
| HCM | 18,3±0,7 | 18,0±0,4 | 18,1±0,4 | 17,7±0,7 |
| CHCM | 34,5±2,0 | 34,6±0,9 | 35,1±0,4 | 34,0±0,8 |
| Plaquetas | 1151500±18467 5 | 1128100±11783 4 | 1103541±233850 | 1146000±75065 |
| Leucócitos* | 7337±1912 ^a | 5320±1646 ^b | 8083±1937 ^a | 5250±1500 ^b |
| Linfócitos* | 75,4±7,2 ^a | 67,6±6,7 ^b | 73,6±7,1 ^a | 72,5±2,4 ^a |
| Segmentados* | 20,8±6,7 ^a | 26,6±6,8 ^b | 23,4±7,0 ^{a,b} | 24,7±1,9 ^{a,b} |
| Monócitos | 3,5±2,6 | 4,0±2,1 | 2,7±2,0 | 2,3±1,4 |
| Eosinófilos | 0,2±0,4 | 0,3±0,9 | 0,2±0,6 | 0,5±0,5 |
| ALT* | 58,0±19,0 ^{a,b} | 52,9±8,7 ^a | 66,1±19,5 ^b | 66,4±13,8 ^b |
| AST | 84,7±23,9 | 89,0±30,1 | 96,2±35,0 | 92,3±25,3 |
| Creatinina* | 0,33±0,06 ^{a,b} | 0,37±0,05 ^a | 0,29±0,08 ^b | 0,38±0,06 ^a |
| Ureia | 42,9±5,8 | 43,9±4,0 | 43,2±5,5 | 45,2±7,9 |
| FA | 198,2±33,8 | 202,0±42,9 | 229,1±50,8 | 195,4±55,4 |
| Albumina* | 37,5±4,9 ^a | 40,9±1,9 ^b | 39,4±3,6 ^{a,b} | 39,8±2,0 ^{a,b} |
| Proteínas Totais* | 59,4±8,9 ^a | 67,5±3,6 ^b | 62,0±6,4 ^a | 66,9±3,9 ^b |

(*diferenças significativas entre os grupos por meio da ANOVA, p<0,05)

Fonte: elaborado pelo autor (2025)

Tabela 6 – Valores de referência da colônia de ratos Wistar do CBR-UFJF (2022-2024)

| Variáveis | Valores de referência |
|-------------------|-----------------------|
| Hemácias | 7000-10000 |
| Hematócrito | 40-50 |
| Hemoglobina | 13-18 |
| VCM | 48-55 |
| HCM | 17-20 |
| CHCM | 35-37 |
| Plaquetas | 900000-1500000 |
| Leucócitos | 3000-10000 |
| ALT | 30-80 |
| AST | 60-130 |
| Creatinina | 0,20-0,50 |
| Ureia | 30-50 |
| FA | 120-300 |
| Albumina* | 30-50 |
| Proteínas Totais* | 40-70 |

Fonte: elaborado pelo autor (2025)

6.7 ANÁLISE DE EXCREÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS URINÁRIOS

Durante os períodos de gaiola metabólica foi coletada a urina produzida durante as 12 horas e quantificada a ingesta hídrica dos animais. Apesar da grande variabilidade intrínseca em ambas as medidas, o volume médio de urina (8,98 mL e 8,25 mL) e água (12,55 mL e 12,08 mL) foi similar ao comparar-se a coleta na primeira semana com a coleta na semana antes da eutanásia. O volume de urina apresentou maior variação (entre 1,5mL e 18mL), o que nos levou a diluir todas as amostras em 50mL para análise da excreção de GAGs.

Foi realizada eletroforese com amostras isoladas de urinas por animal, porém a concentração de GAGs foi muito pequena, não sendo possível visibilizar de forma adequada sua presença nas lâminas. Dessa forma, optamos por realizar um pool de

amostras, unindo as urinas obtidas dos animais do mesmo grupo em cada momento de análise.

Após a confecção do *pool*, obtivemos 24 amostras, cuja eletroforese foi realizada em 4 lâminas distintas aleatoriamente. A maioria das amostras evidenciou excreção predominante de CS e HS, sem diferença significativa entre os grupos. Houve um *outliner*, no grupo M2 em 8 semanas, na primeira semana após eutanásia onde houve excreção aumentada de CS.

Em todos os grupos, exceto no *outliner*, houve um padrão de excreção semelhante dos GAGs quando comparada a primeira semana com o período pré-eutanásia, com maior excreção dos GAGs na primeira semana.

Figura 14 – Painéis de eletroforese do grupo F1

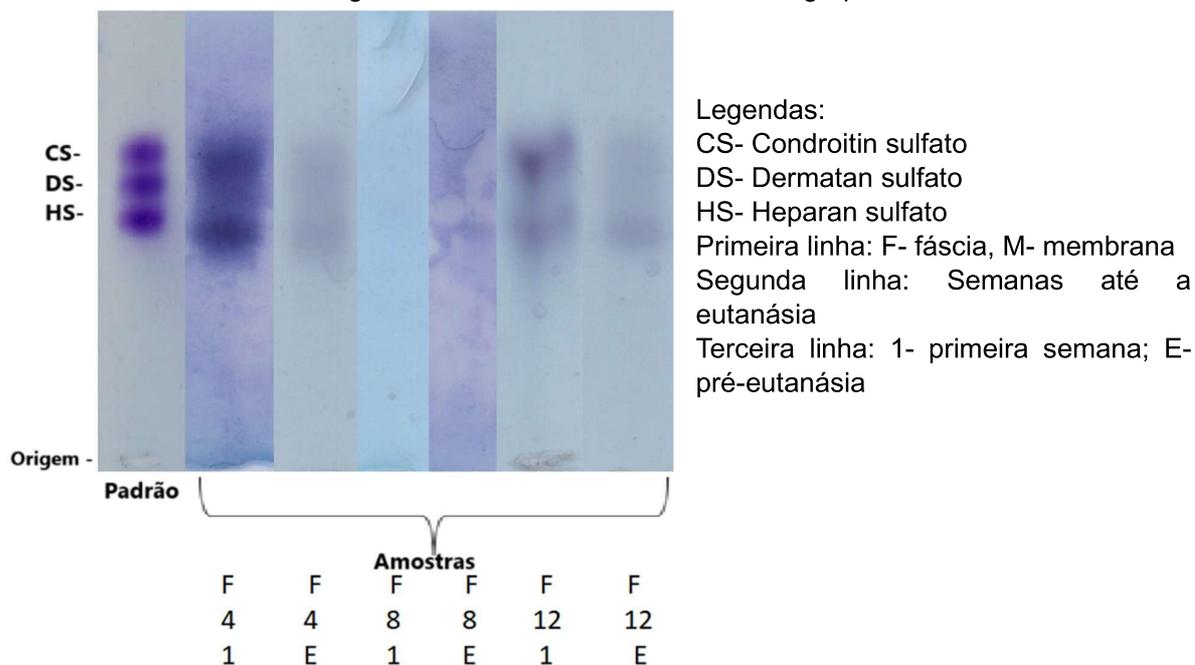


Figura 15 – Painéis de eletroforese do grupo F2

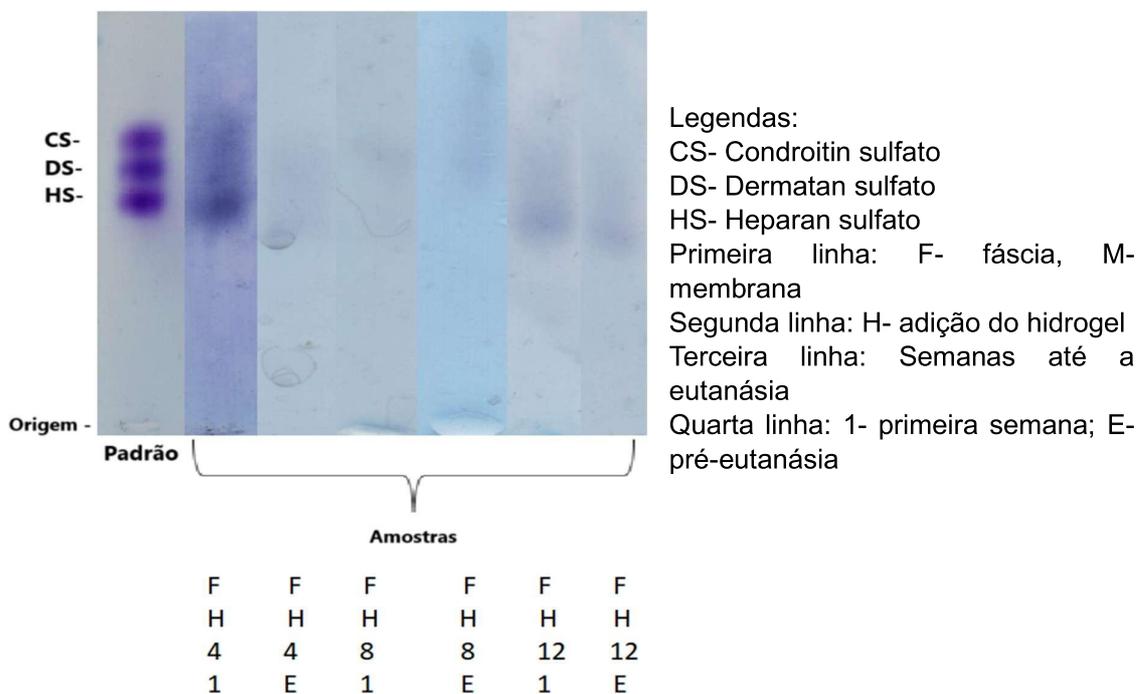


Figura 16 – Painéis de eletroforese do grupo M1

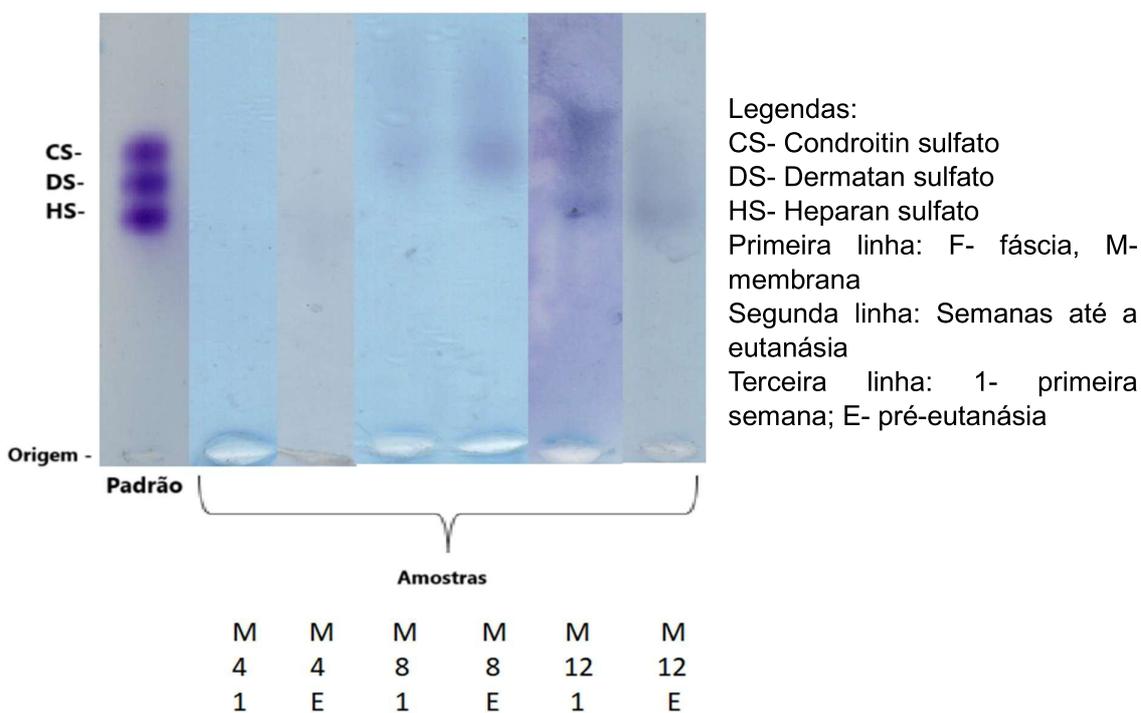


Figura 17 – Painéis de eletroforese do grupo M2

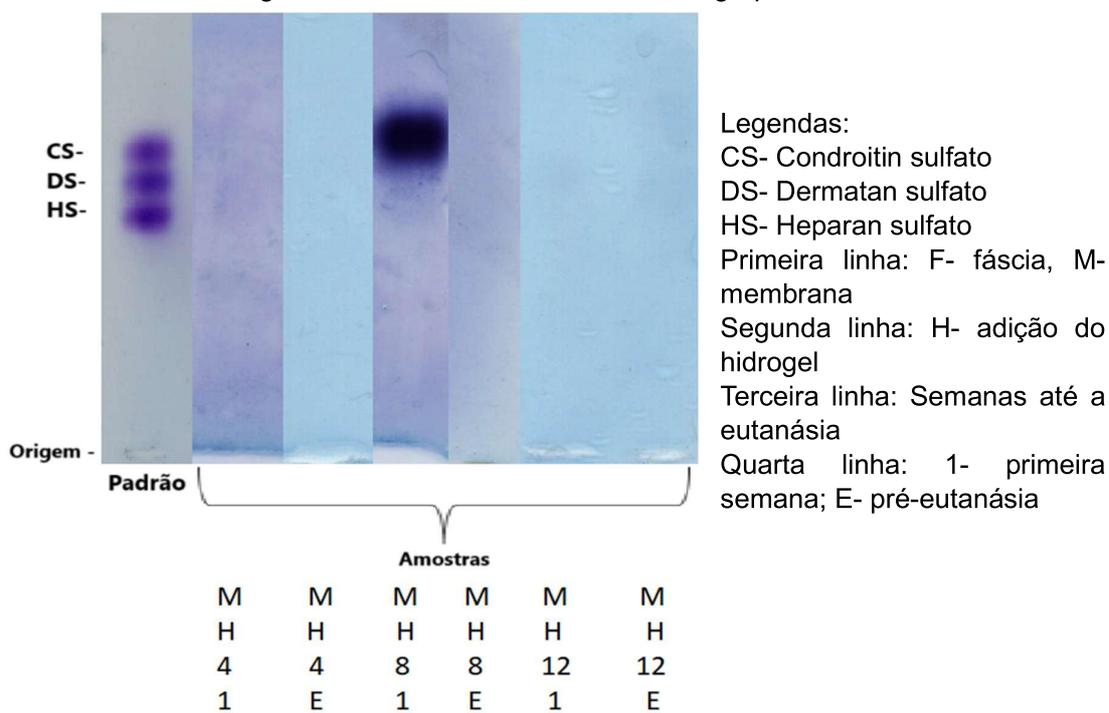
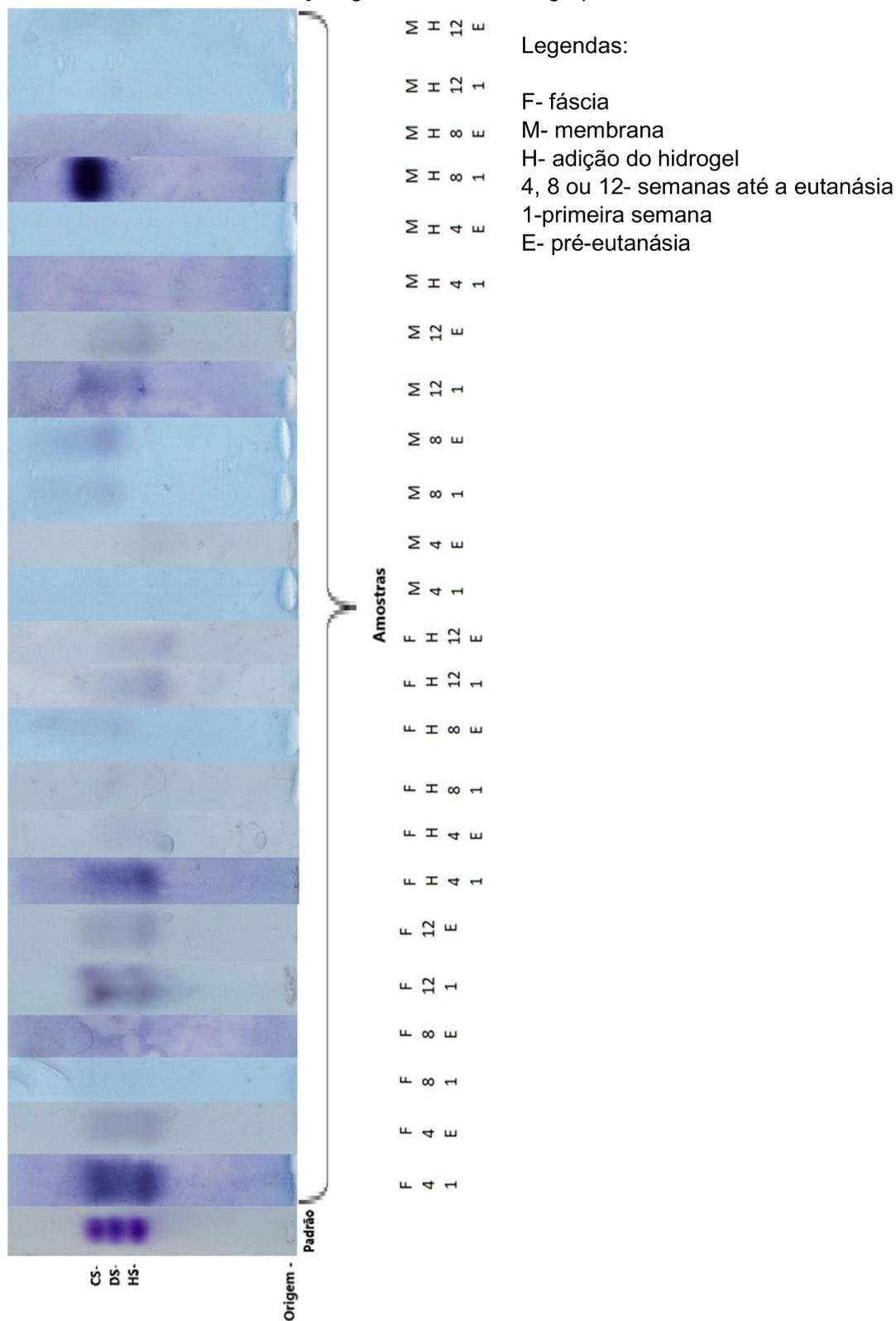


Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose da excreção urinária de GAGs dos animais, evidenciando principalmente CS e HS como subprodutos, com maior excreção uma semana após a cirurgia, comparado com os mesmos animais na semana da eutanásia. Não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento.



6.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a eutanásia os animais foram distribuídos aleatoriamente para conservação dos joelhos em formaldeído 10% para análise histológica ou congelamento a -80°C . Dessa forma, 96 joelhos de 48 animais foram enviados para preparação e análise histológica. Durante o processo de preparação e descalcificação tivemos a perda quase total das amostras dos grupos F1 e M1, tornando impossível a análise destes. Dessa forma, nossa avaliação histológica concentrou-se em analisar os grupos F2 e M2 e seus joelhos controle.

As lâminas com os joelhos dos grupos F2 e M2 foram analisadas por microscopia óptica (Olympus® DP73) em um aumento de 10 vezes e com auxílio do *software* Olympus® cellSens Dimension, sendo pontuadas de acordo com os escores de Pineda e/ou Wakitani, por quatro examinadores independentes. Em ambos os escores, quanto menor a pontuação obtida, mais a neocartilagem se assemelha ao tecido cartilaginoso hialino normal da articulação. (Figuras 19 a 27)

O coeficiente de correlação intraclasse (CCI) foi usado para a análise da reprodutibilidade interobservadores, sendo adotada a seguinte classificação: ruim $< 0,50$, moderado $0,50$ a $0,75$, bom $0,75$ a $0,90$ e excelente $>0,90$ (Koo e Li, 2016). As análises foram feitas no *software* IBM SPSS Statistics para Windows versão 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp), sendo adotado o valor de $p < 0,05$ para a significância estatística.

A análise demonstrou escores médios de Pineda e Wakitani superiores (menor pontuação final) no grupo cartilagem fragmentada + fásia (F2) quando comparados aos controles e superiores no grupo cartilagem fragmentada + membrana (M2) quando comparado ao grupo cartilagem fragmentada + fásia (F2). (Gráficos 3 e 4)

O tempo do tratamento até a eutanásia também foi um fator importante, com os melhores valores sendo obtidos naqueles ratos eutanasiados após 12 semanas em todos os grupos de tratamento, com uma maior queda de pontuação entre 4 e 8 semanas do tratamento. Mesmo no grupo controle há melhora dos escores com a evolução do tempo, evidenciando que há mecanismos intrínsecos que realizam uma tentativa de recuperação da cartilagem mesmo sem o tratamento adequado.

Observou-se uma concordância interobservador classificada como boa a excelente na classificação histológica (Tabela 7). Os coeficientes de concordância variaram de 0,60 a 0,99, exceto na subescala de Coloração Matriz onde foi observada uma maior variabilidade (0,41 a 0,95). Os coeficientes de concordância observados foram similares entre as técnicas Pineda e Wakitani.

Figura 19 – Imagem representativa da articulação do joelho do grupo controle (4 semanas). Observe que a lesão é evidenciada sem proliferação de condrócitos em seu interior, sem preenchimento da falha (seta preta) e sem reparo da junção osteocondral. A coloração da matriz extracelular permanece inalterada. (aumento 10x)

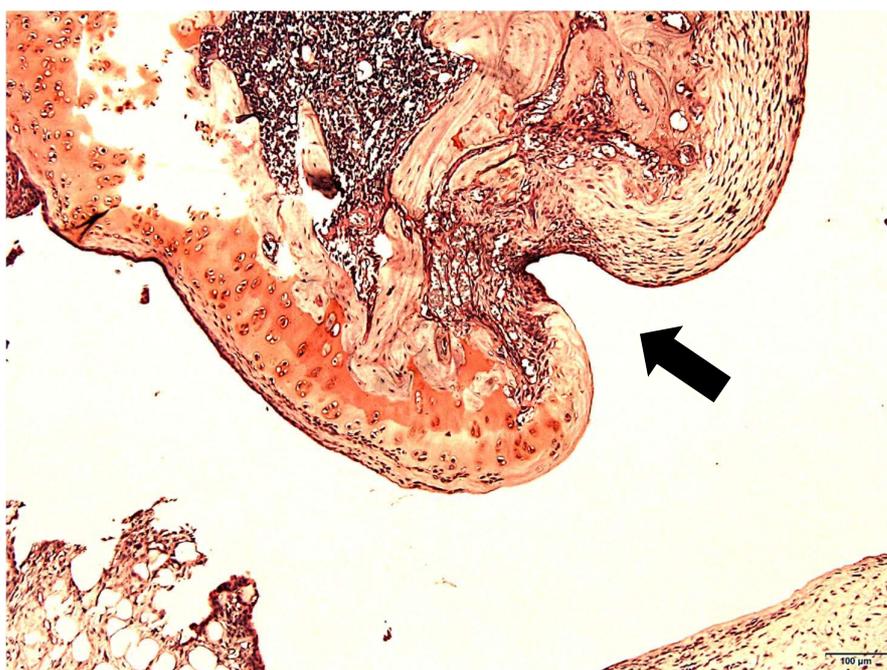


Figura 20 - Imagem representativa da articulação do joelho do grupo controle (8 semanas). Observe que a lesão é evidenciada sem proliferação de condrócitos em seu interior (seta preta), sem preenchimento da falha e sem reparo da junção osteocondral. A coloração da matriz extracelular permanece inalterada. (aumento 10x)

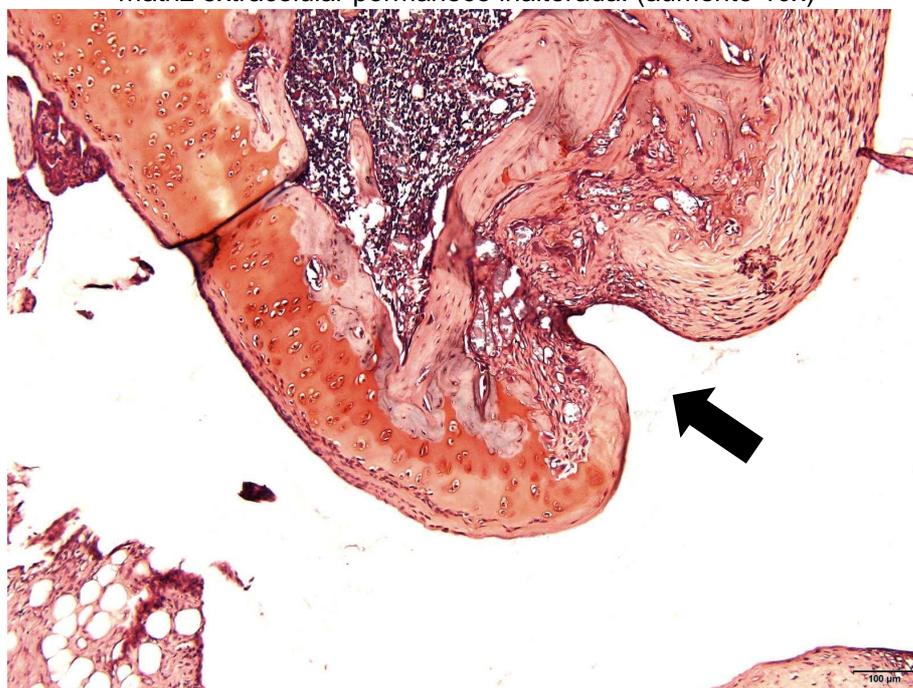


Figura 21 – Imagem representativa da articulação do joelho do grupo controle (12 semanas). Observe que a lesão é evidenciada sem proliferação de condrócitos em seu interior, sem preenchimento e sem reparo da junção osteocondral. A coloração da matriz extracelular permanece inalterada. (aumento 10x)

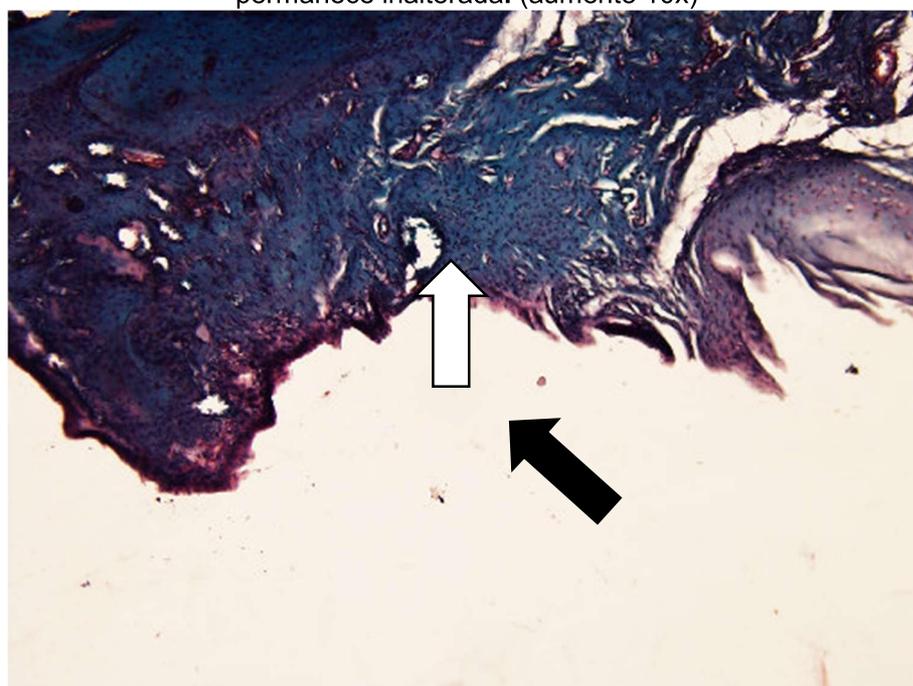


Figura 22 – Imagem representativa da articulação do joelho tratado do grupo F2 (4 semanas). Observe que a lesão apresenta proliferação de condrócitos em seu interior (seta branca), ainda sem preenchimento total da falha (seta preta) e sem reparo da junção osteocondral. (aumento 10x)

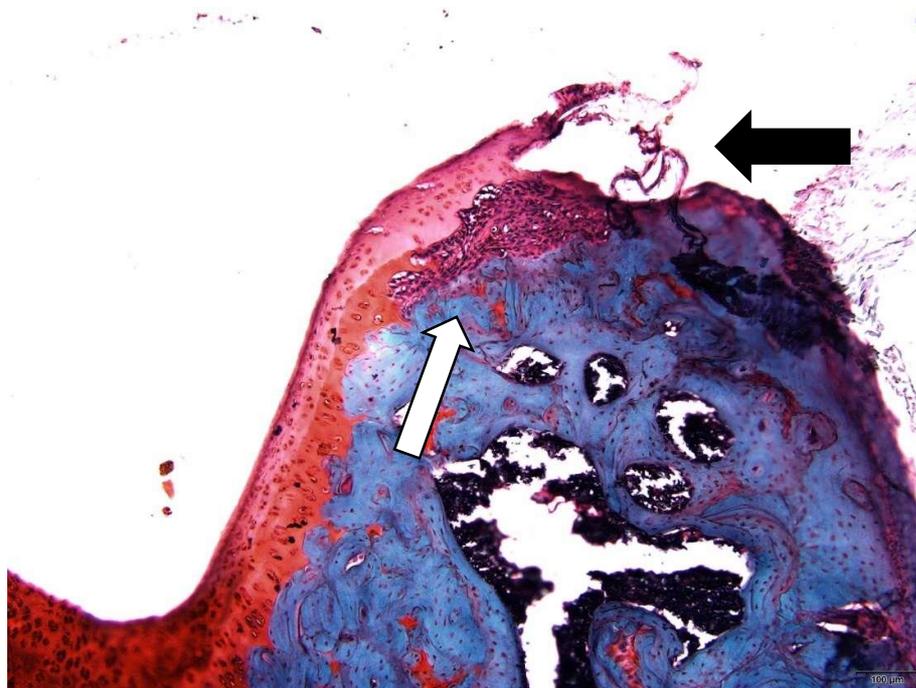


Figura 23 – Imagem representativa da articulação do joelho tratado do grupo F2 (8 semanas). Observe que a lesão apresenta proliferação de condrócitos em seu interior (seta branca), ainda sem preenchimento total da falha (seta preta) e sem sinais de reconstrução da junção osteocondral. (aumento 10x)

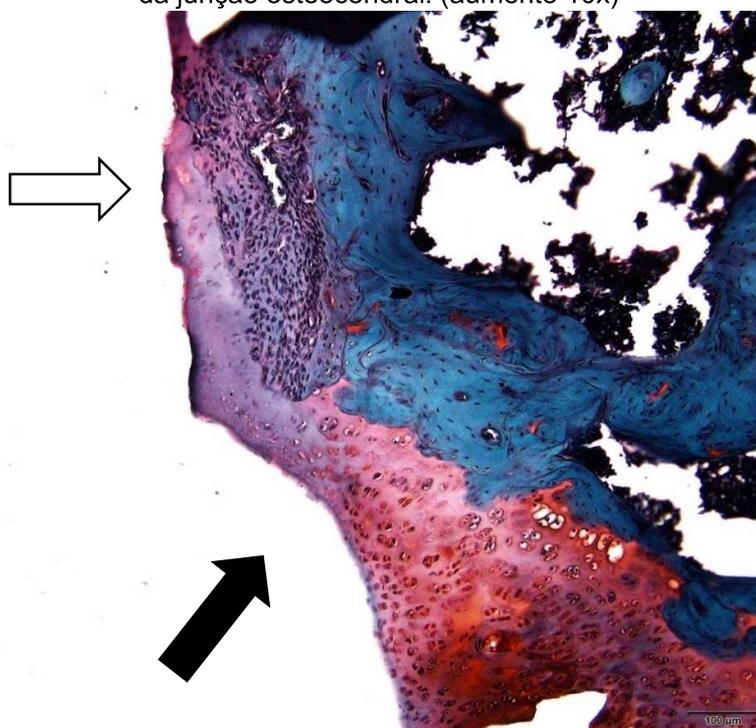


Figura 24 – Imagem representativa da articulação do joelho tratado do grupo F2 (12 semanas). Observe que a lesão apresenta proliferação de condrócitos em seu interior (seta branca), com preenchimento de aproximadamente 50% do defeito (seta preta), coloração da matriz extracelular com significativa redução e boa reconstrução da junção osteocondral. (aumento 10x)

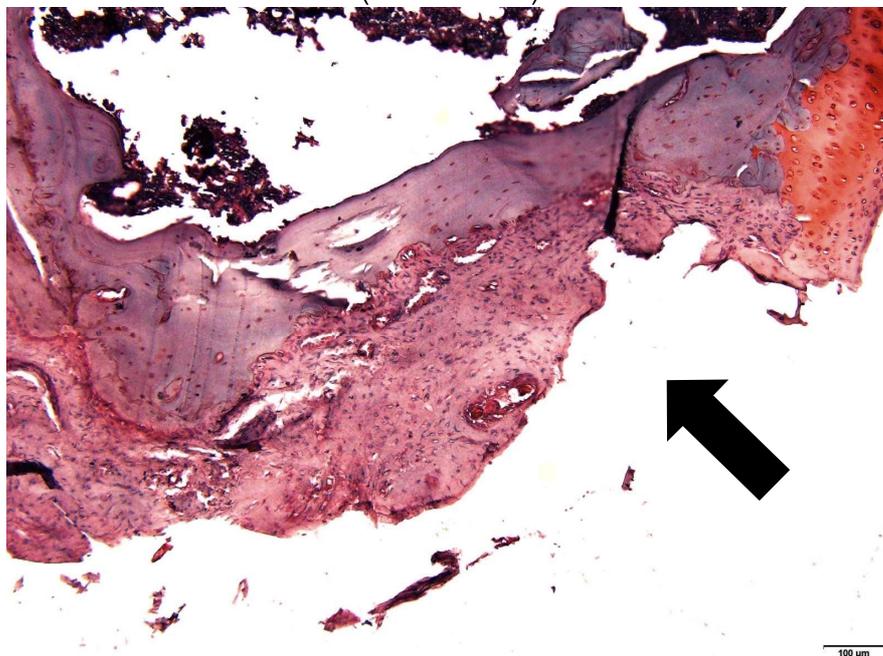


Figura 25 – Imagem representativa da articulação do joelho tratado do grupo M2 (4 semanas). Observe que a lesão apresenta ligeira proliferação de condrócitos em seu interior, preenchimento >75% do defeito (seta preta), coloração da matriz extracelular com significativa redução e sem reconstrução da junção osteocondral. (aumento 10x)

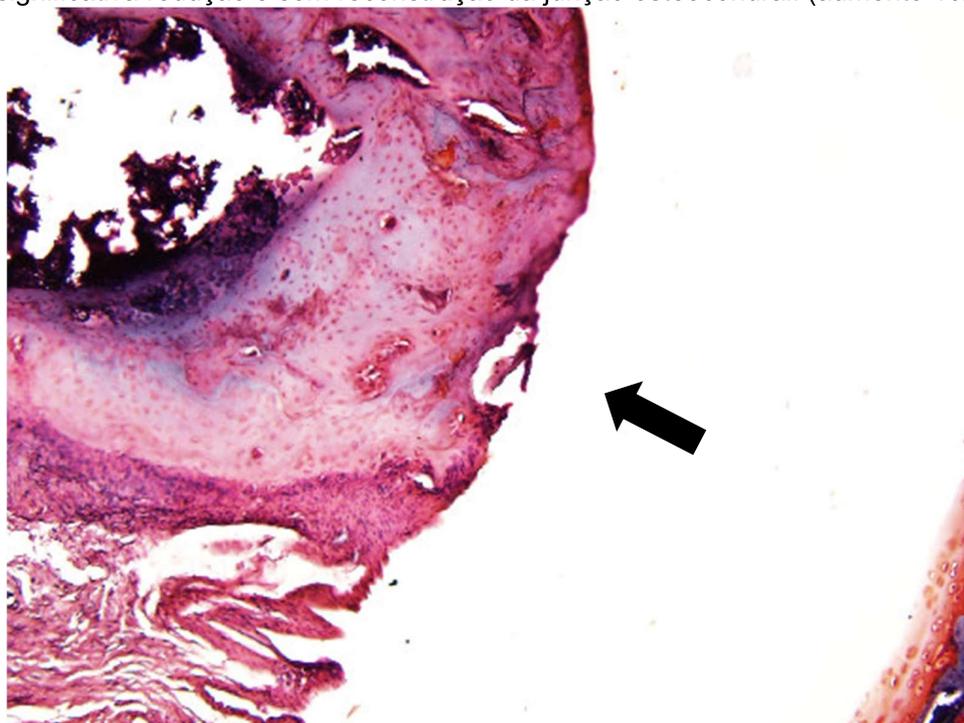


Figura 26 – Imagem representativa da articulação do joelho tratado do grupo M2 (8 semanas). Observe que a lesão apresenta preenchimento de 100% do defeito (seta preta), proliferação de condrócitos no interior da lesão, coloração da matriz extracelular com significativa redução e boa reconstrução da junção osteocondral (aumento 10x)

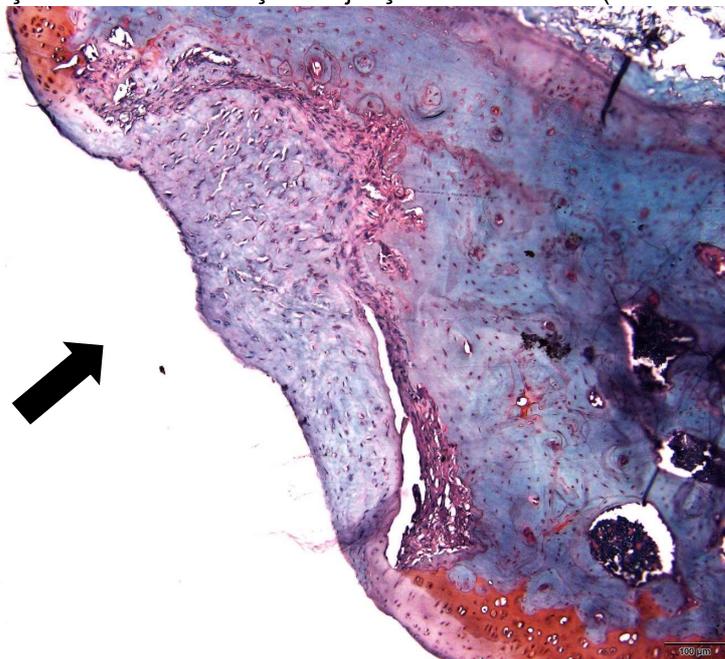


Figura 27 – Imagem representativa da articulação do joelho tratado do grupo M2 (12 semanas). Observe que a lesão apresenta preenchimento de 100% do defeito (seta preta), proliferação de condrócitos no interior da lesão, coloração da matriz extracelular com pouca redução e boa reconstrução da junção osteocondral. (aumento 10x)

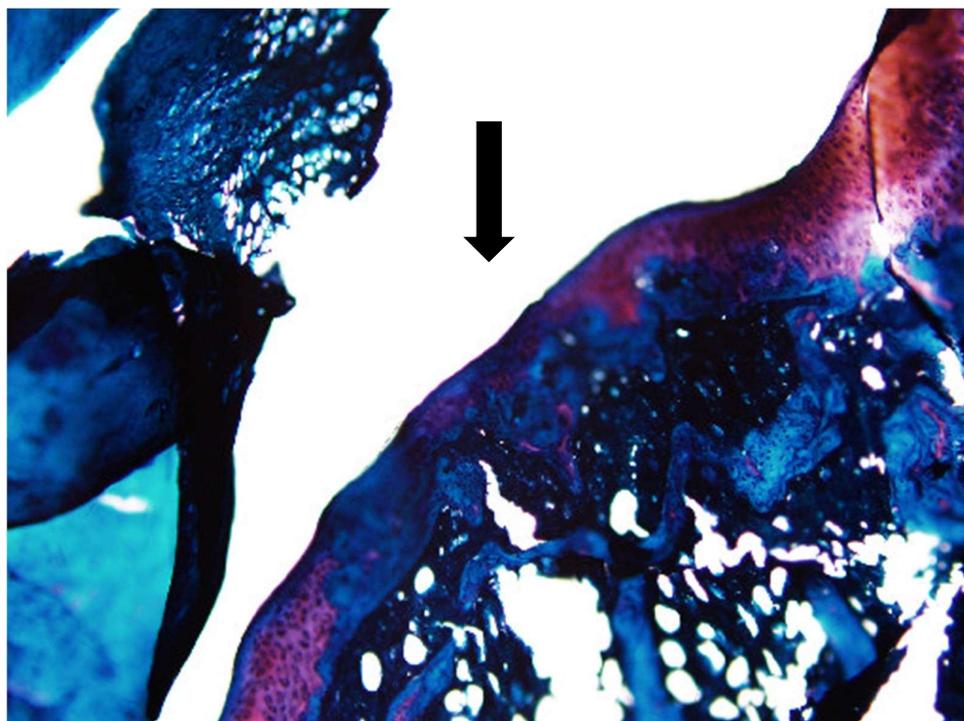
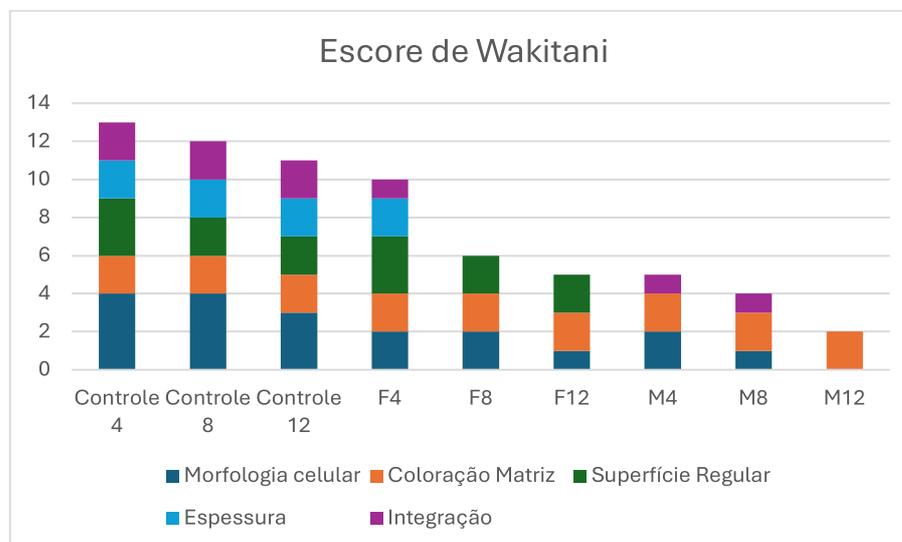
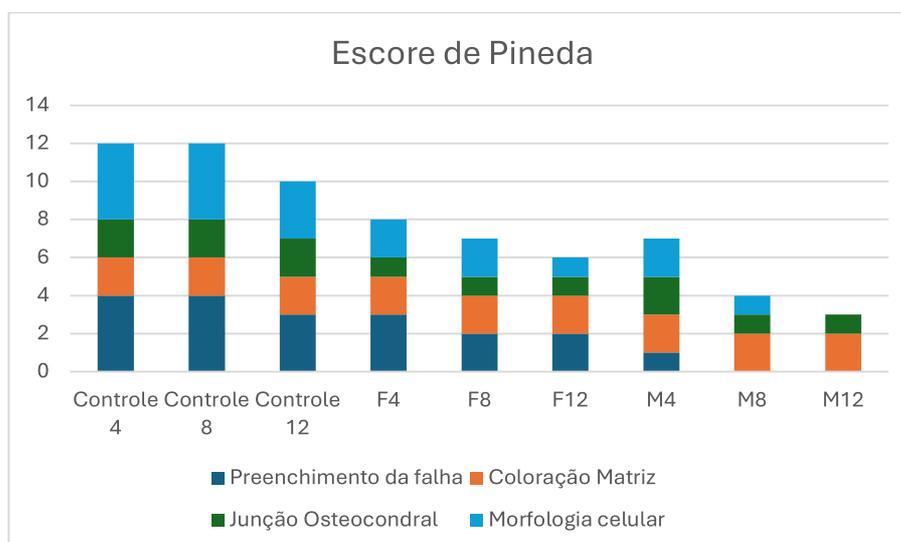


Gráfico 3 – Valor médio do Escore de Wakitani e sua pontuação de acordo com os parâmetros analisados



Fonte: elaborado pelo autor (2025)

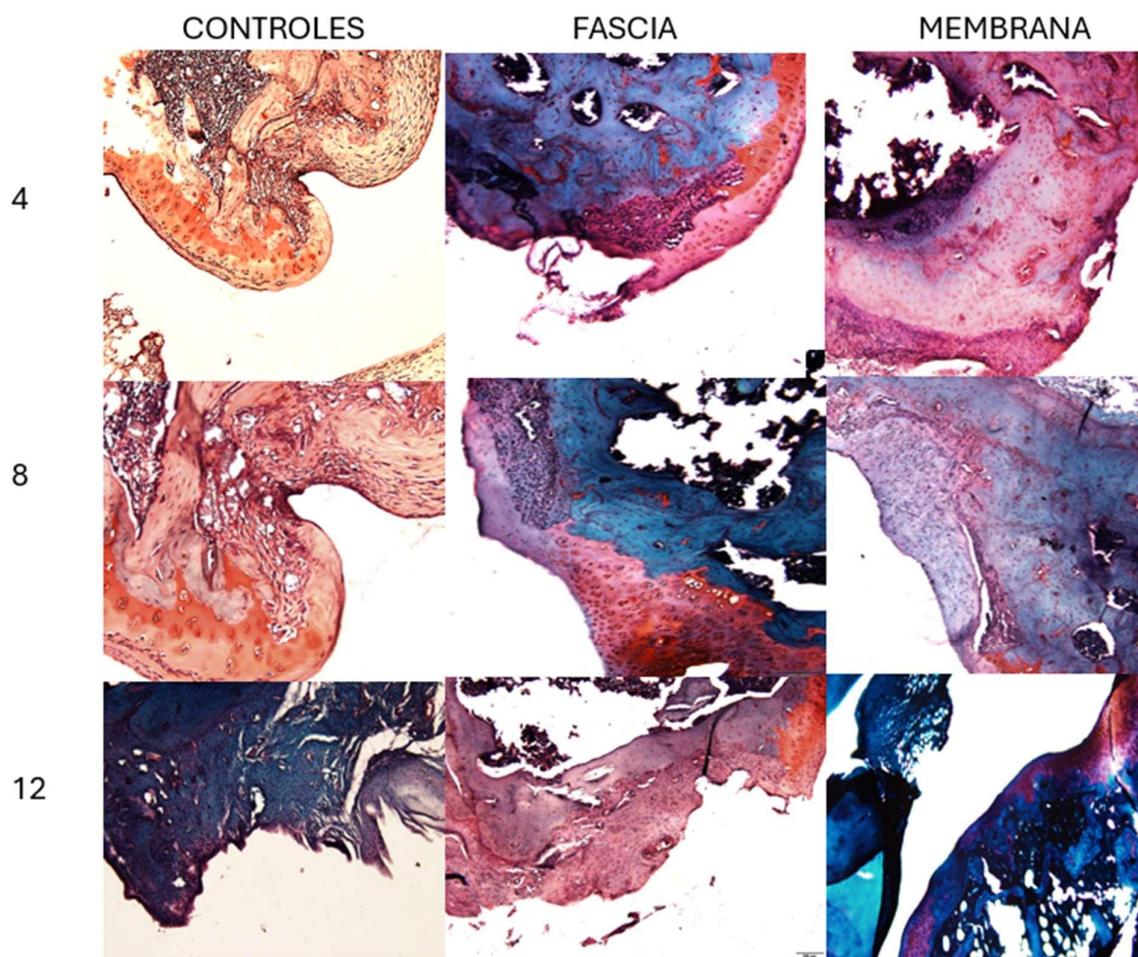
Gráfico 4 – Valor médio do Escore de Pineda e sua pontuação de acordo com os parâmetros analisados



Fonte: elaborado pelo autor (2025)

Tabela 7 – Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) aleatório de duas vias e intervalo de confiança de 95% da concordância absoluta interobservador.

| Escala / Fatores | CCI (IC95%) | Classificação (IC95%) |
|-------------------------|--------------------|------------------------------|
| Pineda | | |
| Preenchimento da Falha | 0,94 (0,83 – 0,98) | Excelente (Boa – Excelente) |
| Coloração Matriz | 0,80 (0,41 – 0,95) | Boa (Ruim – Excelente) |
| Junção Osteocondral | 0,85 (0,60 – 0,96) | Boa (Moderada – Excelente) |
| Morfologia Celular | 0,96 (0,89 – 0,99) | Excelente (Boa – Excelente) |
| Total | 0,95 (0,82 – 0,98) | Excelente (Boa – Excelente) |
| Wakitani | | |
| Morfologia celular | 0,96 (0,89 – 0,99) | Excelente (Boa – Excelente) |
| Coloração matriz | 0,80 (0,42 – 0,95) | Boa (Ruim – Excelente) |
| Superfície regular | 0,90 (0,73 – 0,97) | Boa (Boa – Excelente) |
| Espessura | 0,87 (0,66 – 0,97) | Boa (Moderada – Excelente) |
| Integração | 0,92 (0,78 – 0,98) | Excelente (Boa – Excelente) |
| Total | 0,97 (0,93 – 0,99) | Excelente (Excelente) |

Figura 28 – Painel de lâminas histológicas coradas pelo método Safranin-o/*Fast green*

7 DISCUSSÃO

Apesar do impacto social e econômico da osteoartrose em escala global, não existem ainda drogas modificadoras da história natural da doença. O desenvolvimento e avaliação dessas terapias passa por estudos pré-clínicos em modelos animais. Os estudos desenvolvidos nesses modelos animais nos permitem ter importantes informações sobre sintomas clínicos (p. ex.: dor), estudar a patologia tecidual e descobrir fatores de risco, além de descobrir relações a nível molecular, celular e patológico.

Esses estudos apresentam grande variabilidade em relação à forma de indução do processo de osteoartrite/lesões focais, sendo desenvolvidos diversos modelos através de injeções de antígeno específico (AIA) (Thote *et al.*, 2012; Zaki *et al.*, 2021), transecção ou desestabilização do menisco medial (Thote *et al.*, 2012), lesão condral direta por cirurgia (Malfait *et al.*, 2013) ou osteoartrite induzida por obesidade. (Griffin *et al.*, 2010).

Modelos que utilizam AIA, obesidade ou transecção do menisco medial apresentam como dificuldade o controle do tamanho da lesão, sendo mais utilizados para estudo do processo degenerativo global da articulação. A realização da lesão condral focal por via cirúrgica direta é uma alternativa mais segura e, caracteristicamente, é realizada utilizando trefinas, brocas ou pinças de biópsia, porém essas técnicas estão relacionadas a diversas complicações e, principalmente, ao difícil controle e conseqüente variabilidade do tamanho e profundidade da lesão. Mamachan e colaboradores desenvolveram modelo com utilização de brocas de pontas finas com uma retífica de alta rotação em coelhos com bons resultados quanto à uniformização do tamanho e profundidade das lesões. (Mamachan *et al.*, 2023). Outro fator de controle já evidenciado em outros estudos é a realização da lesão pelo mesmo cirurgião e com os mesmos instrumentos em todos os animais (Rudert, 2002).

Matsushita e colaboradores desenvolveram uma técnica semelhante para lesão condral em coelhos, relatando além desse controle, uma diminuição de lesões térmicas ao redor da lesão. Em nosso estudo, utilizamos a retífica de alta rotação nos proporcionando bom controle do tamanho e profundidade da lesão e todos os procedimentos foram performados pelo mesmo cirurgião com os mesmos

instrumentos. O modelo desenvolvido em nosso estudo permitiu a realização de uma lesão com limites bem definidos, sem lesão adicional a tecidos moles e reprodutível em todos os animais do estudo. Não foi observada necrose de tecidos moles ao redor da lesão.

As últimas décadas trouxeram um grande avanço da engenharia de tecidos e, no que tange, ao sistema músculo-esquelético, Giannoudis e colaboradores descreveram em 2007 o conceito do diamante, destacando a importância de quatro grandes fatores para regeneração tecidual: presença de células osteogênicas ou condrogênicas, fatores de crescimento celular, presença de *scaffolds* com capacidade osteocondutora e estabilidade mecânica (Giannoudis *et al.*, 2007).

Entre os fatores de crescimento e reparo da cartilagem encontram-se o fator de crescimento β (TGF- β), proteína morfogenética (BMP), hormônios tireoidianos, proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), fatores derivados de plaquetas, fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), vitaminas e fatores de crescimento insulina-*like* (IGFs). Dentre estes, o TGF- β é o fator chave para proliferação e diferenciação dos condrócitos (Farokhi, 2019).

Uma grande variedade de materiais sintéticos e naturais tem sido utilizados como *scaffolds*, carreadores celulares e agentes terapêuticos para recuperação da cartilagem, destacando-se hidrogéis feitos de diversos polímeros, que promovem condrogênese e regeneração da cartilagem na presença de fatores de indução, ao promoverem um microambiente tridimensional adequado.

O desenvolvimento de hidrogéis com propriedades mecânicas similares à cartilagem tem longo estudo de ácidos de álcool polivilínico (PVA). (Chremos, 2022). Recentemente, Horkay e Bassar propuseram um novo composto com uso de matriz de PVA com adição de partículas de ácido acrílico (PAA) através de *cross-link*, correspondendo ao complexo agregam/ácido hialurônico, gerando a presença de estresse tecidual mesmo sem estímulo externo. (Horkay e Bassar, 2022 *apud* 2020). Pipino e colaboradores analisaram 46 pacientes com lesões osteocondrais do joelho tratados com microfraturas associadas ou não a um hidrogel de glicosamina e poliglicosamina e relataram melhora significativa dos escores funcionais nos pacientes que utilizaram o hidrogel no tratamento, com superioridade em relação ao grupo-controle. No mesmo estudo, foi realizada análise *in vitro* do hidrogel, demonstrando a

formação de cartilagem hialina no grupo que recebeu o mesmo. Biópsias após um ano de tratamentos evidenciaram a presença de colágeno tipo II e cartilagem hialina no tecido neoformado. (Pipino *et al.*, 2019)

Em contra-partida, Vindas-Bolaños e colaboradores avaliaram a resposta em equinos de um *scaffold* de matriz extra-articular de cartilagem, produzido por impressão 3D e não evidenciaram regeneração satisfatória da cartilagem, com pouco preenchimento do defeito com tecido fibroso, abundante em colágeno tipo I e com pouco colágeno tipo II. (Vindas-Bolaños, 2016). Apesar de resultados promissores, nenhum *scaffold* isoladamente consegue prover a regeneração da cartilagem, sendo necessária estabilidade e ambiente adequados para formação e diferenciação de condrócitos. (Li *et al.*, 2023)

Entre os componentes da matriz celular, o colágeno tipo II é uma das moléculas mais estudadas por ser um indutor da condrogênese. Lu e colaboradores analisaram *scaffolds* de colágeno tipo II e colágeno tipo I em células-tronco de tecido adiposo e verificaram superioridade do colágeno tipo II para gerar estabilidade mecânica e para induzir diferenciação celular. O colágeno tipo II também amplificou a ação de fatores condroindutores, como o TGF- β 1. (Lu, 2010)

Martínez-Puig e Michelacci publicaram revisões narrativas destacando a importância do colágeno tipo II em sua forma nativa como um fator protetor à presença de reações auto-imunes à cartilagem a nível articular. O colágeno tipo II estimula a diferenciação de células T regulatórias (TRegs) que, na articulação, inibem a cascata inflamatória da liberação de autoantígenos produzidos pelo catabolismo da cartilagem. (Michelacci, 2023; Martínez-Puig, 2023). (Figura 29)

Utilizamos em dois grupos de tratamento o Hidrogel Biocompósito de Colágeno (HBC) produzido pelo laboratório de Glicoconjugados do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF. Esse hidrogel possui concentração final de 10 mg/mL, com proporção de colágeno tipo II para colágeno tipo I de 1:10. Em nosso estudo, os animais que tiveram adicionado o hidrogel a seu tratamento evoluíram com menor valor de leucócitos e maior valor de proteínas totais, quando comparados aos animais onde o hidrogel não foi adicionado. Wu e colaboradores destacam que os macrófagos encontrados junto ao tecido sinovial exercem atividade pró-inflamatória, realizando sinalização de moléculas como alarminas e citocinas como a interleucina-1 (IL-1) e

fator de necrose tumoral (TNF- α). Além disso, os macrófagos ativam a produção de metaloproteinases (MMPs) e de enzimas de degradação da matriz a partir de fibroblastos. Sakurai e colaboradores analisaram o papel desses macrófagos em ratos com osteoartrose e verificaram que a supressão dos mesmos estava relacionada a melhora da dor, diminuindo a resistência a anti-inflamatórios inibidores da ciclooxigenase (COX). (Sakurai *et. al.*, 2019) Gomez-Aristizábal e colaboradores analisaram humanos com osteoartrose, verificando correlação entre detecção de macrófagos no líquido sinovial e rigidez articular, dor e diminuição da qualidade de vida, postulando que subprodutos dos macrófagos poderiam ser utilizados como marcadores biológicos da osteoartrose e que sua modulação deveria ser objetivo de novos tratamentos. Os menores valores de leucócitos encontrados nos grupos onde foi utilizado o hidrogel são animadores quando analisados conjuntamente com os dados clínicos, indicando uma menor atividade dos macrófagos e inferindo menor dor. (Gomez-Aristizábal *et. al.*, 2019).

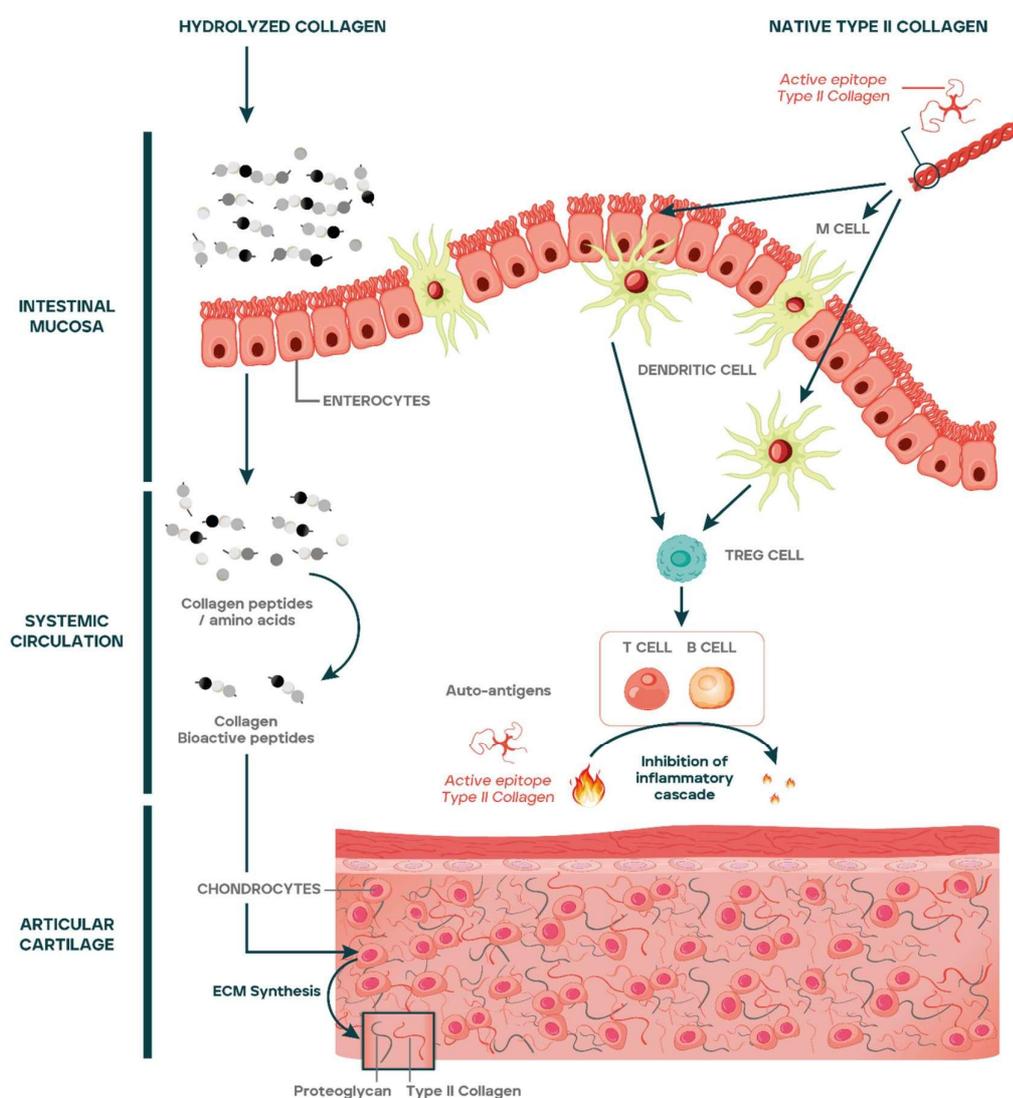
Os tratamentos com gel resultaram em maiores valores de proteínas totais em relação a tratamentos sem gel. Em nossa busca, não encontramos estudos que relacionassem o nível de proteínas séricas ao uso de hidrogel. Diversos estudos analisam proteínas séricas específicas como marcadores precoces de OA.

Ling e colaboradores analisaram 169 proteínas presentes no soro de 22 pacientes com OA radiograficamente inicial, comparando com 66 pacientes sem OA, com idades entre 22 e 92 anos e encontraram 16 proteínas com valores significativamente diferentes entre os indivíduos com OA e os controles, destacando que a maioria das proteínas estava diminuída nos pacientes com OA e que a diferença na concentração era maior quanto mais jovem o paciente. Ao repetir essa análise após 10 anos, as concentrações foram mantidas. Entre as proteínas que se encontram diminuídas estão metaloproteinase 2 (MMP-2), fator inibidor de plasminogênio (PAI-I), D-dímero DD5 e DD6, molécula de adesão intracelular (ICAM-1) e P-selectina, enquanto proteínas relevantes na resposta imune e inflamatória encontram-se aumentadas, como proteínas de inibição de macrófagos (MIP-1 α), interleucinas (IL-1 α , IL-2, IL-15), metaloproteinase 7 (MMP-7) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF-7). (Ling *et al.*, 2010).

Fernández-Puente e colaboradores analisaram 349 proteínas séricas em pacientes com OA moderada, OA grave e controles e encontraram três grupos de

proteínas com diferença estatisticamente significativa: proteínas alteradas somente na OA inicial/moderada, proteínas alteradas somente na OA grave e proteínas alteradas em ambos os estágios. No estágio inicial da OA foram identificadas seis proteínas, sendo que quatro estavam diminuídas, principalmente a glicoproteína de membrana associada a lisossomos (LAMP-2) e a fosfolipase D específica fosfatidilinositolglicano (PHLD) e duas se encontravam aumentadas, principalmente a proteína ligante-3-galactina (LG3BP). (Fernández-Puente *et al.*, 2011)

Figura 29 – Inibição da resposta auto-imune articular induzida pelo colágeno tipo II



Fonte: Martínez-Puig *et al.*, 2023

Em nosso estudo, encontramos maiores valores de ALT em ratos tratados com membrana em relação àqueles que foram tratados com a fáschia muscular. Não encontramos na literatura estudos relacionando a membrana de colágeno ou a técnica AMIC com a função hepática.

Huang e colaboradores (2023) encontraram correlação entre osteoartrite e elevação de ALT ao analisar dados de uma população europeia de 750 mil indivíduos. Embora a correlação entre ALT e a osteoartrite ainda não seja bem elucidada, a correlação da função hepática com distúrbios circulatórios já é bem estabelecida. A elevação de ALT altera mecanismos circulatórios e a homeostase dos lipídios, gerando hiperplasia vascular subcondral, diminuição do fluxo sanguíneo e estase venosa, que levam a hipoxia tecidual e alteração da expressão gênica de citocinas, ocasionando, em última análise, remodelação subcondral e morte de condrocitos. Essas últimas etapas são reconhecidas como componentes da patogênese da OA. (Huang et al., 2023). Harrison e colaboradores (2024) analisaram adultos mexicanos com osteoartrite e correlacionaram a elevação de ALT a maiores níveis de dor e ansiedade. (Harrison et al., 2024).

A creatinina é um metabólito produzido pelo tecido muscular e a diminuição de massa muscular está intimamente ligada ao desenvolvimento de OA. Liao e colaboradores publicaram uma metanálise com 495 pacientes e evidenciaram que indivíduos com OA possuem menores níveis séricos de creatinina quando comparados a indivíduos saudáveis. (Liao et al., 2023) Lim e colaboradores analisaram 3428 indivíduos coreanos sem insuficiência renal e relataram que baixos níveis de creatinina possuem correlação com OA e com a sua gravidade. (Lim et al., 2024) Em nosso estudo, os ratos submetidos ao tratamento membrana sem gel foram aqueles que apresentaram menores valores de creatinina sérica. Esse resultado pode representar uma pior resposta da cartilagem ao estímulo regenerativo nesse grupo, mas deve ser analisado com cautela, uma vez que os animais também foram submetidos ao processo de lesão no joelho contralateral. Outro fator a ser considerado é a variabilidade intrínseca da colônia, uma vez que os valores, embora com diferença estatisticamente significativa encontram-se dentro dos limites de variabilidade da mesma.

O uso da cartilagem fragmentada é uma técnica descrita há mais de 40 anos e que, recentemente, vem sendo utilizada para o tratamento de lesões condrais em

humanos, com incisão mediana e artrotomia por via parapatelar medial com luxação da patela em sua segunda geração (Salzmann *et al.*, 2017). Em nosso modelo animal, utilizamos o mesmo acesso, que permite excelente visibilização da porção articular dos côndilos femorais com flexão de 30° do joelho, permitindo a confecção da lesão condral circunscrita, retirada de fragmentos da região troclear e preenchimento de pelo menos 75% da falha com fragmentos de cartilagem, transportando condrócitos com capacidade de proliferação tecidual para o local que objetivamos tratar.

Em relação à estabilidade mecânica necessária para que a regeneração tecidual da cartilagem possa ocorrer, diversos estudos apresentam bons resultados com a fixação dos fragmentos de cartilagem com cola de fibrina (Matsushita, 2019; Christensen, 2015; Marmotti, 2013), quando comparados com os controles. Entretanto, alguns resultados sugerem que a cola de fibrina teria efeitos negativos na migração celular e reparo tecidual. (Brittberg, 1997). No nosso modelo, realizamos a fixação dos fragmentos com suturas através da fásia ou da membrana de colágeno utilizada e verificamos uma boa resposta a nível celular. Esse resultado positivo é especialmente importante quando verificamos o alto custo e baixo acesso ao uso da cola de fibrina na prática clínica.

A associação da cartilagem fragmentada com gel atelocolágeno foi testada *in vitro* por Tsuyuguchi e colaboradores utilizando fragmentos obtidos de joelhos de mulheres com osteoartrose, em comparação com condrócitos isolados associados ao gel. Após 3 semanas de cultura, a proliferação celular e a produção de matriz, aferidas pela histologia e por imuno-histoquímica foram significativamente maiores no grupo cartilagem fragmentada, evidenciando maior expressão de células Ki67, leCt-1 e TGF- β e maior conteúdo de GAGs. (Tsuyuguchi *et al.*, 2021)

A membrana de colágeno (Chondro-Gide®, Geistlich®) vem mostrando resultados promissores. Em uma revisão sistemática, Ong e colaboradores analisaram 18 estudos com 490 pacientes submetidos a AMIC e constataram melhora clínica, radiológica e funcional dos pacientes quando comparados aos controles, concluindo que se trata de um procedimento seguro, eficaz e reprodutível. (Ong *et al.*, 2024). Alguns estudos relatam bons resultados, mesmo após sete anos do procedimento (Schiavone Panni *et al.*, 2017). No entanto, não há estudos analisando a regeneração da cartilagem a nível histológico com o uso da técnica, o que representa uma inovação do nosso modelo.

A membrana de colágeno associada ao HBC apresentou resultados promissores quando analisada na microscopia óptica e verificados os escores de Pineda e Wakitani, quando comparados aos controles e ao grupo que utilizou cartilagem fragmentada e HBC. Particular importância se encontrou na análise da regularidade da superfície articular nos animais que utilizaram a membrana.

Para analisar a resposta clínica dos tratamentos, a marcha é um dos principais parâmetros verificados nos estudos, pois permite traçar inferências em relação à dor dos animais. Malfait e colaboradores destacam que embora várias alterações da marcha se devam à perda de congruência articular, essas podem ser minimizadas por pequenas correções do eixo. (Malfait *et al.*, 2023). Em nosso estudo, alguns animais apresentaram limitação de apoio do membro inferior esquerdo na primeira semana pós-operatória, porém essa limitação não foi mantida, não se verificando claudicação em nenhum dos animais antes da eutanásia, resultado similar ao encontrado na literatura (Jacobs *et al.*, 2017; Lakes *et al.*, 2018).

Nossa análise da marcha foi realizada de forma subjetiva, visualizando a presença ou não de claudicação como parâmetro, o que traz algumas limitações, uma vez que em não realizamos mensurações da velocidade da marcha, bem como as forças envolvidas no contato com o solo. Chang e colaboradores destacam que animais com osteoartrite tem uma redução da carga vertical no membro operado, destacando esta como um dos principais parâmetros a serem analisados. (Chang *et al.*, 2024)

Alguns animais desenvolveram uma limitação da extensão do joelho direito (joelho-controle) na semana da eutanásia. Essa limitação pode ser explicada pelas alterações degenerativas na cartilagem articular secundária à lesão condral. Esses resultados são compatíveis com a literatura, validando nosso modelo animal. Makii e colaboradores analisaram amplitude de movimento e marcha em camundongos com osteoartrose induzida por lesão meniscal cirúrgica comparados com animais-controle e verificaram limitação da extensão dos joelhos, porém sem alterações no ciclo da marcha. (Makii *et al.*, 2018) Dixon e colaboradores encontraram resultados similares em humanos com osteoartrose dos joelhos comparados com os controles, correlacionando a diminuição da amplitude de movimento, predominantemente da extensão, com a gravidade da osteoartrose (Dixon *et al.*, 2010).

Após a eutanásia, ambos os joelhos dos animais dos grupos F2 e M2 foram retirados e enviados para análise histológica, sendo usado como corante Safranin-O/*fast green*.

Em nosso estudo, aplicamos os escores de Pineda e Wakitani, avaliando morfologia de condrócitos, coloração da matriz extracelular pela Safranina, percentual de preenchimento do defeito articular, reconstrução da junção osteocondral, análise da superfície e espessura da cartilagem e integração da neocartilagem nas bordas do defeito.

Ao dissecarmos os resultados de cada item dos escores utilizados, destaca-se uma superioridade marcante do grupo M2 quando avaliamos o percentual de preenchimento da falha e a regularidade da superfície articular. Esse resultado confirma uma melhor integração da membrana quando comparada à fásia. Matsushita (2019) já havia reportado melhor resultado da cartilagem fragmentada comparada aos controles em coelhos e com resultados semelhantes à ACI. A análise da membrana é um diferencial do nosso estudo, onde ela apresentou resultados ainda superiores ao uso da cartilagem fragmentada isolada.

A eletroforese dos glicosaminoglicanos (GAGs) urinários dos animais não apresentou diferenças significativas entre os grupos de tratamento e demonstrou que a excreção dos GAGs, principalmente CS e HS é aumentada na primeira semana após a cirurgia quando comparada à semana da eutanásia, o que reflete a alta taxa de *turnover* da matriz cartilaginosa. Achados similares foram descritos em equinos, sugerindo que essa excreção pode ser utilizada para diagnóstico e monitoramento da doença articular (Baccarin *et. al.*, 2012).

As principais limitações de nosso estudo encontram-se: na análise da excreção de GAGs, devido ao mesmo animal ser utilizado nos grupos controle e tratamento, dificultando a análise comparativa. Uma análise em diferentes animais como controle e tratamento poderia gerar um padrão mais fidedigno; na análise subjetiva da marcha, onde analisamos somente a presença ou não de claudicação sem uma análise de parâmetros objetivos e; na perda das amostras histológicas dos grupos F1 e M1, que não nos permitiram analisar a nível histológico o efeito do HBC na regeneração da cartilagem.

8 CONCLUSÃO

O modelo experimental de tratamento de lesões condrais se mostrou válido, com resultados reprodutíveis e compatíveis com a literatura e, nos permitirá testar novos tratamentos visando a recuperação da cartilagem.

O hidrogel e a membrana apresentaram em nosso estudo resultados promissores quando comparados aos demais grupos de tratamento.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOFF, B.; CALDERA, F. E. **Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. Medical Clinics of North America** W.B. Saunders, 1 mar. 2020.

ALBRECHT, F.; ROESSNER, A.; ZIMMERMANN, E. Closure of Osteochondral Lesions Using Chondral Fragments and Fibrin Adhesive **Arch Orthop Trauma Surg**. v. 101, p. 213-217, 1983

AMBROSE, K. R. et al. A public health approach to osteoarthritis in the United States. **Osteoarthritis and Cartilage** W.B. Saunders Ltd, 1 abr. 2024.

AURICH, M. et al. Induced Redifferentiation of Human Chondrocytes from Articular Cartilage Lesion in Alginate Bead Culture After Monolayer Dedifferentiation: An Alternative Cell Source for Cell-Based Therapies? **Tissue Engineering Part A**, v. 24, n. 3–4, p. 275–286, fev. 2018.

BACCARIN, R. Y. A. et al. Urinary glycosaminoglycans in horse osteoarthritis. Effects of chondroitin sulfate and glucosamine. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 88–96, ago. 2012.

BALAKRISHNAN, B.; BANERJEE, R. Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 8, p. 4453–4474, 10 ago. 2011.

BIJLSMA, J. W. J.; KNAHR, K. Strategies for the prevention and management of osteoarthritis of the hip and knee. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 1, p. 59–76, fev. 2007.

BOYCE, M. K. et al. Non-terminal animal model of post-traumatic osteoarthritis induced by acute joint injury. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 5, p. 746–755, maio 2013.

BRITTBURG, M. et al. Influence of fibrin sealant (Tisseel®) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. **Biomaterials**. v. 18, p. 235-242, 1997.

BRITTBURG, M. et al. Evaluation of Cartilage Injuries and Repair. **The Journal of Bone & Joint Surgery** v. 85(suppl_2), p 58-69, abril 2003.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J.; GRODZINSKY, A. J. Articular cartilage and osteoarthritis. **Instructional course lectures**, v. 54, p. 465–80, 2005.

CARBALLO, C. B. et al. **Basic Science of Articular Cartilage. Clinics in Sports Medicine** W.B. Saunders, 1 jul. 2017.

CAVALCANTI FILHO, M. M. DA C. et al. Atualização no diagnóstico e tratamento das lesões condrais do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, n. 47 (1), p. 12–20, 2012.

CHAN, K. M.; BOWE, M. T.; ALLEN, K. D. **Recommendations for the analysis of rodent gait data to evaluate osteoarthritis treatments. Osteoarthritis and Cartilage** W.B. Saunders Ltd, , 1 abr. 2023.

CHREMOS, A. et al. Prestressed Composite Polymer Gels as a Model of the Extracellular-Matrix of Cartilage. **Gels**, v. 8, n. 11, 1 nov. 2022.

CHRISTENSEN, B. B. et al. Autologous Dual-Tissue Transplantation for Osteochondral Repair: Early Clinical and Radiological Results. **Cartilage**, v. 6, n. 3, p. 166–173, 22 jul. 2015.

CHU, C. R.; SZCZODRY, M.; BRUNO, S. Animal models for cartilage regeneration and repair. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 16, n. 1, p. 105–15, fev. 2010.

CLEGG, D. O. et al. Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 8, p. 795–808, 23 fev. 2006.

CLEMENTS, K. M. et al. Cellular and histopathological changes in the infrapatellar fat pad in the monoiodoacetate model of osteoarthritis pain. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 6, p. 805–812, jun. 2009.

COHEN, J. Statistical Power Analysis. **Current Directions in Psychological Science**, v. 1, n. 3, p. 98–101, 1 jun. 1992.

COHEN, N. P.; FOSTER, R. J.; MOW, V. C. Composition and Dynamics of Articular Cartilage: Structure, Function, and Maintaining Healthy State. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 28, n. 4, p. 203–215, out. 1998.

DIETRICH, C. P.; MCDUFFIE, N. M.; SAMPAIO, L. O. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 130, p. 299–304, jan. 1977.

DIXON, S. J. et al. Knee joint stiffness during walking in knee osteoarthritis. **Arthritis Care and Research**, v. 62, n. 1, p. 38–44, 15 jan. 2010.

EVERHART, J. S. et al. Cost-efficacy of Knee Cartilage Defect Treatments in the United States. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 48, n. 1, p. 242–251, 30 jan. 2020.

FAROKHI, M. et al. **Silk fibroin scaffolds for common cartilage injuries: Possibilities for future clinical applications**. **European Polymer Journal**. Elsevier Ltd, 1 jun. 2019.

FERNÁNDEZ-PUENTE, P. et al. Identification of a panel of novel serum osteoarthritis biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 11, p. 5095–5101, 4 nov. 2011.

FERRETTI, M. et al. Controlled *in vivo* Degradation of Genipin Crosslinked Polyethylene Glycol Hydrogels within Osteochondral Defects. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 9, p. 2657–2663, set. 2006.

FLANIGAN, D. C. et al. Prevalence of Chondral Defects in Athletes' Knees. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 42, n. 10, p. 1795–1801, out. 2010.

FRANSEN, M. et al. The epidemiology of osteoarthritis in Asia. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 14, n. 2, p. 113–121, 25 maio 2011.

GABBI FILHO, J. P. A.; SOUSA, E. B. DE. Tratamento das lesões condrais no joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 58, n. 04, p. e551–e556, ago. 2023.

GAO, L. et al. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 47, n. 1, p. 222–231, 21 jan. 2019.

GIANNOUDIS, P.V. et. al.; Fracture healing: the diamond concept. **Injury**. v. 38, S4, p. 53-56, set 2007

GÓMEZ-ARISTIZÁBAL, A. et al. Synovial fluid monocyte/macrophage subsets and their correlation to patient-reported outcomes in osteoarthritic patients: A cohort study. **Arthritis Research and Therapy**, v. 21, n. 1, 18 jan. 2019.

GRIFFIN, T. M. et al. Diet-induced obesity differentially regulates behavioral, biomechanical, and molecular risk factors for osteoarthritis in mice. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 4, p. R130, 6 jul. 2010.

GUERMAZI, A. et al. Brief Report: Partial- and Full-Thickness Focal Cartilage Defects Contribute Equally to Development of New Cartilage Damage in Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. **Arthritis & Rheumatology**, v. 69, n. 3, p. 560–564, 27 mar. 2017.

HARRISON, T. C. et al. Mixed-Methods Study of Disability Self-Management in Mexican Americans with Osteoarthritis. **Nursing Research**, v. 73, n. 3, p. 203–215, 1 maio 2024.

HAWKING, S. **A brief history of time: from the Big Bang to Black Holes**. New York: Bantam Books, 1998.

HORKAY, F.; BASSER, P. J. Composite Hydrogel Model of Cartilage Predicts Its Load-Bearing Ability. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

HORKAY, F.; BASSER, P. J. Hydrogel composite mimics biological tissues. **Soft Matter** v.18, n.23, p.4414-4426, Jun 2022.

HUA, Y. et al. Fabrication of biphasic cartilage-bone integrated scaffolds based on tissue-specific photo-crosslinkable acellular matrix hydrogels. **Materials Today Bio**, v. 17, 15 dez. 2022.

HUANG, G. et al. Mendelian randomization to evaluate the causal relationship between liver enzymes and the risk of six specific bone and joint-related diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023.

JACOBS, B. Y. et al. Unique spatiotemporal and dynamic gait compensations in the rat monoiodoacetate injection and medial meniscus transection models of knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 5, p. 750–758, maio 2017.

JASIN, H. E. Structure and Function of the Articular Cartilage Surface. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 24, n. sup101, p. 51–55, 12 jan. 1995.

JIA SHYAN ONG, J.; FEN TAN, S.; KURIEN, T. A systematic review on Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC) for chondral knee defects. **The Knee**, v. 51, p. 102–113, dez. 2024.

JORDAN, J. M. et al. Ethnic and sex differences in serum levels of cartilage oligomeric matrix protein: The Johnston county osteoarthritis project. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 3, p. 675–681, 28 mar. 2003.

KNUDSON, C. B.; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 12, n. 2, p. 69–78, abr. 2001.

KRYCH, A. J. et al. Cartilage Injury in the Knee: Assessment and Treatment Options. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 28, n. 22, p. 914–922, 15 nov. 2020.

LAKES, E. H.; ALLEN, K. D. Quadrupedal rodent gait compensations in a low dose monoiodoacetate model of osteoarthritis. **Gait & Posture**, v. 63, p. 73–79, jun. 2018.

LI, Y. et al. Enhancing cartilage repair with optimized supramolecular hydrogel-based scaffold and pulsed electromagnetic field. **Bioactive Materials**, v. 22, p. 312–324, 1 abr. 2023.

LIAO, Z. et al. **Differential Metabolites in Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis**. **Nutrients** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 out. 2023.

LIM, C. W.; RYU, D. J.; SUH, Y. J. Association between Low Serum Creatinine Levels and Knee Osteoarthritis in Koreans without Renal Insufficiency. **Yonsei Medical Journal**, v. 65, n. 9, p. 519–526, 1 ago. 2024.

LIND, M. et al. Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG poly lactide scaffold: an in vivo study in goats. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 16, n. 7, p. 690–698, 17 jul. 2008.

LING, S. M. et al. Serum protein signatures detect early radiographic osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 1, p. 43–48, jan. 2009.

LITWIC, A. et al. Epidemiology and burden of osteoarthritis. **British Medical Bulletin**, v. 105, n. 1, p. 185–199, mar. 2013.

LU, Y. et al. Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 6, p. 1261–1270, jun. 2006.

LU, Z. et al. Collagen Type II Enhances Chondrogenesis in Adipose Tissue-Derived Stem Cells by Affecting Cell Shape. **Tissue Engineering**, v. 16, n.1, p.81-90, 2010.

MADRY, H.; LUYTEN, F. P.; FACCHINI, A. Biological aspects of early osteoarthritis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 20, n. 3, p. 407–422, 19 mar. 2012.

MAKII, Y. et al. Alteration of gait parameters in a mouse model of surgically induced knee osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 26, n. 2, 1 maio 2018.

MALFAIT, A. M.; LITTLE, C. B.; MCDUGALL, J. J. **A commentary on modelling osteoarthritis pain in small animals. Osteoarthritis and Cartilage**, set. 2013.

MAMACHAN, M. et al. Osteochondral defect creation in animal model with brad point drill bits - A preliminary study. **Journal of Orthopaedic Reports**, v. 2, n. 4, p. 100213, dez. 2023.

MANCINI, D.; FONTANA, A. Five-year results of arthroscopic techniques for the treatment of acetabular chondral lesions in femoroacetabular impingement. **International Orthopaedics**, v. 38, n. 10, p. 2057–2064, 1 out. 2014.

MARMOTTI, A. et al. Autologous cartilage fragments in a composite scaffold for one stage osteochondral repair in a goat model. **European Cells and Materials**, v. 26, p. 15–32, 2013.

MARTEL-PELLETIER, J. et al. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 351–384, abr. 2008.

MARTÍNEZ-PUIG, D. et al. **Collagen Supplementation for Joint Health: The Link between Composition and Scientific Knowledge. Nutrients** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 mar. 2023.

MATSUSHITA, R. et al. Repair of an Osteochondral Defect With Minced Cartilage Embedded in Atelocollagen Gel: A Rabbit Model. **American Journal of Sports Medicine**, v. 47, n. 9, p. 2216–2224, 1 jul. 2019.

MEDERAKE, M. et al. Reliability and Accuracy of the Outerbridge Classification in Staging of Cartilage Defects. **Orthopaedic Surgery**, v. 16, n. 5, p. 1187–1195, 1 maio 2024.

MICHELACCI, Y. M. et al. Possible role for chondroitin sulfate in urolithiasis: In vivo studies in an experimental model. **Clinica Chimica Acta**, v. 208, n. 1–2, p. 1–8, jun. 1992.

MICHELACCI, Y. M.; GLASHAN, R. Q.; SCHOR, N. Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects. **Kidney International**, v. 36, n. 6, p. 1022–1028, dez. 1989.

MICHELACCI, Y. M. et al. Chondrocyte Homeostasis and Differentiation Transcriptional Control and Signaling in Healthy and Osteoarthritic Conditions. **Life**. v. 13, 1460, jun. 2023

MONTGOMERY, S. R. et al. Trends in the surgical treatment of articular cartilage defects of the knee in the United States. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 22, n. 9, p. 2070–2075, 30 set. 2014.

NEHRER, S. et al. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. **Biomaterials**, v. 18, n. 11, p. 769–776, jun. 1997.

ORTH, P. et al. Small-Diameter Awls Improve Articular Cartilage Repair After Microfracture Treatment in a Translational Animal Model. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 1, p. 209–219, 6 jan. 2016.

ORTH, P.; MADRY, H. Complex and elementary histological scoring systems for articular cartilage repair. **Histology and Histopathology**, 1 ago. 2015.

OSAGO, H. et al. Complete solubilization of cartilage using the heat-stable protease thermolysin for comprehensive GAG analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 548, p. 115–118, maio 2018.

OSSENDORFF, R. et al. Biologic principles of minced cartilage implantation: a narrative review. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 143, n. 6, p. 3259–3269, 1 jun. 2023.

PINEDA, S. et al. A Semiquantitative Scale or Histologic Grading of Articular Cartilage Repair. **Cells Tissues Organs**, v. 143, n. 4, p. 335–340, 1992.

PIPINO, G. et al. Microfractures and hydrogel scaffolds in the treatment of osteochondral knee defects: A clinical and histological evaluation. **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, v. 10, n. 1, p. 67–75, 1 jan. 2019.

RIBOH, J. C. et al. Comparative efficacy of cartilage repair procedures in the knee: a network meta-analysis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 25, n. 12, p. 3786–3799, 7 dez. 2017.

RICHARDSON, D. W.; LOINAZ, R. An Evidence-Based Approach to Selected Joint Therapies in Horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, ago. 2007.

RUDERT, M. Histological Evaluation of Osteochondral Defects: Consideration of Animal Models with Emphasis on the Rabbit, Experimental Setup, Follow-Up and Applied Methods. **Cells Tissues Organs**, v. 171, n. 4, p. 229–240, 2002.

SADLIK, B. et al. All-Arthroscopic Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis-Aided Repair of a Patellar Cartilage Defect Using Dry Arthroscopy and a Retraction System. **The Journal of Knee Surgery**, v. 30, n. 09, p. 925–929, 10 nov. 2017.

SAKURAI, Y. et al. Contribution of synovial macrophages to rat advanced osteoarthritis pain resistant to cyclooxygenase inhibitors. **Pain**, v. 160, n. 4, p. 895–907, 2019.

SALZMANN, G. M.; CALEK, A. K.; PREISS, S. Second-Generation Autologous Minced Cartilage Repair Technique. **Arthroscopy Techniques**, v. 6, n. 1, p. e127–e131, 1 fev. 2017.

SAWKINS, M. J. et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7865–7873, 2013.

SCHIAVONE PANNI, A. et al. Good clinical results with autologous matrix-induced chondrogenesis (Amic) technique in large knee chondral defects. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, 21 mar. 2017.

SCHNEIDER, S. et al. Arthroscopic Minced Cartilage Implantation (MCI): A Technical Note. **Arthroscopy Techniques**, v. 10, n. 1, p. e97–e101, jan. 2021.

SCHREINER, A. J. et al. Clinical Application of the Basic Science of Articular Cartilage Pathology and Treatment. **Journal of Knee Surgery**, v. 33, n. 11, p. 1056–1068, 1 nov. 2020.

SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–7, mar. 2004.

SPAHN, G.; KLINGER, H. M.; HOFMANN, G. O. How valid is the arthroscopic diagnosis of cartilage lesions? Results of an opinion survey among highly

experienced arthroscopic surgeons. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 129, n. 8, p. 1117–1121, 15 ago. 2009.

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, nov. 2018.

SPILLER, K. L.; MAHER, S. A.; LOWMAN, A. M. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 17, n. 4, p. 281–299, ago. 2011.

THOTE, T. et al. Localized 3D analysis of cartilage composition and morphology in small animal models of joint degeneration. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 8, p. 1132–1141, ago. 2013.

TSUYUGUCHI, Y. et al. The Benefit of Minced Cartilage Over Isolated Chondrocytes in Atelocollagen Gel on Chondrocyte Proliferation and Migration. **Cartilage**, v. 12, n. 1, p. 93–101, 1 jan. 2021.

VEGA, S. L.; KWON, M. Y.; BURDICK, J. A. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. **European Cells and Materials**, v. 33, p. 59–75, 1 jan. 2017.

VENN, M. F. Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 38, n. 1, p. 57–62, 1 fev. 1979.

VINDAS BOLAÑOS, R. A. et al. The use of a cartilage decellularized matrix scaffold for the repair of osteochondral defects: the importance of long-term studies in a large animal model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 3, p. 413–420, 1 mar. 2017.

VISHWANATH, V.; PRAMANIK, K.; BISWAS, A. Optimization and evaluation of silk fibroin-chitosan freeze-dried porous scaffolds for cartilage tissue engineering application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 7, p. 657–674, 2 maio 2016.

WANG, M. et al. **Designing functional hyaluronic acid-based hydrogels for cartilage tissue engineering**. **Materials Today Bio**Elsevier B.V., , 15 dez. 2022.

WIDUCHOWSKI, W.; WIDUCHOWSKI, J.; TRZASKA, T. Articular cartilage defects: Study of 25,124 knee arthroscopies. **The Knee**, v. 14, n. 3, p. 177–182, jun. 2007.

WU, C. L. et al. **The role of macrophages in osteoarthritis and cartilage repair**. **Osteoarthritis and Cartilage**W.B. Saunders Ltd, , 1 maio 2020.

YU, X. et al. Anisotropic hydrogel fabricated by controlled diffusion as a bio-scaffold for the regeneration of cartilage injury. **RSC Advances**, v. 12, n. 43, p. 28254–28263, 6 out. 2022.

ZAKI, S.; SMITH, M. M.; LITTLE, C. B. Pathology-pain relationships in different osteoarthritis animal model phenotypes: it matters what you measure, when you measure, and how you got there. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 29, n. 10, p. 1448–1461, 1 out. 2021.

ZOUZIAS, I. C.; BUGBEE, W. D. Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 24, n. 2, p. 79–84, jun. 2016