

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Título: Terapia celular autóloga para lesões osteo-condrais : estudo em um modelo animal em coelhos

Matias Eliseo Melendez

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Co-orientador: Dr^a Ursula Matte

Porto Alegre – RS – Brasil

Dezembro de 2006

Agradecimentos

Finalmente, não posso deixar de agradecer a grande ajuda recebida pelo Dr. Renato Torres em todos os procedimentos cirúrgicos e nas produtivas discussões realizadas nesse trabalho. Também gostaria de agradecer ao pessoal da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Centro de Terapia Gênica do mesmo estabelecimento, onde foram realizadas as discussões iniciais e as culturas celulares.

Índice	
Capa	1
Agradecimentos	2
Instituição financiadora	5
Lista de abreviaturas	6
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Cartilagem articular	8
1.2. Osteoartrose	9
1.3. Terapia celular e Engenharia de tecidos	12
1.3.1. Transplante Autólogo de Condrócitos	13
1.3.2. Células Aderentes de Medula Óssea	14
1.3.3. Células Mononucleares de Medula Óssea	16
1.4. Modelo experimental de Lesão Osteo-condral	17
1.5. Justificativa e delineamento do trabalho	18
2. OBJETIVOS	19
3. CAPITULO I Artigo científico	20
Autologous cell transplantation in a rabbit model of osteoarthritis	21
Introduction	21
Material and methods	22
Animal model	22
Articular defect induction	23
Treatment groups	23
Cell isolation and culture	24
ABMC isolation and culture	24
BMMC isolation	25
Chondrocyte isolation and culture	25
Cell Transplantation	26
Histological analysis	27
Statistical analysis	28
Results	28
Animals	28

Chondrocyte culture	28
ABMC culture	28
Histologic analysis	29
Discussion	30
Conclusions	33
Acknowledgments	33
References	34
Tables	42
Table I - Primer sequences for expression assay in cultured Chondrocytes	42
Table II - Modified O’Driscoll Histologic Scoring Scale	42
Table III. Histomorphometric evaluation of the seven groups (mean±s.e.m.)	43
Table IV - Modified O’Driscoll Histologic Scoring	44
Figures	45
Figure 1. Chondrocyte and ABMC cell culture.	45
Figure 2. HE stained articular cartilage of UTD4 group.	45
Figure 3. Identification of BMMC transplanted into the osteochondral defect.	46
Figure 4. Histologic HE images of treatment groups.	46
4. Discussão	47
5. Conclusões	51
6. Referencias	52
7. Anexo I	65
Tabela I. Distribuição dos grupos experimentais	65

Instituição

Trabalho desenvolvido no Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Fonte financiadora

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – FIPE/HCPA

Bolsa convênio PEC-PG CAPES

Lista de abreviaturas

ABMC	Células Aderentes de Medula Óssea (<i>Adherent Bone Marrow Cells</i>)
ACLT	Transecção do ligamento cruzado anterior (<i>Anterior Cruciate Ligament Transection</i>)
ACT	Transplante Autólogo de Condrócitos (<i>Autologous Chondrocyte Transplantation</i>)
BMMC	Células Mononucleares de Medula Óssea (<i>Bone Marrow Mononuclear Cells</i>)
DAPI	4'-6-diamino-2-phenylindol
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hanks (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HE	Hematoxilina-Eosina
MSC	Células Tronco Mesenquimais (<i>Mesenchymal Stem Cells</i>)
OA	Osteoartrose
PBS	Solução Fisiológica Balanceada (<i>Physiological Balanced Solution</i>)

RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>)
UTD	Defeito Não-Tratado (Untreated Defect)
UTD4	Defeito Não-Tratado quatro semanas pós- lesão (<i>Untreated Defect Four Weeks Post-Lesion</i>)
UTD8	Defeito Não-Tratado oito semanas pós- lesão (<i>Untreated Defect Eight Weeks Post-Lesion</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cartilagem articular

As articulações são unidades funcionais que transmitem cargas mecânicas entre os ossos em contato durante atividades diárias normais ou especializadas, tais como esportes. Cada componente funcional e estrutural de uma articulação (cartilagem articular, osso, músculos, ligamentos/tendões e nervos) participa na transmissão das cargas aplicadas. Uma falha em qualquer um destes componentes pode produzir um mau funcionamento no complexo como um todo. Acredita-se que as mudanças estruturais iniciais acontecem quando a articulação recebe uma carga de impacto, que leva à lesão estrutural e à falha mecânica da cartilagem articular. O avanço progressivo do dano tissular depende das condições de carga da área de cartilagem lesada (Arokoski *et al*, 2000).

A cartilagem articular é a camada delgada de material deformável e amortecedor que delimita as extremidades ósseas das articulações diartrodias, protegendo-as contra o desgaste da carga repetitiva e da fricção associada ao movimento articular. Segundo Schmidt e colaboradores (2004), as principais funções da cartilagem articular são:

- suportar e distribuir as forças geradas durante a carga da articulação;
- estabilizar e guiar os movimentos da articulação;
- contribuir para a lubrificação da articulação.

A cartilagem articular está composta por uma matriz orgânica saturada de água. Essa fase aquosa constitui entre 65 a 85% do peso total do tecido, sendo importante no controle das suas propriedades físicas. Os componentes estruturais dominantes da matriz sólida são o colágeno e os proteoglicanos carregados negativamente. O colágeno, principalmente o tipo II, organiza-se para formar pequenas fibrilas e grandes fibras. A orientação e dimensão das fibras variam dependendo da profundidade da camada cartilaginosa (Bely, 1987).

Por outro lado, a cartilagem articular não possui vasos (sangüíneos ou linfáticos), estando isolada da circulação sistêmica. Isso faz com que o mecanismo comum de reparo

de lesões, através de infiltrado inflamatório ou migração celular, não aconteça quando a cartilagem articular é danificada (Buckwalter, 2002).

Os proteoglicanos da cartilagem articular são polímeros grandes constituídos por moléculas de agregação conhecidas como agreganos. Uma molécula de agregano simples está formada de um núcleo protéico e numerosas cadeias laterais de glicosaminoglicanos (anteriormente chamados de mucopolissacarídeos). A maioria das moléculas de agregano está unida a uma simples cadeia longa de ácido hialurônico, formando agregados grandes de proteoglicanos. Os proteoglicanos estão carregados negativamente pela presença de grupamentos carboxilas e sulfatos sobre os glicosaminoglicanos, conferindo carga negativa à matriz extracelular. Conseqüentemente, a cartilagem é altamente hidrofílica, com tendência a absorver fluido, mantendo o equilíbrio mecânico e químico regulado pelos condrócitos do próprio tecido. A zona mais profunda da cartilagem articular apresenta aspecto esclerosado (espongiforme), tendo assim propriedades químicas similares àquelas possuídas pelo tecido ósseo subcondral, possibilitando uma conexão firme entre o osso e a cartilagem (Bely, 1987).

1.2. Osteoartrose

A Osteoartrose (OA) se caracteriza por uma alteração da cartilagem articular, com degeneração de matriz extracelular, fibrilação, formação de fissuras, e por fim perda da superfície articular. O processo progressivo da OA afeta principalmente articulações envelhecidas. Outros tecidos articulares também são afetados, como o osso subcondral, ligamentos, cápsula articular, membrana sinovial, e músculos periarticulares (Murphy *et al*, 2003). Os defeitos da cartilagem articular ainda são um problema prático, especialmente em pacientes jovens.

A cartilagem articular exigida extensivamente durante os movimentos das articulações pode propiciar falhas, devido à fadiga, que levam à fragmentação e fibrilação da superfície articular. Na etapa tardia, a cartilagem torna-se completamente desgastada, expondo o osso subcondral e permitindo a formação de cistos subcondrais. Logo, o osso sofre uma hipertrofia através da proliferação de osteócitos periféricos, enquanto a membrana sinovial sofre hiperemia e achatamento devido à inflamação (Bely, 1987; Glasson *et al*, 2005).

Macroscopicamente, a degeneração da cartilagem é caracterizada por fibrilação da superfície articular, presença de fissuras e a perda parcial ou completa do tecido. Sintomas adicionais de OA incluem um aumento de hidratação da cartilagem; estreitamento do espaço articular; alterações, tanto na atividade celular quanto no osso subcondral; além de mudanças na estrutura e composição cartilaginosa (Setton *et al*, 1999).

Os fragmentos da cartilagem articular produzem sinovite; e as enzimas, liberadas durante o processo inflamatório aumentam ainda mais a destruição do tecido condróide. Devido ao dano nesse tecido, as superfícies das cartilagens articulares, dos ossos envolvidos na articulação, se tornam incongruentes (mecanicamente incompatíveis devido à falta de ajustamento das superfícies articulares). Dessa forma, as superfícies congruentes restantes (intacta) sofrem sobrecarga, aumentando ainda mais o dano articular (Bely, 1987). O enfraquecimento por redução de massa e a perda de elasticidade produzem a deformação da superfície articular. Desse modo, as principais alterações na OA afetam o amortecimento, estabilidade e lubrificação da cartilagem articular (Setton *et al*, 1999).

A OA manifesta-se clinicamente por dor, mobilidade limitada, e deformidade articular. A regeneração da cartilagem hialina lesionada não acontece espontaneamente (Arokoski *et al*, 2000; Brittberg *et al*, 1994; Buckwalter e Mow, 1992, Buckwalter e Lane, 1997; Buckwalter e Mankin, part I, 1997; Buckwalter e Mankin, part II, 1997; Buckwalter *et al*, 2000; Buckwalter, 2002; Buckwalter *et al*, 2002; Baltzer e Arnold, 2005).

Basicamente, a OA pode ser agrupada de acordo com Natarajan e Mayilvahanan (2002) da seguinte forma:

- OA primária, quando não existe patologia prévia identificada;
- OA secundária, quando é encontrada alguma patologia prévia.

A OA primária ou idiopática, geralmente acontece na idade adulta (principalmente em pessoas com mais de 60 anos de idade), e é devida ao desgaste mecânico normal ao longo da vida, assim como as lesões articulares. Nessa faixa etária, o quadril e os joelhos são as articulações mais comumente afetadas. A OA é menos freqüente em articulações que não sofrem sobrecarga como o ombro e o cotovelo. Deve-se considerar também a obesidade como um fator de predisposição para a OA (Litzke *et al*, 2004; Martin e Buckwalter, 2002).

Em jovens, a OA pós-traumática pode levar à incapacidade física. Os tratamentos ortopédicos utilizados em idosos (como a restrição do exercício físico e a utilização de implantes articulares) não são adequados para o desenvolvimento de uma vida social plena de um paciente jovem (Buckwalter e Brown, 2004).

A OA secundária é causada pelo desgaste anormal da articulação, podendo ser produzido por incongruência mecânica das superfícies articulares - como resultado de uma fratura ou doença anterior que tenha envolvido a superfície articular.

No que se refere ao joelho, segundo Natarajan e Mayilvahanan (2002), a OA secundária, pode ser desencadeada por vários tipos de lesões:

- 1) consolidação viciosa de fraturas envolvidas nas superfícies articulares da tíbia, fêmur ou a patela (nessa categoria se incluem as lesões osteo-condrais);
- 2) corpos articulares perdidos dentro da cápsula sinovial (advindos de osteocondrite ou de trauma);
- 3) alinhamento anômalo dos ossos devido a deformidades como *genu valgum* ou *genu varum* (osteoartrose mecânica).

Os defeitos osteocondrais avançam em profundidade na superfície articular, chegando até o osso subcondral vascularizado. Raramente pode ser observado um reparo espontâneo, pela invasão de Células Tronco Mesenquimais Condroprogenitoras (cpMSC) ao sítio da lesão. Essas células se diferenciam posteriormente em condrócitos e regeneram a cartilagem articular. Contudo, o reparo desses defeitos não reproduz a arquitetura da cartilagem hialina original. O tecido de cicatrização resultante possui natureza fibrosa, tornando-o mais vulnerável aos radicais livres, metaloproteinases e citocinas catabólicas do processo inflamatório (Martin *et al*, 2004). Dessa forma, torna-se evidente que a cartilagem articular possui uma capacidade limitada de auto-regeneração após lesão (Ochi *et al*, 2004).

Quando a cartilagem hialina representa o único tecido envolvido na lesão, nenhuma dor é observada diretamente pela falta de inervação desse tecido. Isso promove a demora no diagnóstico precoce da doença, aumentando o risco para desenvolvimento de osteoartrite (Buckwalter e Mankin, 1997).

Uma vez apresentadas as dificuldades de auto-reparação, e levando em consideração que o tratamento terapêutico tradicional (como microfratura, enxertos de tecido mole, enxertos osteocondrais e osteotomia total ou parcial) não reproduz nem a arquitetura tissular original, nem a funcionalidade, a introdução de terapias alternativas é de vital importância na OA (Ochi *et al*, 2004; Mithöfer *et al*, 2005).

Várias abordagens de tratamento (condrectomia (Vachon *et al*, 1992), perfuração (Mitchell e Shepard, 1976), raspagem da cartilagem (Ogilvie-Harris e Jackson, 1984), artroplastia (Johnson, 1986), transplante autólogo (Britterberg *et al*, 1996) ou alogênico (Wakitani *et al*, 1989) de condrócitos, periósteo (O’Driscoll *et al*, 1986), assim como enxerto de cartilagem e de osso (Beaver *et al*, 1992) tem sido aplicadas para a degeneração da cartilagem articular, mas elas estão longe de ser satisfatórias. Portanto, existe um grande desafio para os cirurgiões clínicos para reparar defeitos grandes e de espessura total da cartilagem articular

1.3. Terapia celular e Engenharia de tecidos

A ausência de vasos sanguíneos faz com que lesões na cartilagem articular não sejam reparadas espontaneamente, o qual é ainda dificultado pela baixa taxa de mitose dos condrócitos

A engenharia de tecidos tem sido amplamente investigada para reparo de defeitos da cartilagem articular. Alguns problemas surgem pelo pequeno tamanho das biópsias de tecido de cartilagem e pela difícil expansão dos condrócitos em cultura (Guo *et al*, 2004).

O transplante de células cultivadas oferece outro método para introduzir uma nova população celular nos defeitos condrais e osteocondrais. Alguns trabalhos científicos demonstram que os condrócitos e as células mesenquimais indiferenciadas colocadas em defeitos na cartilagem articular sobrevivem e produzem em um novo tecido similar ao hialino (Buckwalter, 2002; Wakitani *et al*, 1989; Buckwalter e Martin, 1995; Wakitani *et al*, 1988; Wakitani *et al*, 1994). Esse tipo de engenharia tissular *in situ* é utilizada para compensar a deficiência em número ou função das células progenitoras (Muschler *et al*, 2004; Arosarena, 2005).

1.3.1. Transplante Autólogo de Condrócitos

Uma das primeiras abordagens para o reparo da cartilagem articular, e a única terapia celular para osteoartrose aprovada pelo FDA (Federal Register, 1995) para uso clínico, desde julho de 1995, é o transplante autólogo de condrocitos (Litzke *et al*, 2004).

Nessa terapia, condrocitos são isolados de biópsias de cartilagem de regiões de baixa carga da articulação. O procedimento de extração de biópsia articular é por si mesmo um procedimento invasivo que produz um dano adicional à articulação, motivo pelo qual deve ser o mais restringido possível (Benz *et al*, 2002).

Uma vez extraída a biópsia, os condrocitos são liberados da matriz extracelular do tecido através de digestão enzimática e colocados em cultura para expansão celular. Por último, essas células são transplantadas em defeitos focais da cartilagem para aumentar a capacidade de regeneração da cartilagem articular (Peterson *et al*, 2000).

Em 1994, Brittberg *et al* relataram a implantação de condrocitos autólogos para tratar defeitos articulares em humanos. Nesse trabalho, condrocitos autólogos em suspensão foram transplantados em uma lesão osteocondral e revestida com uma camada de periósteo.

O transplante autólogo de condrocitos (ACT) tem sido relatado em modelos de experimentação animal de pequeno porte. Condrocitos autólogos, expandidos previamente em cultura celular, foram transplantados em coelhos de 2-3 semanas, em uma lesão de patela. O transplante celular reconstituiu a cartilagem articular da lesão, com tecido histologicamente similar à cartilagem articular hialina. Nesse trabalho, os condrocitos transplantados foram mantidos no local da lesão com uma camada de periósteo, evitando que células tronco autólogas em circulação não transplantadas atingissem a lesão (Brittberg *et al*, 1996).

Em um estudo com cavalos, Litzke e colaboradores (2004), dividiram o transplante de condrocitos em três etapas:

1. Etapa de artrotomia: um disco de 10 mm de diâmetro de profundidade completa foi retirado de uma região de carga da articulação tíbio-tarsal.

2. Etapa de proliferação em cultura: os condrócitos foram isolados enzimaticamente da cartilagem removida e expandidos em cultura durante 2-4 semanas com soro autólogo.

3. Etapa de transplante celular: uma segunda artrotomia foi realizada de maneira idêntica à primeira, na extremidade contralateral. Uma camada de periósteo foi retirada da metáfise lateral distal e suturada ao redor da cartilagem normal. Após esse procedimento, foram injetados condrócitos autólogos dentro da lesão.

No entanto, os condrócitos, quando cultivados em monocamada, perdem o seu fenótipo. Para solucionar isso, foram desenvolvidos protocolos de cultura sobre matrizes tridimensionais, baseadas em géis de agarose, colágeno e alginato (Tallheden *et al*, 2005; Izumi *et al*, 2000). Contudo, sabe-se que essa desdiferenciação é temporária, pois uma vez submetidos ao estímulo adequado em cultura tridimensional, essas células voltaram a apresentar o fenótipo de condrócitos diferenciados (Benya e Shaffer, 1982).

As desvantagens dessa técnica incluem, além da morbidade da biópsia de cartilagem, cultura *in vitro* prolongada com alta probabilidade de infecções na mesma, características de crescimento variável na cultura primária de condrócitos e o elevado preço da terapia (Minas e Nehrer, 1997). Inclusive, a sutura do periósteo usualmente afeta a cartilagem articular adjacente (Breinan *et al*, 1997).

1.3.2. Células Aderentes de Medula Óssea

O primeiro isolamento bem sucedido de colônias fibroblasto-*like* de medula óssea foi descrito há 4 décadas por Friedenstein e colaboradores (1970). O método de isolamento foi baseado na propriedade de aderência das células fibroblasto-*like* derivadas da medula ao substrato plástico da placa de cultura celular, e à ausência de aderência das células hematopoiéticas derivadas da medula. Ainda hoje em dia, o procedimento de Friedenstein é considerado um protocolo padrão para isolar células tronco mesenquimais de medula óssea (Alhadlaq e Mao, 2003; Thomson *et al*, 1993; Meirelles e Nardi, 2003).

As células mesenquimais de medula óssea, pós-natal e adulta, são chamadas atualmente de Células Tronco Mesenquimais ou MSC (Mesenchymal Stem Cells), mas como no presente trabalho não foi feito nenhum estudo de diferenciação celular *in vitro*, essas células serão chamadas de Células Aderentes de Medula Óssea (ABMC na introdução e

ABMC no artigo). Essas células sofrem redução em número no decorrer do envelhecimento. Por exemplo, a frequência apresentada em recém-nascidos é de 1×10^6 , e decai para 5×10^5 MSC em pessoas na faixa etária de 80 anos. Essas células, quando transplantadas em tecidos danificados, atuam como uma fonte celular autóloga com o potencial de diferenciação, sendo uma alternativa terapêutica para melhorar a resposta articular ao dano (Fibbe, 2002) (Jorgensen *et al*, 2001; Wakitani e Yamamoto, 2002).

O potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais das ABMC tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo*, incluindo osso (Bruder *et al*, 1997; Bruder *et al*, 1988), cartilagem (Kadiyala, 1997; Wakitani *et al*, 1994), tendão (Young *et al*, 1988; Awad *et al*, 1999), músculo (Ferrari *et al*, 1998; Galmiche *et al*, 1993) e tecido adiposo (Dennis *et al*, 1999; Prockop, 1997).

As ABMC com potencial condrogênico podem ser isoladas a partir de vários tecidos, incluindo periósteo, músculo esquelético, tecido adiposo, neural e hepático, medula óssea e membrana sinovial (Fibbe, 2002; Barry, 2003). Inclusive, o uso de ABMC foi descrito para defeitos articulares (Ponticiello *et al*, 2000; Solchaga *et al*, 2002) e de tendão (Young *et al*, 1998).

A injeção intraarticular de ABMC, como uma suspensão livre, depois de uma lesão traumática é capaz de reparar a cartilagem e os meniscos danificados (Murphy *et al*, 2003).

Nas lesões osteo-condrais, as células tronco possuem capacidade proliferativa e de diferenciação reduzidas. O transplante celular local ou sistêmico pode aumentar o reparo ou inibir a perda progressiva do tecido articular. No entanto, as metodologias terapêuticas ainda precisam ser aprimoradas, para que o tecido regenerado possua as propriedades mecânicas restabelecidas (Jorgensen *et al*, 2001).

As células isoladas da medula óssea podem ser expandidas em cultura, mantendo a sua capacidade de diferenciação, quando submetidas a estímulos adequados. Assim, segundo Ochi e colaboradores (2004) e Lee e colaboradores (2004), as células tronco mesenquimais são células promissoras para o tratamento terapêutico das lesões osteo-condrais.

As vantagens apresentadas pelas ABMC, quando comparadas com os condrócitos diferenciados, demonstram que essas possuem uma maior capacidade proliferativa, dependendo das características do meio em que se encontram (Lee *et al*, 2004).

As ABMC têm sido utilizadas *in vivo* para reparar a cartilagem em modelos animais. Caplan e colaboradores (1997) demonstraram em coelhos, a regeneração de uma lesão na cartilagem articular no côndilo femoral, quatro semanas após transplante de ABMC. Entretanto, o tecido regenerado estava composto por uma matriz de colágeno tipo I, altamente hidratado, que não reproduzia a função mecânica original da articulação.

As limitações com as células tronco adultas incluem a falta de marcadores para sua caracterização e a sua baixa concentração. Éstima-se que uma de cada 20000 a uma em 100000 células nucleadas de medula óssea seja uma célula estromal mesenquimal, representando 0,001%-0,01% de células nucleadas (Arosarena, 2005; Barry, 2003; Bonab *et al*, 2006).

Em um estudo de Wakitani e Yamamoto (2002), ABMC autólogas (expandidas em cultura) foram transplantadas no joelho de doze pacientes, durante o procedimento de osteotomia tibial padrão. As MSC injetadas nesses pacientes foram recobertas com periósteo autólogo (fina camada de tecido conjuntivo que recobre os ossos do corpo). Quando comparados com o grupo controle (pacientes cuja lesão foi coberta apenas com periósteo autólogo, sem transplante celular), os pacientes tratados com ABMC possuíram uma pontuação melhor na análise artroscópica e histológica, apesar de não ter sido observada uma melhora clínica estatisticamente significativa entre ambos os grupos.

De maneira similar, Ponticiello e colaboradores (2000) demonstraram que matrizes carregadas com ABMC e implantadas em uma lesão osteocondral no côndilo femoral médio originou células de cartilagem e ósseas.

1.3.3. Células Mononucleares de Medula Óssea

O componente celular da medula óssea representa uma população heterogênea que inclui células retículo-endoteliais, fibroblastos, adipócitos e precursores osteogênicos.

As células mononucleares de medula óssea (BMMC) estão sendo usadas amplamente em estudos clínicos de infarto de miocárdio (Meluzin *et al*; 2006; Beeres *et al*, 2006; Mendonça *et al*, 2006) e lesão da medula espinal (Urdzikova *et al*, 2006), entre outros, mas nenhum estudo tem sido relatado para osteoartrose com essas células.

1.4. Modelo experimental de Osteoartrose

Os esforços para produzir modelos animais de OA que mimetizem a doença humana originaram dois modelos: químico e cirúrgico. O modelo químico envolve a injeção intra-articular de compostos que possuem vários efeitos na fisiologia da articulação, incluindo a inibição do metabolismo dos condrócitos com papaína ou iodoacetato, dano de ligamentos e tendões com colagenase, ou denervação seletiva da articulação com imunotoxinas. Por outro lado, o modelo cirúrgico induz instabilidade da articulação por meniscotomia parcial, usualmente em combinação com transecção dos ligamentos cruzados ou colaterais, ou miectomia (Pomonis *et al*, 2005).

Nos modelos de lesão em ligamentos ou meniscos, a inibição destes tecidos de atenuação do peso altera a magnitude e distribuição das forças aplicadas à articulação. Acredita-se que a instabilidade mecânica é o fator primário de início e progresso da degeneração da cartilagem na OA humana. O modelo de OA por transecção do ligamento cruzado anterior (ACLT) tem sido o mais empregado no estudo das alterações degenerativas da cartilagem articular (Spriet *et al*, 2005).

O nosso modelo experimental é uma adaptação da técnica descrita por Brittberg e colaboradores (1994) e se encontra descrito na seção Material and Methods do artigo. Brevemente podem-se destacar algumas diferenças claras entre os dois modelos:

- A principal diferença é a eliminação da sutura do periósteo na cartilagem articular, pois isso era física e tecnicamente impossível para nós. A camada de cartilagem articular presente no joelho dos coelhos é muito delgada para praticar uma sutura nas condições cirúrgicas que possuíamos. Isto requer um treinamento importante e uma técnica cirúrgica muito aprimorada. Ao invés de fixação por sutura do periósteo, introduzimos o uso de uma cola sintética biocompatível, o cianoacrilato de etila, melhor conhecido no Brasil pelo seu nome comercial, Super Bonder®.
- A segunda diferença importante entre os protocolos, é que no modelo experimental de Brittberg e colaboradores (1994) as células são transplantadas na cartilagem articular, depois de ser feita a fixação do periósteo à cartilagem. Por motivos práticos, nós transplantamos as células antes da fixação do periósteo.

Depois de realizado o transplante o periósteo foi colocado em posição e aderido à cartilagem articular.

- Em linhas gerais, o restante do nosso procedimento seguiu as diretrizes do protocolo original descrito por Britberg e colaboradores (1994).

1.5. Justificativa e delineamento do trabalho

O delineamento do trabalho se justifica para evitar a evolução natural de uma lesão osteo-condral em uma alteração degenerativa que propicia o aparecimento de osteoartrose articular. Nesse sentido, no presente estudo comparamos o efeito de diferentes células autólogas (condrócitos, células aderentes de medula óssea e células mononucleares de medula óssea) no tratamento de um defeito articular induzido em um modelo de coelho adulto. Defeitos de profundidade total foram criados, ultrapassando a cartilagem calcificada, no côndilo medial do fêmur. As células foram transplantadas *in situ* de maneira autóloga. Um fragmento de periósteo foi aderido sobre as células transplantadas com o uso de Cianocrilato de Etila. Os defeitos tratados foram comparados com grupos não tratados. Avaliações quantitativas histomorfológicas foram feitas para estimar o nível de reparo tissular. A distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais está resumido no Anexo I.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar a possibilidade de reparo, através de terapia celular autóloga, de lesão induzida na cartilagem articular do joelho de coelhos.

Objetivos específicos:

1. Padronizar a lesão articular cirúrgica em coelhos através do uso de microfuradeira odontológica.
2. Padronizar o isolamento e cultura de condrócitos e células mononucleares de coelhos no Centro de Pesquisas do HCPA
3. Comparar, através de análise histológica e histomorfometria, o grau de reparo articular utilizando transplante autólogo de células mononucleares de medula óssea, células aderentes de medula óssea e condrócitos cultivados, de forma isolada ou em conjunto.

CAPITULO I

Artigo científico em fase de preparação. Será submetido a revista científica Stem Cells da Editorial AlphaMed Press. A formatação se encontra de acordo com as especificações desta revista.

Autologous cell transplantation in a rabbit model of osteochondral defect

Matias E Melendez, Renato Torres, Paulo Lompa, Patrícia LC Lopez, Carolina Uribe,
Guilherme Baldo, Ursula Matte, Roberto Giugliani

Abstract

Acute and repetitive joint overload or trauma can damage articular surfaces causing pain, joint dysfunction, and effusions. In some instances, this articular surface damage leads to progressive joint degeneration or even osteoarthritis. Osteochondral defects stimulates chondral and bony repair, but it rarely restores an articular surface that duplicates the normal articular cartilage properties. Current therapeutic procedures for articular cartilage injuries and degeneration have resulted in hyaline-like repair tissue, but does not approximate the durability and function of the normal articular surface. In that way, the objective of our study was to evaluate the behavior of rabbit chondrocytes, bone marrow mononuclear cells (BMMC), adherent bone marrow cells (ABMC) transplantations and the co-transplantation of chondrocyte with BMMC and chondrocyte with ABMC. Cells were injected into the osteochondral defect. The defect was covered with a periosteal flap taken from the proximal medial tibia and adhered with ethil cyanocrylate at the adjacent healthy articular cartilage. Four weeks after cell transplantation animals were sacrificed. Evaluation included histological examination according to explicit criteria and posterior photographs analysis. Chondrocyte transplantation did not regenerate the subchondral bone, but did regenerate the cartilage articular fulfilling the defect with hyaline cartilage. Co-cultured groups had a poorer osteochondral repair. When using ABMC and BMMC, defects were mainly regenerated with hyaline-like cartilage and subchondral bone. Ethil Cyanoacrylate had a good outcome in sealing the osteochondral defect. Our results suggest that the use of ABMC or BMMC can reduce the rate of degeneration in our model.

Introduction

Joints are functional units that transmit mechanical loads between contacting bones during normal daily or specialized activities, such as sports. Each structural and functional component of joint (articular cartilage, bone, muscles, ligaments/tendons and nerves) participate in load transmission. Failure in any of these components can cause joint malfunction. It is thought that the initial structural changes take place when joints receive an impact loading, which leads to structural damage and mechanical failure of articular cartilage. Further advancement of the tissue damage depends on the loading conditions of the injured cartilage area¹.

Normal hyaline cartilage covers and protects articulating surfaces against the damaging effect of decades of repetitive load and friction associated with joint movement². Articular cartilage defects are still a practical problem, especially in younger patients³, since once damaged, hyaline cartilage does not regenerate⁹⁻¹².

Osteoarthritis (OA) is described as a generally progressive loss of articular cartilage accompanied by attempted repair of the cartilage, remodeling, and sclerosis of subchondral bone, and, in many instances, the formation of subchondral bone cysts and osteophytes. Osteochondral lesions are manifested clinically by pain, limited mobility, and joint deformity.^{1, 3-9}

When the hyaline cartilage is the only tissue affected, no pain is directly observed, because it lacks innervation. This absence of early diagnosis may be an important risk factor for development of osteoarthritis⁶. Occupational repetitive use of knee, possibly coupled with heavy lifting and knee bending also may participate in OA^{1, 13, 14}. Sports demanding repetitive high levels of impact and torsional loading, also increase the risk of articular cartilage degeneration and the resulting clinical syndrome of OA^{4, 6, 15}. Chondral and osteochondral lesions are both common after trauma^{3, 16}.

Several treatment approaches (chondroectomy¹⁷, drilling¹⁸, cartilage scraping¹⁹, arthroplasty²⁰, transplantation of autogeneic²¹ or allogeneic chondrocytes²², periosteum²³, as well as cartilage and bone flap²⁴) have been applied for articular cartilage degeneration, but it is still a great challenge for clinical surgeons to repair large, full-thickness defects of articular cartilage¹⁵.

Transplantation of cultured cell provides another method of introducing a new cell population to repair chondral and osteochondral defects. Experimental work has shown that chondrocytes and undifferentiated mesenchymal cells placed in articular cartilage defects survive and produce a new hyaline-like tissue^{4, 22, 25-27}. This type of in-situ tissue engineering is designed to compensate for a deficiency in the number or function of progenitor cells²⁸⁻²⁹.

The objective of the present study was to compare the effect of different autologous cells (chondrocytes, adherent bone marrow cells and mononuclear bone marrow cells) on healing of an induced articular defect in an adult rabbit model. Full-thickness defects were created down to the zone of calcified cartilage in the femur medial condyle and autologous cells were transplanted *in situ*. A periosteal flap was adhered over transplanted cells by the use of Ethyl-Cyanoacrylate. The treated defects were compared with the untreated ones. Quantitative histomorphometry was used to evaluate the level of tissue repair within the lesions.

Material and methods

Animal model

Fifteen male adult New Zealand White rabbits (3-month-old), weighing on average 2,500 g were used for the investigation. All operations were developed with the animals under general or local anesthesia under complete sterile procedures. General anesthesia was achieved by intramuscular administration of 7.5 mg/kg of Ketamine (Dopalen Vetrands®) and 1.5 mg/kg of Xylazine (Anasedan Vetrands®) and local anesthesia with Lidocain 2%. The animals received 0.15 mL of Flotril 10% 5 (Schering-Plough) one day pre-operation and two days post-operation. After the procedures, rabbits were allowed free activity in the cages. They received, daily, 1 mL of oral morphine, during 14 days post-operation. Animals were housed and cared in the Animal Experimentation Unit of the Hospital Clinical de Porto Alegre, Brazil (surgeries were also performed in the same Unit). The study protocol was reviewed and approved by the Research Ethical Committee of the Hospital Clinical de Porto Alegre, Brazil.

Articular defect induction

After skin trichotomy, the knee joint was incised through a 2 cm medial longitudinal parapatellar incision. Knee joint was exposed through arthrotomy and lateral dislocation of the patella, followed by a 90° knee flexion to expose the weight-bearing area of the medial femoral condyle. Full-thickness articular cartilage defect, with 3 mm in both diameter and depth, were created on a load-bearing surface of the medial condyle of the femur,

bilaterally, four weeks before cell transplantation. The center of the defect was in the middle portion of the medial femoral condyle^{3, 30, 31}.

There was no intraoperative bleeding from the subchondral bone. The patellar tendon was reduced, and the skin was closed. Wound closure was performed in layers. Joint capsule were closed with 4-0 Vicryl (Ethicon®) and skin with 4-0 mononylon (Ethicon ®).

Treatment groups

We generated 30 defects in 15 rabbits, that were analyzed after 8 weeks. For the animals treated with cell transplantation, a second surgery was performed 4 weeks after the lesion has been generated, as described below. All treated animals received 3×10^5 cells in a final volume of 50 μ L of DMEM-F12. In all cases, cells were stained with 4'-6-diamino-2-phenylindol (DAPI)³² (Invitrogen), previous to transplantation, for posterior identification.

Animals were divided into six groups:

Untreated defects (UTD): In 6 animals, one of the lesions were left untreated. Three animals had a 4 weeks lesion (UTD4) and other 3 animals had an 8 weeks lesion (UTD8). Wounds were closed as previously described and subject to no further manipulation.

Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMC): In the same animals described above (and in both legs of another one), condyle defects were treated with mononuclear cells from bone marrow.

Adherent Bone Marrow Cells (ABMC): Two animals received ABMC on both limbs.

Autologous Chondrocyte Transplantation (ACT): Two animals received ABMC on both limbs.

Chondrocyte/BMMC co-transplantation (ACT/BMMC): Two animals received $1,5 \times 10^5$ chondrocytes mixed with $1,5 \times 10^5$ BMMC in both limbs.

Chondrocyte/ABMC co-transplantation (ACT/ABMC): Two animals received $1,5 \times 10^5$ chondrocytes mixed with $1,5 \times 10^5$ ABMC in both limbs.

Cell isolation and culture

ABMC isolation and culture

During the articular defect induction procedure, described above, an inter-condylar perforation in the left operated knee was performed, followed by a medullar bone marrow aspiration. ABMC were isolated and cultured based in a previous work³³. Briefly, two mL of heparinized blood from bone marrow were aspirated with 5 mL syringe and diluted with an equal volume of PBS. Then, the mononuclear cells were isolated from the collected samples by the Ficoll density gradient method. Cells at the interface were collected and washed 3 times in PBS. After washing, cells were resuspended in DMEM-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (all from Gibco). All the isolated cells were plated in a 25 cm² flask at a density of at least 2.5×10^6 cells/mL for primary culture. Flasks were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and fed by complete medium replacement every 4 days. When fibroblast-like cells at the base of the flask reached more than 90% confluence, adherent cells were detached using 0.25% trypsin EDTA and passaged in a 1:2 ratio. A median of two (range 1-3) passages were sufficient to obtain the required amount of cells for transplantation.

BMMC isolation

Cells were isolated as described for the ABMC group, but without cell culturing. After isolation was performed, cells were resuspended in DMEM-12 medium without serum at a concentration of 3×10^5 cells/ μ L in a total volume of 50 μ L. Cells were stained with DAPI for the future identification of the transplanted cells. Cells were immediately transplanted into the chronic articular defects.

Chondrocyte isolation and culture

During the articular defect induction procedure, described above, a small fragment of cartilage was removed from the intercondylar region of the femur and rinsed in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) for posterior isolation of chondrocytes. The chondrocyte isolation and culture was performed based in the work of Dorotka³⁴. Briefly, the removed cartilage fragment was dissected under sterile conditions and minced into 1-mm² pieces. Then, the chondrocytes were isolated by enzymatic digestion of the extracellular matrix by incubating the cartilage pieces in a 0.20% solution of collagenase II (12 hours incubation maintained in a humidified atmosphere at 5% CO₂ and 37°C). After enzymatic digestion, isolated cells were centrifuged for 10 minutes at 800 rpm and plated in a six-well plate with Ham-F12 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Culture medium was changed twice weekly. Confluent chondrocyte cell cultures were trypsinized with 0.05% trypsin and replated in 25 cm² flasks. All experiments used chondrocytes that were less than passage 4. All cultures were maintained in a humidified atmosphere consisting of 5% CO₂ at 37°C. Three weeks after isolation, an expression assay for Collagen I, Collagen II, and Aggrecan through Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed. Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) and amplified with SuperScript OneStep RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen). For both protocols the manufacturer specifications were followed. GAPDH amplification was used as internal control. Primer sequences were taken from Sakay *et al*³⁵ and are described in Table I.

Cell Transplantation

In all groups, except UTD4 and UTD8 which received no cells, the autologous cell transplantation procedure used was exactly the same. Cell transplantation autologous technique is an adaptation from the Autologous Chondrocyte Transplantation protocol (ACT) published by Britberg *et al*³. Briefly, cell transplantation took place four weeks after the first surgery (articular defect induction). Cultured cells were detached from plates by trypsinization (0.05% trypsin) followed by three medium washes and cell pellet centrifugation. After the last centrifugation, the cell suspension was stained with DAPI and

aspirated into a 1-mL tuberculin syringe with a 1.2-mm needle. The final volume of the cell suspension was 50 μ L (medium without supplementation), with a total of 3×10^5 cells. For groups BMMC and ACT/BMMC, BMMC were prepared as described above, without culture.

With animals under general and local anesthesia, a new medial parapatellar arthrotomy was performed, followed by a lateral dislocation of the patella and a 90° knee flexion to expose the induced lesion area of the medial femoral condyle. Induced osteochondral lesion was excised up to the normal surrounding cartilage. After complete removing of the fibrocartilage scar tissue produced in the osteochondral induced lesion, the cell suspension was dropped into the defect.

Periosteum was obtained from the proximal part of the tibia, and a 1 cm² periosteal flap, with the cambium layer facing the base of the defect, was placed over the lesion covering and protecting the cell suspension. The periosteal flap was adhered with Ethil Cyanoacrylate (Super Bonder®) to the articular cartilage surrounding the defect (no suture was achieved). The joint capsule and skin were carefully sutured in separate layers, as previously described.

Histological analysis

Rabbits were euthanized four weeks after cell transplantation with an intracardiac injection of 4 mL of xylocaine 2% solution under general anesthesia, until cardiac arrest was achieved. The distal femur was removed and placed in 10% neutral buffered formalin. After fixation, samples were subsequently placed in a decalcification solution for 2–4 days at room temperature. The decalcified specimens were embedded in paraffin and microtomed to 4-mm thick slices. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). Some periosteal flaps were also embedded in paraffin, microtomed to 4-mm thick slices and HE stained. Light microscopy was performed on a BX41 Olympus microscope. The histomorphometric evaluation was carried out with the software program Corel PhotoPaint 11. Filling of the defect was determined in terms of the percentage area of reparative tissue

in the defect, based on a coronary plane through the center of the lesion. The specific tissue types of the filling of the original defect area were converted into area percentages³⁴.

Grading was performed at a 4X magnification. The area of the defect was calculated as a rectangle of the base, which was equal to the distance between both adjacent healthy edges of the defect, and the height, which was equal to the subchondral bone alterations observed. The height was recorded at a distance from the margins in this standard manner to reflect the original height of the defect³⁶.

The area of each specific type of tissue within the defect was measured by counting the number of pixels containing that specific tissue type. Dividing the area of the specific type of tissue (in pixels) by the total area of the defect (in pixels) yielded an area percentage³⁶.

The degree and quality of cartilage repair was assessed histologically and scored in a blind manner with a grading system modified from O'Driscoll *et al*²³ and Frenkel³¹ (Table II). The reliability of the scoring system has been demonstrated in recent studies^{34, 37-38}. Maximum score was 16 points. All results represent the means and standard deviations of their respective groups.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using analysis of variance (oneway analysis of variance comparing scores between groups). Post hoc tests were performed by using the Tukey multiple comparison test with $p < 0.05$ considered significant³¹.

Results

Animals

No animal died during both surgery interventions, but three animals died spontaneously postoperative, few days after articular defect induction surgery without any apparent reason. Those animals were not included in the histological analysis because they do not achieve the necessary treatment period. The other animals showed no signs of pain, wound

infection or swelling during the all 8-experimental weeks. After opening the joint, the synovial fluid was found to be clear in all animals. There was no sign of synovitis. The animal weight along the experiment was $2,988.34 \pm 329.28$ g.

Chondrocyte culture

No signs of contamination were observed in the chondrocyte cultures. In some plates it was not possible to obtain the cell amount established in the cell transplantation protocol. Thus, instead of 3×10^5 cells in 50 μ L, animals received about a half of the normal dose. Cells displayed a spherical morphology, characteristic of this cell type. Loss of expression of collagen I, collagen II and aggrecan was observed in the expression assay, three weeks after primary culture (data not shown). Figures 1A and 1B show a three-weeks chondrocyte culture.

ABMC culture

No signs of contamination were observed in the ABMC cultures. Elongated fibroblast-like adherent mesenchymal cells appeared after 2 to 5 days in culture and subsequently became spindle shaped or fibroblast-like (Figure 1C and 1D).

Histologic analysis

Three animals were sacrificed four weeks after lesion induction (UTD4) in order to assess the appearance of the cartilage at the time of treatment. These animals showed an initial stage of lesion, with an immature subchondral bone, an irregular superficies and an initial level of spontaneous repair with some hyaline cartilage, but mainly fibrous fibrocartilage tissues (Figure 2).

When UTD4 and UTD8 are compared, a damage progression from UTD4 is observed, demonstrated by the increase of the fibrous tissue percentage and the increase of empty areas percentage. In both groups, the defects did not regenerate spontaneously, after the analyzed period.

In all groups the defects were grossly distinguishable from the surrounding tissue. No inflammatory response was seen in the specimens as assessed in HE stain (lack of inflammatory infiltrate). The Ethil Cyanoacrylate had a good outcome in sealing the osteochondral defect. Figure 3 shows the identification of transplanted BMMC, previously stained with the fluorescent marker DAPI. Figures 3B and 3C correspond to different fields of the same slide, identifying the transplanted BMMC (bright blue).

Figure 4 shows histological photographs of the osteochondral defects treated with the different approaches. Untreated animals (Figure 4A) showed areas of irregular fibrous tissue surrounded by more hyaline-like tissue and complete absence of subchondral bone regeneration; the scar tissue was not bonded to the subchondral bone or to the adjacent cartilage. Animals treated with BMMC (Figure 4B) showed an almost complete regeneration, specially the reconstitution of subchondral bone. Animals treated with ABMC (Figure 4C) had an even better outcome, with equally regenerated bone but with more wide hyaline cartilage. As expected, chondrocyte transplantation did not regenerate the subchondral bone, but did regenerate the cartilage articular fulfilling the defect with hyaline cartilage (Figure 4D). On the other hand, both groups treated with a mixture of ACT and BMMC or ABMC had a poorer lesion repair, although with an increase in subchondral bone area for ACT/ABMC (Figure 4E) and in transitional tissue for ACT/BMMC (Figure 4F).

Histomorphometric evaluation is resumed in Table III. Some samples were not completely filled with the regenerated tissue, as shown in figures 4A, 4E and 4F. UTD8 had the largest amount of fibrous tissue ($P=0.021$). Although there was no statistical difference between this group and the others, a tendency was observed with p values ranging from 0.058 to 0.050. Remarkably, the ABMC group showed no signs of fibrous tissue at all. The ACT/ABMC group demonstrated less total fill ($P=0.003$) of the defects. All defects demonstrated changes in the subchondral bone, especially growth of reparative tissue.

Total histological score (Table IV) showed no difference between the groups, except for a more severe degeneration in ACT/ABMC group when compared with UTD4 ($P=0.023$).

When evaluating the Cell Morphology, ANOVA test detected a variation between groups (P=0.038), but the Tukey test did not identify the different one.

Overall, a tendency in the reduction of the progression of the lesion can be observed in treated animals, with mean values closer to those of UTD4 than UTD8. Figure 4 shows the identification of transplanted BMMC, previously stained with the fluorescent marker DAPI. Figures 3B and 3C correspond to different fields of the same slide, identifying the transplanted BMMC (bright blue).

Discussion

Repair of chondral and osteochondral lesions in adult mammals does not occur spontaneously³⁹⁻⁴¹. Defects progress from initial degenerative changes of the affected joint up to complete loss of articular surface. Several surgical techniques have been reported in animals and in humans^{8-9, 34-36, 42-45}, but a valuable technique to restore a defect in the articular surface is still non-existent.

In this study, we evaluated the autologous transplantation of different cell populations to repair a surgical lesion in an animal model of osteochondral defect. To our surprise, the best results were obtained by the transplantation of AMBC and BMMC alone. However, we were not able to achieve a complete repair of the lesion, but a clear trend towards a reduction of the progression could be observed in these two groups and in ACT alone.

There are some limitations in the ACT approach, such as the number of autologous chondrocytes available for these procedures and the need for repeated surgery that explain the interest in the transplantation of other cell types. The disadvantages of this technique include cartilage biopsy morbidity, prolonged *in vitro* culture with the risk of infection, variable growth characteristics of primary chondrocytes, and high cost⁴⁶. Although we found a loss of expression of collagen I and II, and aggrecan in monolayer cultured chondrocytes, suggesting a dedifferentiated phenotype, it is well known that dedifferentiated chondrocytes have the capacity to re-differentiate when cultured in three-dimensional multilayer conditions⁴⁸. In our study, this capacity can be inferred by the ability of cultured chondrocytes to regenerate, to some extent, the articular cartilage.

The positive results obtained by AMBC suggest that a sub-population of Mesenchymal Stem Cells was present in this culture. Although more analysis are necessary, we suppose that the transplanted cells differentiate in vivo obtaining a tissue structure similar to chondrocyte in cartilage, as seen in the DAPI fluorescence photographs (Figure 3). DAPI vital staining of transplanted cells avoid the necessity of using viral or non-viral vectors for gene marker transference, providing the clear-cut evidence for the sustained integration in the target tissue of transplanted cells of donor origin, as cited by Bianco *et al*⁵⁰.

As described by Breinan *et al*³⁶, suturing of periosteal flap often affects the adjacent articular cartilage and it is very technically demanding³¹. In certain cross sections, suturing of the periosteal flap creates clefts, completely separating the superficial layers from the deep layers of articular cartilage. For this reason, we did not perform a suture approach for periosteal flap fixation. Instead of this we introduced an easy and simple adhesive technique using Ethyl Cyanoacrylate. Based in our knowledge and literature reviews, this is the first article describing an adaptation of the Britberg *et al*³ periosteal flap fixation technique in which there is an Ethyl Cyanoacrylate fixation without suture and with excellent results. Although the lack of a periosteal flap adhesion group without cell transplantation in our experiment did not allow for further conclusions about this approach, it was previously reported that periosteum alone do not repair defective cartilage³

As known, osteochondral defects develop as a progressive disease that may finish with complete loss of articular cartilage, as demonstrated when comparing the UTD4 and UTD8 groups, with an increase of fibrillation and increase in empty area percentage, with consequent decrease in articular cartilage and hyaline tissue percentage. Although not observed in co-transplantation groups, in the other treatment groups a significant delay in the disease progression was observed, evidenced by the similarity of the fibrous tissue, empty area, articular and hyaline cartilage percentages. That is an encouraging outcome for this progressive disease, at least for the evaluation time used in this study. However, a more detailed immunohistochemistry-based analysis should be performed to assess the type of collagen produced by the transplanted cells.

Regarding, co-transplantation, this approach has already been described for several diseases⁵¹⁻⁵³ with good results. As far as we know, however, it was never described for osteochondral defects. Although we can not explain the molecular basis for the poorer outcome of the co-transplantation groups (ACT/BMMC and ACT/ABMC), it is indeed possible that different reasons may account for our findings in each group. For the ACT/BMMC groups it can be speculated that, although transplantations were always autologous, there was an immune response, probably due to the culture conditions (FBS probably). Another speculation is the low concentration of chondrocyte obtained for transplantation or maybe there was a deleterious competition for the differentiation signals secreted in the defect area. More studies are necessary to conclude if co-transplantation is really an option for osteochondral defects.

The results of this study suggest that the use of ABMC or BMMC can reduce the rate of degeneration in our model. In this scenario, the use of BMMC is even more feasible due to the necessity of culture to obtain ABMC. As shown for other diseases, the use of BMMC is a relatively simple and safe procedure⁵⁴⁻⁵⁶ that could be extended to the treatment of articular lesions.

Conclusions

One of the most important findings of this experiment was the rare increased degenerative response in the co-transplanted groups. The authors presumed that some immune response may be present or perhaps the cell therapy approach for the osteochondral defect described here is cell concentration dependent. Although this early pre-clinical data is encouraging and demonstrates the safety and effectiveness of cell based therapies for osteoarthritis, at least for ABMC, BMMC and chondrocytes, there are still many questions to be answered surrounding the mechanism of action. Therefore, further studies with a shorter and longer follow-up periods and experiments focused on the improvement of defect repair are needed to draw more specific conclusions.

Acknowledgments

The authors would like to thank the dedicated members of the AEU Staff for their superb and compassionate care of the animals used in this study. We are indebted to Marcele Cerski, MD, for her critical comments and helpful suggestions.

References

1. Arokoski JPA, Jurvelin JS, Väättäin U, Helminen HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10:186–198.
2. Benz K, Breit S, Lukoschek M, Mau H, Richter W. Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 293:284–292.
3. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331:889–895.
4. Buckwalter JA. Articular Cartilage Injuries. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2002; 402:21–37
5. Buckwalter JA, Martin JA, Mankin HJ: Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2000; 49:481–489.
6. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage. Part I. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A:600-611.
7. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage. Part II. Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A:612-632
8. Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and Osteoarthritis; *American Journal of Sports Medicine* 1997; 25(6):873-881

9. Baltzer AW, Arnold JP. Bone-cartilage transplantation from the ipsilateral knee for chondral lesions of the talus. *Arthroscopy* 2005; 21(2):159-166.
10. Buckwalter JA, Rosenberg LA, Hunziker EB: Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitation Repair. In Ewing JW (ed). *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy*. New York, Raven Press 19–56, 1990.
11. Buckwalter JA, Mow VC: Cartilage Repair in Osteoarthritis. In Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ (eds). *Osteoarthritis: Diagnosis and Management*. Ed 2. Philadelphia, Saunders 71–107, 1992.
12. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 1982; 64(3):460-466.
13. Felson DT, Hannan MT, Naimark A, Berkeley J, Gordon G, Wilson PW, Anderson J. Occupational physical demands, knee bending, and the knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J Rheumatol* 1991; 18(10):1587–1592.
14. Kirkeskov Jensen L, Eenberg W. Occupation as a risk factor for knee disorders. *Scand J Work Environ Health* 1996; 22: 165–75.
15. Guo X, Wang C, Zhang Y, Xia R, Hu M, Duan C, Zhao Q, Dong L, Lu J, Qing Song Y. Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into beta-tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue Eng*. 2004;10(11-12):1818-29
16. Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, Butler DL. Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee: incidence of anterior cruciate tears and other injuries. *J Bone Joint Surg Am*; 1980; 62(5):687-95, 757.

17. Vachon AM, McIlwraith CW, Powers BE, McFadden PR, Amiel D. Morphologic and biochemical study of sternal cartilage autografts for resurfacing induced osteochondral defects in horses. *Am J Vet Res* 1992;53(6):1038-47.
18. Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforation through the subchondrol bone. *J. Bone Joint Surg* 1976; 58(2):230-3.
19. Ogilvie-Harris DJ, Jackson RW. The arthroscopic treatment of chondromalacia patellae. *J. Bone Joint Surg.*1984; 66(5):660-5.
20. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: Present status. *Arthroplasty* 1986; 2(1):54-69.
21. Britterberg M, Nillson A, Lindahl A, Ohsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes 1996; *Clin Orthop Relat Res.* 1996; 326:270-283.
22. Wakitani S, Kimura T, Hirrooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K. Repair of rabbit articular surface with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J. Bone Joint Surg Br.* 1989; 71(1):74-80.
23. O'Driscoll SW, Keely FW, Salter RB The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for histological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion: An experimental investigation in the rabbit. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1986; 68(7):1017-1035.
24. Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic defects in the knee. A survivorship analysis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1992. 74(1):105-110.

25. Buckwalter JA, Martin JA. Degenerative Joint Disease. Clin Symp 1995; 47(2):1-32.
26. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am. 1994; 76(4):579-592.
27. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, *et al*: Repair of rabbits articular surfaces by allograft of chondrocytes embedded in collagen gels. Trans Orthop Res Soc 13:440, 1988.
28. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell based tissue engineering. J Bone Joint Surg Am. 2004; 86-A(7):1541-1558.
29. Arosarena O. Tissue engineering. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2005; 13(4):233-41.
30. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. J Bone Joint Surg Am. 2001;83-A(1):53-64.
31. Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. Plast Reconstr Surg. 2000;105(3):980-90.
32. Borenstein N, Hekmati M, Bruneval P, Montarras D. Unambiguous identification of implanted cells after cellular cardiomyoplasty: a critical issue. Circulation 2003 9;108 Suppl 1:II253-8.
33. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. BMC Cell Biol. 2006; 10;7:14

34. Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials* 2005;26(17):3617-3629
35. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Nakai T, Ando K, Hotta T. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration.. *Spine* 2005;30(21):2379-2387.
36. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79(10):1439-1451.
37. Moojen DJ, Saris DB, Auw Yang KG, Dhert WJ, Verbout AJ. The correlation and reproducibility of histological scoring systems in cartilage repair. *Tissue Eng* 2002; 8(4):627-634.
38. O'Driscoll SW, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Gallay SH, Fitzsimmons JS. Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system. *Tissue Eng* 2001; 7(3):313-320
39. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:532-53.
40. Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. *N Engl J Med* 1974;291:1285-92.
41. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78:721-

42. Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997;5:262–7.
43. Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first 10 years. *Clin Orthop* 1983;174:69–86. 38 Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for posttraumatic defects in the knee. A survivalship analysis. *J Bone Joint Surg Br* 1992;74:105–10.
44. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 1997;342:254–69.
45. van Susante JLC, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RPH. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 1999;20: 1167–75.
46. Minas, T., Nehrer, S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 1997, 20:525.
47. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215–24.
48. Alhadlaq A and Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2003; 82:951-956.
49. Alhadlaq A, Elisseff J, Hong L, Williams C, Caplan AI, Sharma B, Kopher RA, Tomkoria S, Lennon DP, Lopez A and Mao JJ. Adult stem cell driven genesis of human- shaped articular condyle. *Ann Biomed Eng* 2004; 32:911- 923.

50. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Gehron Robey P. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells* 2001; 19:180-192.
51. Thomas M, Wang X, Hornsby PJ. Human adrenocortical cell xenotransplantation: model of cotransplantation of human adrenocortical cells and 3T3 cells in scid mice to form vascularized functional tissue and prevent adrenal insufficiency. *Xenotransplantation* 2002; 9(1):58-67.
52. Min JY, Sullivan MF, Yang Y, Zhang JP, Converso KL, Morgan JP, Xiao YF. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg* 2002; 74(5):1568-75.
53. Rahman TM, Diakanov I, Selden C, Hodgson H. Co-transplantation of encapsulated HepG2 and rat Sertoli cells improves outcome in a thioacetamide induced rat model of acute hepatic failure. *Transpl Int* 2005;18(8):1001-9.
54. Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornacek I, Hlinomaz O, Kala P, Panovsky R, Prasek J, Kaminek M, Stanicek J, Klabusay M, Koristek Z, Navratil M, Dusek L, Vinklarkova J. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006;152(5):975.e9-15.
55. Beeres SL, Bax JJ, Dibbets-Schneider P, Stokkel MP, Fibbe WE, van der Wall EE, Schalij MJ, Atsma DE. Sustained effect of autologous bone marrow mononuclear cell injection in patients with refractory angina pectoris and chronic myocardial ischemia: twelve-month follow-up results. *Am Heart J* 2006;152(4):684.e11-6.
56. Mendonca ML, Freitas GR, Silva SA, Manfrim A, Falcao CH, Gonzales C, Andre C, Dohmann HF, Borojevic R, Otero RM. Safety of intra-arterial autologous

bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke. *Arq Bras Cardiol* 2006;86(1):52-5.

57. Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006;23(9):1379-91.

Tables

Table I - Primer sequences for expression assay in cultured chondrocytes.

Gene	Reverse primer sequence	Forward primer sequence
GAPDH	TCACCATCTTCCAGGAGCGA	CACAATGCCGAAGTGGTCGT
Type I Collagen	TCTGCCCGTTGGGCTTATGA	CATTGCCTTTGATTGCTGGG
Type II Collagen	ATGACAATCTGGCTCCCAAC	GAACCTGCTATTGCCCTCTG
Aggrecan	AGACAGTGACCTGGCCTGAC	TGGCCTCTCCAGTCTCATTC

Table II - Modified O'Driscoll Histologic Scoring Scale

Characteristic	Scores	
I	Cellular morphology (non subchondral bone)	
	Hyaline cartilage	4
	Articular cartilage	3
	Transition tissue	2
	Fibrous tissue	1
II	Structural integrity	
	Normal	2
	Slight disruption, including cysts	1
	Severe disintegration	0
III	Hyaline articular cartilage	0-10
IV	Empty spaces	0-(-10)
	Total minimum score	-9
	Total maximum score	16

Table III. Histomorphometric evaluation of the seven groups (mean±s.e.m.)

	UTD		AC T	BM MC	AB MC	ACT /ABMC	ACT/ BMMC
	4 weeks	8 weeks					
Empty area (% of defect area)	1.61± 1.39 ^a	10.4 4±12.91 ^a	1.72 ±1.76 ^a	4.35 ±4.78 ^a	2.92 ±5.05 ^a	11.6 7±10.68 ^a	32.34 ±9.62 ^b
Fibrous tissue (% of defect area)	1.71± 1.89 ^a	14.1 0±10.40 ^b	1.94 ±0.24 ^{ab}	3.58 ±3.84 ^{ab}	0±0. 00 ^a	2.58 ±4.47 ^{ab}	1.57± 2.22 ^a
Transitional tissue (% of defect area)	3.23± 5.59 ^a	19.4 1±14.95 ^a	29.1 8±20.66 ^a	30.0 6±32.90 ^a	6.44 ±11.16 ^a	16.8 3±10.40 ^a	36.08 ±1.86 ^a
Articular cartilage (% of defect area)	28.53 ±24.77 ^a	2.42 ±4.20 ^a	16.6 8±20.07 ^a	11.4 1±11.67 ^a	1.84 ±1.91 ^a	0±0. 00 ^a	0±0.0 0 ^a
Hyaline cartilage (% of defect area)	22.39 ±30.65 ^a	5.65 ±9.78 ^a	6.04 ±8.26 ^a	6.68 ±11.33 ^a	22.7 3±20.22 ^a	0±0, 00 ^a	0±0,0 0 ^a
Subchondra l bone (% of defect area)	42.54 ±0.41 ^a	47.9 9±29.21 ^a	44.4 4±32.31 ^a	43.9 2±20.23 ^a	66.0 7±4.50 ^a	66.5 6±17.16 ^a	30.02 ±9.26 ^a

P<0.05

Table IV - Modified O'Driscoll Histologic Scoring

	UTD		ACT	BMMC	ABMC	ACT/ABMC	ACT/BMMC
	4 weeks	8 weeks					
Cellular morphology	3.33±0.58 ^a	2.00±0.00 ^a	2.33±0.58 ^a	3.00±0.82 ^a	3.33±1.15 ^a	1.67±0.58 ^a	2.00±0.00 ^a
Structural integrity	2.00±0.00 ^a	1.00±1.00 ^a	2.00±0.00 ^a	1.71±0.49 ^a	1.67±0.58 ^a	0.56±1.15 ^a	0.50±0.71 ^a
Hyaline cartilage	2.40±3.06 ^a	0.56±0.98 ^a	0.60±0.83 ^a	0.67±1.13 ^a	2.27±2.02 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a
Empty spaces	0.16±0.14	1.4±1.29	0.17±0.18	0.43±0.48	0.29±0.50	1.17±1.07	3.23±0.96
Total score	2.00±0.00 ^b	1.00±1.00 ^{a, b}	2.00±0.00 ^{a, b}	1.71±0.49 ^{a, b}	1.67±0.58 ^b	0.56±1.15 ^{a, b}	0.50±0.71 ^a

P<0.05

Figures

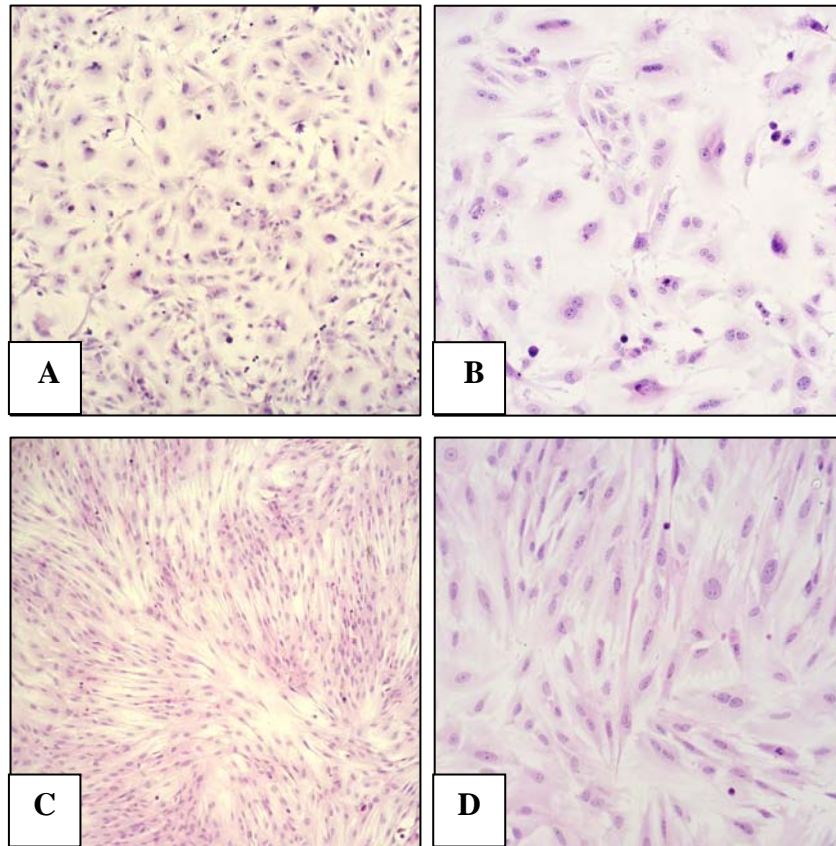


Figure 1. Chondrocyte (A-B) and ABMC (D-E) culture stained with HE. A-C) 10X magnification; B-D) 20X

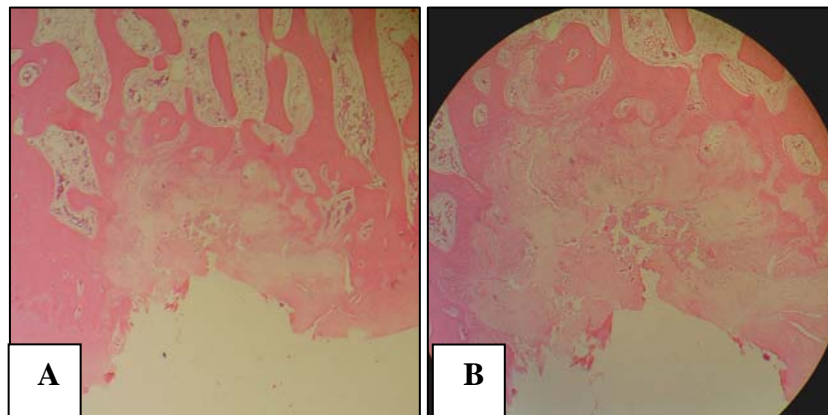


Figure 2. HE stained articular cartilage of UTD4 group. A) 4X magnification, B) 10X magnification

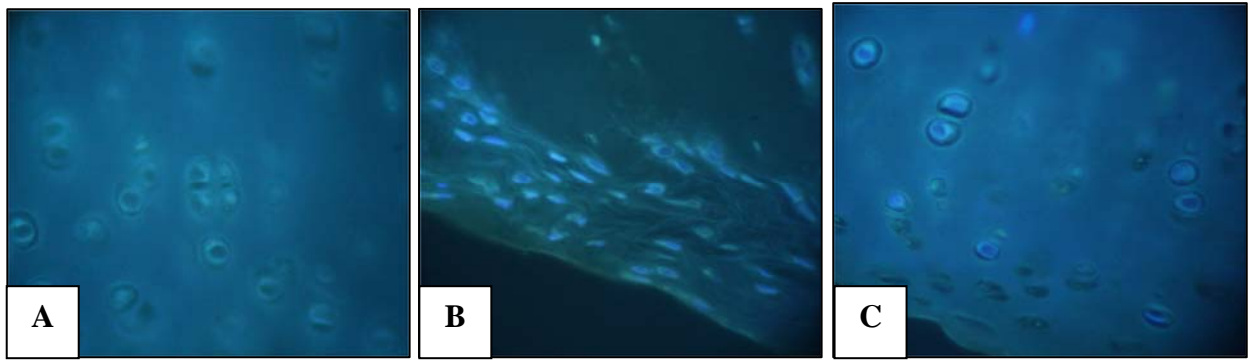


Figure 3. Identification of BMSC transplanted into the osteochondral defect. A) Negative control, 100X magnification; B-C) DAPI-positive BMSC, 100X magnification.

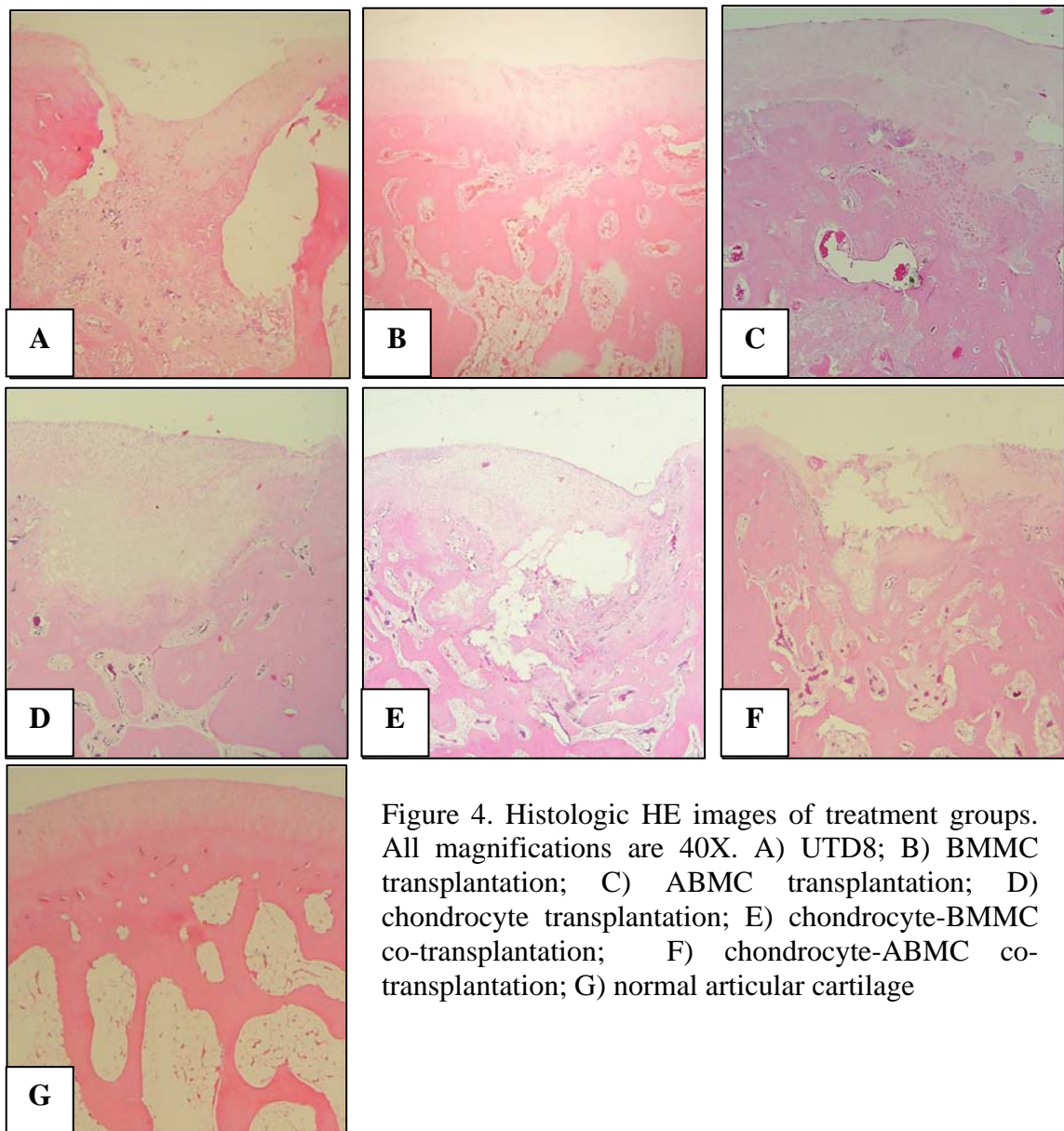


Figure 4. Histologic HE images of treatment groups. All magnifications are 40X. A) UTD8; B) BMSC transplantation; C) ABMC transplantation; D) chondrocyte transplantation; E) chondrocyte-BMSC co-transplantation; F) chondrocyte-ABMC co-transplantation; G) normal articular cartilage

3. Discussão

O reparo de lesões condrais e osteocondrais não é produzido espontaneamente em mamíferos adultos. Os defeitos evoluem desde mudanças degenerativas iniciais até uma perda completa da superfície articular. Varias técnicas cirúrgicas têm sido relatadas em animais e humanos (Johnson, 1986; Rodrigo *et al*, 1994; Stone e Walgenbach, 1997; Homminga, 1990; Homminga *et al*, 1992; Hangody *et al*, 1997; Mankin *et al*, 1983; Beaver *et al*, 1992, van Susante *et al*, 1999; Brittberg *et al*, 1994), mas o padrão ouro da terapia de reparo de defeitos da superfície articular ainda não existe.

Quando as células de medula óssea são colocadas em cultura celular, a população aderente tende a formar colônias de células fusiformes, similares aos fibroblastos em cultura celular bidimensional (Alhadlaq *et al*, 2004). Isto se encontra de acordo com a morfologia das células aderentes de medula óssea isoladas no presente trabalho. Por mais que exista um consenso de que uma subpopulação de células aderentes isoladas de medula óssea pode ser chamada de células tronco mesenquimais (MSC, do inglês), sempre que apresentarem a capacidade de se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares (Alhadlaq e Mao, 2003), nesse trabalho não foi feito nenhum estudo de diferenciação celular *in vitro*, mas a capacidade de se diferenciarem na linhagem condrogênica foi evidenciada pela presença de células DAPI positivas na cartilagem articular com fenótipo de condrócitos.

Como já foi citado por Bianco e colaboradores (2001), uma evidência clara da integração no tecido alvo das células transplantadas é de vital importância nos estudos de terapia celular. Nesse trabalho, as células foram coradas com o corante vital DAPI para sua posterior identificação no tecido alvo, fazendo desnecessária transferência gênica com vetores virais ou não virais.

Devido à probabilidade de uma resposta imune do hospedeiro nos transplantes alogênicos, assim como também a transmissão de doenças virais (Barry e Murphy, 2004; Frenkel *et al*, 1999), o uso de células autóloga para todos os transplantes celulares foi de vital importância no nosso estudo.

No protocolo de transplante autólogo de condrócitos (ACT), descrito por Brittberg e colaboradores (1994), a sutura do perióstio demanda uma técnica aprimorada e com frequência afeta a cartilagem articular normal adjacente à lesão. Inclusive, foi impossível conseguir uma sutura na cartilagem articular de coelhos pela pequena espessura do tecido. Por esse motivo, nós não realizamos nenhum tipo de sutura para fixar o perióstio à cartilagem articular. Em vez disso, introduzimos uma nova técnica cirúrgica, a qual é simples e rápida, e que se baseia na utilização da cola sintética biocompatível, o Cianoacrilato de Etila, comumente conhecido pelo seu nome comercial, Super Bonder®. Essa técnica, assim como também o uso de cianoacrilato, não tinha sido descrita para terapia celular de osteoartrose. O cianoacrilato é utilizado a nível comercial e clínico para tratar doenças vasculares, já que produz embolia de vasos sanguíneos, e feridas cortantes da pele. Nesse trabalho a utilização de cianoacrilato demonstrou-se eficiente para a fixação do perióstio no sítio da lesão.

Uma questão a ser considerada é a ausência do grupo experimental onde o perióstio tenha sido aderido com cianoacrilato, mas que não tenha recebido células, o qual não permite maiores conclusões sobre a função do fragmento de perióstio no defeito articular. No entanto, baseados em estudos anteriores de enxertos de perióstio, onde observou-se que o dano articular não regenera quando o perióstio é utilizado sem alguma outra abordagem em paralelo, decidimos excluir esse grupo experimental (Brittberg *et al*, 1994).

Além da dificuldade da fixação do perióstio à cartilagem articular, um problema comum a qualquer procedimento de transplante celular, existem outras limitações no ACT, como o número reduzido de condrócitos disponíveis em biópsias de pequeno tamanho, tempo prolongado de cultura celular, com a possibilidade de contaminação, necessidade de duas intervenções cirúrgicas e o fato de ser um procedimento de alto custo (Minas e Nehrer, 1997). Além disso, há o risco de não se obter número suficiente de condrócitos para o transplante, como ocorreu neste trabalho em alguns animais.

Também existem dificuldades inerentes à cultura de condrócitos *in vitro*. No estudo de expressão gênica para os marcadores tecido específico (colágeno I, colágeno II e agregan), observou-se uma perda de expressão, sugerindo-se uma desdiferenciação dos condrócitos em cultura. No entanto, encontra-se bem documentado que esses condrócitos possuem a

capacidade de se re-diferenciar ao fenótipo condrogênico uma vez colocados em condições de cultura tridimensional (Benya e Shaffer, 1982). Em nosso estudo, essa capacidade pode ser inferida pela recuperação da cartilagem observada no grupo ACT.

Como é sabido, a OA é uma doença degenerativa que pode terminar com perda da superfície articular. Quando comparados os grupos UTD4 e UTD8 observa-se um aumento de fibrilação e de áreas vazias, assim como também uma diminuição da cartilagem articular e hialina. Tratando-se de uma doença com uma degeneração progressiva importante do tecido e, com isso, da qualidade de vida do paciente, o retardo no aparecimento de degeneração articular observado nos três tratamentos não baseados em co-transplante celular (ACT, ABMC e BMMC) é de suma importância. Evidências disso são os achados de que a porcentagem de tecido fibroso, tecido vazio e a porcentagem de cartilagem articular e hialina se mantêm similares àquelas observadas no grupo UTD4 nesses três grupos. Neste sentido, é importante ressaltar que esse resultado, mesmo que não corresponda a uma recuperação completa da lesão, sugere que a terapia celular pode ser um importante adjuvante nos tratamentos já existentes.

Os nossos achados concordam com os achados por Martin e colaboradores (2004), onde se mostrou que Células Tronco Mesenquimais Condroprogenitoras, quando colocadas em uma lesão osteocondral diferenciam-se posteriormente em condrócitos, regenerando parcialmente a cartilagem articular.

A terapia celular baseada em co-transplante está sendo utilizada em várias doenças (Thomas *et al*, 2002; Min *et al*, 2004; Rahman *et al*, 2005), mas baseados na revisão bibliográfica feita para esse trabalho, acreditamos nunca tenha sido feita para osteoartrose. Por motivos que desconhecemos, nos grupos experimentais onde foi feito um co-transplante celular (ACT/BMMC e ACT/ABMC) o reparo da lesão não foi atingido, observando-se inclusive um dano ainda maior do que aquele observado nos grupos controle (UTD4 e UTD8). Ainda que não tenhamos condições de determinar os mecanismos específicos que expliquem essa diferença, pode-se levantar algumas hipóteses. Em primeiro lugar, poderia se pensar que, ainda que os transplantes tenham sido autólogos, no co-transplante ACT/BMMC houve uma resposta imune, provavelmente devido a alguma condição da cultura celular de condrócitos associada à presença de células do sistema

imune isoladas no procedimento de obtenção das BMMC. Para testar essa hipótese, deveriam ser analisados animais sacrificados em um intervalo de tempo menor, pois a reação inflamatória, se ocorreu, não estava mais presente após 4 semanas.

Entretanto, essa hipótese não explicaria os resultados encontrados no grupo ABMC/ACT, em que ambas as células foram submetidas ao mesmo procedimento de cultura e, provavelmente, as ABMC foram depletadas do seu componente hematopoiético. Por esse motivo, talvez seja mais plausível uma hipótese que considere a existência de uma competição ou interferência entre os diferentes tipos celulares transplantados pelos sinais de diferenciação secretados no local do defeito. Mais estudos serão necessários para concluir se o co-transplante é de fato prejudicial para terapia celular em lesões osteocondrais.

A elevada heterogeneidade dos resultados observados, evidenciada pelo amplo desvio padrão (Table II), deve ter sido causada pelo pequeno número amostral utilizado. Embora não possa ser eliminada, a presença de variabilidade genotípica deve ser reduzida, já que os animais provêm do mesmo produtor que possui uma endogamia elevada. Por outro lado, embora não tenha se observado sangramento proveniente da medula óssea durante a cirurgia de indução da lesão articular, na análise histológica observou-se que a profundidade da lesão teve graus variáveis, contatando em alguns casos o osso subcondral profundo, possibilitando regenerações tissulares através de diferentes mecanismos de reparo. Entretanto, devido aos elevados custos, curto espaço de tempo e a necessidade de padronização das diferentes técnicas empregadas nesse estudo (técnica cirúrgica no modelo animal, cultura de condrócitos, cultura de ABMC, e limitações de espaço na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) foi impossível ter grupos experimentais com um número amostral maior. Nesse sentido podemos considerar os resultados encontrados nesse trabalho como dados preliminares para posteriores estudos.

Em conclusão, pode-se observar níveis de reparo similar nos joelhos tratados com BMMC e ABMC. Considerando esse resultado, e somado ao fato de que o transplante de BMMC não requer tempos prolongados de cultura celular (o qual pode acarretar contaminações das células ou baixo *número* de células após cultura) podemos concluir que

o transplante autólogo de BMMC é a melhor opção para terapia celular para as lesões osteo-condral com alto potencial pré-artrósicas , pelo menos na janela de tempo analisada. No entanto, para realizar uma conclusão definitiva acreditamos que o número amostral deve de ser aumentado, assim como também os intervalos nos períodos de análises. Finalmente, é necessário realizar uma avaliação mais completa das características do tecido regenerativo produzido, através do uso de imunohistoquímica, especialmente para determinação do tipo de colágeno produzido.

Conclusões

Neste estudo foi padronizada a lesão articular cirúrgica em coelhos através do uso de microfuradeira odontológica, com produção de um defeito com características similares a uma lesão osteocondral com um grande potencial pré-artrósico.

Foi padronizado o isolamento e cultura de condrócitos e células mononucleares de coelhos.

A comparação, através de análise histológica e histomorfometria, do grau de reparo articular utilizando transplante autólogo de células mononucleares de medula óssea, células aderentes de medula óssea e condrócitos cultivados, de forma isolada ou em conjunto, demonstrou que o transplante de células isoladas apresenta melhores resultados.

Apesar de não ter sido observado o reparo de lesão induzida na cartilagem articular do joelho de coelhos, através de terapia celular autóloga, obteve-se um retardo na progressão da lesão, especialmente com o uso de ABMC e BMMC de forma isolada. Ainda não tendo se obtido uma regeneração total da lesão articular induzida no nosso modelo experimental, e com isso uma possível correção total do defeito, os achados neste trabalho indicam que as condições para o desenvolvimento da osteoartrose podem ser retardadas com o uso de terapia celular.

Referências

- Alhadlaq A and Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2003; 82:951-956.
- Alhadlaq A, Elisseeff J, Hong L, Williams C, Caplan AI, Sharma B, Kopher RA, Tomkoria S, Lennon DP, Lopez A and Mao JJ. Adult stem cell driven genesis of human- shaped articular condyle. *Ann Biomed Eng* 2004; 32:911- 923.
- Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* 2003;82(12):951-6.
- Arokoski JPA, Jurvelin JS, Väätäinen U, Helminen HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10:186–198.
- Arosarena O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 13(4):233-41.
- Awad H.A., Butler D.L., Boivin G.P., Smith F.N., Malaviya P., Huibregtse B., Caplan A.I., Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon, *Tissue Eng.* 1999; 5: 267-277.
- Baltzer AW, Arnold JP. Bone-cartilage transplantation from the ipsilateral knee for chondral lesions of the talus. *Arthroscopy* 2005; 21(2):159-166.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-84.
- Barry FP. Biology and clinical applications of Mesenchymal Stem Cells. *Birth Defects Research* 2003;(Part C) 69:250–256

- Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic defects in the knee. A survivorship analysis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1992. 74(1):105-110.
- Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for posttraumatic defects in the knee. A survivalship analysis. *J Bone Joint Surg Br* 1992;74:105–10.
- Beeres SL, Bax JJ, Dibbets-Schneider P, Stokkel MP, Fibbe WE, van der Wall EE, Schalij MJ, Atsma DE. Sustained effect of autologous bone marrow mononuclear cell injection in patients with refractory angina pectoris and chronic myocardial ischemia: twelve-month follow-up results. *Am Heart J* 2006;152(4):684.e11-6.
- Bely M; Arthrosis (1987); The Arthritis Trust of America (www.arthritistrust.org)
- Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215–24.
- Benz K, Breit S, Lukoschek M, Mau H, Richter W. Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 293:284–292.
- Bianco P, Reginacci M, Gronthos S, Gheron Robey P. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells* 2001; 19:180-192.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol.* 2006; 10;7:14
- Borenstein N, Hekmati M, Bruneval P, Montarras D. Unambiguous identification of implanted cells after cellular cardiomyoplasty: a critical issue. *Circulation* 2003 9;108 Suppl 1:II253-8.

- Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79(10):1439-1451.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331:889–895.
- Britterberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes 1996; *Clin Orthop Relat Res.* 1996; 326:270-283.
- Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E., Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J. Cell Biochem.* 1997;64: 278-294.
- Bruder S.P., Kurth A.A., Shea M., Hayes W.C., Jaiswal N., Kadiyala S., Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells, *J Orthop. Res.* 1998;16: 155-162.
- Buckwalter JA, Brown TD. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(423):7-16.
- Buckwalter JA, Lane NE. Athletics and Osteoarthritis; *American Journal of Sports Medicine* 1997; 25(6):873-881
- Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage. Part I. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A:600-611.
- Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage. Part II. Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A:612-632

- Buckwalter JA, Martin JA, Mankin HJ: Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2000; 49:481–489.
- Buckwalter JA, Martin JA. Degenerative Joint Disease. *Clin Symp* 1995; 47(2):1-32.
- Buckwalter JA, Mow VC: Cartilage Repair in Osteoarthritis. In Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ (eds). *Osteoarthritis: Diagnosis and Management*. Ed 2. Philadelphia, Saunders 71–107, 1992.
- Buckwalter JA, Rosenberg LA, Hunziker EB: Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitation Repair. In Ewing JW (ed). *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy*. New York, Raven Press 19–56, 1990.
- Buckwalter JA. Articular Cartilage Injuries. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2002; 402:21–37
- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 1997;342:254–69.
- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop*. 1997;342:254–69.
- Dennis J.E., Merriam A., Awadallah A., Yoo J.U., Johnstone B., Caplan A.I., A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse, *J. Bone Miner. Res.* 1999;14: 700-709.
- Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials* 2005;26(17):3617-3629

- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F., Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, *Science* 1998; 279: 1528-1530.
- Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis.* 2002 Nov;61 Suppl 2:ii29-31.
- Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(3):980-90.
- Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg.* 2000 Mar;105(3):980-90.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.
- Galmiche M.C., Koteliansky V.E., Briere J., Herve P., Charbord P., Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway, *Blood* 1993;82: 66-76.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005;434(7033):644-8.
- Guo X, Wang C, Zhang Y, Xia R, Hu M, Duan C, Zhao Q, Dong L, Lu J, Qing Song Y. Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into beta-tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue Eng.* 2004;10(11-12):1818-29

- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997;5:262–7.
- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997;5:262–7.
- Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PSM, van der Linden AJ. Perichondral grafting for cartilage knee. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:1003–7.
- Homminga GN, Bulstra SK, Kuyer R, van der Linden AJ. Repair of sheep articular cartilage defects with a rabbit costal perichondral graft. *Acta Orthop Scand* 1991;62:415–18.
- Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78:721–
- Izumi T, Tominaga T, Shida J, Onishi F, Itoman M. Chondrocyte transplantation for osteochondral defects with the use of suspension culture. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(3):207-12.
- Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(1):53-64.
- Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(12):3464-74.
- Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: Present status. *Arthroplasty* 1986; 2(1):54-69.

- Jorgensen C, Noel D, Apparailly F, Sany J. Stem cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2001; 60:305–309
- Kadiyala S., Young R.G., Thiede M.A., Bruder S.P., Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*, *Cell Transplant.* 1997;6: 125-134.
- Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J.* 2004 Jun 30;45 Suppl:41-7.
- Litzke LE, Wagner E, Baumgaertner W, Hetzel U, Josimovic-Alasevic O, Libera J. Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann Biomed Eng* 2004;32(1):57-69.
- Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first 10 years. *Clin Orthop* 1983;174:69–86. 38 Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for posttraumatic defects in the knee. A survivalship analysis. *J Bone Joint Surg Br* 1992;74:105–10.
- Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation. The first 10 years. *Clin Orthop* 1983;174:69–86.
- Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. *N Engl J Med* 1974;291:1285–92.
- Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 1982; 64(3):460-466.
- Martin JA, Brown TD, Heiner AD, Buckwalter JA. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(427 Suppl):S96-103.

- Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:106-10.
- Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 2003;123(4):702-11.
- Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornacek I, Hlinomaz O, Kala P, Panovsky R, Prasek J, Kaminek M, Stanicek J, Klabusay M, Koristek Z, Navratil M, Dusek L, Vinklarkova J. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006;152(5):975.e9-15.
- Mendonca ML, Freitas GR, Silva SA, Manfrim A, Falcao CH, Gonzales C, Andre C, Dohmann HF, Borojevic R, Otero RM. Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke. *Arq Bras Cardiol* 2006;86(1):52-5.
- Min JY, Sullivan MF, Yang Y, Zhang JP, Converso KL, Morgan JP, Xiao YF. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg* 2002; 74(5):1568-75.
- Minas, T., Nehrer, S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 1997, 20:525.
- Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforation through the subchondrol bone. *J. Bone Joint Surg* 1976; 58(2):230-3.

- Mithofer K, Peterson L, Mandelbaum BR, Minas T. Articular cartilage repair in soccer players with autologous chondrocyte transplantation: functional outcome and return to competition. *Am J Sports Med.* 2005;33(11):1639-46. Epub 2005 Aug 10.
- Moojen DJ, Saris DB, Auw Yang KG, Dhert WJ, Verbout AJ. The correlation and reproducibility of histological scoring systems in cartilage repair. *Tissue Eng* 2002; 8(4):627-634.
- Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86-A(7):1541-1558.
- Natarajan M, Mayilvahanan N; *Book of Orthopaedics and Traumatology; Fifth Edition; Publicado por M.N. Orthopaedic Hospital; 2002*
(www.bonetumour.org/book/aptext)
- O'Driscoll SW, Keely FW, Salter RB The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for histological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion: An experimental investigation in the rabbit. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1986; 68(7):1017-1035.
- O'Driscoll SW, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Gallay SH, Fitzsimmons JS. Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system. *Tissue Eng* 2001; 7(3):313-320
- Ochi M, Adachi N, Nobuto H, Yanada S, Ito Y, Agung M. Articular cartilage repair using tissue engineering technique--novel approach with minimally invasive procedure. *Artif Organs.* 2004;28(1):28-32.
- Ogilvie-Harris DJ, Jackson RW. The arthroscopic treatment of chondromalacia patellae. *J. Bone Joint Surg.* 1984; 66(5):660-5.

- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;(374):212-34.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, Walker K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain.* 2005 Apr;114(3):339-46. Epub 2004 Dec 19.
- Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2000;52: 246–255.
- Prockop D.J., Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues, *Science.* 1997;276: 71-74.
- Rahman TM, Diakanov I, Selden C, Hodgson H. Co-transplantation of encapsulated HepG2 and rat Sertoli cells improves outcome in a thioacetamide induced rat model of acute hepatic failure. *Transpl Int* 2005;18(8):1001-9.
- Rodrigo JJ, Steadman RJ, Silliman JF, Fulstone HA. Improvement of full-thickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion. *Am J Knee Surg* 1994;7:109–16.
- Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Nakai T, Ando K, Hotta T. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration.. *Spine* 2005;30(21):2379-2387.
- Schmidt TA, Schumacher BL, Klein TJ, Voegtline MS, Sah RL. Synthesis of proteoglycan 4 by chondrocyte subpopulations in cartilage explants, monolayer cultures, and resurfaced cartilage cultures. *Arthritis Rheum* 2004; 50(9):2849-57.

- Setton LA, Elliott DM, Mow VC; Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration; *Osteoarthritis and Cartilage* 1999; 7:2-14
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:532–53.
- Solchaga LA, Gao J, Dennis JE, Awadallah A, Lundberg M, Caplan AI, Goldberg VM. Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng.* 2002 Apr;8(2):333-47.
- Spriet MP, Girard CA, Foster SF, Harasiewicz K, Holdsworth DW, Lavery S. Validation of a 40 MHz B-scan ultrasound biomicroscope for the evaluation of osteoarthritis lesions in an animal model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005 Feb;13(2):171-9.
- Stone KR, Walgenbach A. Surgical technique for articular cartilage transplantation to full-thickness cartilage defects in the knee joint. *Operative Techniques in Orthopedics* 1997;7:305–11.
- Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjogren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, Brittberg M, Lindahl A. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):R560-8. Epub 2005 Mar 3.
- Thomas M, Wang X, Hornsby PJ. Human adrenocortical cell xenotransplantation: model of cotransplantation of human adrenocortical cells and 3T3 cells in scid mice to form vascularized functional tissue and prevent adrenal insufficiency. *Xenotransplantation* 2002; 9(1):58-67.
- Thomson BM, Bennett J, Dean V, Triffitt J, Meikle MC, Loveridge N. Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells: skeletogenic potential, colony-forming activity, and response to dexamethasone, transforming growth

factor beta, and basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Res.* 1993;8(10):1173-83.

- Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006;23(9):1379-91.
- Vachon AM, McIlwraith CW, Powers BE, McFadden PR, Amiel D. Morphologic and biochemical study of sternal cartilage autografts for resurfacing induced osteochondral defects in horses. *Am J Vet Res* 1992;53(6):1038-47.
- van Susante JLC, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RPH. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 1999;20: 1167–75.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76(4):579-592.
- Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, *et al*: Repair of rabbits articular surfaces by allograft of chondrocytes embedded in collagen gels. *Trans Orthop Res Soc* 13:440, 1988.
- Wakitani S, Kimura T, Hirrooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K. Repair of rabbit articular surface with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J. Bone Joint Surg Br.* 1989; 71(1):74-80.
- Wakitani S, Yamamoto T. Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect. *Microscopy research and technique.* 2002; 58:14-18

- Young R.G., Butler D.L., Weber W., Caplan A.I., Gordon S.L., Fink D.J., Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair, J. Orthop. Res. 1998, 16: 406-413.

Anexo I

Animal ID	Pata esquerda	Pata direita
1	UTD4	BMMC
2	UTD4	BMMC
3	UTD4	BMMC
4	UTD8	BMMC
5	UTD8	BMMC
6	UTD8	BMMC
7	ABMC	ABMC
8	ABMC	ABMC
9	ACT	ACT
10	ACT	ACT
11	ACT/BMMC	ACT /BMMC
12	ACT/BMMC	ACT /BMMC
13	ACT/ABMC	ACT /ABMC
14	ACT/ABMC	ACT /ABMC
15	BMMC	BMMC