

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO DA**  
**REGIÃO CENTRO-OESTE**

**LAYNNA DE CARVALHO SCHWEICH ADAMI**

**EFEITOS DA TERAPIA CELULAR, COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**  
**DO TECIDO ADIPOSE, E DO INFILTRADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS**  
**NO TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE NÃO RESPONSIVA AO TRATAMENTO**  
**MEDICAMENTOSO**

**CAMPO GRANDE**

**2021**

**LAYNNA DE CARVALHO SCHWEICH ADAMI**

**EFEITOS DA TERAPIA CELULAR, COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO, E DO INFILTRADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE NÃO RESPONSIVA AO TRATAMENTO MEDICAMENTOSO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul para defesa necessária para a obtenção do título de doutora, sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira e coorientação da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva.

**CAMPO GRANDE**

**2021**



**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**  
**Doutorado**

Aos trinta dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e um, às sete horas e trinta minutos, na sala de videoconferência - à distância, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Rodrigo Juliano Oliveira (UFMS), Elenice Deffune (UNESP), Flavio Henrique Paraguassu Braga (INCA), Gustavo Monnerat Cahli (UFRJ) e Silvio Assis de Oliveira Junior (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **LAYNNA DE CARVALHO SCHWEICH ADAMI**, CPF 02365341144, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e do infiltrado de plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite não responsiva ao tratamento medicamentoso**" e orientação de Rodrigo Juliano Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Interno)		Aprovada
Dra. Elenice Deffune (Externo)		Aprovada
Dr. Flavio Henrique Paraguassu Braga (Externo)		Aprovada
Dr. Gustavo Monnerat Cahli (Externo)		Aprovada
Dra. Larissa Correa Hermeto (Externo) (Suplente)		Aprovada
Dr. Silvio Assis de Oliveira Junior (Interno)		Aprovada

**RESULTADO FINAL:**

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

**OBSERVAÇÕES:**

---

---

---

---

---

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

## Agradecimentos

Agradeço à Deus por nunca me faltar e sempre acalantar meu coração nas horas em que eu senti mais angústia durante esses quatro anos. À Iemanjá por me agradecer com tua calma e manter minha sanidade, mesmo durante as minhas maiores crises de ansiedade diante dos obstáculos que apareceram durante a execução desta pesquisa.

Aos meus pais, Izabel e Delmir, obrigado por sempre estarem ao meu lado e por sempre acreditarem nas escolhas que eu fiz até agora. Todo suporte, toda a base de caráter que vocês me deram foram essenciais para eu me tornar quem eu sou. Tento todos os dias honrar tudo o que vocês me proporcionam até hoje. Agradeço a Deus por ter me colocado nessa família, e por ter dois pais tão maravilhosos. Amo vocês.

A minha irmã Lyzandra, obrigada por sempre ser minha parceira, por topar embarcar nas minhas ideias mirabolantes e por me ensinar como de vez em quando é preciso viver um momento de ócio para desestressar dessa vida louca. Amo você.

Ao meu marido Leandro, obrigada por todo suporte todos esses anos. Teu colo é o que mantém minha paz e sossega toda a ansiedade e medo que me tomaram esse tempo em que decidi embarcar nessa vida de pesquisa. Obrigada por ser quem você é, por sempre cuidar de mim, por entender meu tempo e por sempre tentar entender e me ajudar nas minhas tabelas e estatísticas malucas. Amo você meu amor.

A minha cunhada Luana, por revisar carinhosamente esta tese, por sempre me apoiar e por lutar vigorosamente pela atuação das mulheres no meio acadêmico científico.

Obrigada aos meus colegas do laboratório CeTroGen, pela parceria durante os experimentos, pela paciência de me explicar algo quando eu não fazia ideia do que tinha que fazer, pela alegria e descontração durante o desespero de ter que entregar resultado enquanto o experimento não dava certo pela milésima vez, e por sempre estarem a postos para me ajudar nas correrias do laboratório. Vocês conseguiram tornar meus dias mais leves diante de toda essa loucura.

Obrigada ao meu orientador Rodrigo Juliano Oliveira, por toda a sua paciência durante todos esses 6 anos de orientação. Obrigada por todo o suporte para a resolução dos problemas que apareceram nesta pesquisa e em nossos outros experimentos. Obrigada por confiar no meu trabalho e por me enxergar como profissional com respeito. Pode contar comigo em futuras pesquisas, se os meus conhecimentos puderem ajudar.

Ao casal Dra. Andréia e Dr. Roberto Antonioli Silva, obrigada por todo suporte e atenção no desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada por separarem um tempinho na agenda de vocês para realizarem os procedimentos que eram necessários, para que tudo isso saísse do papel. A expertise dos dois foi de suma importância tanto para a execução desta pesquisa, quanto para o sucesso dela. Muito obrigada mesmo.

Aos cirurgiões plásticos, Dra. Tatyane Ferreira, Dr. Marcelo Rosseto e Dr. Jovino Nogueira, obrigada por executarem as cirurgias de lipoaspiração necessárias para a realização desta pesquisa, assim como por disponibilizarem um tempinho em suas agendas para me ajudar. Sem vocês essa pesquisa não conseguiria ir para frente, muito obrigada mesmo.

Obrigada aos profissionais da Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste (PPGSD) pela contribuição intelectual e pela disponibilidade de atender a demanda dos pós-graduandos quando necessário.

Obrigada a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC – Brasil, por mais uma vez me proporcionar a oportunidade de crescimento como profissional.

E por fim, obrigada a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro desta pesquisa.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

## RESUMO

Schweich-Adami, L.C. **Efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e do infiltrado de plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite não responsiva ao tratamento medicamentoso.** [Tese de Doutorado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2021.

O aumento de indivíduos com Osteoartrite (OA) tem gerado aumento de gastos públicos com o acompanhamento e manutenção dos tratamentos, que perduraram anos e mesmo assim não são resolutivos. Este estudo é a primeira proposta de terapia celular para OA realizada no Sistema Público de Saúde Brasileiro, no Estado de Mato Grosso do Sul. O objetivo do trabalho foi dividido em duas etapas: a laboratorial que visou analisar a qualidade das células tronco mesenquimais (CTM) cultivadas da 1ª a 10ª passagem, e posteriormente a clínica, que de forma inédita analisou e comparou 4 tipos de intervenções em pacientes com OA: plasma rico em plaquetas (PRP), CTM, CTM+PRP e o procedimento cirúrgico padrão realizado em nosso hospital. A análise das passagens das CTM foi feita por ensaio de imunofenotipagem, diferenciação celular, ensaio de cometa, ensaio de morte celular citológico e molecular, análise morfológica, apoptose, integridade de membrana e viabilidade no citometro de fluxo. A avaliação dos pacientes foi realizada pela aplicação dos questionários WOMAC, SF-36 e EVA, e pela análise do líquido sinovial (citocinas inflamatórias, análise enzimática, colorimétrica e viscosidade). Em relação a qualidade das CTM, o processo de tripsinização realizado durante o cultivo não interferiu na estabilidade genômica das células. Mas a partir da 6ª passagem, as CTM começaram a modificar sua capacidade de deposição justaposta e proliferação em monocamada, assim como aumentaram seu tamanho. A viabilidade celular sofreu diminuição significativa apenas na 10ª passagem, e comprovou-se que isso acontecia por apoptose devido a alteração da permeabilidade de membrana. Os resultados dos questionários aplicados nos pacientes, apresentaram uma maior melhora dos escores dos domínios analisados (avaliação inicial x final/por grupo e valores finais/ entre os grupos) no grupo CTM+PRP, seguido do grupo CTM e PRP. Na avaliação das citocinas inflamatórias, houve redução significativa (avaliação inicial x final/por grupo) da citocina IL-1b apenas nos grupo CTM+PRP (40%) e CTM (31%), da IL-6 no grupo CTM+PRP (72%), da IL-8 nos grupo CTM+PRP (50%) e CTM (31%), e TNF no grupo CTM+PRP (46%). Apenas as reduções do grupo CTM+PRP foram consideradas significativas na análise dos valores finais/ entre os grupos. Houve também aumento significativo da quantidade de proteínas totais (79%) no grupo controle e células polimorfonucleares (47%) do grupo CTM+PRP. Diante dos resultados, observamos que as terapias com CTM+PRP e apenas CTM são seguras e efetivas para a melhora do quadro algico, da capacidade funcional e da inflamação articular em pacientes com OA. Entretanto, considera-se o uso de CTM+PRP como a alternativa mais promissora no auxílio do manejo desta patologia.

**Palavras-chave:** Terapia Celular; Dor Articular; Inflamação; Ortopedia; Medicina Regenerativa.

## ABSTRACT

Schweich-Adami, L.C. **Effects of cell therapy with adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma in the treatment of osteoarthritis that was not responsive to drug treatment.** [Tesis]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2021.

The increase in individuals with Osteoarthritis (OA) has generated an increase in public spending on monitoring and maintaining treatments, which have lasted for years and are still not resolvable. This study is the first cell therapy proposal for OA carried out in the Brazilian Public Health System, in the State of Mato Grosso do Sul. The objective of the work was divided into two stages: the laboratory which aimed to analyze the quality of adipose-derived stem cells (ADSCs) cultured from the 1st to the 10th passage, and later the clinic, which in an unprecedented way analyzed and compared 4 types of interventions in patients with OA: platelet-rich plasma (PRP), ADSCs, ADSCs + PRP and the standard surgical procedure performed in our hospital. The analysis of the ADSCs passages was performed by immunophenotyping assay, cell differentiation, comet assay, cytological and molecular cell death assay, morphological analysis, apoptosis, membrane integrity and viability in the flow cytometer. The evaluation of the patients was carried out by applying the questionnaires of WOMAC, SF-36 and EVA, and by analyzing the synovial fluid (inflammatory cytokines, enzymatic, colorimetric and viscosity analysis). Regarding the quality of ADSCs, the trypsinization process carried out during cultivation did not interfere with the genomic stability of the cells. But as of the 6th pass, ADSCs started to modify its capacity for juxtaposed deposition and proliferation in monolayer, as well as increasing its size. Cell viability was significantly reduced only on the 10th passage, and it was proven that this was due to apoptosis due to changes in membrane permeability. The results of the questionnaires applied to the patients, showed a greater improvement in the scores of the analyzed domains (initial x final evaluation / by group and final values / between groups) in the ADSCs + PRP group, followed by the ADSCs and PRP group. In the evaluation of inflammatory cytokines, there was a significant reduction (initial x final / per group) of the IL-1 $\beta$  cytokine only in the ADSCs + PRP (40%) and ADSCs (31%) groups, of IL-6 in the ADSCs + PRP group (72%), IL-8 in the ADSCs + PRP (50%) and ADSCs (31%) groups, and TNF in the ADSCs + PRP group (46%). Only the reductions in the ADSCs + PRP group were considered significant in the analysis of the final values / between the groups. There was also a significant increase in the amount of total proteins (79%) in the control group and polymorphonuclear cells (47%) in the ADSCs + PRP group. In view of the results, we observed that therapies with ADSCs + PRP and only ADSCs are safe and effective for improving pain, functional capacity and joint inflammation in patients with OA. However, the use of ADSCs + PRP is considered the most promising treatment option in helping to manage this pathology.

**Keywords:** Cell Therapy; Joint Pain; Inflammation; Orthopedics; Regenerative Medicine.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** – Esquema de regiões da matriz e zonas estruturais da cartilagem articular (Fonte: Ilustração da autora) 16
- Figura 2** - Esquema da articulação do joelho representando os tecidos articulares sinoviais afetados na Osteoartrite (Fonte: Ilustração da autora) 20
- Figura 3**- Fluxograma de manipulação do lipoaspirado e processamento realizado para a extração e obtenção de CTM. 33
- Figura 4** – Fluxograma dos procedimentos realizados neste ensaio clínico. NP= número de participantes e NJ= número de joelhos 38
- Figura 5** - Procedimento cirúrgico de videoartroscopia A) Enfaixamento com faixa elástica realizado previamente ao início do torniquete em região de coxa; B) Artrocentese; C) Líquido sinovial coletado; D e E) Posicionamento dos instrumentos cirúrgicos e locais de entrada e F) Visualização da cartilagem articular danificada para limpeza de debris ou áreas sem nivelamento. 39
- Figura 6** – A) Demonstração de tamanho de região demarcada para a retirada de tecido adiposo por lipoaspiração B) Injeção subcutânea de anestésico C) Retirada de tecido adiposo por lipoaspiração D) Aplicação do kinesiotape (100% tensão) para proteção e reabilitação da área acometida. 40
- Figura 7** – Fluxograma representativo dos procedimentos realizados durante o preparo das seringas utilizadas nas intervenções. 42
- Figura 8**- Morfologia, caracterização e potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo: (A) Cultura indiferenciada - células com características de fibroblastos; (B) Cultura de diferenciação adipogênica – presença de vacúolos lipídicos corados com *Oil Red O*; (C) Cultura de diferenciação osteogênica – presença de depósitos de cálcio corados com *Alizarin Red*; e (D) Cultura de diferenciação condrogênica – presença de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos corada com *Alcian Blue*. As barras representam 50  $\mu$ m. (E) Perfil imunofenotípico das células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. As células expressaram os marcadores CD105 e CD90 e não expressaram CD34 e CD133. 45
- Figura 9** - Média e desvio padrão da frequência de danos no DNA (*Comet Length e Tail Moment*) em células tronco mesenquimais durante a manipulação extensa (1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> passagem). 45
- Figura 10**– Fotomicrografia das células tronco mesenquimais, aderidas ao frasco de cultivo em monocamada, ao longo de 10 passagens. As células apresentaram manutenção da morfologia fibroblastóide da 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> passagem (P1-P10). Aumento 10X. As barras representam 50  $\mu$ m. 46
- Figura 11** – A) Fotomicrografia de células tronco mesenquimais livres (de sua adesão). As células mantiveram seu tamanho da 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> passagem (A-D) uniformemente. Após a 4<sup>a</sup> passagem observou-se leve aumento do tamanho das células na 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> passagens (P5-P6). Nas culturas da 7<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> passagem observou-se importante aumento do tamanho celular. 47

Aumento 40X. As barras representam 50  $\mu\text{m}$ . B) Gráfico *boxplot* representando limite superior, 1º quartil, mediana, 3º quartil e limite inferior do tamanho das células tronco mesenquimais livres ( $\mu\text{m}$ ).

**Figura 12** – Avaliação de morte celular. A) Média  $\pm$  desvio padrão da frequência de células tronco mesenquimais viáveis e em morte celular avaliadas por meio do ensaio diferencial de brometo de etídeo e alaranjado de acridina; (B) Fotomicrografia do ensaio citológico de morte celular (60x) demonstrando (1) células viáveis, (2) células em apoptose inicial (setas brancas) e (3) células em apoptose final (seta laranja). As barras representam 50  $\mu\text{m}$ ; e C) Confirmação da morte celular por apoptose utilizando o ensaio de Anexina V em citometria de fluxo na 10ª passagem. 48

**Figura 13** – Resultado do ensaio de viabilidade celular e integridade de membrana por iodado de propídeo. A) Média e desvio padrão da contagem de CTM/mL e viabilidade CTM por passagem; B) Resultado da análise da integridade de membrana da 10ª passagem. 49

**Figura 14** - Pontuação dos domínios do questionário WOMAC aplicado antes (inicial) e 6 meses após às intervenções (final). A) Score da intensidade da dor; B) Score da rigidez; C) Score da atividade física; D) Score total WOMAC e E) Redução (%) dos scores dos domínios de WOMAC. Todos os valores foram demonstrados em média  $\pm$  erro padrão da média. Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final (*t*-Student;  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p < 0,05$ ). 52

**Figura 15**- Pontuação da EVA aplicado antes e 6 meses após das intervenções. Os dados foram demonstrados em média  $\pm$  erro padrão da média. Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final (*t*-Student;  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p < 0,05$ ). 53

**Figura 16** – Pontuação dos domínios do questionário SF-36 aplicado antes e 6 meses após das intervenções A) Capacidade funcional; B) Limitação por aspectos físicos; B) Dor; D) Estado geral de saúde; E) Vitalidade; F) Aspectos sociais; G) Limitações por aspectos emocionais; H) Saúde mental e I) Aumento (%) de scores dos domínios de SF-36 após 6 meses das intervenções dos grupos. A pontuação variou de 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 = pior e 100 = melhor para cada domínio, foram demonstrados em média  $\pm$  erro padrão da média. Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final (*t*-Student;  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p < 0,05$ ). 55

**Figura 17** –Valores da quantificação de citocinas dos líquidos sinoviais coletados antes e 6 meses após as intervenções. A) IL-1b; B) IL-6; C) IL-8; D) IL-10; E) IL-12p70; F) TNF e G) Porcentagem de variação dos valores antes e 6 meses após as intervenções. + indica aumento da concentração. – indica redução da concentração. Os valores foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final (*t*-Student;  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p < 0,05$ ). 57

<b>Tabela 1</b> – Características dos pacientes coletadas durante a anamnese e entrevista	49
<b>Tabela 2-</b> Dados dos parâmetros analisados por ensaios enzimáticos e colorimétricos do líquido sinovial coletado	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OA – Osteoartrite

AH – Ácido Hialurônico

CTE – Células tronco embrionárias

CTM – Células tronco mesenquimais

PRP- Plasma Rico em Plaquetas

EVF- Estroma Vascular Fracionado

HGF – Hepatocyte growth factor (Fator de crescimento dos hepatócitos)

VEGF – Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotelial vascular)

PGF – Placental growth factor (Fator de crescimento da placenta)

TGF $\beta$  – Transforming growth factor beta (Fator de crescimento transformador beta)

FGF-2 – Fibroblast growth factor 2 (Fator de crescimento de fibroblasto 2)

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PBS - Solução de tampão fosfato

DMEM – Meio DMEM de baixa glicose

SBF – Soro Bovino Fetal

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1. Componentes da cartilagem.....	15
2.2. Organização estrutural da cartilagem .....	16
2.3. Processo de reparo da cartilagem.....	17
2.4. Epidemiologia e fisiopatologia da Osteoartrite.....	18
2.5. Classificação e exames de imagem para a avaliação da OA .....	20
2.6. Tratamentos atuais existentes e suas limitações .....	21
2.6.1. Intervenções conservadoras .....	21
2.6.2. Intervenções cirúrgicas .....	23
2.7. Células Tronco.....	26
2.7.1. Células tronco mesenquimais .....	26
2.7.2. Células tronco do tecido adiposo.....	28
2.8. Plasma Rico em Plaquetas .....	29
3. OBJETIVOS.....	30
4. METODOLOGIA.....	31
1- ETAPA LABORATORIAL .....	31
4.1. Casuística e obtenção das culturas primárias.....	31
4.2. Coleta do Lipoaspirado e Cultivo Celular .....	31
4.3. Ensaio Biológicos.....	33
4.3.1. Caracterização por imunofenotipagem das células tronco mesenquimais .....	33
4.3.2. Comprovação da multipotência por ensaio de diferenciação celular .....	33
4.3.2.1. Diferenciação adipogênica .....	34
4.3.2.2. Diferenciação osteogênica.....	34
4.3.2.3. Diferenciação condrogênica .....	35
4.3.3. Ensaio Cometa.....	35
4.3.4. Análise morfológica .....	36
4.3.5. Ensaio de morte celular citológico e molecular.....	36
4.3.6. Viabilidade celular e Integridade de membrana .....	37
2- ETAPA CLÍNICA .....	37
4.4. Casuística dos pacientes tratados na pesquisa .....	37
4.5. Procedimentos cirúrgicos.....	39

4.5.1. Videoartroscopia de joelho .....	39
4.5.2. Procedimento de coleta de gordura, extração e cultivo de células tronco mesenquimais .....	39
4.6. Procedimentos realizados para o preparo das seringas utilizadas nas intervenções	41
4.7. Avaliação do líquido sinovial .....	43
4.8. Questionários .....	43
4.9. Análise estatística .....	44
5. RESULTADOS .....	44
1- ETAPA LABORATORIAL .....	44
5.1. Caracterização das Células tronco mesenquimais .....	44
5.2. Ensaio Cometa .....	45
5.3. Análise morfológica.....	46
5.4. Morte Celular .....	47
2- ETAPA CLÍNICA .....	49
5.5. Comprovação de multipotência das células tronco mesenquimais.....	50
5.6. Western Ontario McMaster Universities .....	50
5.7. Escala Visual Analógica de dor .....	52
5.8. Short Form Health Survey 36 .....	53
5.9. Análise do líquido sinovial .....	55
5.10. Reações adversas .....	59
6. DISCUSSÃO .....	59
7. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS .....	65
ANEXO A .....	80
ANEXO B .....	83
ANEXO C .....	86
ANEXO D .....	90
ANEXO E.....	94
ANEXO F.....	94
ANEXO G .....	97

## 1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença complexa resultante do processo de degradação da cartilagem articular e alterações no osso subcondral e sinóvia. O processo de envelhecimento é a principal etiologia, resultando na incapacidade em realizar suas atividades de vida diária, devido ao quadro álgico que apresenta. Essa é uma questão que se agrava no mundo inteiro e que no Brasil tem causado aumento de gastos na saúde pública, visto que a população está em processo de envelhecimento. Esses fatos aumentam o número de pacientes que se encontram nas filas de espera para colocação de prótese total, a fim de, solucionar seu problema e retornar as suas atividades. Porém muitos pacientes ainda não se encontram na idade, na qual a prótese é indicada, e continuam convivendo com esta afecção, tentando adaptar a sua vida a suas condições dolorosas.

As técnicas disponíveis atualmente para o tratamento de OA, podem resultar em alívio dos sintomas, mas não na regeneração do tecido lesado. A idealização e construção de um substituto biológico que recomponha a cartilagem articular nativa impõem o uso de células vivas que sejam capazes de sintetizar e manter a matriz cartilaginosa. Em contraste com a reparação já conquistada em outros estudos, a regeneração da cartilagem é definida como a restituição da cartilagem articular em sua condição original aos níveis histológicos, bioquímicos e biomecânicos, tornando-se indistinguíveis da cartilagem sadia. O tratamento ideal então para esta condição visaria à restauração do deslizamento da cartilagem e da habilidade de resistência aos desgastes dos componentes articulares, melhorando a mecânica da articulação e reduzindo a progressão da OA. Os resultados pré-clínicos do nosso grupo, nos permitiram concluir que uma terapia realizada com a conjugação de células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas é benéfica para regeneração cartilaginosa da OA no modelo experimental por meio de efeito parácrinos e diferenciação celular. Estes dados são importantes para uma maior investigação acerca da resolução do quadro de OA em humanos. Afim de, garantir a segurança e qualidade das células tronco mesenquimais do tecido adiposo em nosso laboratório, as mesmas foram analisadas durante o cultivo celular da 1ª a 10ª passagem.

O presente estudo, trata-se então da primeira proposta de terapia celular em humanos no estado de Mato Grosso do Sul, em parceria com um Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP/UFMS). A utilização de células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas no tratamento de doenças crônicas não

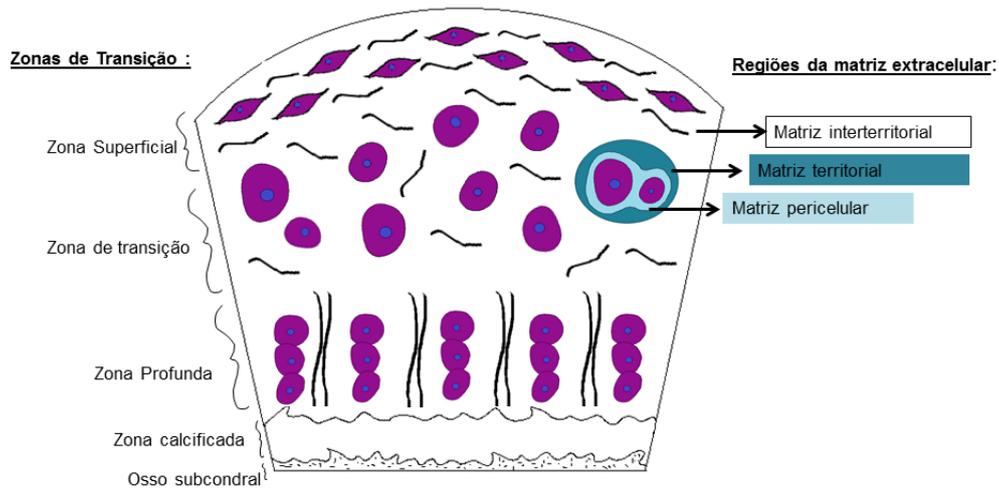
degenerativas ortopédicas, já tem sido uma prática desenvolvida em grandes centros de todo o mundo. No entanto, é pioneira em nossa região. Da mesma forma, é inédita a comparação do efeito entre essas duas terapias, sua conjunção e a cirurgia de videoartroscopia.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Componentes da cartilagem**

A cartilagem hialina é um tecido conjuntivo ímpar, idealmente adaptado para atuar como absorvente elástico contra choques e como superfície de resistência contra desgastes. Essa capacidade de deformação de absorção de impacto se dá por sua composição que compõem uma matriz hidratada contendo de 70 a 80% de água . A matriz cartilaginosa é composta por 48 a 62% de colágeno tipo II e 22 a 38% de proteoglicanos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Outros tipos de colágenos como V, VI, IX, X e XI, e outros colágenos secundários, fazem parte da composição da matriz cartilaginosa, as glicosaminoglicanas presentes correspondem a 15% e são estes: o condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato, heparam-sulfato e ácido hialurônico (MANDELBAUM et al., 1998).

A cartilagem articular é um tipo especial de tecido conjuntivo, sua falta de inervação e vascularização dificulta seu processo de reparo. Sua arquitetura e composição bioquímica são reguladas pelos condrócitos (SÄÄMÄNEN et al., 2010). Essas células são protegidas por uma região de matriz estreita que é estruturalmente distinta da matriz extracelular, esta região única é chamada de matriz pericelular, que se integra com o tecido circundante por meio da matriz territorial, ligando a matriz pericelular a “matriz interterritorial” (ou seja, a matriz extracelular) (Figura 1) (GUILAK et al., 2018). Esta matriz extracelular é porosa e permeável e fornece as capacidades exclusivas para a pressurização de fluídos que permitem o suporte de carga a longo prazo pela articulação (GUILAK et al., 2018).



**Figura 1** – Esquema de regiões da matriz e zonas estruturais da cartilagem articular (Fonte: Ilustração da autora)

A nutrição desta região é suportada pelo líquido sinovial e pelo osso subcondral por difusão por meio do movimento articular regular. O movimento da articulação sinovial induz a entrada e saída do líquido sinovial da cartilagem articular para fornecer nutrientes e descartar produtos residuais para a cartilagem (SOPHIA FOX; BEDI; RODEO, 2009). O osso subcondral proximal fornece nutrientes como glicose, oxigênio e água para a cartilagem por perfusão a partir de seus vasos densos na região subcondral (IMHOF et al., 2000). Contém poucas células, principalmente condrócitos e sinoviócitos, transferidos da cartilagem e da sinóvia, assim como alguns leucócitos migrados. As outras moléculas de baixo peso, presentes no plasma são a glicose, os aminoácidos, o ácido úrico, a bilirrubina e algumas enzimas. A instalação de um processo inflamatório ocasionado por alguma lesão aguda ou patologia em desenvolvimento, pode aumentar a permeabilidade vascular capilar e permitir que moléculas maiores, como o fibrinogênio, atravessem a sinóvia e se integrem ao líquido sinovial. Isso leva a uma alteração de sua densidade e efetividade em sua função na articulação (MELO, 2003). Portanto, a interação entre esses componentes desempenha o papel-chave na homeostase da articulação.

## 2.2. Organização estrutural da cartilagem

A superfície das articulações sinoviais é revestida por matriz pericelular e no adulto pode medir de 2 a 4µm de espessura. Os condrócitos são protegidos por esta matriz e se apresentam dispostos em zonas (GUILAK et al., 2018). Microscopicamente, essa região se divide em zona superficial, intermediária e mais profunda, sendo a última

ancorada ao osso subcondral, conferindo estabilidade à cartilagem articular. Enquanto macroscopicamente, a cartilagem articular é brilhante, lisa, branca e semirrígida (ALLAN et al., 2007). As articulações sinoviais também apresentam ligamentos intra- e extracapsulares.

A aparente simplicidade estrutural da cartilagem hialina é complexa. Apesar da falta de inervação e vasos sanguíneos, este tecido é composto por várias camadas, diferindo ligeiramente na organização (por exemplo, densidade celular, composição da matriz extracelular (MEC) e orientação das fibras de colágeno) (LEE, Y.; CHOI; HWANG, 2018), e assim, no módulo elástico local (ANTONS et al., 2018). Além disso, embora a cartilagem contenha apenas um tipo de célula referida como condrócitos, as células em diferentes camadas têm morfologias e funcionalidades distintas (YIN et al., 2018). Este tecido é geralmente dividido em quatro zonas (Figura 1) (LI et al., 2016): 1- zona superficial em contato com o líquido sinovial, contendo condroprogenitores; 2- zona intermediária ou de transição abaixo a zona superficial, contendo condrócitos redondos; 3- zona profunda ou radial; e 4 – camada calcificada em contato direto com o osso subcondral subjacente.

### **2.3. Processo de reparo da cartilagem**

O processo de cicatrização de uma possível lesão restrita à cartilagem hialina articular não obedece inteiramente às três fases naturais que são necrose, inflamação e reparação (DOROTKA et al., 2005). Entre as razões para essa ineficiência da resposta reparadora após o dano incluem a inabilidade dos condrócitos em migrar ao local da injúria, a natureza avascular da cartilagem e a ausência do coágulo de fibrina (MITHOEFER, 2013). Por essas inabilidades, este tecido de reparação não organiza as fibras em forma de arco, nem zonas de estratificação bem definidas, sendo mais semelhante ao tecido fibroso que à própria cartilagem hialina. Destaca-se também que a competência mecânica do tecido reparado é significativamente inferior à cartilagem sadia. Logo esse se torna um fator limitante já que a cartilagem original não é restabelecida neste processo de reparação (CAPLAN et al., 1997).

Como todo condrócito é rodeado por esta região de tecido, quaisquer sinais químicos ou físicos que os condrócitos percebem podem ser modulados pela matriz pericelular. Sabe-se que ela serve como "filtro" dos sinais biomecânicos e bioquímicos para os condrócitos (CHEN et al., 2013) regulando a mecânica e ambientes físico-

químicos na cartilagem e na homeostase do ambiente articular (KHOSHGOFTAR; TORZILLI; MAHER, 2018). Essa homeostase em um adulto normal é alcançada graças à complexa interação entre a mecânica da articulação, os fatores de crescimento, os hormônios e o envelhecimento, a fim de, não haver perda nem ganho de tecido (BUCKWALTER; MANKIN; GRODZINSKY, 2005). Todo esse processo possui um regulador adicional também chamado processo de mecanotransdução (KHOSHGOFTAR; TORZILLI; MAHER, 2018). Esse evento é a capacidade de resposta por meio da expressão gênica dos condrócitos a estímulos mecânicos (BOMER et al., 2016). As ocorrências de injúria neste local leva ao sequestro de vários fatores de crescimento e podem desempenhar um papel importante na regulação da atividade dos condrócitos e na qualidade da cartilagem local (VINCENT et al., 2004).

Vários métodos para reparo de cartilagem foram estudados até o momento, tanto para a resolução dos quadros de lesão de cartilagem em pacientes jovens, para que suas lesões não evoluam para a OA, quanto para pacientes mais idosos, a fim de, promover a melhora do quadro já instalado de OA e postergar a necessidade da prótese total da articulação. Porém muitos deles parecem ainda ter limitações devido à baixa capacidade regenerativa da cartilagem articular.

#### **2.4. Epidemiologia e fisiopatologia da Osteoartrite**

Atualmente no mundo, a OA é considerada a 4ª doença que mais promove incapacidade funcional (LAPUENTE; DOS-ANJOS; BLÁZQUEZ-MARTÍNEZ, 2020). No Brasil, tem-se a previsão de chegar em 2050 a 64 milhões de indivíduos com OA, se o fator envelhecimento da população for considerado. Este fato resulta em uma carga socioeconômica relevante e afeta o produto interno bruto dos países desenvolvidos (HILIGSMANN et al., 2013). Visto que esta patologia pode causar limitações severas das atividades diárias afetando seriamente a qualidade de vida do indivíduo, desde seu bem-estar até sua capacidade de realizar seu trabalho.

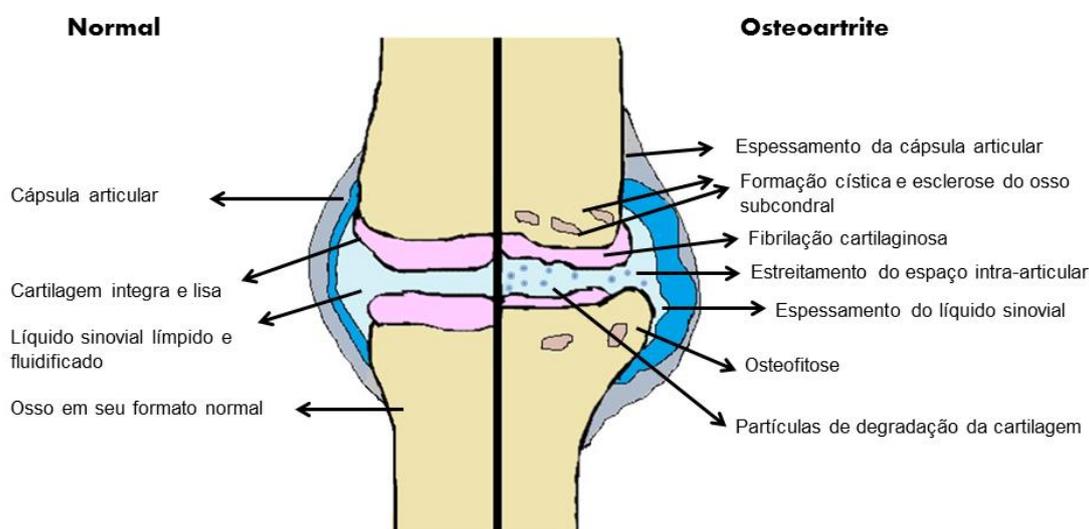
Dentre as articulações, a do joelho é a mais frequentemente afetada, por sustentar o peso de todo corpo em conjunto com as sucessíveis mudanças bruscas de direção do corpo durante as atividades de vida diária sem nenhum suporte, evidenciando um maior desgaste da cartilagem articular (ZACARON et al., 2006; MICHAEL; SCHLÜTER-BRUST; EYSEL, 2010; ADATIA; RAINSFORD; KEAN, 2012). Em relação aos fatores de risco, os mais comuns citados são: Sexo, sendo as mulheres mais propensas a

desenvolver esta patologia (ALLEN; GOLIGHTLY, 2015), principalmente aquelas que já atingiram a menopausa (COOPER; JAVAID; ARDEN, 2014); Genética, acredita-se que características individuais em genes específicos que codificam proteínas estruturais da matriz da cartilagem extracelular, aumentam em 30–65% do risco de desenvolvimento de OA (ALLEN; GOLIGHTLY, 2015); Obesidade, o aumento exacerbado de peso e a presença de síndrome metabólica também são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de OA (FRANCISCO et al., 2018); Lesões pré-existentes na articulação (HINCKEL; GOMOLL, 2017) e o envelhecimento que é responsável pela maioria dos casos de desenvolvimento de OA, tendo a prevalência e a incidência particularmente pronunciadas nas articulações do joelho, quadril e mão. Cerca de 50% dos idosos com mais de 65 anos e 80% dos maiores de 75 anos são afetados pela OA (LOESER; COLLINS; DIEKMAN, 2016).

A OA também denominada doença articular crônica degenerativa ou osteoartrose, pode ser definida em termos patológicos, como a reparação aberrante e eventual degradação da cartilagem articular em associação com alterações no metabolismo ósseo subcondral periarticular, osteofitose, inflamação sinovial, fibrose e formação de fissuras, podendo resultar em perda total da superfície articular (Figura 2) (ALLEN; GOLIGHTLY, 2015). A OA pode ser classificada como primária devido ao processo de envelhecimento, onde há degeneração cartilaginosa por razões desconhecidas; ou secundária, quando ocorrem respostas a alterações que causam instabilidade articular e sobrecarga ou em resposta a outra afecção articular já reconhecida como, por exemplo, uma infecção ou inflamação imunomediada (SCHULZ, 2008). Esse desequilíbrio fisiológico de degradação e síntese, resultam em alterações na composição da matriz extracelular local (NELSON et al., 2014). Esse desequilíbrio leva a uma inflamação, sendo este um fator importante para o entendimento do progresso da OA. Várias citocinas, como interleucina-1 $\beta$  e fator de crescimento transformador  $\beta$ , proteases e óxido nítrico sintetase são peças chave na patogênese da OA (BENNELL; HUNTER; PATERSON, 2017).

Nos estágios iniciais da OA, os condrócitos quiescentes são ativados para remodelar o conteúdo da matriz da cartilagem (DIEPPE; LOHMANDER, 2005). Resumidamente, esse processo fisiopatológico pode ser dividido em três fases que se sobrepõem. No início, a matriz extracelular degrada em um nível molecular, o teor de água aumenta, o tamanho das moléculas de agregano dentro do tecido diminui levando a

mudanças nas propriedades mecânicas da cartilagem nessa fase anabólica hipertrófica (LARK et al., 1997). Na segunda fase, os condrócitos tentam compensar este dano por meio do aumento na proliferação e em sua atividade metabólica, pela formação de *clusters* celulares formados por clonagem, aparecendo rodeados por moléculas da matriz recém-sintetizada. Esta condição pode permanecer por vários meses e anos levando a formação de tecido fibroso na região da matriz pericelular. Na terceira fase, após o fracasso dessas tentativas de compensação precoce, os condrócitos tornam-se catabólicos e sofrem senescência e apoptose e, em última instância, resultam na degeneração progressiva da cartilagem articular (HUNZIKER, 2002), que é considerado como um estado irreversível de OA (LOESER et al., 2012). Logo, a progressão da OA é provavelmente atribuível à ação de moléculas de sinalização, tais como citocinas pró-inflamatórias que induzem a produção de enzimas de degradação da matriz enquanto suprime a síntese da mesma. Durante essa degradação progressiva da cartilagem articular, o osso subcondral interage com a cartilagem por meio de vários mecanismos de sinalização que são apresentados e associados ao aumento da dor e da disfunção (SCANZELLO et al., 2011), devido à sensibilização periférica e central (DIEPPE; LOHMANDER, 2005).



**Figura 2** - Esquema da articulação do joelho representando os tecidos articulares sinoviais afetados na Osteoartrite (Fonte: Ilustração da autora)

## 2.5. Classificação e exames de imagem para a avaliação da OA

Radiograficamente a OA tem quatro graus, que variam de acordo com a severidade da doença. É considerado 0 - quando não há nenhuma anormalidade aparente; 1- como o começo do aparecimento de osteófitos; 2- moderado estreitamento da

cartilagem articular associada a moderada esclerose do osso subcondral; 3 - > 50% de estreitamento do espaço articular, cômido aparecimento de pseudócitos (associados à inflamação) no osso subcondral e alteração na forma das superfícies articulares, esclerose subcondral extensa; 4 - destruição das articulações, espaço articular obliterado, cistos subcondrais, posição subluxada (KELGREN; LAWRENCE, 1957). Clinicamente, todos esses achados são caracterizados em; presença de deformação da articulação, dor, rigidez matinal, crepitação óssea e atrofia muscular (EVERHART; ABOULJOURD; FLANIGAN, 2018).

Outra forma de avaliar é com a ressonância magnética, sendo possível avaliar a cartilagem articular, tecidos moles, edema e possíveis lesões na medula óssea (lesão subcondral). A possibilidade de observação do real grau e o tamanho da lesão da cartilagem é de suma importância para orientar o tratamento, porém ainda deve-se subestimar o tamanho da lesão em até 60% com este exame (GOMOLL et al., 2011). Já com a tomografia computadorizada é possível observar detalhes anatômicos finos de osso subcondral quando há alguma suspeita de lesão na região. São exemplos de situações de possível visualização: uma perfuração subcondral, osso enxerto, ou transplante de aloenxerto osteocondral, bem como para osteocondrite dissecante ou fratura osteocondral. Se durante o exame for adicionado o contraste intra-articular se torna possível também a visualização da cartilagem da articulação (HINCKEL; GOMOLL, 2017).

A videoartroscopia é uma técnica minimamente invasiva, e a partir deste procedimento é possível observar alterações na sinóvia que normalmente não são visíveis em exames de imagem (AF KLINT et al., 2009). Os pequenos detalhes da detecção da progressão da OA se descobertos inicialmente podem prever alterações estruturais e clínicas com maior precisão (AYRAL et al., 2005). A artroscopia também pode ser usada para diferenciar a sinóvia normal de reativa e inflamatória na OA, que pode ser uma distinção importante, uma vez que a inflamação sinovial parece ter um efeito direto na cartilagem adjacente (SELLAM; BERENBAUM, 2010).

## **2.6. Tratamentos atuais existentes e suas limitações**

### **2.6.1. Intervenções conservadoras**

Dentre os tratamentos existentes, a maioria deles tem como objetivo proporcionar o alívio da dor, que é um dos principais sintomas. Quando a OA está em sua fase inicial, deve-se dar ênfase ao regime terapêutico não-farmacológico. A Arthritis Foundation

recomenda que os pacientes com OA realizem a autoeducação no manejo da condição e encorajem a perda de peso para pacientes com sobrepeso e obesidade. Isso implica dieta e exercício para reduzir e gerenciar o peso saudável; no entanto, devido à dor e limitação física resultante da OA, a cinesioterapia mesmo sendo benéfica, muitas vezes é de difícil implementação. Isso porque é necessária frequência e manutenção do hábito do paciente na prática dos exercícios para que seus resultados e melhora do quadro sejam alcançados (WELLSANDT; GOLIGHTLY, 2018). Como a maioria possui muita dificuldade em relação a sua movimentação e execução dos movimentos, os resultados tendem a aparecer ainda mais devagar, pois tudo deve ser feito de forma cautelosa. A fisioterapia na OA tem como objetivo aperfeiçoar a biomecânica articular para manter o alinhamento correto e reduzir qualquer excesso de carga anormal sobre a articulação envolvida, desta forma a hidroterapia tem mostrado bons resultados (DIAS et al., 2017). O alívio da dor, da rigidez e de outros sintomas associados também fazem parte dos objetivos da reabilitação física, alcançados com o uso de técnicas como terapia manual, laser, termoterapia e eletroterapia (BOSSSEN et al., 2015; BOVE et al., 2018).

As medicações, quando utilizadas, tem o objetivo de tratar os sintomas e a primeira categoria empregada no alívio da dor e a segunda categoria para retardar, parar ou reverter as alterações patológicas que ocorrem nos tecidos articulares (MCALINDON; BANNURU; SULLIVAN; ARDEN et al., 2014). A primeira categoria inclui anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais, analgésicos como amantadina, gabapentina e opióides. Estes compostos promovem claramente alívio da dor e alguns estudos observaram evidências de que eles podem levar a mudanças estruturais na cavidade articular. Porém o uso a longo prazo desses medicamentos apresenta efeitos tóxicos ao organismo (HARVEY; HUNTER, 2008). Já na segunda estão glicosaminoglicanos, colágenos orais, ácidos graxos essenciais e compostos naturais de caráter anti-inflamatório e antioxidantes, como a Curcumina, Vitamina D, Gengibre, *Miconia Albicans* “canela de velho”, *Uncaria Tomentosa* “unha de gato”, *Harpagophytum Procumbens* “garra do diabo”, Magnésio e Metilsulfonilmetano “MSM” (FUGGLE; COOPER; OREFFO; PRICE et al., 2020). Os glicosaminoglicanos, colágenos orais, ácidos graxos essenciais e a vitamina D irão auxiliar no aumento da síntese de colágeno e proteoglicanos tipo II em condrócitos articulares humanos e são capazes de reduzir a produção de alguns mediadores pró-inflamatórios e metaloproteases, além de reduzir o processo de morte celular e melhorar o equilíbrio anabólico/catabólico

da matriz da cartilagem extracelular. Já os compostos naturais, auxiliarão na regulação da inflamação sistêmica e aumento da atividade imunomodulatória como um todo, a fim de controlar o processo que perturbou a homeostase articular (FUGGLE et al., 2020) Porém, a falta de aconselhamento e informações clínicas adequadas é um problema para os médicos ao considerarem essas formas alternativas de terapia para os seus pacientes.

Outra opção medicamentosa é o uso de corticosteroides de forma intra-articular. Essa abordagem é um investimento de alto custo que possui efeitos em relação ao alívio de dor melhorando funcionalidade, sendo o benefício geralmente transitório com duração de 1 semana a 24 meses (LEVY et al., 2018). Entretanto, segundo a Academia Americana de Ortopedia Cirurgiões (AAOS) não há evidências para a recomendação do uso de corticosteróides intra-articulares no tratamento da OA de joelho (JEVSEVAR, 2013), mas mesmo assim os médicos ainda optam por esta opção de tratamento.

O uso de viscosuplementos também tem sido averiguado, um dos mais utilizados é o ácido hialurônico (AH). Em articulações com OA observa-se AH em concentrações endógenas menores, o que explica os efeitos de sua reposição nestas articulações (ALTMAN et al., 2015). AH é um componente essencial dos proteoglicanos, que se entrelaça entre as fibras de colágeno e ajuda a prender a água aumentando a viscosidade do fluido intra-articular, diminuindo o estresse oxidativo dentro da articulação e inibindo a fagocitose de macrófagos, e com isso resultando em um antiinflamatório benéfico (BELK et al., 2021).

### **2.6.2. Intervenções cirúrgicas**

A decisão de avançar com tratamento cirúrgico deve levar em consideração as variáveis dependentes do paciente (idade, capacidade física, índice de massa corporal, comorbidades e patologias associadas) e da lesão (nível/ grau de lesão, o tamanho e localização e os limites e história de intervenções anteriores), considerando sempre as expectativas, preocupações e objetivos do paciente para esta modalidade de tratamento. O estado mecânico da articulação do joelho é muitas vezes a chave do sucesso ou fracasso das técnicas cirúrgicas de reparação da cartilagem articular (COOPER; JAVAID; ARDEN, 2014).

As modalidades cirúrgicas são organizadas em 3 categorias: paliativas (lavagem e desbridamento), de estimulação da medula óssea (furagens/ perfurações, artroplastia por abrasão ou microfratura) e técnicas de substituição (enxerto). A maioria das técnicas,

concebidas para o tratamento das lesões da cartilagem articular, essencialmente reparam significativamente o tecido cartilaginoso. Com isso, se assume a teoria de que o estímulo proporcione um recrutamento de células estromais da medula para o local de reparo através destes canais, levando à formação subsequente de tecido que se assemelha a cartilagem articular, porém esta abordagem só é eficaz para pequenos reparos (GOBBI; KARNATZIKOS; KUMAR, 2014). Além disso, ainda existe um déficit no processo regenerativo pela deposição da fibrocartilagem (COOPER; JAVAID; ARDEN, 2014).

Existe também a opção pela substituição condral direta (mosaicoplastia e transplante de aloenxerto osteocondral). Esses procedimentos são realizados durante a cirurgia de vídeoartroscopia onde, após debridamento adequado e aparamento da área lesada, pequenos plugues cilíndricos retirados de áreas não influenciadas pela descarga de peso são inseridos no reparo (JACOBI et al., 2011). A restauração da área afetada por meio da mosaicoplastia muitas vezes produz um resultado funcional desejável, porém os resultados podem variar muito dependendo da idade, sexo e tamanho da lesão (NAKAGAWA et al., 2016). Outras desvantagens incluem dor no local doador e a disponibilidade limitada de área de tecido doado, o que torna a mosaicoplastia aplicável apenas em defeitos pequenos a intermediários. A mosaicoplastia é considerada um desafio cirúrgico, pois todos os plugues implantados para fixação do tecido devem ser ajustados com precisão para fornecer a superfície plana da cartilagem articular (GRACITELLI et al., 2015).

Para pacientes jovens, no tratamento de lesões osteocondrais maiores que 4 cm<sup>2</sup> uma opção é transplante osteocondral fresco. Sua vantagem é proporcionar ao paciente a substituição do tecido articular lesado e doente por outro tecido biológico saudável, com matriz osteocondral, arquitetura de fibras colágenas preservadas, cartilagem hialina e condrócitos bons. Resumidamente, as lesões condrais são expostas através de uma artrotomia e, em seguida, as lesões são medidas e dimensionadas cuidadosamente. Posteriormente é realizado o corte da região lesada e a mesma proporção é retirada e preparada a partir do aloenxerto osteocondral (TÍRICO et al., 2017). Para a execução da técnica todas as peças são adquiridas em Bancos de Tecidos credenciados (MCALLISTER et al., 2007). A correta extração e conservação da peça são de suma importância para a preservação da viabilidade e manutenção das células vivas da peça. Atualmente, essa prática clínica é limitada pela disponibilidade de tecidos de doadores compatíveis com os pacientes elegíveis de recebimento (STOKER et al., 2018).

A forma mais radical de cirurgia é a colocação da prótese total da articulação, adotada quando há grande deformação da estrutura articular. Essa troca irá permitir uma melhora significativa frente ao quadro inicial, da qualidade de vida e realinhamento da articulação acometida. Infelizmente devido ao processo cicatricial de grande extensão, restará aparente limitação funcional resultante da diminuição da amplitude de movimento que a colocação da prótese proporciona, sendo de suma importância o acompanhamento fisioterápico desde o pós-cirúrgico imediato (MOLLON et al., 2013).

Todas essas técnicas disponíveis e liberadas atualmente para o tratamento de OA podem resultar em alívio dos sintomas, mas não na regeneração do tecido lesado. A idealização e construção de um substituto biológico que recomponha a cartilagem articular nativa impõem o uso de células vivas que sejam capazes de sintetizar e manter a matriz cartilaginosa. Em contraste com a reparação já descrita em outros estudos, a regeneração da cartilagem é definida como a restituição da cartilagem articular em sua condição original aos níveis histológicos, bioquímicos e biomecânicos, tornando-se indistinguíveis da cartilagem sadia. Com isso, foram desenvolvidas as técnicas de implante de condrócitos autólogos (ACI) recomendado para pacientes com grau III e IV, de acordo com a Sociedade Internacional de Reparo de Cartilagem (ICRS), para Lesões  $\geq 2 \text{ cm}^2$  localizadas em as regiões do côndilo femoral ou troclear (HINCKEL; GOMOLL, 2017). A técnica ACI consiste na utilização de condrócitos autólogos expandidos *in vitro* para restaurar a cartilagem articular, porém ela apresenta risco de distribuição desigual e extravasamento de condrócitos, além de exigir exposição mais extensa devido à retirada de enxerto de periósteo. Essas pequenas situações levaram ao desenvolvimento da técnica de implantação de condrócitos autólogos baseados em matriz, onde os expandidos em laboratório do paciente são semeados em uma membrana. Essas podem ser andaime de colágeno tipo I / III (MACI), andaime de colágeno bovino tipo I de favo de mel (NeoCart®), esponja de colágeno tipo I de dupla camada contendo condroitina (Hyalograft® C), e hidrogel de agarose / alginato (Cartipatch®) (HUANG, B. J.; HU; ATHANASIOU, 2016). Durante o procedimento de entrega desta membrana, os condrócitos são protegidos com cola de fibrina, esta membrana é moldada e aparada de acordo com o tamanho da lesão, qualquer material restante é aparado de forma que não haja proeminência que possa comprometer a estabilidade mecânica do implante durante a amplitude de movimento. Após o ajuste, ele é posicionado com o lado poroso voltado para o osso subcondral e, em seguida, fixado com cola de fibrina ou suturas adicionais ao

redor da periferia. Esse procedimento pode ser feito por via artroscópica, reduzindo assim tanto a extensão da exposição quanto os tempos de operação, conferindo segurança e eficácia na maioria dos pacientes (BASAD et al., 2015). Entretanto, com todas essas suturas ao redor da periferia para fixação da matriz, ainda se faz necessária a descoberta de uma forma de tratamento que visa a promoção do deslizamento natural da cartilagem possibilitando certa resistência aos desgastes por impactos diários e assim possibilitando a redução da progressão da OA (MOLLON et al., 2013). Por fim, a restauração *in vivo* e / ou reconstrução *in vitro* da cartilagem hialina é o objetivo de inúmeras abordagens de engenharia de tecidos; no entanto, o sucesso permanece limitado até o momento.

## **2.7. Células Tronco**

Caracterizam-se as células tronco por suas características primordiais: a capacidade de auto renovação e a de diferenciação em um ou mais tipos de células especializadas, que, quando reintroduzidas no organismo, adquirem a funcionalidade de qualquer tecido, tornando-as extremamente atrativas para a regeneração de tecidos. (CAPLAN, 2000). O grau de "potência", ou seja, a gama de opções de diferenciação para gerar diferentes tipos de células, é utilizado para classificá-las hierarquicamente, podendo ser totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As totipotentes são células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005). As pluripotentes são originadas das células internas do blastocisto e podem formar todos os tecidos que compõem o embrião, sendo também chamadas de células tronco embrionárias (CTE) (ZATZ, 2004). Já as multipotentes provêm de células tronco adultas, e são aquelas capazes de originar no mínimo 3 subgrupos de linhagens celulares (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005). Essas correspondem a uma população extremamente heterogênea, e sua subclassificação já tem sido muito bem descrita na literatura em neural, hematopoiéticas e mesenquimais (WAGERS; WEISSMAN, 2004; KALRA; TOMAR, 2014) .

### **2.7.1. Células tronco mesenquimais**

As células tronco mesenquimais (CTM), possuem capacidade de autorrenovação, com capacidade de manter sua função por várias passagens e também sem perder sua habilidade de diferenciação (ZOU et al., 2020). É considerada também uma população

heterogênea de células, que refletem em propriedades morfológicas e biológicas variáveis. Três subpopulações com características intrínsecas podem ser distinguidas: células pequenas com capacidade rápida de autorrenovação, normalmente não aderentes; células fusiformes, normalmente com função parácrina; e células grandes e planas, que podem estar associadas ou a senescência ou a células tronco estromais. Infelizmente não é possível distingui-las morfológicamente tão facilmente, sendo possível realizar apenas por meio de marcadores de superfície específicos.

O “efeito parácrino”, muitas vezes descrito na literatura, age na modulação de respostas inflamatórias e imunológicas resgatando então a homeostase do local receptor da terapia (AL-GHADBAN; BUNNELL, 2020). Isto acontece não só devido a secreção de fatores de crescimento e citocinas comumente citadas, mas principalmente pela liberação de vesículas extracelulares diretamente no meio extracelular, que variam de 10 nm a vários micrômetros. Essas vesículas contêm vários componentes, incluindo material genético na forma de RNA mensageiro (mRNA), microRNA (miRNA), lipídios e proteínas bioativas (TO et al., 2020). Elas podem ativar a sinalização intracelular da membrana plasmática ou podem ser internalizadas, regulando positivamente a produção endógena das células nativas (KIM, M. et al., 2019).

As CTM podem ser isoladas de inúmeras fontes tais como medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo, membranas fetais, líquido amniótico e músculo esquelético dentre outros numerosos tecidos adultos (BOUWENS, 1998; GRONTHOS et al., 2000; ZUK et al., 2001; JIANG et al., 2002; ZHENG; TANIGUCHI, 2003; BOULTON; ALBON, 2004; GROVE; BRUSCIA; KRAUSE, 2004). Para ser considerada uma CTM, segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, os principais pré-requisitos são: adesão em cultivo de monocamadas, diferenciação em condrócitos, osteócitos e adipócitos *in vitro* e a presença dos marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105, assim como ausência ou negatividade dos marcadores CD45, CD34, CD14 (ou CD11b), CD79 $\alpha$  (ou CD19), e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006; BOURIN et al., 2013).

Pesquisas com CTM adultas ganharam destaque em função de sua facilidade de acesso e abundância, e também por não envolverem questões éticas tal qual como os ensaios com CTE (BURASTERO et al., 2010).

Levando-se em conta o fato de que a capacidade de regeneração na OA é comprometida em função da presença de lesões de caráter extenso e que não permitem o preenchimento suficiente para o retorno da atividade biológica (ALLEN; GOLIGHTLY,

2015), pesquisas recentes demonstram resultados promissores de regeneração do tecido cartilaginoso (DOMPE et al., 2019; BIAZZO et al., 2020; LAM; REUVENY; OH, 2020). Nesse contexto a comunidade científica trabalha na perspectiva do desenvolvimento de terapias celulares com CTM, para que sejam resolutivas na medicina regenerativa ortopédica.

### **2.7.2. Células tronco do tecido adiposo**

A terapia celular com CTM do tecido adiposo é utilizada no tratamento de diversas doenças, principalmente no campo da medicina regenerativa (BORA; MAJUMDAR, 2017; BACAKOVA et al., 2018). O tecido adiposo, uma importante fonte de CTM, pode ser coletado de forma minimamente invasiva e menos dolorosa se comparada com a forma de coleta de outras fontes (DOMPE et al., 2019). Esse tecido apresenta maior rentabilidade de CTM por quantidade de tecido manipulado (BROWN, 2018). O material biológico é retirado do indivíduo por meio de lipoaspiração, e as áreas que mais são exploradas são a gordura de Hoffa, gordura subcutânea da região do abdome inferior, flancos e nádegas (KOH, Y.-G. et al., 2013; FODOR; PAULSETH, 2015).

As CTM têm apresentado resultados interessantes no tratamento de OA (BIAZZO et al., 2020). Sua capacidade de remodelar o tecido cartilaginoso, aumentar o volume da cartilagem tratada com características semelhantes a cartilagem sadia (JO et al., 2014; JO et al., 2017) trouxe esperança para os pesquisadores no desenvolvimento de uma terapia que impedisse a progressão desta patologia. Um fator em questão que tem se levado em consideração é a capacidade angiogênica das CTM no ambiente microfisiológico do local em que ela é aplicada. A presença do Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), já se encontra em demasia nas articulações com OA (TAKANO et al., 2018) e a estimulação da presença deste fator de crescimento pelo uso das CTM interfere diretamente na diferenciação condrogênica, pois devido a sua natureza avascular do tecido cartilaginoso, o processo regenerativo ficaria comprometido (LEE, C. S. et al., 2012). Por isso tem se adotado o uso em conjunto das CTM com o PRP, para melhor direcionamento do efeito parácrino.

Muitos estudos com essa nova terapia celular, ainda são realizados com base nos dados apresentados na literatura, tornando seus protocolos, muitas vezes, ainda não padronizados para aplicação clínica. Detalhes específicos muito importantes, como região

do corpo onde é realizada a coleta da gordura, a forma com a qual o material é lipoaspirado, lavado e digerido, faz com que diversos tipos celulares fiquem disponíveis para o manuseio, havendo a necessidade de critérios para a classificação e separação das CTM (ANVISA, 2017). Por isso o uso das CTM atualmente ainda não é considerado o tratamento padrão para OA. Outra peculiaridade a ser levada em conta é a condição do indivíduo doador, o envelhecimento e o estilo de vida do mesmo tem forte influência em várias propriedades das CTM. Dentre elas podemos destacar a viabilidade, status de proliferação e potencial de diferenciação de várias linhagens (KORNICKA et al., 2015; MAREĐZIAK et al., 2016)

## **2.8. Plasma Rico em Plaquetas**

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto sanguíneo autólogo contendo plaquetas altamente concentradas e vários tipos de fatores de crescimento, proteases e citocinas, que tem a capacidade de ativar uma variedade de vias de sinalização (NGUYEN; BORG-STEIN; MCINNIS, 2011). As plaquetas desempenham um importante papel no início do processo de reparo, pois são responsáveis pelo suporte para a formação de coágulos, o que leva à quimiotaxia de citocinas apropriadas. O PRP usa esse efeito duplo para estimular fibroblastos, CTM e condrócitos autólogos, além de diminuir o processo inflamatório (LE et al., 2018). Nas articulações com OA, foi demonstrado que o PRP afeta células locais e infiltrantes, principalmente células sinoviais, endoteliais, células envolvidas na imunidade inata (como macrófagos) e componentes celulares da cartilagem e ossos (MIFUNE et al., 2013; DHILLON; PATEL; JOHN, 2017).

A principal vantagem do uso do PRP é que seu preparo é considerado simples e de baixo custo, e por ser material oriundo do próprio paciente, é considerado atóxico e incapaz de gerar imunorreação ou eventos mutagênicos (SHAHID; KUNDRA, 2017). O uso do PRP proporciona o equilíbrio do anabolismo e catabolismo na formação de cartilagem, por meio da organização do microambiente inflamatório existente durante a progressão da OA (ANDIA; MAFFULLI, 2013). Desta forma, os benefícios da aplicação do PRP intra-articular refletem-se na diminuição dos sinais clínicos associados à OA, tais como a redução da claudicação e da efusão sinovial. Mas, o principal sinal relatado pela literatura é a redução significativa da dor articular (MONTAÑEZ-HEREDIA et al., 2016). Neste sentido, pesquisas com o uso do PRP, comparado as terapias convencionais,

para o tratamento de lesões em cartilagem articular são de interesse dos ortopedistas pelo seu potencial regenerativo. A utilização dessa abordagem como *scaffold* para o transplante de condrócitos ou CTM também vem apresentando excelentes resultados (BUI et al., 2014; PAK et al., 2016; BANSAL et al., 2017). Assim, a evidência científica básica mostra que o PRP melhora o reparo e retarda a deterioração do tecido fornecendo pelo menos plausibilidade biológica para o seu uso como uma modalidade terapêutica modificadora da doença na OA. Mesmo que o PRP não leve à regeneração da cartilagem, ele ainda pode oferecer benefícios sintomáticos e funcionais via modulação da inflamação e analgesia direta (BENNELL; HUNTER; PATERSON, 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e do infiltrado de plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite não responsiva ao tratamento medicamentoso.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

##### **1- ETAPA LABORATORIAL**

- Identificar as CTM do tecido adiposo por meio de citometria de fluxo.
- Diferenciar as CTM do tecido adiposo humano em tecido adiposo, cartilaginoso e ósseo *in vitro*.
- Avaliar a integridade genômica das CTM antes da terapia celular da 1º a 10º passagem;
- Avaliar o formato das CTM antes e após cada processo de tripsinização da 1º a 10º passagem;
- Avaliar a viabilidade CTM por citometria de fluxo da 1º a 10º passagem;

##### **2- ETAPA CLÍNICA**

- Analisar a qualidade de vida dos participantes, assim como analisar a funcionalidade e características do líquido sinovial antes e após a intervenção da cirurgia de videoartroscopia no joelho com osteoartrite;

- Analisar a qualidade de vida dos participantes, assim como analisar a funcionalidade e características do líquido sinovial antes e após a intervenção com cirurgia de videoartroscopia e aplicação de PRP, no joelho com osteoartrite;
- Analisar a qualidade de vida dos participantes, assim como analisar a funcionalidade e características do líquido sinovial antes e após a intervenção cirurgia de videoartroscopia e terapia celular de CTM em associação com PRP, no joelho com osteoartrite;
- Analisar a qualidade de vida dos participantes, assim como analisar a, funcionalidade e características do líquido sinovial antes e após a intervenção com cirurgia de videoartroscopia e terapia celular de CTM, no joelho com osteoartrite.

## **4. METODOLOGIA**

### **1- ETAPA LABORATORIAL**

#### **4.1. Casuística e obtenção das culturas primárias**

O material biológico utilizado nesta etapa foi proveniente de 3 pacientes, do sexo feminino com idade entre 30-50 anos, que já seriam submetidas ao procedimento de lipoaspiração com um Médico Cirurgião Plástico particular. A obtenção e manipulação deste material foram realizados após aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o protocolo nº 2.866.367. As células tronco mesenquimais do tecido adiposo, utilizadas nos ensaios biológicos a seguir, foram extraídas e cultivadas apenas para a padronização dos processos de cultivo do laboratório e para a realização das técnicas de avaliação propostas desta etapa.

#### **4.2. Coleta do Lipoaspirado e Cultivo Celular**

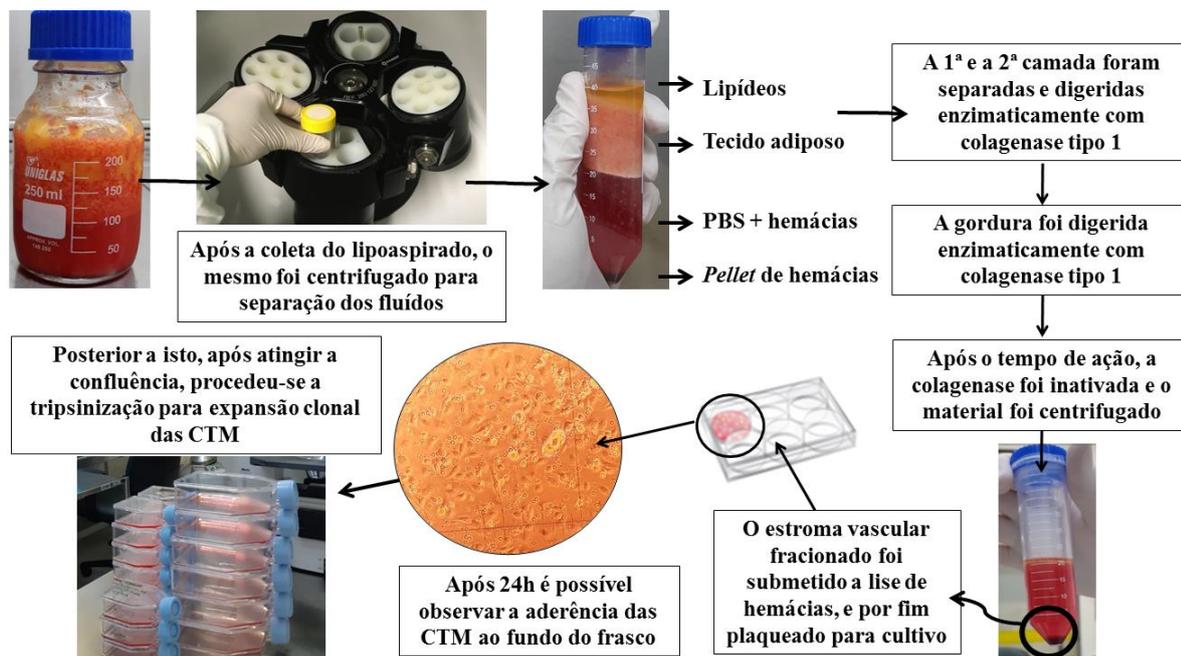
Após devida antissepsia e assepsia (clorexidina alcoólica) as pacientes foram anestesiadas, para isto foram injetados via subcutânea para que houvesse desprendimento do estroma adiposo 100 mL de solução fisiológica, 20 mL de lidocaína 2% e 4mL de NaCl, sendo aguardados 15 min para ação completa. Em seguida, foram feitas incisões cirúrgicas de aproximadamente 1,0 cm na região abdominal do paciente com lâmina de bisturi nº 11 e por meio desta incisão o tecido adiposo foi coletado por lipoaspiração com cânula própria. Esta cânula com calibre médio de 3,25d foi acoplada a uma seringa de 60 mL para coleta da gordura. Foram coletados cerca de 200 mL do material biológico em

recipiente estéril, contendo 200 mL de solução tampão fosfato (PBS; 8g de NaCl; 0,2g de KCl; 1,15g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1000 mL de água deionizada) e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina/Amphotericin, Sigma-Aldrich®, A5955, Lot#017M47) Posteriormente, a cirurgia teve seu prosseguimento conforme o planejado.

O recipiente contendo o material biológico foi encaminhado ao Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen/HUMAP/EBSERH) para adequada manipulação. Para o processamento do lipoaspirado foi utilizada colagenase do tipo 1 (Gibco®; CATS N° 9001-12-1; 290U/mg) para digestão da amostra como descrito por Markarian *et al.* (2014), com adaptações (MARKARIAN *et al.*, 2014). Quando para cada 1mL de gordura, 3mL de colagenase diluída (1mL de PBS : 0,87mg de colagenase) foi utilizada. Após 30 min a atividade enzimática foi neutralizada com 30 mL de DMEM de baixa glicose (Sigma®, D5523, Lot#SLBT7950) acrescido de 2,5 g de HEPES ácido Livre (Sigma®, H3375, Lot#SLCDE799) e 3,7 g de Bicarbonato de sódio (Dinâmica®, 1005-1, P.10.0159.003.00.30) suplementado com 10% SBF (Gibco®, Sigma-Aldrich®, F2561, Lot#SPBB2353V67V) (Figura 3) e, posteriormente, foi centrifugado a 2000 rpm /10min para obtenção de um *pellet* contendo a fração do estroma vascular em alta densidade sendo o sobrenadante descartado.

O *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de solução de lise (0,37g de EDTA; 8g de NH<sub>4</sub>Cl; 0,84 de NaHCO<sub>3</sub>; 100 mL de água deionizada). Em seguida, a solução foi homogeneizada e permaneceu por 10 min a temperatura ambiente com agitação a cada 5 min. O preparado foi centrifugado a 1600 rpm/ 5 min e o sobrenadante descartado.

O *pellet* final foi ressuspenso em 3 mL de DMEM, 10% de SBF e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina/Amphotericin, Sigma-Aldrich®, A5955, Lot#017M47) e então semeado em placa de cultivo de 6 poços (9,60 cm<sup>2</sup>). Logo após 24 horas foi possível observar a adesão das CTM no fundo do frasco. Após 3 dias, a cultura foi lavada cuidadosamente com 2 mL de PBS (3x) para a eliminação de células não aderentes e debris, finalmente recebendo novamente o DMEM. No quinto dia, as culturas foram tripsinizadas (300 µL de tripsina 0,25%), centrifugadas (1200 rpm/5 min), e o *pellet* de cada poço foi transferido para o frasco de cultivo celular de 75cm<sup>2</sup> onde expansão aconteceu da mesma forma até a 10ª passagem, sendo que o meio de cultivo (DMEM, 10% SBF e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina/Amphotericin) foi trocado a cada 72h (10mL).



**Figura 3-** Fluxograma de manipulação do lipoaspirado e processamento realizado para a extração e obtenção de CTM.

### 4.3. Ensaios Biológicos

#### 4.3.1. Caracterização por imunofenotipagem das células tronco mesenquimais

A imunofenotipagem das células foi caracterizada por citometria de fluxo. Aproximadamente  $2.0 \times 10^5$  CTM na 1ª passagem foram coletadas de uma garrafa de 25 cm<sup>3</sup> por tripsinização (1ml tripsina 0,25%/ 3 min), centrifugadas e incubadas durante 30 min a 4°C, com anticorpos, para os seguintes marcadores celulares: CD105, CD90, CD34 e CD133 (Pharmingen BD, San Diego, CA. EUA). As células foram analisadas em um ACCURI C6 (Becton Dickinson, EUA). Os gráficos de caracterização foram gerados com a captura de  $10^4$  eventos (software BD ACCURI C6; Becton Dickinson, EUA).

#### 4.3.2. Comprovação da multipotência por ensaio de diferenciação celular

As células, na 3ª passagem, foram submetidas ao ensaio de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. Para isto, foram semeadas  $10^5$  células/poço em placas de 6 poços. Após a adesão celular (24 horas), o DMEM foi descartado e, em seguida, as células foram cultivadas com o meio específico (DE CARVALHO

SCHWEICH et al., 2017). Os procedimentos foram realizados em triplicatas, com uma cultura de CTM utilizando meio DMEM para controle da diferenciação.

#### **4.3.2.1. Diferenciação adipogênica**

Para cada 1 mL HDMEM, suplementado com 20% de SBF, utilizou-se 0,714 µL de insulina (0,35mg/mL); 100 µM de indometacina (0,0447g de indometacina Sigma® em 5 mL de DMSO); 3,5 µM de rosiglitazona (0,0089g de rosiglitazona em 5 mL de DMSO); 10<sup>-5</sup> M de dexametasona (solução estoque - 1,2 mg de dexametasona em 1223 µL de etanol sendo a solução final preparada a partir de 10 µL da solução estoque para cada 2,5 mL de DMEM) (MARKARIAN et al., 2014; DE CARVALHO SCHWEICH et al., 2017). Todas as soluções foram estocadas em freezer, exceto a indometacina (temperatura ambiente). O meio diferenciador foi preparado no dia do uso, sendo trocado a cada 3 dias (HERMETO, L. et al., 2016) e o processo de diferenciação se deu por duas semanas (VIEIRA et al., 2014) .

Após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 60 min, em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas com isopropanol a 60% e, posteriormente, incubadas com *Oil Red O* (Sigma®) por 20 min em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação foi confirmada pelo acúmulo de lipídeos intracelulares.

#### **4.3.2.2. Diferenciação osteogênica**

Para a produção do meio de indução osteogênica foi utilizado 7,9 mL de DMEM; 10 µL de solução estoque de ácido ascórbico (50 mg de ácido ascórbico 2-fosfato em 10 mL de DMEM); 1 mL de solução estoque de β-glicerofosfato (630mg de β-glicerofosfato em 20 mL de DMEM) e 1 mL de SBF. Todas as soluções foram estocadas em freezer, e o meio diferenciador foi preparado a cada semana, sendo que no momento de cada troca, 1µL de dexametasona 1.000x era acrescentado para cada 1 mL de meio osteogênico. O meio de diferenciação foi trocado a cada 3 dias durante quatro semanas (HERMETO, L. et al., 2016).

Após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 10 min, em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e coradas com *Alizarin Red* (Sigma®) por 5 min em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada (MARKARIAN et al.,

2014). A diferenciação osteogênica foi comprovada pela visualização de depósitos de cálcio no 21º dia.

#### **4.3.2.3. Diferenciação condrogênica**

As células foram mantidas com o *kit* de diferenciação condrogênica STEMPRO (Gibco® Life Technologies) segundo instruções do fabricante por 21 dias, sendo o meio de cultura trocado a cada 3 dias.

Após o descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 30 min a temperatura ambiente com paraformaldeído 4%, depois foram lavadas 2 vezes com PBS e coradas com *Azul de Alcian* (Neon®) por 5 min à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada (CAMASSOLA et al., 2012). A diferenciação foi confirmada pela presença de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos no 21º dia.

#### **4.3.3. Ensaio Cometa**

Este ensaio foi realizado segundo método de Oliveira, *et al.* (2007) com adaptações. Para o Ensaio Cometa as células foram semeadas em um frasco com 25cm<sup>3</sup> (3 x 10<sup>5</sup> células / frasco), mantido por 24 horas na incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37° C até a adesão celular. Após, atingir a confluência de 80% as células foram coletadas com tripsina (1mL tripsina 0,25%/3 min), centrifugadas e o sobrenadante descartado. Uma alíquota (40µL) foi ressuspensa em agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (120µL) (Invitrogen Co, Carlsbad, CA) a 37°C, e distribuídas em lâminas previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% (Invitrogen Co, Carlsbad, CA), sendo cobertas com lamínula. As lâminas foram imediatamente colocadas no refrigerador durante 20 min. Após ocorrer a solidificação da agarose, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução de lise (NaCl 2,5M, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) titriplex 100 mM, Tris 10 mM (pH 10), Triton X-100 a 1% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%), sendo mantidas no escuro a 4°C durante 2 horas. Após a lise celular, as lâminas permaneceram em uma cuba de eletroforese, cobertas com tampão alcalino (pH 12), por 20 min (NaOH 10N, EDTA-titriplex 200mM) para desnaturação do DNA. A eletroforese (300 mA e 25 V) foi realizada com o mesmo tampão por mais 20 min. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4M, pH 7,5, por 15 min (3 vezes / 5 min cada), fixadas em etanol absoluto por 10 min,

deixadas secar durante a noite em temperatura ambiente e, armazenadas até o momento de análise. O material foi corado (100  $\mu$ L de brometo de etídio, 20 mg/mL), os nucleóides foram fotografados em microscópio de fluorescência (Leica, DMi8) com uma ampliação de 200X. Posteriormente, foram analisados mais de 200 nucleóides por repetição utilizando o programa CometScore 2.0.0.38 TriTek, avaliando os parâmetros do Momento da cauda (% DNA na cauda multiplicado pelo comprimento da cauda). As células foram analisadas da 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> passagem, em triplicata.

#### **4.3.4. Análise morfológica**

Para análise do formato celular, as mesmas foram analisadas no microscópio invertido no momento em que atingiam 100% de sua confluência em um frasco de 75 cm<sup>3</sup> e então tripsinizadas (2mL tripsina 0,25%/ 3 min), inativadas com 10mL de DMEM, centrifugadas (1200 rpm/5 min) e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 1 mL de DMEM ao *pellet* e 20  $\mu$ L foram retirados e depositados em um poço de uma placa de 96 poços, e então as CTM foram analisadas no microscópio na ampliação de 40X antes de sua adesão. O diâmetro de cada uma foi avaliado pelo programa Fiji, utilizando método de Feret. As células foram analisadas da 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> passagem, em triplicata.

#### **4.3.5. Ensaio de morte celular citológico e molecular**

A primeira técnica para determinar os índices de viabilidade celular, apoptose e necrose foi a coloração diferencial com laranja de acridina e brometo de etídio, utilizando microscopia de fluorescência. Para isso os frascos com 25cm<sup>3</sup> foram preparados usando  $2 \times 10^5$  células, e após a adesão foram tripsinizados, centrifugados e o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1mL de PBS. Uma alíquota de 20  $\mu$ L foi retirada e corada com 2  $\mu$ L da solução contendo 100  $\mu$ g / mL de laranja de acridina e 100  $\mu$ g / mL de brometo de etídio, ambos diluídos em PBS, e depois depositados em uma lâmina e cobertos por uma lamínula para continuar a leitura. Nas células de exame, um total de 100 células por repetição foi examinado com um microscópio de fluorescência (NIKON® Eclipse E200) (OLIVEIRA et al., 2007). As células foram analisadas da 1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> passagem, em triplicata. Após a conferência dos resultados, as CTM da 10<sup>a</sup> passagem foram também avaliadas por citometria de fluxo em triplicata. Para isto, foi utilizado o Kit de Detecção de Apoptose PE Annexin V (BD Pharmingen™), conforme orientações

do fabricante. A aquisição foi realizada em um ACCURI C6 (Becton Dickinson, EUA), onde  $10^4$  eventos foram adquiridos (software BD ACCURI C6; Becton Dickinson, EUA).

#### **4.3.6. Viabilidade celular e Integridade de membrana**

Após as células atingirem a confluência de 80% as CTM foram tripsinizadas (1mL tripsina 0,25%, 3 min), centrifugadas (1.200 rpm/ 5 min) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* ( $2 \times 10^5$  células) foi ressuspenso em 100µL de PBS transferidos para 1 criotubo. Após essa etapa, a suspensão celular no criotubo recebeu 25 uL Iodeto de Propídeo (50ug/mL). Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, imediatamente procedeu-se a aquisição em um ACCURI C6 (Becton Dickinson, EUA), onde  $10^4$  eventos foram adquiridos (software BD ACCURI C6; Becton Dickinson, EUA). As células foram analisadas da 1ª a 10ª passagem na viabilidade e da 10ª na integridade de membrana, em triplicata.

## **2- ETAPA CLÍNICA**

### **4.4. Casuística dos pacientes tratados na pesquisa**

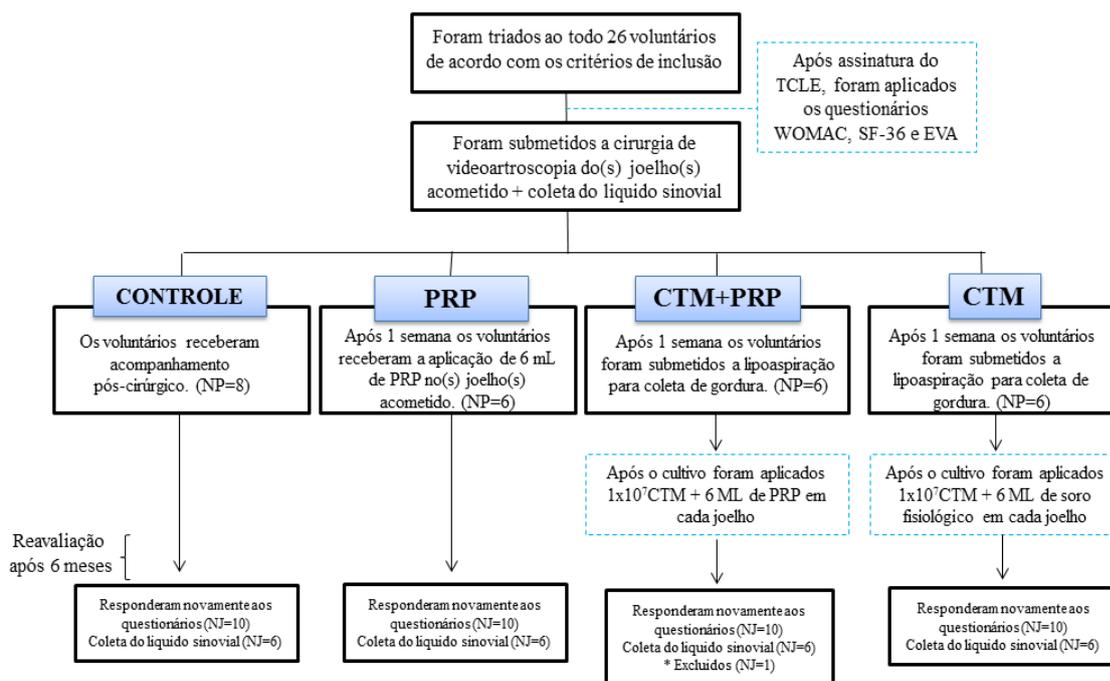
O presente estudo foi aprovado pelo Comitê Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEPSH/UFMS) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o parecer nº 1.478.117. A equipe de pesquisadores explicou o intuito da pesquisa bem como os benefícios que a mesma poderia trazer à comunidade em geral. Foram feitos os devidos esclarecimentos acerca dos procedimentos de coleta de materiais biológicos. Sanadas as dúvidas, após assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A, B, C e D) no mesmo momento foram agendados os procedimentos cirúrgicos de videoartroscopia, coletas da amostra de tecido adiposo por lipoaspiração na região abdominal e a coleta de sangue periférico para a produção do PRP.

Os pacientes foram triados de junho/2018 a junho/2019, no Ambulatório de Ortopedia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian administrado pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (HUMAP/EBSERH) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pelo médico responsável Dr. Roberto Antonioli Silva e sua equipe de residentes. Esses pacientes já possuíam indicação para cirurgia de joelho. Foram incluídos indivíduos voluntários, adultos, de ambos os sexos, com idade entre 40-75 anos diagnosticados, utilizando radiografias, com Osteoartrite grau II a IV

(KELLGREN; LAWRENCE, 1957). Os pacientes não deveriam ter sido responsivos ao tratamento conservador (físico e medicamentoso) comumente utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS) por pelo menos 6 meses. Foram excluídos indivíduos que relataram ser portadores de hemofilia, anemia, doenças gastrointestinais, câncer, alterações tireoidianas, hepáticas, nefrológicas progressas e HIV.

Neste estudo aberto e aleatorizado, participaram no total 26 pacientes que foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos. Cada grupo continha pelo menos 10 joelhos tratados (Figura 4):

- Grupo Controle – os pacientes foram submetidos à cirurgia de videoartroscopia, tratamento padrão do serviço de ortopedia do HUMAP/EBSERH.
- Grupo PRP – os pacientes foram submetidos à cirurgia de videoartroscopia e, posteriormente, receberam um transplante de plasma rico em plaquetas (PRP, 6mL) intra-articular;
- Grupo PRP + CTM – os pacientes foram submetidos à cirurgia de videoartroscopia e, posteriormente, receberam um transplante de PRP +  $1 \times 10^7$  células tronco mesenquimais (CTM) em um volume final de 6mL;
- Grupo CTM – os pacientes foram submetidos à cirurgia de videoartroscopia e, posteriormente, receberam um transplante de  $1 \times 10^7$  CTM em solução fisiológica em um volume final de 6mL.



**Figura 4** – Fluxograma dos procedimentos realizados neste ensaio clínico. NP= número de participantes e NJ= número de joelhos

## 4.5. Procedimentos cirúrgicos

### 4.5.1. Videoartroscopia de joelho

Os pacientes foram submetidos à avaliação pré-cirúrgica. Os parâmetros avaliados foram hemograma, potássio, uréia, creatinina, glicemia, tempo de atividade da protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, tempo de trombina e proteína C reativa. Após esses exames os pacientes foram encaminhados para a realização da cirurgia de videoartroscopia. Todas as cirurgias procederam-se conforme rotina do serviço de Ortopedia do Hospital (HUMAP/UFMS) e foram realizadas pelo mesmo médico ortopedista. Foi realizada apenas a limpeza da articulação e debridamento leve da cartilagem afetada, e nenhuma microfratura ou debridamento agressivo foi realizado (Figura 5). Foram prescritos antibiótico e analgésico para a primeira semana de pós-cirúrgico e o uso de muletas por 1 mês.



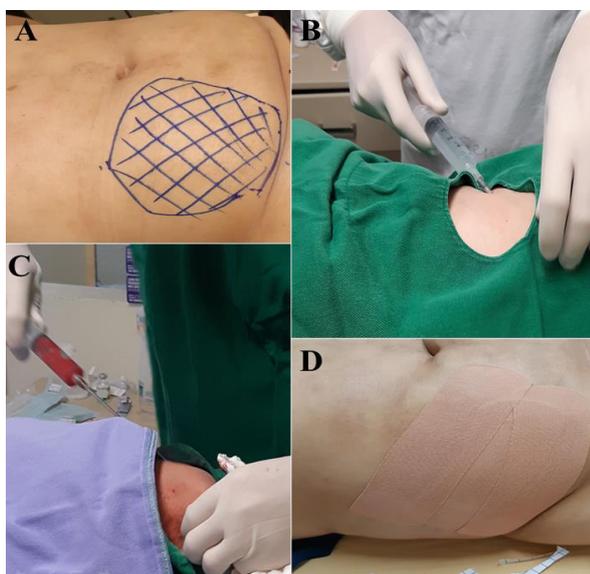
**Figura 5** - Procedimento cirúrgico de videoartroscopia A) Enfaixamento com faixa elástica realizado previamente ao início do torniquete em região de coxa; B) Artrocentese; C) Líquido sinovial coletado; D e E) Posicionamento dos instrumentos cirúrgicos e locais de entrada e F) Visualização da cartilagem articular danificada para limpeza de debris ou áreas sem nivelamento.

### 4.5.2. Procedimento de coleta de gordura, extração e cultivo de células tronco mesenquimais

Os pacientes do grupo retornaram 1 semana após a videoastrosopia, para a coleta de gordura, que foi realizada por um cirurgião plástico colaborador da pesquisa, no

ambulatório de Dermatologia, na sala de pequenos procedimentos cirúrgicos (HUMAP/EBSERH). A lipoaspiração procedeu-se conforme descrito no item 4.2. (Figura 6). Logo em seguida, a incisão foi fechada com um ponto feito com fio de Nylon nº 4 e o paciente recebeu um curativo com micropore. Acima de toda região lipoaspirada a fisioterapeuta responsável pela pesquisa aplicou uma fita de kinesiotape com tensão 100%, afim de prevenir a formação de fibroses ou seromas (Figura 6D). O paciente recebeu também instruções quanto ao uso de medicamentos para o alívio de possível quadro álgico local após o procedimento.

Posteriormente, o recipiente contendo o lipoaspirado foi encaminhado ao Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen/HUMAP/EBSERH). O processamento das células foi realizado por digestão enzimática com Colagenase tipo 1 conforme já descrito no item 4.2. O lipoaspirado bruto de cada paciente foi armazenado apenas para utilização no presente estudo, sendo posteriormente descartado em recipiente próprio para descarte de material biológico, seguido de depósito em lixo hospitalar.



**Figura 6** – A) Demonstração de tamanho de região demarcada para a retirada de tecido adiposo por lipoaspiração B) Injeção subcutânea de anestésico C) Retirada de tecido adiposo por lipoaspiração D) Aplicação do kinesiotape (100% tensão) para proteção e reabilitação da área acometida.

O *pellet* de estroma vascular fracionado adquirido ao final do processo de digestão enzimática foi ressuspensionado em 5 mL de meio de cultivo (DMEM, 10% SBF e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina/Amphotericin) e semeado em um frasco de cultivo de 25cm<sup>3</sup>. Após 3 dias a cultura foi lavada 3x com 3 mL de PBS para a eliminação de

células não aderentes e debris, e recebeu novamente o meio de cultivo. Conforme a expansão ocorria e as CTM atingiam confluência de 70-80% nos frascos, elas eram tripsinizadas (tripsina 0,25%/3min), divididas e semeadas em novos frascos maiores, até a obtenção da quantidade de células estipuladas para o tratamento de cada joelho ( $1 \times 10^7$ ). Uma alíquota de células foi cultivada em separado, afim de, serem realizados os ensaios biológicos de confirmação da real presença de CTM na 1ª passagem (citometria de fluxo (CD105, CD90, CD34 e CD133) e diferenciação celular (adipogênica, osteogênica e condrogênica) conforme descrito em Schweich, *et al.* (2017) (DE CARVALHO SCHWEICH *et al.*, 2017). Todos os materiais usados para transplante foram submetidos previamente à análise da viabilidade celular, por meio de azul de tripan, e rotina convencional microbiológica (aerobiose e microaerofilia), por 72h de incubação.

#### **4.6. Procedimentos realizados para o preparo das seringas utilizadas nas intervenções**

##### **4.6.1. Preparo e transplante do plasma rico em plaquetas**

Os pacientes do grupo PRP, retornaram após 1 semana da videoartroscopia. Para cada joelho tratado foram coletados 18 ml de sangue periférico em tubos contendo 3,2% de citrato de sódio. Frascos foram centrifugados a 1500 rpm/10 min. O plasma e o *pellet* adjacente formado foram então separados em outro tubo e centrifugados a 2000 rpm/15min. Após descarte dos 2/3 superiores, o PRP foi aspirado por uma seringa. Em seguida, com a mesma seringa que já continha os 6 mL de PRP, aspirou-se 0,3 mL de gluconato de cálcio 10%. Então, fez-se a homogeneização do produto que foi imediatamente transplantado. Antes do transplante, o joelho do paciente foi submetido à assepsia para então seguir com a injeção intra-articular de PRP (Figura 7). Foi aplicada uma bandagem ao redor do joelho tratado, a fim de que fosse evitada a flexão do membro nas primeiras 12 horas. Orientações quanto ao repouso na primeira semana e cuidados pós-transplantes foram devidamente explicados aos pacientes.

##### **4.6.2. Preparação e transplante das células tronco mesenquimais associadas ou não ao plasma rico em plaquetas**

Após atingir a quantidade de CTM necessárias para o transplante em cada joelho ( $1 \times 10^7$ ), os pacientes dos grupos CTM+PRP e CTM foram contatados e retornaram ao ambulatório de ortopedia do Hospital (HUMAP/UFMS) para a realização do transplante.

Para o preparo da seringa, os frascos com CTM primeiramente foram lavados com 3 mL de PBS (3x), posteriormente, foram trispinizados (tripsina 0,25%/3 min) e o conteúdo foi centrifugado (1200rpm/5min) em um tubo graduado do tipo falcon. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuscendido em 3mL de PBS. Na sequência os tubos foram novamente centrifugados (1200rpm/5min), repetindo esse processo 3 vezes. Após este preparo, o *pellet* foi homogeneizado em 6mL de solução fisiológica e aspirado em uma seringa, que foi encaminhada para o Ambulatório de Ortopedia, onde foi realizada a assepsia do joelho acometido. O paciente recebeu anestesia local (lidocaína 2%) na região interarticular lateral do joelho. Após 10 min foi realizado o transplante por meio de uma injeção intra-articular (agulha 21G) de CTM no joelho acometido (Figura 7). Depois, foi aplicada uma bandagem ao redor do joelho, a fim de que fosse evitada a flexão do membro nas primeiras 12 horas. Orientações quanto ao repouso na primeira semana e cuidados pós-transplantes foram devidamente explicados aos pacientes.

Para os pacientes do Grupo CTM+PRP, durante o preparo das CTM para o transplante, fez-se a coleta de sangue e o preparo do PRP foi realizado conforme já descrito no item 4.6.1. O *pellet* de CTM foi incorporado aos 6 mL de PRP adquiridos, mas não se adicionou gluconato de cálcio 10% para gelificação do material. A aplicação e cuidados procederam-se da mesma maneira descrita acima (Figura 7). Os pacientes receberam as mesmas orientações.



**Figura 7** – Fluxograma representativo dos procedimentos realizados durante o preparo das seringas utilizadas nas intervenções.

#### **4.7. Avaliação do líquido sinovial**

A coleta do líquido sinovial aconteceu em 2 momentos. A primeira foi ainda no centro cirúrgico antes do início da cirurgia de videoartroscopia, após preparação de antisepsia, assepsia e sedação do paciente. Foram injetadas via intra-articular 15 mL de solução fisiológica no joelho acometido. Fez-se 10 flexões de joelho passivas e, posteriormente, procedeu-se com a artrocentese para a coleta de 5 mL do líquido sinovial. Três mililitros foram destinados às análises laboratoriais e 2mL foram criopreservados e enviados para análise em um tubo Falcon estéril de 15mL. Uma aliquota de 2mL foi criopreservada em ultrafreezer (-80°C).

A segunda coleta foi realizada no ambulatório de Ortopedia (HUMAP/UFMS) após 6 meses da terapia celular. Após assepsia do joelho foi aplicado anestesia local (lidocaína 2%) na região interarticular lateral do joelho, após 10 min foram injetadas via intra-articular 15 mL de solução fisiológica no joelho e os procedimentos foram continuados como descrito anteriormente.

O líquido sinovial foi analisado, macroscopicamente, em relação a viscosidade e a coloração. Microscopicamente, por meio de ensaios colorimétricos enzimáticos, foi avaliado frações de proteínas totais e albumina/globulina (ALB/GLOB) com o kit Total Protein Gen.2 (TP2-REF #0003183734190c501V13.0), e glicose com o kit Glucose HK (GLUC3-REF#0104404483190c501V16.0), ambos analisados no Cobas 6000® conforme instruções do fabricante. Para a análise de citologia global e citologia diferencial foi utilizado o sistema automatizado Sysmex XN-3000™ de acordo com as recomendações do fabricante.

A análise de citocinas foram realizadas nas amostras criopreservadas. Para isso utilizou-se o Human Inflammatory Cytokine CBA KIT (BDBiosciences – Cat: 551811), conforme instruções do fabricante. As análises foram realizadas por citometria de fluxo (Cytotflex – Beckman Coulter).

#### **4.8. Questionários**

Para avaliação dos pacientes, os questionários escolhidos foram aplicados em 2 momentos, antes da realização da cirurgia e após 6 meses das diferentes intervenções dos grupos aqui propostos:

- Western Ontario McMaster Universities (WOMAC) é um questionário específico de qualidade de vida para osteoartrite (Anexo E), composto por 24 itens, divididos

em 3 domínios, que devem ser respondidos conforme apresentação nas últimas 72h: Dor (5 itens), Rigidez (2 itens) e Função física (17 itens). Para cada componente, é calculado um resultado final numa escala de 0 a 100, onde zero corresponde a menor interferência da OA na vida do indivíduo e 100 a maior interferência da OA na vida do indivíduo.

- Escala Visual Analógica de Dor (EVA) (Anexo F), é uma autoavaliação sobre a quantidade de dor que o paciente está sentindo no momento, onde zero representa a inexistência de quadro algico, e 10 o máximo de dor sentida pelo paciente em seu joelho.
- Short Form Health Survey 36 (SF-36) é composto por 36 itens, divididos em 8 domínios: Capacidade funcional (10 itens), Aspecto físico (4 itens), Dor (2 itens), Estado geral de saúde (5 itens), Vitalidade (4 itens), Aspecto social (2 itens), Aspecto emocional (3 itens), Saúde mental (5 itens) e mais uma questão de avaliação comparativa entre o estado de saúde atual e com o avaliado inicialmente (Anexo G). Para cada componente, é calculado um resultado final numa escala de 0 a 100, onde zero corresponde ao pior estado de saúde e 100 ao melhor. A utilização desse questionário tem por objetivo procurar estabelecer parâmetros para comparação ou entendimento da qualidade de vida dos pacientes nas diferentes dimensões citadas acima.

#### **4.9. Análise estatística**

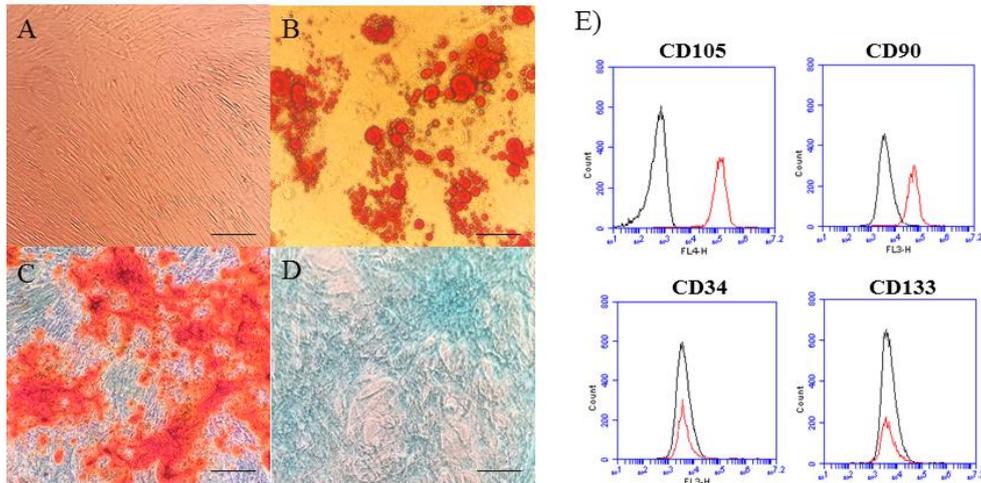
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média ou porcentagens. A análise estatística foi realizada comparando-se os dados de antes e depois com o teste *t*-Student. Para dados paramétricos e comparações entre os dados de pós tratamento, utilizou-se ANOVA/Bonferroni e para dados não paramétricos utilizou-se o teste Kruskal Wallis/Dunn. Os números absolutos e as porcentagens foram comparados por qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$  (*Software* GraphPad InStat 5).

## **5. RESULTADOS**

### **1- ETAPA LABORATORIAL**

#### **5.1. Caracterização das Células tronco mesenquimais**

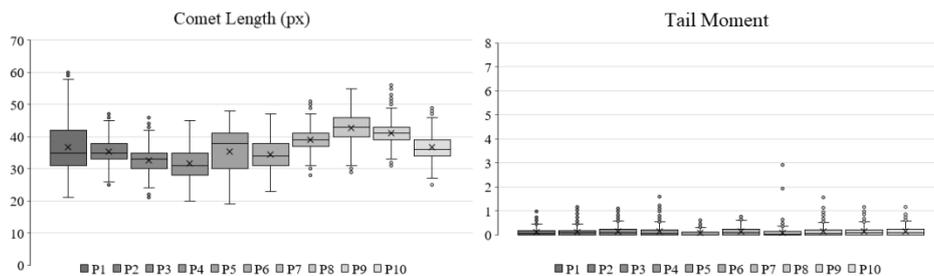
As células utilizadas neste estudo possuíam capacidade de diferenciação em células adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas que foram confirmadas pelas colorações de *Oil red O*, *Alizarin Red* e *Alcian Blue* (Figura 8A-D). Essas mesmas células expressaram, no ensaio de imunofenotipagem, os marcadores CD105 e CD90 e não expressam CD34 e CD133 (Figura 8E). Essas características confirmam que as células utilizadas tratavam-se de CTM derivadas do tecido adiposo.



**Figura 8-** Morfologia, caracterização e potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo: (A) Cultura indiferenciada - células com características de fibroblastos; (B) cultura de diferenciação adipogênica – presença de vacúolos lipídicos corados com *Oil Red O*; (C) cultura de diferenciação osteogênica – presença de depósitos de cálcio corados com *Alizarin Red*; e (D) cultura de diferenciação condrogênica – presença de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos corada com *Alcian Blue*. As barras representam 50  $\mu\text{m}$ . (E) Perfil imunofenotípico das células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. As células expressaram os marcadores CD105 e CD90 e não expressaram CD34 e CD133.

## 5.2. Ensaio Cometa

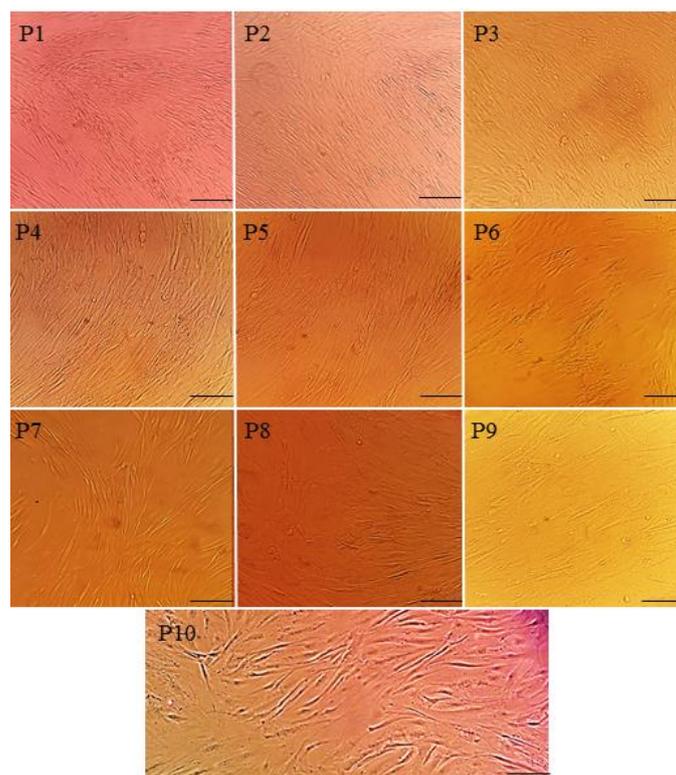
O processo de tripsinização realizado durante o cultivo não interferiu na estabilidade genômica das células já que o *Comet Length* e o *Tail Moment* não apresentaram variações durante as 10 passagens analisadas (Figura 9).



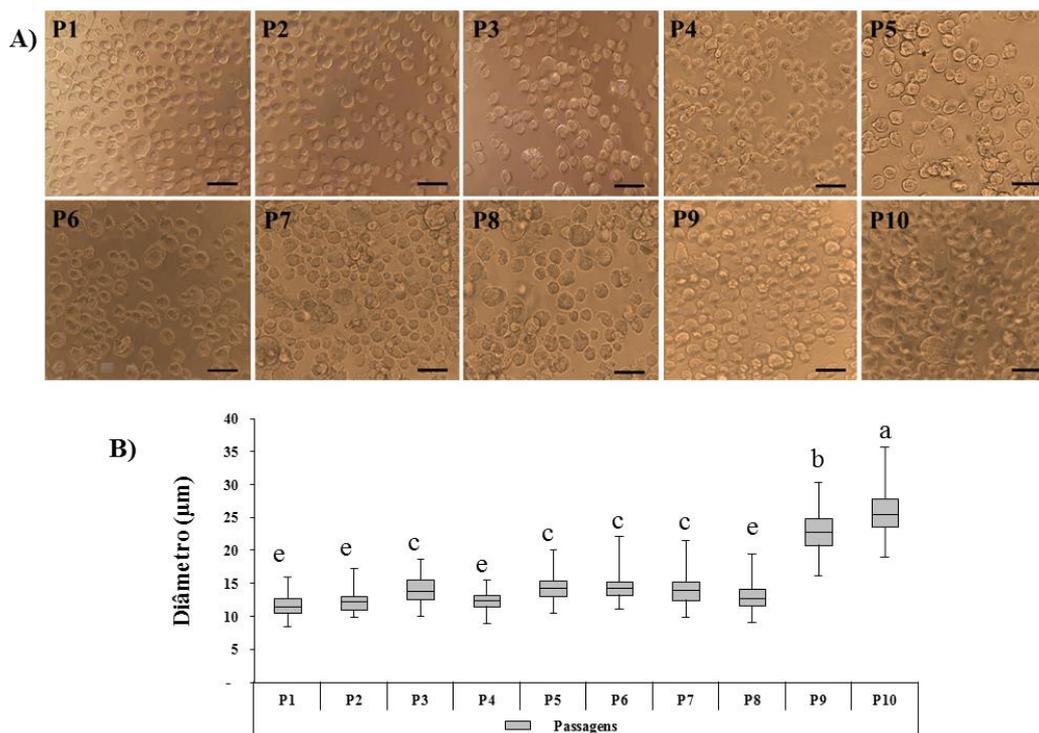
**Figura 9** - Média e desvio padrão da frequência de danos no DNA (*Comet Length* e *Tail Moment*) em células tronco mesenquimais durante a manipulação extensa (1<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> passagem).

### 5.3. Análise morfológica

Durante a análise das CTM ainda aderidas ao frasco, foi verificado que quanto maior a passagem, menor é a capacidade de formação de monocamada justaposta. As CTM mantiveram seu formato fibroblastóide em todas as passagens (Figura 10). Quando as células foram analisadas após a tripsinização (formato livre), observou-se aumento do tamanho das células conforme o aumento de suas passagens (Figura 11A). As passagens 8 ( $13,01 \pm 1,91$ ), 9 ( $22,80 \pm 3,24$ ) e 10 ( $25,87 \pm 3,67$ ) apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ) nos tamanhos das células em relação à primeira passagem. A variação de tamanho das células não foi linear, os valores de diferença da 1ª passagem para a 2ª, da 2ª para a 3ª e assim por diante até a 10ª passagem foi de +5%, +15%, -12%, +15%, +2%, -4%, -7%, +75% e +13%, respectivamente (Figura 11B).



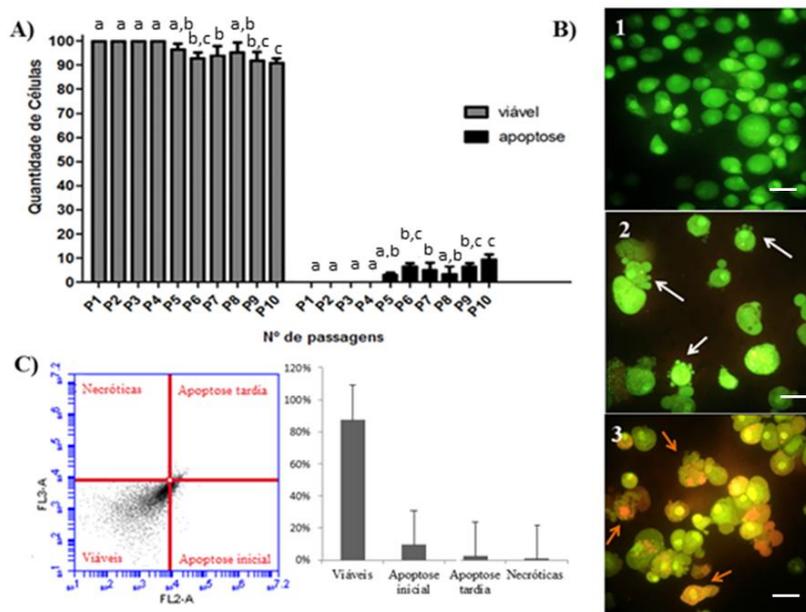
**Figura 10**– Fotomicrografia das células tronco mesenquimais, aderidas ao frasco de cultivo em monocamada, ao longo de 10 passagens. As células apresentaram manutenção da morfologia fibroblastóide da 1ª a 10ª passagem (P1-P10). Aumento 10X. As barras representam 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 11** – A) Fotomicrografia de células tronco mesenquimais livres (de sua adesão). As células mantiveram seu tamanho da 1ª a 4ª passagem (A-D) uniformemente. Após a 4ª passagem observou-se leve aumento do tamanho das células na 5ª e 6ª passagens (P5-P6). Nas culturas da 7ª a 10ª passagem observou-se importante aumento do tamanho celular. Aumento 40X. As barras representam 50 µm. B) Gráfico boxplot representando Limite superior, 1º quartil, mediana, 3º quartil e limite inferior do tamanho das células tronco mesenquimais livres (µm).

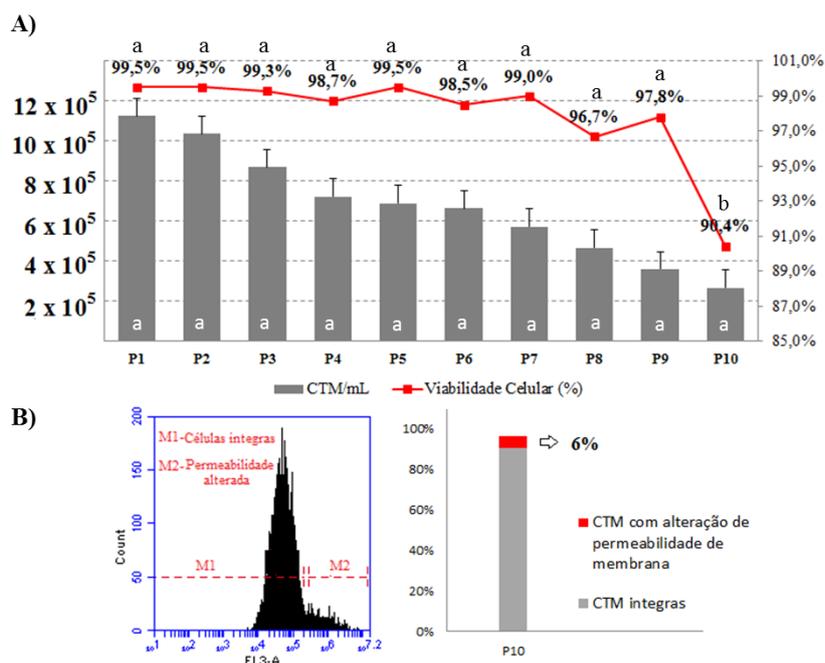
#### 5.4. Morte Celular

O ensaio de morte celular pela coloração diferencial com brometo de etídeo e alaranjado de acridina, demonstraram que as mortes celulares iniciaram a partir da 5ª passagem. No entanto, somente na 10ª passagem houve redução significativa da viabilidade celular (Figura 12A) e as características citológicas eram sugestivas de apoptose (Figura 12B). Os resultados da citometria de fluxo, para anexina V, realizados na 10ª passagem, confirmaram que as mortes celulares tratavam-se de apoptose (Figura 12C).



**Figura 12** – Avaliação de morte celular. A) Média  $\pm$  desvio padrão da frequência de células tronco mesenquimais viáveis e em morte celular avaliadas por meio do ensaio diferencial de brometo de etídeo e alaranjado de acridina; (B) Fotomicrografia do ensaio citológico de morte celular (60x) demonstrando (1) células viáveis, (2) células em apoptose inicial (setas brancas) e (3) células em apoptose final (seta laranja). As barras representam 50  $\mu$ m; e C) Confirmação da morte celular por apoptose utilizando o ensaio de Anexina V em citometria de fluxo na 10<sup>a</sup> passagem.

As porcentagens de viabilidade variaram de 90,40% (10<sup>a</sup> passagem) à 99,50% (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> passagens). As proliferações foram avaliadas ao longo das passagens e a quantidade variou de  $11 \times 10^5$  a  $2 \times 10^5$  células. A quantidade da 1<sup>a</sup> para a 2<sup>a</sup>, da 2<sup>a</sup> para a 3<sup>a</sup> e assim por diante até a 10<sup>a</sup> passagem reduziram a quantidade de células em 8%, 16%, 17%, 5%, 4%, 14%, 18%, 23%, 26%, respectivamente (Figura 13). Esta redução não foi considerada estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Ao ser analisada a viabilidade das CTM por passagem verificou-se que a redução na 10<sup>a</sup> apresentou uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação as demais passagens (Figura 13). No ensaio de integridade de membrana foi possível observar a comprovação da presença de 6% de células com alteração na permeabilidade de membrana.



**Figura 13** – Resultado do ensaio de viabilidade celular e integridade de membrana por iodeto de propídeo. A) Média e desvio padrão da contagem de CTM/mL e viabilidade CTM por passagem; B) Resultado da análise da integridade de membrana da 10ª passagem.

## 2- ETAPA CLÍNICA

Os dados sócio-demográficos e as características clínicas dos diferentes grupos estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferenças estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) para nenhum dos parâmetros analisados entre os diferentes grupos experimentais. Em média, os voluntários dos grupos controle, PRP e CTM estavam sobrepeso. Já o grupo CTM+PRP estava com obesidade grau 1. Dentre as doenças concomitantes podemos citar hipertensão, hipercolesterolemia, depressão e hiperinsulinemia.

**Tabela 1** – Características dos pacientes coletadas durante a anamnese e entrevista

	Controle	PRP	CTM+PRP	CTM	
Nº de participantes	8	6	6	6	
<b>Dados sociodemográficos</b>					
Gênero <sup>1</sup>	Masculino	6 (75%)	4 (66,7%)	3 (50%)	4 (66,7%)
	Feminino	2 (25%)	2 (33,3%)	3 (50%)	2 (33,3%)
Idade (anos) <sup>2</sup>	51±4,67	48±3,51	52,66±4,60	58,5±6,17	
Altura (cm) <sup>2</sup>	1,72±0,02	1,72± 0,04	1,68±0,04	1,71±0,03	
Peso inicial (kg) <sup>2</sup>	78,75±5,0	80,33±4,0	87,5±6,42	89,33±8,0	

IMC inicial <sup>2</sup>		26,48±1,51	27,30±1,74	31,08±2,66	29,98±1,69
Nº de participantes com doenças concomitantes <sup>1</sup>	Sim	2 (25%)	4 (66,7%)	3 (50%)	4 (66,7%)
	Não	6 (75%)	2 (33,3%)	3 (50%)	2 (33,3%)
Duração dos sintomas do joelho acometido (Anos) <sup>2</sup>		6,87±2,08	5,16±1,04	11,5 ±2,56	9,16±2,50
Tempo de auxílio financeiro do governo recebido durante o afastamento de seu trabalho (Anos) <sup>2</sup>		4±1,85	3,8±0,75	3,8±2,63	2,8±2,56
Tempo de espera para realização de cirurgia eletiva ortopédica pelo SUS (Anos) <sup>2</sup>		4±1,85	3,8±0,75	5±1,79	4,8±0,72
<b>Características dos joelhos tratados</b>					
Nº de joelhos tratados		10	10	11	10
Nº de pacientes que tiveram ambos os joelhos tratados <sup>1</sup>		2 (25%)	4 (66,7%)	5 (83,33%)	4 (66,7%)
Nº de pacientes que tiveram apenas 1 joelho tratado <sup>1</sup>		6 (75%)	2 (33,3%)	1 (16,6%)	2 (33,3%)
Nº de pacientes que possuíam OA primária (envelhecimento) <sup>1</sup>		4 (40%)	4 (40%)	8 (80%)	8 (80%)
Nº de pacientes que possuíam OA secundária (acidente ou trauma) <sup>1</sup>		6 (60%)	6 (60%)	2 (20%)	2 (20%)
<b>Classificação da OA por radiografia (Kellgren Lawrence)</b>					
Grau 2 <sup>2</sup>		5 (50%)	4 (40%)	3 (27,27%)	2 (20%)
Grau 3 <sup>2</sup>		5 (50%)	6 (60%)	5 (45,45%)	5 (50%)
Grau 4 <sup>2</sup>		0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (27,27%)	3 (30%)
<b>Tratamentos anteriores ineficazes</b>					
Farmacológico <sup>2</sup>		8 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
Cirurgia <sup>2</sup>		2 (25%)	0 (0,0%)	2 (33,4%)	0 (0,0%)
Fisioterapia <sup>2</sup>		2 (25%)	2 (33,4%)	2 (33,4%)	2 (33,4%)

Os valores de idade, peso, altura, peso inicial e IMC inicial foram expressos em média±desvpad. IMC – sobrepeso: valores de 25 a 29,5 e obesidade 1: valores de 30 a 34,9. O indivíduo foi considerado idoso com ≥60 anos. Nos itens com o nº sobre escrito 1, utilizou-se teste de qui-quadrado, e com o nº 2 sobre escrito utilizou-se ANOVA/Bonferroni, as diferenças foram consideradas significativas quando p≤0,05.

## 5.5. Comprovação de multipotência das células tronco mesenquimais

As células utilizadas neste estudo possuíam capacidade de diferenciação em células adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas, o que foi confirmado pelas colorações de *Oil red O*, *Alizarin Red* e *Alcian Blue*. Essas mesmas células expressaram, no ensaio de imunofenotipagem, os marcadores CD105 e CD90 e não expressam CD34 e CD133. Essas características confirmam que as células utilizadas tratavam-se de CTM derivadas do tecido adiposo. O tempo médio de cultivo das CTM para se atingir a quantidade necessária para o transplante foi de 56,33±15,08 dias.

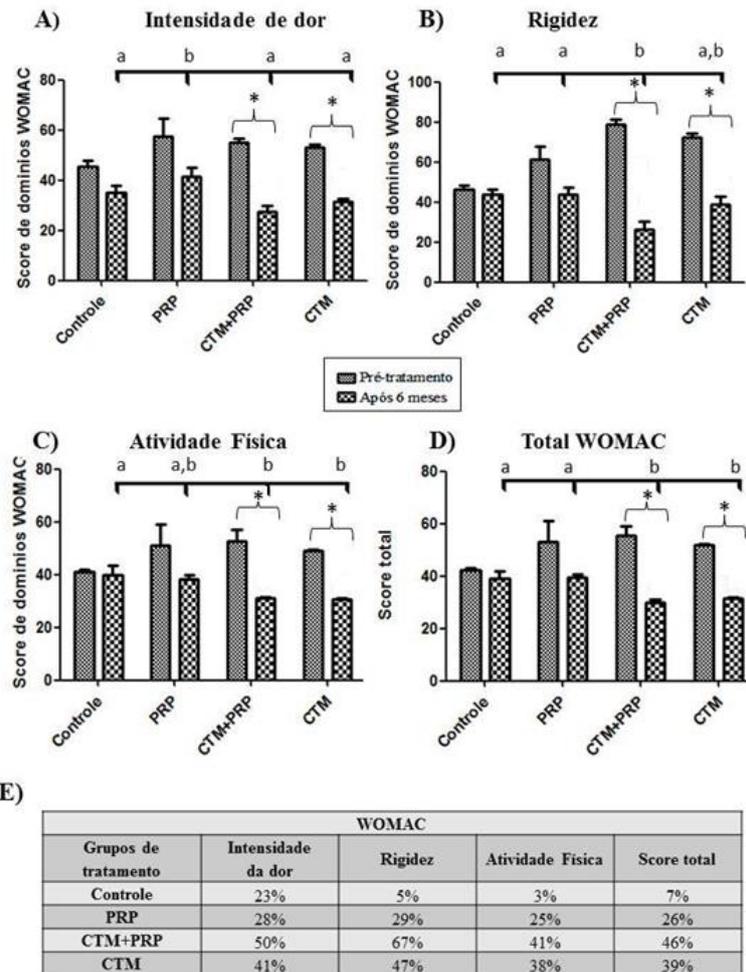
## 5.6. Western Ontario McMaster Universities

Os resultados dos questionários WOMAC demonstraram que para o domínio dor a videoartroscopia e o PRP não alteram ( $p>0,05$ ) os escores (Figura 14A). Mas, houve uma redução desse domínio em 23% e 28%, respectivamente, quando comparados os momentos anterior a intervenção e 6 meses após a intervenção (avaliação inicial x final) (Figura 3E). Já os grupos CTM+PRP e CTM apresentaram redução significativa ( $p<0,05$ ) quando comparadas as avaliações iniciais e finais (Figura 14A). As porcentagem de redução do escore de intensidade de dor foram de 50 e 41% para os grupos CTM+PRP e CTM, respectivamente (Figura 14E). Após 6 meses os pacientes que apresentavam maior escore de dor ( $p<0,05$ ) eram do grupo PRP.

Para o domínio rigidez a cirurgia de videoartroscopia e o PRP não alteraram ( $p>0,05$ ) os escores dos dois momentos de análise (inicial e final) (Figura 14B) e as porcentagens de melhora foram de apenas 5% e 29% (Figura 14E). Para os grupos CTM+PRP e CTM houve melhora significativa ( $p<0,05$ ) da rigidez (Figura 14B) e as porcentagens de melhora foram de 67 e 47% para os grupos CTM+PRP e CTM, respectivamente (Figura 3E). Para esse domínio o melhor tratamento foi o CTM+PRP visto que esse grupo apresentou a maior taxa de redução do score entre os grupos ( $p<0,05$ ) (Figura 14E).

Para o domínio atividade física a cirurgia de videoartroscopia e o PRP não alteraram ( $p<0,05$ ) os escores dos dois momentos de análise (Figura 14C) e as porcentagens de melhora foram de apenas 3% e 25%, respectivamente. Para os grupos CTM+PRP e CTM houve melhora significativa ( $p<0,05$ ) da atividade física (Figura 14C) e as porcentagens de melhora foram de 41 e 38% para os grupos CTM+PRP e CTM, respectivamente (Figura 14E). Para esse domínio os melhores tratamentos foram o CTM+PRP e CTM. Entre esses dois protocolos não há diferenças ( $p>0,05$ ).

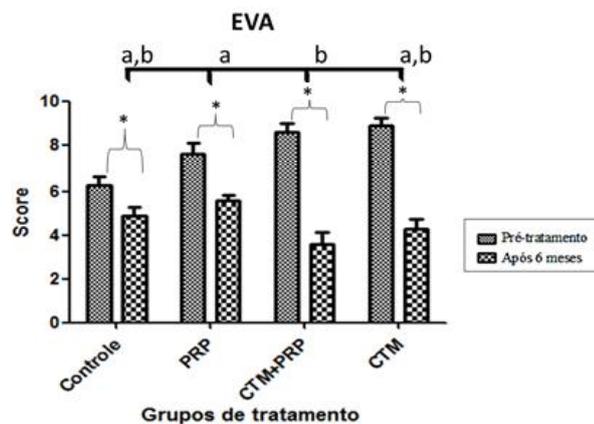
O índice geral do WOMAC, indicou que a cirurgia de videoartroscopia e o PRP não melhoraram ( $p>0,05$ ) os escores do antes e depois da intervenção (Figura 14D) e as porcentagens de melhora foram de 7% e 26% (Figura 14D). Para os grupos CTM+PRP e CTM houve melhora significativa ( $p<0,05$ ) global (Figura 14D) e as porcentagens de melhora foram de 46 e 39%, respectivamente (Figura 14E). Para esse domínio os melhores tratamentos foram o CTM+PRP e CTM. Entre esses dois protocolos não há diferenças ( $p>0,05$ ).



**Figura 14** - Pontuação dos domínios do questionário WOMAC aplicado antes (inicial) e 6 meses após às intervenções (final). A) Score da intensidade da dor; B) Score da rigidez; C) Score da atividade física; D) Score total WOMAC e E) Redução (%) dos scores dos domínios de WOMAC. Todos os valores foram demonstrados em média  $\pm$  erro padrão da média. Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final (*t*-Student;  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

### 5.7. Escala Visual Analógica de dor

Os valores de EVA reduziram em todos os grupos (Figura 15). No entanto, a redução só foi significativa para grupos PRP, CTM+PRP e CTM. No Controle o score inicial era de  $6,3 \pm 1,15$  e diminuiu ( $p > 0,05$ ) para  $4,9 \pm 1,19$  (22%); no PRP diminuiu ( $p < 0,05$ ) de  $7,6 \pm 1,57$  para  $5,6 \pm 0,69$  (26%); no CTM+PRP diminuiu ( $p < 0,05$ ) de  $8,6 \pm 1,17$  para  $3,6 \pm 1,71$  (53%); e no CTM diminuiu ( $p < 0,05$ ) de  $8,9 \pm 1,10$  para  $4,3 \pm 1,41$  (52%) (Figura 15). Para o EVA o melhor tratamento é o CTM+PRP.



**Figura 15-** Pontuação da EVA aplicado antes e 6 meses após das intervenções. Os dados foram demonstrados em média  $\pm$  erro padrão da média.. Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final (*t*-Student;  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

### 5.8. Short Form Health Survey 36

Os resultados do questionário SF-36 demonstraram que a capacidade funcional aumentou ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos (Figura 16A) quando comparados os momentos anterior à intervenção e 6 meses após a intervenção (avaliação inicial x final). A videoartroscopia melhorou o domínio em 229%, o PRP em 318%, o transplante de CTM+PRP em 343% e o transplante de CTM em 318% (Figura 16I). Quando comparados os pós-tratamento de todos os grupos verificou-se que o CTM+PRP é o tratamento mais efetivo ( $p < 0,05$ ) (Figura 16A).

A limitação por aspecto físico não se modificou após a cirurgia de videoartroscopia e a porcentagem de melhora foi de apenas 29%. No entanto, esse domínio aumentou ( $p < 0,05$ ) em 71% no grupo PRP, em 154% para o grupo CTM+PRP e em 138% para o grupo CTM (avaliação inicial x final) (Figura 16B e 16I). Para esse domínio o tratamento CTM+PRP apresentou o melhor resultado. Em segundo lugar está o tratamento com CTM (Figura 16B).

Para o domínio dor, a cirurgia de videoartroscopia não resultou em melhora significativa ( $p > 0,05$ ) apesar de ter uma melhoria de 17%. Já o aumento ( $p < 0,05$ ) para o PRP foi de 63%, para o CTM+PRP foi de 197% e para o CTM foi de 200% (avaliação inicial x final) (Figura 16C e 16I). O melhor tratamento para redução da dor foi o CTM+PRP (Figura 16C).

Para o domínio estado geral de saúde verificou-se que todos os grupos apresentaram melhora ( $p < 0,05$ ) (Figura 16D). As porcentagens de melhora foram da ordem de 38, 63, 142 e 110% para os grupos Controle, PRP, CTM+PRP e CTM,

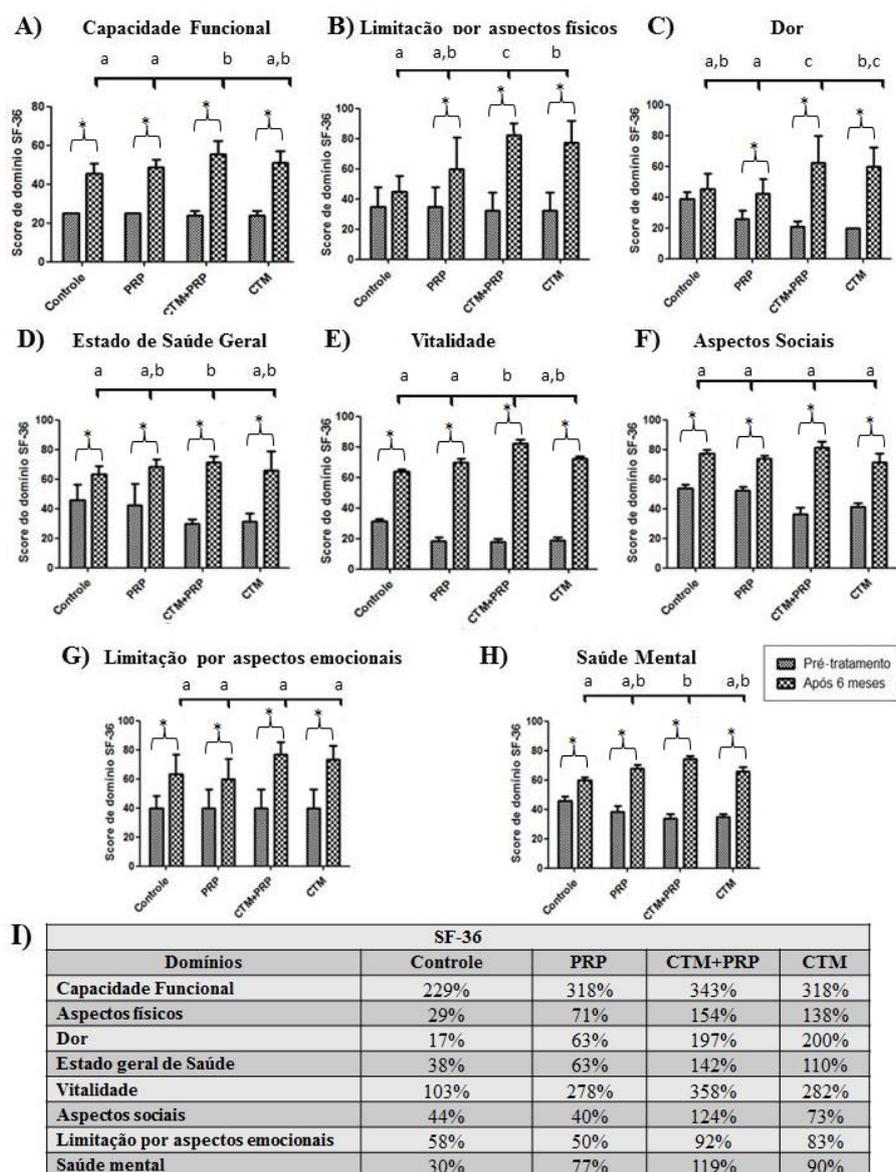
respectivamente (avaliação inicial x final) (Figura 16I). Para esse domínio o melhor tratamento é o CTM+PRP (Figura 16D).

Para o domínio vitalidade verificou-se que todos os grupos apresentaram melhora ( $p < 0,05$ ) (avaliação inicial x final) (Figura 16E). As porcentagens de melhora foram de 103, 278, 358 e 282% para os grupos Controle, PRP, CTM+PRP e CTM, respectivamente (Figura 16I). Para esse domínio o melhor tratamento foi o CTM+PRP (Figura 16E).

Para o domínio aspectos sociais verificou-se que todos os grupos apresentaram melhora ( $p < 0,05$ ) (avaliação inicial x final) (Figura 16F). As porcentagens de melhora foram de 44, 40, 124 e 73% para os grupos Controle, PRP, CTM+PRP e CTM, respectivamente (Figura 16I). Para esse domínio não há diferenças significativas entre os tratamentos após 6 meses da terapia celular (Figura 16F).

Para o domínio limitação por aspectos emocionais verificou-se que todos os grupos apresentaram melhora ( $p < 0,05$ ) (avaliação inicial x final) (Figura 16G). As porcentagens de melhora foram de 58, 50, 92 e 83% para os grupos Controle, PRP, CTM+PRP e CTM, respectivamente (Figura 16I). Para esse domínio não há diferenças significativas entre os tratamentos após 6 meses da terapia celular (Figura 16G).

Para o domínio saúde mental verificou-se que todos os grupos apresentaram melhora ( $p < 0,05$ ) (avaliação inicial x final) (Figura 16H). As porcentagens de melhora foram de 30, 77, 119 e 90% para os grupos Controle, PRP, CTM+PRP e CTM, respectivamente (Figura 16I). Para esse domínio o melhor tratamento foi o CTM+PRP (Figura 16H).



**Figura 16** – Pontuação dos domínios do questionário SF-36 aplicado antes e 6 meses após das intervenções A) Capacidade funcional; B) Limitação por aspectos físicos; B) Dor; D) Estado geral de saúde; E) Vitalidade; F) Aspectos sociais; G) Limitações por aspectos emocionais; H) Saúde mental e I) Aumento (%) de scores dos domínios de SF-36 após 6 meses das intervenções dos grupos. A pontuação variou de 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 = pior e 100 = melhor para cada domínio, foram demonstrados em média  $\pm$  erro padrão da média. Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final ( $t$ -Student;  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

### 5.9. Análise do líquido sinovial

A quantificação de citocinas inflamatórias presentes no líquido sinovial demonstrou que no grupo Controle houve manutenção da citocina IL-1b (2%) e aumento de 30% da IL-6, 113% da IL-8, 90% da IL-10, 99% da IL-12p70 e 38% da TNF. Porém,

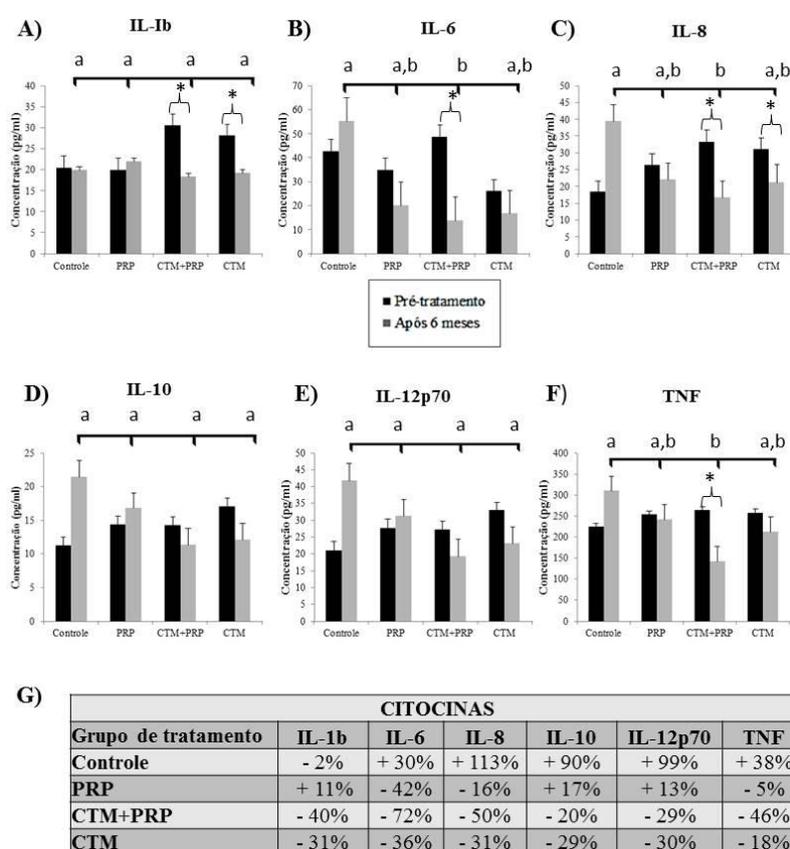
esses aumentos não foram estatisticamente significativos ( $p>0,05$ ) (avaliação inicial x final) (Figura 17 B-G).

No grupo PRP houve ligeiro aumento, apesar de não significativo ( $p>0,05$ ), da citocina IL-1b (11%), IL-10 (17%) e da IL-12p70 (13%). Observou-se também diminuição de 42% da IL-6, 16% da IL-8 e 5% da TNF. Essas reduções também não foram estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) (avaliação inicial x final) (Figura 17 B-G).

No grupo CTM+PRP todas as citocinas diminuíram suas concentrações. Porém somente as diminuições de IL-1b (46%), IL-6 (72%), IL-8 (50%) e TNF (46%) foram estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) (avaliação inicial x final) (Figura 17 B-G).

No grupo CTM, houve diminuição de 31% de IL-1b, 36% da IL-6, 31% da IL-8, 29% da IL-10, 30% da IL-12p70 e 18% da TNF. Somente as reduções de IL-1b e IL-8 foram estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ) (avaliação inicial x final) (Figura 17 B-G).

Ao fazer a comparar de todas as citocinas entre os grupos, 6 meses após a intervenção, observou-se que não houve variações significativas ( $p>0,05$ ) para IL-1b, IL-10, IL-12p70. A IL-6, IL-8 e o TNF reduziram significativamente somente no grupo CTM+PRP. Nos grupos PRP e CTM houve uma tendência à redução dessas mesmas citocinas. No entanto, os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p>0,05$ ).



**Figura 17** – Valores da quantificação de citocinas dos líquidos sinoviais coletados antes e 6 meses após as intervenções. A) IL-1b; B) IL-6; C) IL-8; D) IL-10; E) IL-12p70; F) TNF e G) Porcentagem de variação dos valores antes e 6 meses após as intervenções. + indica aumento da concentração. – indica redução da concentração. Os valores foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final (*t*-Student;  $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

Foi analisada também de forma macroscópica, a viscosidade, clarificação da coloração e pureza do líquido sinovial, foi observado que houve uma melhora foi evidente nas amostras coletadas dos grupos CTM+PRP, CTM seguido de PRP, sendo o grau de melhora referente a ordem dos grupos citados.

Em relação aos resultados dos parâmetros analisados por ensaios enzimáticos e colorimétricos do líquido sinovial coletado (Tabela 2), no grupo Controle houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) (avaliação inicial x final) de 79% de proteínas totais, os demais parâmetros também aumentaram em 26% de Albumina/Globulina, 79% da glicose, 34% de células polimorfonucleares, 13% de linfócitos e 8% de leucócitos, porém não apresentou significância ( $p > 0,05$ ) (avaliação inicial x final).

No grupo PRP, houve uma diminuição de 25% de proteínas totais, 9% de Albumina/Globulina, 7% da glicose, 46% de células polimorfonucleares e 44% de leucócitos, e um aumento de 22% de linfócitos, porém essas variâncias não apresentaram significância estatística ( $p>0,05$ ) (avaliação inicial x final).

No grupo CTM+PRP, houve um aumento sem significância de 10% de proteínas totais, e significativo ( $p<0,05$ ) (avaliação inicial x final) 47% de células polimorfonucleares. Os demais parâmetros tiveram uma diminuição de 20% de Albumina/Globulina, 33% de linfócitos e 35% de leucócitos, porém essas reduções não apresentaram significância estatística ( $p>0,05$ ) (avaliação inicial x final).

E no grupo CTM, houve um aumento de 48% de proteínas totais, 26% de Albumina/Globulina, 40% de glicose, porém não apresentou significância ( $p>0,05$ ). E diminuição de 43% de células polimorfonucleares, 7% de linfócitos e 63% de leucócitos, porém essas variâncias não apresentaram significância estatística ( $p>0,05$ ) (avaliação inicial x final).

**Tabela 2-** Dados dos parâmetros analisados por ensaios enzimáticos e colorimétricos do líquido sinovial coletado

Parâmetros analisados		Controle	PRP	CTM+PRP	CTM
Proteínas totais (g/dL)	Pré-tratamento	0,86±0,56	1,66± 1,52	1,00 ±0,54	0,87±0,81
	Após 6 meses	1,54±0,42 <sup>a</sup>	1,24±0,99 <sup>a</sup>	1,1± 0,44 <sup>a</sup>	1,29±0,45 <sup>a</sup>
	p	0,024*	0,830	0,057	0,072
Albumina/Globulina (g/dL)	Pré-tratamento	1,38±0,60	1,82±1,06	1,83±,0,95	2,02±0,75
	Após 6 meses	1,74±0,41 <sup>a</sup>	1,66±0,45 <sup>a</sup>	1,47±0,27 <sup>a</sup>	2,55±1,77 <sup>a</sup>
	p	0,450	0,061	0,371	0,562
Glicose (mg/dL)	Pré-tratamento	29,8±13,21	80,83±1,52	32,4±21,12	35,87±16,68
	Após 6 meses	53,20±25,84 <sup>a</sup>	75,5±57,35 <sup>a</sup>	57,16±14,52 <sup>a</sup>	50,12±35,15 <sup>a</sup>
	p	0,015*	0,630	0,073	0,141
Células Polimorfonucleares (%)	Pré-tratamento	19,33±11,99	60,83 ±11,05	25,26 ±28,33	43,62± 26,15
	Após 6 meses	29,26±11,58 <sup>a</sup>	41,57±8,74 <sup>a</sup>	47,75±13,04 <sup>a</sup>	27,85± 21,95 <sup>a</sup>
	p	0,859	0,290	0,015*	0,153
Linfócitos (%)	Pré-tratamento	69,66±31,99	44,28 ±25,72	73,09±30,85	63,15±15,61
	Após 6 meses	80±13,69 <sup>a</sup>	57±20,38 <sup>a</sup>	54,83±11,32 <sup>a</sup>	59,28±18,17 <sup>a</sup>
	p	0,983	0,395	0,721	0,561
Leucócito (/mm <sup>3</sup> )	Pré-tratamento	50,37±33,62	47,28±23,17	43,10±28,01	65,16±28,40
	Após 6 meses	54,66±35,91 <sup>a</sup>	32,85±27,65 <sup>a</sup>	31,89±28,03 <sup>a</sup>	40±31,05 <sup>a</sup>
	p	0,812	0,333	0,409	0,378

Análise Estatística: \*Diferença estatisticamente significativa entre em as avaliações inicial e final (*t*-Student;  $p<0,05$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos na avaliação final (Anova/Bonferroni;  $p<0,05$ ).

## 5.10. Reações adversas

As reações adversas observadas foram leves e transitórias. Foram relatados edema e dor em todos os pacientes após a cirurgia de videoartroscopia, porém após a utilização da medicação analgésica, repouso e crioterapia receitados houve melhora dos quadros. Em relação a lipoaspiração, 5 pacientes relataram desconforto na região submetida ao procedimento, estes receberam atendimento fisioterapêutico e aplicação de tape compressivo no local, e obtiveram resolução do quadro álgico. Quanto as aplicações intra-articulares, o efeito adverso mais frequente foi uma dor leve e transitória e pequeno edema, provavelmente causada pelo volume injetado, sendo que 1 paciente apresentou hematoma transitório em toda região frontal do joelho após aplicação de CTM+PRP, relacionamos este acontecimento ao fato de que esta paciente utilizava de forma crônica o ácido acetilsalicílico (AAS). E outro do mesmo grupo foi excluído do estudo devido a presença de edema, calor e dor intensa em um dos joelhos tratados 2 dias após a aplicação, o mesmo foi submetido a videoartroscopia novamente para a limpeza extensiva da articulação com solução fisiológica, descartou-se contaminação por meio de exames de imagem, hemograma e cultura bacteriológica do líquido que estava na articulação, relacionamos este acontecimento a um acúmulo de líquido fora da cavidade articular, visto que a aplicação não foi realizada com o acompanhamento com imagem de ultrassom.

## 6. DISCUSSÃO

Os protocolos de terapia celular com CTM crescem cada vez mais devido aos bons resultados que são alcançados para o tratamento de doenças que não possuem terapêuticas eficazes na medicina tradicional (BACAKOVA et al., 2018; ALGHADBAN; BUNNELL, 2020). Esse fato tem direcionado uma maior atenção a área da medicina regenerativa (VASANTHAN et al., 2021). O tecido adiposo é uma fonte rica de CTM e, por isso, diversos centros de estudos estão desenvolvendo técnicas diferentes para otimização da manipulação deste tecido e do processo de extração das CTM. Dentre as utilizadas recentemente podemos citar: (I) a desagregação tecidual mecânica realizada por ultrassom conhecida como protocolo Stromed (GIBBS et al., 2015); (II) o kit Lipogems®, dispositivo fechado que permite a separação e eliminação de sangue e impurezas das amostras de lipoaspiração por lavagem e agitação extensivas após a

lipoaspirado ser fragmentado por esferas de aço presentes no interior do dispositivo (COUGHLIN et al., 2017; CATTANEO et al., 2018; PANNI et al., 2018); (III) a lavagem extensiva seguida de centrifugação simples (ROATO et al., 2019); e (IV) a utilização de centrífuga que possuem circuitos fechados que são preparados rapidamente; mas, que possuem alto custo (YOKOTA et al., 2017; ONOI et al., 2019). Todos esses métodos permitem apenas a obtenção do estroma vascular fracionado (EVF) que é enriquecido em pericitos e tem uma menor quantidade de células hematopoiéticas do que os lipoaspirados enzimaticamente digeridos (BIANCHI et al., 2013; HUDETZ et al., 2017). Apesar da alta rentabilidade, a quantidade de CTM presentes na fração vascular estromal destes novos protocolos ainda é inferior a quantidade presente após a digestão com colagenase. Em um estudo recente, comparou-se a eficácia do tratamento de OA com EVF e CTM, e foi possível observar que há maior eficácia no tratamento de OA com CTM extraídas com colagenase (YOKOTA et al., 2019).

Quando o objetivo principal é a obtenção de CTM para a expansão *in vitro*, o padrão ouro é a desagregação do tecido adiposo por digestão enzimática com o uso de colagenase (ZUK et al., 2001). Esse método permite um alto rendimento e viabilidade das CTM presentes no EVF em relação aos outros métodos anteriormente descritos. Trabalhos recentes em sua maioria optam por essa técnica (KOH, Y.-G. et al., 2013; PAK et al., 2013; BUI et al., 2014; JO et al., 2014; FODOR; PAULSETH, 2015; KOH, Y.-G. et al., 2015; KIM, Y. et al., 2016; PAK et al., 2016; PERS et al., 2016; BANSAL et al., 2017; JO et al., 2017; HONG et al., 2018; SONG et al., 2018; SPASOVSKI et al., 2018). Entretanto, a literatura não apresenta padronização das concentrações ou unidades de colagenase utilizadas e nem do tempo de digestão; fatores esses que podem interferir na efetividade do protocolo escolhido (PAGANO et al., 2004) e na qualidade das células cultivadas.

Por mais que estes protocolos sejam efetivos, ainda é necessária a realização da padronização do cultivo das CTM (ANVISA, 2017), para a obtenção de uma quantidade maior de células viáveis e com qualidade, devido a severidade da extensão das lesões causadas pela OA (TRUONG; BUI; VAN PHAM, 2018). A preocupação com a qualidade das células é notória e há relatos na literatura de que o aumento do tempo de cultivo pode causar alterações. Como o cultivo deixa as células susceptíveis a eventos extrínsecos (como a utilização de diferentes meios de cultura e suplementos, diferentes soluções desagregantes, dentre outros), eles podem induzir senescência e redução da

capacidade de proliferação e diferenciação celular (LEGZDINA et al., 2016; TRUONG; BUI; VAN PHAM, 2018; DEBNATH; CHELLURI, 2019). Também existe a probabilidade de alterações genéticas, o que poderia afetar sua utilização segura das CTM em ensaios clínicos e terapias futuras (WANG, Y. et al., 2005; SPATH et al., 2010).

Como o presente estudo teve como um dos objetivos a obtenção de CTM para expansão *in vitro*, foi utilizado o protocolo de digestão enzimática que está padronizado em nosso laboratório e que já foram descritos em trabalhos anteriores (VIEIRA et al., 2014; HERMETO, L. et al., 2015; HERMETO, L. et al., 2016; URT-FILHO et al., 2016; DE CARVALHO SCHWEICH et al., 2017; PESARINI et al., 2017; PESARINI et al., 2018; HERMETO, L. C. et al., 2020). A necessidade desta etapa clínica, foi garantir a segurança de futuras pesquisas com terapia celular. Diante dos resultados desta etapa, observamos que a desagregação enzimática por tripsina não causa instabilidade genômica e nem redução da viabilidade celular. No entanto, é capaz de mudar a morfologia da CTM a partir da 6ª passagem. Essas mudanças interferem na capacidade de formação de monocamada e aumento o tempo necessário para a confluência, o que indica perda da homeostase celular. Assim, optamos pela utilização das CTM cultivadas até a 5ª passagem em nossa etapa clínica de terapia celular.

Em relação aos resultados obtidos na etapa clínica desta pesquisa, foi possível analisar a eficácia de 3 novos tipos de terapia que estão sendo utilizadas atualmente. Entretanto, a forma de ação nos eventos inflamatórios da OA ainda não são completamente compreendidos. Diante de todas as análises feitas entre os grupos, a injeção intra-articular de CTM+PRP demonstrou melhora em seus parâmetros, seguido do grupo que utilizou somente CTM. Essas intervenções alcançaram parâmetros parecidos de melhora em seu questionário WOMAC e escala de EVA se comparados com os dados apresentados na literatura atual (LEE, W. S. et al., 2019; LU et al., 2019), indicando que este tratamento auxilia na melhora da funcionalidade destes pacientes, proporcionando possibilidade de retorno as AVDs. Este retorno possibilitou uma melhora também nos índices apresentados no questionário de qualidade de vida SF-36, principalmente em relação a aspectos sociais, estado de saúde geral, vitalidade e na saúde mental como um todo. Reforçando aqui que todas as intervenções obtiveram melhora de seus pacientes neste questionário. Acredita-se que o fato de o tempo de espera para a realização da cirurgia eletiva seja tão grande, que todas as intervenções aqui propostas a estes pacientes, tenha grande valia frente a sua expectativa de melhora e recebimento de

atenção. É sabido que o acometimento por OA leva a incapacidade e também ao desenvolvimento de quadros de depressão em seus portadores, influenciando tanto na piora deles, quanto no desenvolvimento de outras patologias concomitantes (SHARMA et al., 2016). Portanto, saber que a utilização de CTM+PRP e CTM pode possibilitar uma melhora significativa destes pacientes, é de suma importância para o tratamento desses indivíduos e também para o Sistema Único de Saúde, visto que, quanto melhor for a assistência médica e capacidade de resolução da terapia, menor serão os gastos necessários, pois os retornos, as internações e terapias frustradas serão menores.

A cirurgia de videoartroscopia é o padrão ouro disponível hoje pela maioria dos hospitais do Sistema Único de Saúde. Este tipo de intervenção propicia uma melhora na dor, no nivelamento da cartilagem e no processo inflamatório agudo, porém não modifica a qualidade das células nativas que se encontram em processo degenerativo como na OA. Sabe-se que a OA está associada ao desequilíbrio fisiológico de degradação e síntese dos condrócitos, o que resulta em alterações na composição da matriz extracelular local (NELSON et al., 2014). Essa degradação progressiva da cartilagem articular acontece por meio de vários mecanismos de sinalização que são apresentados e associados ao aumento da dor, da disfunção (SCANZELLO et al., 2011) e devido à sensibilização periférica e central da dor (DIEPPE; LOHMANDER, 2005). Portanto, ao retornar à produção de líquido sinovial após a videoartroscopia, o mesmo ainda irá conter citocinas inflamatórias e o novo tecido que será estimulado a ser produzido não promoverá a regeneração do tecido cartilaginoso e sim a sua cicatrização com um tecido diferente (fibrocartilagem). Desta forma, não impedirá o retorno da OA (COOPER; JAVAID; ARDEN, 2014), visto que este novo tecido formado não possui qualidade suficiente, e o paciente continuará mais susceptível a recidivas e retorno da dor em curto prazo.

Os efeitos terapêuticos das CTM acontecem pela presença de fatores tróficos e incluem granulócitos C; interleucinas-6, -7, -8 e -11; e fatores de crescimento como HGF, VEGF, PGF, TGF $\beta$ , FGF-2, (BROWN, 2018). A presença desses componentes evidencia sua capacidade de autorreplicação e diferenciação em outros tipos celulares (FUCHS et al., 2013). Em certas doenças degenerativas, como OA, as CTM locais estão esgotadas e têm capacidade proliferativa e capacidade de diferenciação celular reduzidas (MURPHY et al., 2002). Desta forma, a entrega sistêmica ou local de CTM a esses indivíduos pode, portanto, melhorar o reparo ou inibir a perda progressiva do tecido articular. Esta afirmação já foi comprovada; a aplicação intra-articular de CTM melhorou a capacidade

de regeneração, a capacidade funcional da articulação e promoveu a reconstituição da cartilagem na articulação acometida pela OA (JO et al., 2017; SONG et al., 2018; LEE, W. S. et al., 2019). Em estudos recentes foi possível a verificação do resultado do tratamento via análise histológica, comprovando que o tecido produzido pelo estímulo do tratamento com CTM apresentava melhora morfofisiológica e nenhum tipo de proliferação tumoral, sendo a segurança da terapia garantida (PERS et al., 2016; ROATO et al., 2019). A conservação dos resultados também foram analisados após 2 anos e a melhoria dos pacientes diminuiu pouco neste período quando comparados ao início (KOH, Y.-G. et al., 2015; JO et al., 2017). Entretanto, foi salientado que quanto maior o tamanho da lesão meniscal e mais severo o estágio de degeneração da articulação, menores são os resultados obtidos, sendo necessário um maior número de aplicações para um resultado duradouro e satisfatório (KOH, Y. G. et al., 2014; SONG et al., 2018). O mesmo foi observado no estudo proposto, pois os pacientes que relataram completa satisfação com o resultado possuíam graus menores de OA.

Um ponto a ser considerado é em relação aos componentes presentes no PRP, que são, moléculas bioativas secretadas pelas células tronco hematopoéticas normalmente presentes no sangue com função de promover a comunicação intracelular e célula-ambiente, fundamental na homeostase. Dentre esses componentes do PRP, a fibrina, atuam como *scaffold* e é quimio-atrativo para migração de CTM diretamente para o local da injúria e outras células para o tecido danificado (SUNDMAN et al., 2014), desta forma a interação célula-ambiente-célula auxiliaria na homeostase local e proporcionaria uma prevenção na apoptose das CTM transplantadas e dos condrócitos presentes, uma maior síntese de colágeno tipo II, agregam (RASHID; KWOH, 2019), melhor organização da matriz extracelular (BENNEL; HUNTER; PATERSON, 2017) e diferenciação condrogênica. Assim, essa conjugação de terapias agem melhor primeiramente no controle da inflamação local e após isto proporciona a diferenciação celular específica necessária (VAN PHAM et al., 2013). Estudos recentes tem comprovado a eficácia desta adição (BANSAL et al., 2017; PAK et al., 2018). Nossos resultados também demonstraram uma tendência de melhora dos pacientes que foram tratados com CTM+PRP em relação as outras intervenções. Entretanto, maiores avaliações dos pacientes com exame de imagem e/ou biópsia seriam necessárias para esta afirmação.

Em relação a patogênese da OA a literatura destaca a predominância da IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF (WANG, T.; HE, 2018). Em nossos resultados podemos observar que houve

decréscimo dos níveis de todas as citocinas analisadas principalmente do TNF, nos tratamentos que utilizaram as CTM. Essas interleucinas têm a capacidade de ativar múltiplas vias inflamatórias podendo aumentar gravidade da doença, inchaço das articulações e destruição da cartilagem, tudo isso por meio de um aumento de secreção de metaloproteinases da matriz, prostaglandinas e inibição da síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II (WANG, T.; HE, 2018). Possibilitar a redução de todas essas citocinas no ambiente articular interrompe o círculo vicioso pró-degenerativo, retardando a progressão da doença e restaurando a homeostase do tecido (SIQUEIRA et al., 2017). A IL-10 possui propriedades anti-inflamatórias e é comumente associada a um papel condroprotetor e anti-inflamatório na OA (SARAIVA; O'GARRA, 2010; WOJDASIEWICZ; PONIATOWSKI; SZUKIEWICZ, 2014). Seus altos níveis agem como uma tentativa compensatória para diminuir o ambiente inflamatório, desta forma, a diminuição nos níveis de IL-10 aqui observada, pode ser interpretada como uma tendência ao controle da inflamação local. Embora algumas citocinas tenham mostrado alterações significantes (IL-6, IL-8 e TNF), o pequeno tamanho da amostra e quantidade diferentes dos níveis de citocinas entre os doadores podem ser uma razão para a falta de diferença estatística.

Outra análise que realizamos foi a do líquido sinovial. É sabido que este líquido está diretamente em contato com todas as estruturas da articulação e reage instantaneamente a todos os distúrbios musculoesqueléticos que ali acometem, mudando suas características físico-químicas (HUANG, X., 2018). Essas mudanças aparecem muitas vezes antes do desenvolvimento de certo quadro clínico, podendo servir como uma espécie de indicador da atividade vital das articulações e dar as informações mais precisas sobre seu estado atual. Do ponto de vista bioquímico, nossos resultados mostraram uma mudança em sua composição macroscópica em direção a um perfil anti-inflamatório e, portanto, são consistentes com as melhorias clínicas observadas. Entretanto maiores verificações devem ser realizadas para completa afirmação desta hipótese.

## **7. CONCLUSÃO**

Diante dos resultados, é possível concluir que as terapias com CTM+PRP e apenas CTM são seguras e efetivas para a melhora do quadro algico, da capacidade funcional e da inflamação articular em pacientes com OA não responsiva ao tratamento

conservador. Com isso, considera-se o uso de CTM+PRP como uma alternativa promissora no auxílio do manejo dessa doença, visto que com todos os resultados a maioria dos pacientes retornou as suas AVDs. O potencial de possibilitar o controle inflamatório articular das CTM age como uma prevenção a progressão desta patologia em casos de OA em graus iniciais. Já em graus mais avançados esta terapia poderia ser utilizada para postergar a colocação da prótese total de joelho, alternativa esta que gera altos custos ao SUS e não está ao alcance da população em todos os hospitais públicos.

## **Financiamento**

Toda esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), com edital aprovado FUNDECT/DECIT-MS/CNPq/SES Nº 03/2016 - PPSUS-MS nº de protocolo 35337.522.4584.13062016.

## **REFERÊNCIAS**

---

ADATIA, A.; RAINSFORD, K.; KEAN, W. F. Osteoarthritis of the knee and hip. Part I: aetiology and pathogenesis as a basis for pharmacotherapy. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 64, n. 5, p. 617-625, 2012.

AF KLINT, E.; CATRINA, A. I.; MATT, P.; NEREGRÅD, P.; LAMPA, J.; ULFGREN, A.-K.; KLARESKOG, L.; LINDBLAD, S. Evaluation of arthroscopy and macroscopic scoring. **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 3, p. R81, 2009.

AL-GHADBAN, S.; BUNNELL, B. A. Adipose tissue-derived stem cells: immunomodulatory effects and therapeutic potential. **Physiology**, v. 35, n. 2, p. 125-133, 2020.

ALLAN, K.; PILLIAR, R.; WANG, J.; GRYNPAS, M.; KANDEL, R. Formation of biphasic constructs containing cartilage with a calcified zone interface. **Tissue engineering**, v. 13, n. 1, p. 167-177, 2007.

ALLEN, K. D.; GOLIGHTLY, Y. M. Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence. **Current opinion in rheumatology**, v. 27, n. 3, p. 276, 2015.

ALTMAN, R. D.; MANJOO, A.; FIERLINGER, A.; NIAZI, F.; NICHOLLS, M. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2015.

ANDIA, I.; MAFFULLI, N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 12, p. 721-730, 2013.

ANTONS, J.; MARASCIO, M. G. M.; NOHAVA, J.; MARTIN, R.; APPLGATE, L.; BOURBAN, P.; PIOLETTI, D. Zone-dependent mechanical properties of human articular cartilage obtained by indentation measurements. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 5, p. 57, 2018.

ANVISA. Guia de Inspeção em Banco de Células e Tecidos - Boas práticas em células e tecidos. v., n., p. 1-341, 2017.

AYRAL, X.; PICKERING, E.; WOODWORTH, T.; MACKILLOP, N.; DOUGADOS, M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis—results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 13, n. 5, p. 361-367, 2005.

BACAKOVA, L.; ZARUBOVA, J.; TRAVNICKOVA, M.; MUSILKOVA, J.; PAJOROVA, J.; SLEPICKA, P.; KASALKOVA, N. S.; SVORCIK, V.; KOLSKA, Z.; MOTARJEMI, H. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells—a review. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 4, p. 1111-1126, 2018.

BANSAL, H.; COMELLA, K.; LEON, J.; VERMA, P.; AGRAWAL, D.; KOKA, P.; ICHIM, T. Intra-articular injection in the knee of adipose derived stromal cells (stromal vascular fraction) and platelet rich plasma for osteoarthritis. **Journal of translational medicine**, v. 15, n. 1, p. 141, 2017.

BASAD, E.; WISSING, F. R.; FEHRENBACH, P.; RICKERT, M.; STEINMEYER, J.; ISHAQUE, B. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee: clinical outcomes and challenges. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, n. 12, p. 3729-3735, 2015.

BELK, J. W.; KRAEUTLER, M. J.; HOUCK, D. A.; GOODRICH, J. A.; DRAGOO, J. L.; MCCARTY, E. C. Platelet-rich plasma versus hyaluronic acid for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **The American journal of sports medicine**, v. 49, n. 1, p. 249-260, 2021.

BENNELL, K. L.; HUNTER, D. J.; PATERSON, K. L. Platelet-rich plasma for the management of hip and knee osteoarthritis. **Current rheumatology reports**, v. 19, n. 5, p. 24, 2017.

BIANCHI, F.; MAIOLI, M.; LEONARDI, E.; OLIVI, E.; PASQUINELLI, G.; VALENTE, S.; MENDEZ, A. J.; RICORDI, C.; RAFFAINI, M.; TREMOLADA, C. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. **Cell transplantation**, v. 22, n. 11, p. 2063-2077, 2013.

BIAZZO, A.; D'AMBROSI, R.; MASIA, F.; IZZO, V.; VERDE, F. Autologous adipose stem cell therapy for knee osteoarthritis: where are we now? **The Physician and Sportsmedicine**, v., n., p. 1-8, 2020.

BOMER, N.; CORNELIS, F. M.; RAMOS, Y. F.; DEN HOLLANDER, W.; STORMS, L.; VAN DER BREGGEN, R.; LAKENBERG, N.; SLAGBOOM, P. E.; MEULENBELT, I.; LORIES, R. J. The effect of forced exercise on knee joints in Dio2<sup>-/-</sup> mice: type II iodothyronine deiodinase-deficient mice are less prone to develop OA-like cartilage damage upon excessive mechanical stress. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 3, p. 571-577, 2016.

BORA, P.; MAJUMDAR, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. **Stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 145, 2017.

BOSSEN, D.; VEENHOF, C.; KLOEK, C.; DE BAKKER, D.; DEKKER, J. The association between psychological factors and physical activity levels in patients with knee and hip osteoarthritis. **Physiotherapy**, v. 101, n., p. e165-e166, 2015.

BOULTON, M.; ALBON, J. Stem cells in the eye. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 4, p. 643-657, 2004.

BOURIN, P.; BUNNELL, B. A.; CASTEILLA, L.; DOMINICI, M.; KATZ, A. J.; MARCH, K. L.; REDL, H.; RUBIN, J. P.; YOSHIMURA, K.; GIMBLE, J. M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641-648, 2013.

BOUWENS, L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. **Microscopy research and technique**, v. 43, n. 4, p. 332-336, 1998.

BOVE, A. M.; SMITH, K. J.; BISE, C. G.; FRITZ, J. M.; CHILDS, J. D.; BRENNAN, G. P.; ABBOTT, J. H.; FITZGERALD, G. K. Exercise, manual therapy, and booster sessions in knee osteoarthritis: cost-effectiveness analysis from a multicenter randomized controlled trial. **Physical therapy**, v. 98, n. 1, p. 16-27, 2018.

BROWN, L. L. Adipose-Derived Stromal Stem Cells. In: (Ed.). **Advanced Procedures for Pain Management**: Springer, 2018, p.489-507.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J.; GRODZINSKY, A. J. Articular cartilage and osteoarthritis. **Instructional Course Lectures-American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 54, n., p. 465, 2005.

BUI, K. H.-T.; DUONG, T. D.; NGUYEN, N. T.; NGUYEN, T. D.; LE, V. T.; MAI, V. T.; PHAN, N. L.-C.; LE, D. M.; PHAN, N. K.; VAN PHAM, P. Symptomatic knee osteoarthritis treatment using autologous adipose derived stem cells and platelet-rich plasma: a clinical study. **Biomedical Research and Therapy**, v. 1, n. 01, p. 02-08, 2014.

BURASTERO, G.; SCARFÌ, S.; FERRARIS, C.; FRESIA, C.; SESSAREGO, N.; FRUSCIONE, F.; MONETTI, F.; SCARFÒ, F.; SCHUPBACH, P.; PODESTÀ, M. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. **Bone**, v. 47, n. 1, p. 117-126, 2010.

CAMASSOLA, M.; DE MACEDO BRAGA, L. M. G.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells. In: (Ed.). **Somatic Stem Cells**: Springer, 2012, p.491-504.

CAPLAN, A. I.; ELYADERANI, M.; MOCHIZUKI, Y.; WAKITANI, S.; GOLDBERG, V. M. Principles of cartilage repair and regeneration. **Clinical orthopaedics and related research**, v., n. 342, p. 254-269, 1997.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells and gene therapy. **Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)**, v. 379, n., p. S67-S70, 2000.

CATTANEO, G.; DE CARO, A.; NAPOLI, F.; CHIAPALE, D.; TRADA, P.; CAMERA, A. Micro-fragmented adipose tissue injection associated with arthroscopic procedures in patients with symptomatic knee osteoarthritis. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 19, n. 1, p. 176, 2018.

CHEN, C.; TAMBE, D. T.; DENG, L.; YANG, L. Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 305, n. 12, p. C1202-C1208, 2013.

COOPER, C.; JAVAID, M. K.; ARDEN, N. Epidemiology of osteoarthritis. In: (Ed.). **Atlas of osteoarthritis**: Springer, 2014, p.21-36.

COUGHLIN, R. P.; OLDWEILER, A.; MICKELSON, D. T.; MOORMAN III, C. T. Adipose-Derived Stem Cell Transplant Technique for Degenerative Joint Disease. **Arthroscopy techniques**, v. 6, n. 5, p. e1761-e1766, 2017.

DE CARVALHO SCHWEICH, L.; DE OLIVEIRA, E. J. T.; PESARINI, J. R.; HERMETO, L. C.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B.; BROCHADO, T. M. M.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; OLIVEIRA, R. J. All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, n., p. 1267-1274, 2017.

DEBNATH, T.; CHELLURI, L. K. Standardization and quality assessment for clinical grade mesenchymal stem cells from human adipose tissue. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 41, n. 1, p. 7-16, 2019.

DHILLON, M. S.; PATEL, S.; JOHN, R. PRP in OA knee—update, current confusions and future options. **Sicot-j**, v. 3, n., p., 2017.

DIAS, J. M.; CISNEROS, L.; DIAS, R.; FRITSCH, C.; GOMES, W.; PEREIRA, L.; SANTOS, M. L.; FERREIRA, P. H. Hydrotherapy improves pain and function in older women with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. **Brazilian journal of physical therapy**, v. 21, n. 6, p. 449-456, 2017.

DIEPPE, P. A.; LOHMANDER, L. S. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. **The Lancet**, v. 365, n. 9463, p. 965-973, 2005.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOMPE, C.; WAŚIATYCZ, G.; MOZDZIAK, P.; JANKOWSKI, M.; KEMPISTY, B. Current clinical applications of adipose-derived stem cells in humans and animals. **Medical Journal of Cell Biology**, v. 7, n. 3, p. 105-111, 2019.

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**, v. 26, n. 17, p. 3617-3629, 2005.

EVERHART, J. S.; ABOULJOD, M. M.; FLANIGAN, D. C. The role of full-thickness cartilage defects in knee osteoarthritis (OA) incidence and progression: Data from the OA Initiative. **Journal of Orthopaedic Research**, v., n., p., 2018.

FODOR, P. B.; PAULSETH, S. G. Adipose derived stromal cell (ADSC) injections for pain management of osteoarthritis in the human knee joint. **Aesthetic surgery journal**, v. 36, n. 2, p. 229-236, 2015.

FRANCISCO, V.; PÉREZ, T.; PINO, J.; LÓPEZ, V.; FRANCO, E.; ALONSO, A.; GONZALEZ-GAY, M. A.; MERA, A.; LAGO, F.; GÓMEZ, R. Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 2, p. 594-604, 2018.

FUCHS, Y.; BROWN, S.; GORENC, T.; RODRIGUEZ, J.; FUCHS, E.; STELLER, H. Sept4/ARTS regulates stem cell apoptosis and skin regeneration. **science**, v. 341, n. 6143, p. 286-289, 2013.

FUGGLE, N. R.; COOPER, C.; OREFFO, R. O.; PRICE, A.; KAUX, J.-F.; MAHEU, E.; CUTOLO, M.; HONVO, G.; CONAGHAN, P.; BERENBAUM, F. Alternative and complementary therapies in osteoarthritis and cartilage repair. **Aging clinical and experimental research**, v. 32, n. 4, p. 547-560, 2020.

GIBBS, N.; DIAMOND, R.; SEKYERE, E. O.; THOMAS, W. D. Management of knee osteoarthritis by combined stromal vascular fraction cell therapy, platelet-rich plasma, and musculoskeletal exercises: a case series. **Journal of pain research**, v. 8, n., p. 799, 2015.

GOBBI, A.; KARNATZIKOS, G.; KUMAR, A. Long-term results after microfracture treatment for full-thickness knee chondral lesions in athletes. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 22, n. 9, p. 1986-1996, 2014.

GOMOLL, A. H.; YOSHIOKA, H.; WATANABE, A.; DUNN, J. C.; MINAS, T. Preoperative measurement of cartilage defects by MRI underestimates lesion size. **Cartilage**, v. 2, n. 4, p. 389-393, 2011.

GRACITELLI, G. C.; MERIC, G.; BRIGGS, D. T.; PULIDO, P. A.; MCCAULEY, J. C.; BELLOTI, J. C.; BUGBEE, W. D. Fresh osteochondral allografts in the knee: comparison of primary transplantation versus transplantation after failure of previous subchondral marrow stimulation. **The American journal of sports medicine**, v. 43, n. 4, p. 885-891, 2015.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

GROVE, J. E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D. S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem cells**, v. 22, n. 4, p. 487-500, 2004.

GUILAK, F.; NIMS, R.; DICKS, A.; WU, C.-L.; MEULENBELT, I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. **Matrix Biology**, v., n., p., 2018.

HERMETO, L.; OLIVEIRA, R.; MATUO, R.; JARDIM, P.; DEROSI, R.; ANTONIOLLI, A.; DEFFUNE, E.; EVARISTO, T.; SANTANA, Á. Evaluation of pH effects on genomic integrity in adipose-derived mesenchymal stem cells using the comet assay. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 339-348, 2015.

HERMETO, L.; DEROSI, R.; OLIVEIRA, R.; PESARINI, J.; ANTONIOLLI-SILVA, A.; JARDIM, P.; SANTANA, A.; DEFFUNE, E.; RINALDI, J.; JUSTULIN, L. Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. **Genet Mol Res**, v. 15, n., p. 3, 2016.

HERMETO, L. C.; DEROSI, R.; OLIVEIRA, R. J.; GOMES, F. G.; FERREIRA, W. R.; GALHARDO, J. A.; MÖCK, T. B.; BASAGLIA, W. V.; FERNANDES, D. M. The efficacy of topical insulin application on rat model with burn wounds treated with adipose-derived stem cells. **International Journal of Burns and Trauma**, v. 10, n. 6, p. 296, 2020.

HILIGSMANN, M.; COOPER, C.; ARDEN, N.; BOERS, M.; BRANCO, J. C.; BRANDI, M. L.; BRUYÈRE, O.; GUILLEMIN, F.; HOCHBERG, M. C.; HUNTER, D. J. Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). In: *Seminars in arthritis and rheumatism*, 2013Elsevier, p. 303-313.

HINCKEL, B. B.; GOMOLL, A. H. Autologous chondrocytes and next-generation matrix-based autologous chondrocyte implantation. **Clinics in sports medicine**, v. 36, n. 3, p. 525-548, 2017.

HONG, Z.; CHEN, J.; ZHANG, S.; ZHAO, C.; BI, M.; CHEN, X.; BI, Q. Intra-articular injection of autologous adipose-derived stromal vascular fractions for knee osteoarthritis: a double-blind randomized self-controlled trial. **International orthopaedics**, v., n., p. 1-12, 2018.

HUANG, B. J.; HU, J. C.; ATHANASIOU, K. A. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. **Biomaterials**, v. 98, n., p. 1-22, 2016.

HUANG, X. **Multi-signals involved in human joint homeostasis**: University of Twente, 2018  
HUDETZ, D.; BORIĆ, I.; ROD, E.; JELEČ, Ž.; RADIĆ, A.; VRDOLJAK, T.; SKELIN, A.; LAUC, G.; TRBOJEVIĆ-AKMAČIĆ, I.; PLEČKO, M. The effect of intra-articular injection of autologous microfragmented fat tissue on proteoglycan synthesis in patients with knee osteoarthritis. **Genes**, v. 8, n. 10, p. 270, 2017.

HUNZIKER, E. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 10, n. 6, p. 432-463, 2002.

IMHOF, H.; SULZBACHER, I.; GRAMPP, S.; CZERNY, C.; YOUSSEFZADEH, S.; KAINBERGER, F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. **Investigative radiology**, v. 35, n. 10, p. 581-588, 2000.

JACOBI, M.; VILLA, V.; MAGNUSSEN, R. A.; NEYRET, P. MACI-a new era? **Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy & Technology**, v. 3, n. 1, p. 10, 2011.

JEVSEVAR, D. S. Treatment of osteoarthritis of the knee: evidence-based guideline. **JAAOS- Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 21, n. 9, p. 571-576, 2013.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B. N.; REINHARDT, R. L.; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C. D.; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 41, 2002.

JO, C. H.; LEE, Y. G.; SHIN, W. H.; KIM, H.; CHAI, J. W.; JEONG, E. C.; KIM, J. E.; SHIM, H.; SHIN, J. S.; SHIN, I. S. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. **Stem cells**, v. 32, n. 5, p. 1254-1266, 2014.

JO, C. H.; CHAI, J. W.; JEONG, E. C.; OH, S.; SHIN, J. S.; SHIM, H.; YOON, K. S. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a 2-year follow-up study. **The American journal of sports medicine**, v. 45, n. 12, p. 2774-2783, 2017.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. Tecido cartilaginoso. \_\_\_\_\_. **Histologia básica**, v. 10, n., p. 130-135, 1999.

KALRA, K.; TOMAR, P. Stem cell: basics, classification and applications. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 2, n. 7, p. 919-930, 2014.

KELLGREN, J.; LAWRENCE, J. Radiological assessment of osteo-arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 16, n. 4, p. 494, 1957.

KHOSHGOFTAR, M.; TORZILLI, P. A.; MAHER, S. A. Influence of the pericellular and extracellular matrix structural properties on chondrocyte mechanics. **Journal of Orthopaedic Research®**, v. 36, n. 2, p. 721-729, 2018.

KIM, M.; STEINBERG, D. R.; BURDICK, J. A.; MAUCK, R. L. Extracellular vesicles mediate improved functional outcomes in engineered cartilage produced from MSC/chondrocyte cocultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 5, p. 1569-1578, 2019.

KIM, Y.; CHOI, Y.; LEE, S.; KWON, O.; SUH, D.; HEO, D.; KOH, Y. Assessment of clinical and MRI outcomes after mesenchymal stem cell implantation in patients with knee osteoarthritis: a prospective study. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 24, n. 2, p. 237-245, 2016.

KOH, Y.-G.; JO, S.-B.; KWON, O.-R.; SUH, D.-S.; LEE, S.-W.; PARK, S.-H.; CHOI, Y.-J. Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 29, n. 4, p. 748-755, 2013.

KOH, Y.-G.; CHOI, Y.-J.; KWON, S.-K.; KIM, Y.-S.; YEO, J.-E. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, n. 5, p. 1308-1316, 2015.

KOH, Y. G.; CHOI, Y. J.; KWON, O. R.; KIM, Y. S. Second-look arthroscopic evaluation of cartilage lesions after mesenchymal stem cell implantation in osteoarthritic knees. **The American journal of sports medicine**, v. 42, n. 7, p. 1628-1637, 2014.

KORNICKA, K.; MARYCZ, K.; TOMASZEWSKI, K. A.; MAREŃDZIAK, M.; ŚMIESZEK, A. The effect of age on osteogenic and adipogenic differentiation potential of human adipose derived stromal stem cells (hASCs) and the impact of stress factors in the course of the differentiation process. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, n., p., 2015.

LAM, A. T.; REUVENY, S.; OH, S. K.-W. Human mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair: review on isolation, expansion, and constructs. **Stem cell research**, v. 44, n., p. 101738, 2020.

LAPUENTE, J. P.; DOS-ANJOS, S.; BLÁZQUEZ-MARTÍNEZ, A. Intra-articular infiltration of adipose-derived stromal vascular fraction cells slows the clinical progression of moderate-severe knee osteoarthritis: hypothesis on the regulatory role of intra-articular adipose tissue. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 15, n., p. 1-9, 2020.

LARK, M. W.; BAYNE, E. K.; FLANAGAN, J.; HARPER, C. F.; HOERRNER, L. A.; HUTCHINSON, N. I.; SINGER, I. I.; DONATELLI, S. A.; WEIDNER, J. R.; WILLIAMS, H. R. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 1, p. 93-106, 1997.

LE, A. D.; ENWEZE, L.; DEBAUN, M. R.; DRAGOO, J. L. Current clinical recommendations for use of platelet-rich plasma. **Current reviews in musculoskeletal medicine**, v. 11, n. 4, p. 624-634, 2018.

LEE, C. S.; BURNSED, O. A.; RAGHURAM, V.; KALISVAART, J.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. **Stem cell research & therapy**, v. 3, n. 4, p. 35, 2012.

LEE, W. S.; KIM, H. J.; KIM, K. I.; KIM, G. B.; JIN, W. Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIb, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Stem cells translational medicine**, v., n., p., 2019.

LEE, Y.; CHOI, J.; HWANG, N. S. Regulation of lubricin for functional cartilage tissue regeneration: a review. **Biomaterials research**, v. 22, n. 1, p. 9, 2018.

LEGZDINA, D.; ROMANAUSKA, A.; NIKULSHIN, S.; KOZLOVSKA, T.; BERZINS, U. Characterization of senescence of culture-expanded human adipose-derived mesenchymal stem cells. **International journal of stem cells**, v. 9, n. 1, p. 124, 2016.

LEVY, D. M.; PETERSEN, K. A.; VAUGHT, M. S.; CHRISTIAN, D. R.; COLE, B. J. Injections for Knee Osteoarthritis: Corticosteroids, Viscosupplementation, Platelet-Rich Plasma, and Autologous Stem Cells. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 34, n. 5, p. 1730-1743, 2018.

LI, L.; NEWTON, P. T.; BOUDERLIQUE, T.; SEJNOHOVA, M.; ZIKMUND, T.; KOZHEMYAKINA, E.; XIE, M.; KRIVANEK, J.; KAISER, J.; QIAN, H. Superficial cells are self-renewing chondrocyte progenitors, which form the articular cartilage in juvenile mice. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 3, p. 1067-1084, 2016.

LOESER, R. F.; GOLDRING, S. R.; SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, M. B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 6, p. 1697-1707, 2012.

LOESER, R. F.; COLLINS, J. A.; DIEKMAN, B. O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 7, p. 412, 2016.

LU, L.; DAI, C.; ZHANG, Z.; DU, H.; LI, S.; YE, P.; FU, Q.; ZHANG, L.; WU, X.; DONG, Y. Treatment of knee osteoarthritis with intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal progenitor cells: a prospective, randomized, double-blind, active-controlled, phase IIb clinical trial. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 143, 2019.

MANDELBAUM, B. R.; BROWNE, J. E.; FU, F.; MICHELI, L.; MOSELY, J. B.; ERGGELET, C.; MINAS, T.; PETERSON, L. Articular cartilage lesions of the knee. **The American journal of sports medicine**, v. 26, n. 6, p. 853-861, 1998.

MARĘDZIAK, M.; MARYCZ, K.; TOMASZEWSKI, K. A.; KORNICKA, K.; HENRY, B. M. The influence of aging on the regenerative potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. **Stem cells international**, v. 2016, n., p., 2016.

MARKARIAN, C. F.; FREY, G. Z.; SILVEIRA, M. D.; MILANI, A. R.; ELY, P. B.; HORN, A. P.; NARDI, N. B.; CAMASSOLA, M. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 4, p. 693-702, 2014.

MCALLISTER, D. R.; JOYCE, M. J.; MANN, B. J.; VANGSNESS, C. T. Allograft update: the current status of tissue regulation, procurement, processing, and sterilization. **The American journal of sports medicine**, v. 35, n. 12, p. 2148-2158, 2007.

MELO, R. O líquido Sinovial. **Acta Reum Port**, v. 28, n., p. 249-266, 2003.

MICHAEL, J. W.-P.; SCHLÜTER-BRUST, K. U.; EYSEL, P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 107, n. 9, p. 152, 2010.

MIFUNE, Y.; MATSUMOTO, T.; TAKAYAMA, K.; OTA, S.; LI, H.; MESZAROS, L. B.; USAS, A.; NAGAMUNE, K.; GHARAIBEH, B.; FU, F. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 21, n. 1, p. 175-185, 2013.

MITHOEFER, K. Complex articular cartilage restoration. **Sports medicine and arthroscopy review**, v. 21, n. 1, p. 31-37, 2013.

MOLLON, B.; KANDEL, R.; CHAHAL, J.; THEODOROPOULOS, J. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 21, n. 12, p. 1824-1833, 2013.

MONTAÑEZ-HEREDIA, E.; IRÍZAR, S.; HUERTAS, P. J.; OTERO, E.; DEL VALLE, M.; PRAT, I.; DÍAZ-GALLARDO, M. S.; PERÁN, M.; MARCHAL, J. A.; HERNANDEZ-LAMAS, M. D. C. Intra-articular injections of platelet-rich plasma versus hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritic knee pain: a randomized clinical trial in the context of the Spanish National Health Care System. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 7, p. 1064, 2016.

MURPHY, J. M.; DIXON, K.; BECK, S.; FABIAN, D.; FELDMAN, A.; BARRY, F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 3, p. 704-713, 2002.

NAKAGAWA, Y.; MUKAI, S.; YABUMOTO, H.; TARUMI, E.; NAKAMURA, T. Serial changes of the cartilage in recipient sites and their mirror sites on second-look imaging after mosaicplasty. **The American journal of sports medicine**, v. 44, n. 5, p. 1243-1248, 2016.

NELSON, A. E.; ALLEN, K. D.; GOLIGHTLY, Y. M.; GOODE, A. P.; JORDAN, J. M. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: the

chronic osteoarthritis management initiative of the US bone and joint initiative. In: Seminars in arthritis and rheumatism, 2014Elsevier, p. 701-712.

NGUYEN, R. T.; BORG-STEIN, J.; MCINNIS, K. Applications of platelet-rich plasma in musculoskeletal and sports medicine: an evidence-based approach. **PM&R**, v. 3, n. 3, p. 226-250, 2011.

OLIVEIRA, R. J.; MATUO, R.; DA SILVA, A. F.; MATIAZI, H. J.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R. Protective effect of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 1, p. 41-52, 2007.

ONOI, Y.; HIRANAKA, T.; NISHIDA, R.; TAKASE, K.; FUJITA, M.; HIDA, Y.; FUJISHIRO, T.; OKAMOTO, K. Second-look arthroscopic findings of cartilage and meniscus repair after injection of adipose-derived regenerative cells in knee osteoarthritis: Report of two cases. **Regenerative Therapy**, v. 11, n., p. 212-216, 2019.

PAGANO, C.; CALCAGNO, A.; GIACOMELLI, L.; POLETTI, A.; MACCHI, V.; VETTOR, R.; DE CARO, R.; FEDERSPIL, G. Molecular and morphometric description of adipose tissue during weight changes: a quantitative tool for assessment of tissue texture. **International journal of molecular medicine**, v. 14, n. 5, p. 897-902, 2004.

PAK, J.; CHANG, J.-J.; LEE, J. H.; LEE, S. H. Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 14, n. 1, p. 337, 2013.

PAK, J.; LEE, J. H.; PARK, K. S.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Regeneration of cartilage in human knee osteoarthritis with autologous adipose tissue-derived stem cells and autologous extracellular matrix. **BioResearch open access**, v. 5, n. 1, p. 192-200, 2016.

PAK, J.; LEE, J. H.; PAK, N. J.; PARK, K. S.; JEON, J. H.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Clinical Protocol of Producing Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction for Potential Cartilage Regeneration. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, v., n. 139, p. e58363, 2018.

PANNI, A. S.; VASSO, M.; BRAILE, A.; TORO, G.; DE CICCO, A.; VIGGIANO, D.; LEPORE, F. Preliminary results of autologous adipose-derived stem cells in early knee osteoarthritis: identification of a subpopulation with greater response. **International orthopaedics**, v., n., p. 1-7, 2018.

PERS, Y.-M.; RACKWITZ, L.; FERREIRA, R.; PULLIG, O.; DELFOUR, C.; BARRY, F.; SENSEBE, L.; CASTEILLA, L.; FLEURY, S.; BOURIN, P. Adipose mesenchymal stromal cell-based therapy for severe osteoarthritis of the knee: A phase i dose-escalation trial. **Stem cells translational medicine**, v. 5, n. 7, p. 847-856, 2016.

PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, R. J.; PESSATTO, L. R.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; FELICIDADE, I.; NARDI, N. B.; CAMASSOLA, M.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.

Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, n., p. 861-871, 2017.

PESARINI, J. R.; DE OLIVEIRA, E. J. T.; PESSATTO, L. R.; RABACOW, A. P. M.; CAMASSOLA, M.; DOS SANTOS, B. P.; DE BARROS, M. E.; DE BARROS CANTERO, W.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; OLIVEIRA, R. J. Calcitriol combined with calcium chloride causes apoptosis in undifferentiated adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells, but this effect decreases during adipogenic differentiation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, n., p. 914-924, 2018.

RASHID, H.; KWOH, C. K. Should platelet-rich plasma or stem cell therapy be used to treat osteoarthritis? **Rheumatic Disease Clinics**, v. 45, n. 3, p. 417-438, 2019.

ROATO, I.; BELISARIO, D. C.; COMPAGNO, M.; LENA, A.; BISTOLFI, A.; MACCARI, L.; MUSSANO, F.; GENOVA, T.; GODIO, L.; PERALE, G. Concentrated adipose tissue infusion for the treatment of knee osteoarthritis: clinical and histological observations. **International orthopaedics**, v. 43, n. 1, p. 15-23, 2019.

SÄÄMÄNEN, A.-M.; AROKOSKI, J.; JURVELIN, J.; KIVIRANTA, I. The structure and regenerative capacity of synovial joint tissues. In: (Ed.). **Regenerative medicine and biomaterials for the repair of connective tissues**: Elsevier, 2010, p.1-38.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature reviews immunology**, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.

SCANZELLO, C. R.; MCKEON, B.; SWAIM, B. H.; DICARLO, E.; ASOMUGHA, E. U.; KANDA, V.; NAIR, A.; LEE, D. M.; RICHMOND, J. C.; KATZ, J. N. Synovial inflammation in patients undergoing arthroscopic meniscectomy: molecular characterization and relationship to symptoms. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 2, p. 391-400, 2011.

SCHULZ, K. Afecções articulares. **Cirurgia de Pequenos Animais**, v. 3, n., p. 1143-1315, 2008.

SCHWINDT, T.; BARNABÉ, G.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 11, p. 625, 2010.

SHAHID, M.; KUNDRA, R. Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders. **EFORT open reviews**, v. 2, n. 2, p. 28-34, 2017.

SHARMA, A.; KUDESIA, P.; SHI, Q.; GANDHI, R. Anxiety and depression in patients with osteoarthritis: impact and management challenges. **Open access rheumatology: research and reviews**, v. 8, n., p. 103, 2016.

SIQUEIRA, M. B.; FRANGIAMORE, S.; KLIKA, A. K.; GAJEWSKI, N.; BARSOUM, W. K.; HIGUERA, C. A. Comparison of synovial fluid cytokine levels between traumatic knee injury and end-stage osteoarthritis. **The journal of knee surgery**, v. 30, n. 02, p. 128-133, 2017.

SONG, Y.; DU, H.; DAI, C.; ZHANG, L.; LI, S.; HUNTER, D. J.; LU, L.; BAO, C. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. **Regenerative medicine**, v. 13, n. 3, p. 295-307, 2018.

SOPHIA FOX, A. J.; BEDI, A.; RODEO, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. **Sports health**, v. 1, n. 6, p. 461-468, 2009.

SPASOVSKI, D.; SPASOVSKI, V.; BAŠČAREVIĆ, Z.; STOJILJKOVIĆ, M.; VREĆA, M.; ANĐELKOVIĆ, M.; PAVLOVIĆ, S. Intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis. **The journal of gene medicine**, v. 20, n. 1, p. e3002, 2018.

SPATH, L.; ROTILIO, V.; ALESSANDRINI, M.; GAMBARA, G.; DE ANGELIS, L.; MANCINI, M.; MITSIADIS, T.; VIVARELLI, E.; NARO, F.; FILIPPINI, A. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 6b, p. 1635-1644, 2010.

STOKER, A. M.; STANNARD, J. P.; KUROI, K.; BOZYNSKI, C. C.; PFEIFFER, F. M.; COOK, J. L. Validation of the Missouri Osteochondral Allograft Preservation System for the maintenance of osteochondral allograft quality during prolonged storage. **The American journal of sports medicine**, v. 46, n. 1, p. 58-65, 2018.

SUNDMAN, E. A.; COLE, B. J.; KARAS, V.; DELLA VALLE, C.; TETREAU, M. W.; MOHAMMED, H. O.; FORTIER, L. A. The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis. **The American journal of sports medicine**, v. 42, n. 1, p. 35-41, 2014.

TAKANO, S.; UCHIDA, K.; INOUE, G.; MATSUMOTO, T.; AIKAWA, J.; IWASE, D.; MUKAI, M.; MIYAGI, M.; TAKASO, M. Vascular endothelial growth factor expression and their action in the synovial membranes of patients with painful knee osteoarthritis. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 19, n. 1, p. 204, 2018.

TÍRICO, L. E. P.; DEMANGE, M. K.; SANTOS, L. A. U.; PÉCOR, J. R.; CROCI, A. T.; CAMANHO, G. L. Transplante osteocondral a fresco no joelho no Brasil: mínimo de dois anos de seguimento. **Revista brasileira de ortopedia**, v. 52, n. 1, p. 75-81, 2017.

TO, K.; ROMAIN, K.; MAK, C.; KAMARAJ, A.; HENSON, F.; KHAN, W. The treatment of cartilage damage using human mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a systematic review of in vivo studies. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n., p., 2020.

TRUONG, N. C.; BUI, K. H.-T.; VAN PHAM, P. Characterization of senescence of human adipose-derived stem cells after long-term expansion. v., n., p., 2018.

URT-FILHO, A.; OLIVEIRA, R. J.; HERMETO, L. C.; PESARINI, J. R.; DAVID, N. D.; CANTERO, W. D. B.; FALCÃO, G.; MARKS, G.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B. Mesenchymal stem cell therapy promotes the improvement and recovery of renal function in a preclinical model. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 2, p. 290-299, 2016.

VAN PHAM, P.; HONG-THIEN BUI, K.; QUOC NGO, D.; TAN KHUAT, L.; KIM PHAN, N. Transplantation of nonexpanded adipose stromal vascular fraction and platelet-rich plasma for articular cartilage injury treatment in mice model. **Journal of Medical Engineering**, v. 2013, n., p., 2013.

VASANTHAN, J.; GURUSAMY, N.; RAJASINGH, S.; SIGAMANI, V.; KIRANKUMAR, S.; THOMAS, E. L.; RAJASINGH, J. Role of Human Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Therapy. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 54, 2021.

VIEIRA, M.; OLIVEIRA, R.; EÇA, L.; PEREIRA, I.; HERMETO, L.; MATUO, R.; FERNANDES, W.; SILVA, R.; ANTONIOLLI, A. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells to treat Achilles tendon injuries. **Genet Mol Res**, v. 13, n. 4, p. 10434-10449, 2014.

VINCENT, T. L.; HERMANSSON, M. A.; HANSEN, U. N.; AMIS, A. A.; SAKLATVALA, J. Basic fibroblast growth factor mediates transduction of mechanical signals when articular cartilage is loaded. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 50, n. 2, p. 526-533, 2004.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WANG, T.; HE, C. Pro-inflammatory cytokines: the link between obesity and osteoarthritis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 44, n., p. 38-50, 2018.

WANG, Y.; HUSO, D.; HARRINGTON, J.; KELLNER, J.; JEONG, D.; TURNEY, J.; MCNIECE, I. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. **Cytotherapy**, v. 7, n. 6, p. 509-519, 2005.

WELLSANDT, E.; GOLIGHTLY, Y. Exercise in the management of knee and hip osteoarthritis. **Current opinion in rheumatology**, v. 30, n. 2, p. 151-159, 2018.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł. A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators of inflammation**, v. 2014, n., p., 2014.

YIN, L.; WU, Y.; YANG, Z.; DENSLIN, V.; REN, X.; TEE, C. A.; LAI, Z.; LIM, C. T.; HAN, J.; LEE, E. H. Characterization and application of size-sorted zonal chondrocytes for articular cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 165, n., p. 66-78, 2018.

YOKOTA, N.; YAMAKAWA, M.; SHIRATA, T.; KIMURA, T.; KANESHIMA, H. Clinical results following intra-articular injection of adipose-derived stromal vascular fraction cells in patients with osteoarthritis of the knee. **Regenerative Therapy**, v. 6, n., p. 108-112, 2017.

YOKOTA, N.; HATTORI, M.; OHTSURU, T.; OTSUJI, M.; LYMAN, S.; SHIMOMURA, K.; NAKAMURA, N. Comparative clinical outcomes after intra-articular injection with adipose-derived cultured stem cells or noncultured stromal vascular fraction for the treatment of knee osteoarthritis. **The American journal of sports medicine**, v. 47, n. 11, p. 2577-2583, 2019.

ZACARON, K. A. M.; DIAS, J.; ABREU, N.; DIAS, R. Nível de atividade física, dor e edema e suas relações com a disfunção muscular do joelho de idosos com osteoartrite. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 10, n. 3, p., 2006.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos avançados**, v. 18, n. 51, p. 247-256, 2004.

ZHENG, Y.-W.; TANIGUCHI, H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. In: *Seminars in liver disease*, 2003 Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, p. 337-348.

ZOU, M. L.; LIU, S. Y.; SUN, Z. L.; WU, J. J.; YUAN, Z. D.; TENG, Y. Y.; FENG, Y.; YUAN, F. L. Insights into the role of adipose-derived stem cells: Wound healing and clinical regenerative potential. **Journal of cellular physiology**, v., n., p., 2020.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

## ANEXO A – GRUPO CONTROLE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/TCLE

#### Prezado(a) Senhor(a)

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e do infiltrado de plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite não responsiva ao tratamento medicamentoso”. Você tem tempo para refletir, e a decisão final se gostaria ou não de participar da pesquisa é sua. Lembre-se que, à medida que surgirem dúvidas, você poderá perguntar ao pesquisador responsável.

Este estudo será conduzido pelos pesquisadores Laynna de Carvalho Schweich, Roberto Antonioli Silva, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva e Rodrigo Juliano Oliveira e visa conhecer os efeitos da aplicação das células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas na articulação do joelho. Atualmente, a osteoartrite é uma importante questão de saúde pública, principalmente em função das complicações decorrentes da mesma. Logo, há que se lançar mão de novos conhecimentos que possam ser mais efetivos, em especial na melhora do quadro da osteoartrite, buscando o benefício para o paciente. Caso a pesquisa seja um sucesso, a população poderá ser beneficiada com novos tratamentos (mais efetivos) para pacientes debilitados pela osteoartrite.

Nesta pesquisa em específico, os quarenta pacientes com diagnóstico de osteoartrite e indicação para cirurgia ortopédica, que já tiverem realizados os exames de risco cirúrgico serão convidados a realizar a cirurgia de artroscopia de joelho. No primeiro momento será realizada a avaliação da articulação por exame de imagem (ressonância magnética) e depois serão aplicados questionários de qualidade de vida e condição clínica, a fim de, coletar detalhes sobre a forma como esta patologia esta agravando a qualidade de vida do paciente. Ressaltando que o exame de imagem e a aplicação dos questionários acontecerão também ao fim do estudo, ambos no Ambulatório de Ortopedia do HUMAP/EBSERH.

---

Rubrica do Participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

---

Quanto aos riscos relacionados ao procedimento cirúrgico propriamente dito a cirurgia é de pequeno porte, sendo realizada por vídeo, por uma equipe competente e experiente. Porém como qualquer procedimento invasivo pode haver possíveis reações no pós-operatório tais como, hematomas, calor persistente ou vermelhidão ao redor do joelho, quadro álgico persistente e edema na região da articulação acometida. Ressaltando que a equipe que compõe esta pesquisa é qualificada o suficiente para a realização destes procedimentos.

A equipe estará prontamente a postos caso seja necessário, sendo direito do participante receber assistência e acompanhamento especializado de forma integral, pelo tempo que for necessário, caso esses eventos adversos aconteçam. Ressaltando que toda e qualquer prestação de assistência acontecerá sem ônus de qualquer espécie ao participante. É de responsabilidade do pesquisador e do HUMAP/EBSERH, a realização de todo e qualquer forma de suporte ao participante. Ainda, fique sabendo que se você aceitar participar, poderá desistir do estudo a qualquer momento sem prejuízos médicos ou pessoais, informando esta decisão à mim pessoalmente ou pelo telefone que encontra-se mais abaixo. Lembrando também que terá direito a indenização caso ocorra qualquer tipo de dano decorrente da participação desta pesquisa.

Não participam da pesquisa pessoas menores de 18 anos. Não haverá qualquer compensação financeira para os que decidirem participar da pesquisa e os benefícios serão obtidos quando os resultados da pesquisa forem usados pelos médicos que buscam novos tratamentos para a osteoartrite por alternativas inovadoras e mais eficientes. Sendo assim de suma importância a confidencialidade dos dados e resultados obtidos nesse estudo, até que sejam analisados e publicados em revistas, jornais, eventos, teses, salientando que em nenhum momento serão divulgados nomes, ou seja, os dados da pesquisa são anônimos e apenas o pesquisador e você, terão acesso a este documento em que consta o seu nome.

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para Laynna de Carvalho Schweich, telefone (67) 8109-2423 ou (67) 3356-2580, Roberto Antonioli Silva (67) Rodrigo Juliano Oliveira (67) 8417-6510.

---

Rubrica do Participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

---

Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67)3345-7187.

Como já informado, sua participação no estudo é voluntária. Caso não queira participar da pesquisa, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a fazer parte deste estudo. Declaro que estou recebendo uma via assinada deste termo de consentimento.

---

**Nome do Participante da pesquisa**

---

**Assinatura do Participante da pesquisa**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Telefone (opcional) \_\_\_\_\_

**Assinatura do pesquisador responsável**

---

**Laynna de Carvalho Schweich**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## ANEXO B – GRUPO PRP

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/TCLE

#### Prezado(a) Senhor(a)

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e do infiltrado de plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite não responsiva ao tratamento medicamentoso”. Você tem tempo para refletir, e a decisão final se gostaria ou não de participar da pesquisa é sua. Lembre-se que, à medida que surgirem dúvidas, você poderá perguntar ao pesquisador responsável.

Este estudo será conduzido pelos pesquisadores Laynna de Carvalho Schweich, Roberto Antonioli Silva, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva e Rodrigo Juliano Oliveira e visa conhecer os efeitos da aplicação das células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas na articulação do joelho. Atualmente, a osteoartrite é uma importante questão de saúde pública, principalmente em função das complicações decorrentes da mesma. Logo, há que se lançar mão de novos conhecimentos que possam ser mais efetivos, em especial na melhora do quadro da osteoartrite, buscando o benefício para o paciente. Caso a pesquisa seja um sucesso, a população poderá ser beneficiada com novos tratamentos (mais efetivos) para pacientes debilitados pela osteoartrite.

Nesta pesquisa em específico, os quarenta pacientes com diagnóstico de osteoartrite e indicação para cirurgia ortopédica, que já tiverem realizados os exames de risco cirúrgico serão convidados a realizar a cirurgia de artroscopia de joelho. No primeiro momento será realizada a avaliação da articulação por exame de imagem (ressonância magnética) e depois serão aplicados questionários de qualidade de vida e condição clínica, a fim de, coletar detalhes sobre a forma como esta patologia esta agravando a qualidade de vida do paciente. Ressaltando que o exame de imagem e a aplicação dos questionários acontecerão também ao fim do estudo, ambos no Ambulatório de Ortopedia do HUMAP/EBSERH.

Durante o procedimento cirúrgico, será coletado sangue do paciente para processamento e separação do plasma, ao final da artroscopia será realizada a aplicação de PRP com volume total máximo de 4mL na articulação. Todo o procedimento de

---

Rubrica do Participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

1/4

manuseio do material biológico será realizado em ambiente e condições estéreis, afim de que eventos de contaminação do mesmo não aconteçam.

Como qualquer procedimento invasivo após a realização da videoartroscopia pode haver possíveis reações no pós-operatório tais como, hematomas, calor persistente ou vermelhidão ao redor do joelho, quadro algico persistente e edema na região da articulação acometida. Já em relação ao infiltrado de plasma rico em plaquetas, a literatura consultada não indica nenhum risco ou efeito adverso visto que o material é autólogo, ou seja, do retirado e transplantado para o próprio paciente. Ressaltando que a equipe que compõe esta pesquisa é qualificada o suficiente para a realização destes procedimentos.

A equipe estará prontamente a postos caso seja necessário, sendo direito do participante receber assistência e acompanhamento especializado de forma integral, pelo tempo que for necessário, caso esses eventos adversos aconteçam. Ressaltando que toda e qualquer prestação de assistência acontecerá sem ônus de qualquer espécie ao participante. É de responsabilidade do pesquisador e do HUMAP/EBSERH, a realização de todo e qualquer forma de suporte ao participante. Ainda, fique sabendo que se você aceitar participar, poderá desistir do estudo a qualquer momento sem prejuízos médicos ou pessoais, informando esta decisão à mim pessoalmente ou pelo telefone que encontra-se mais abaixo. Lembrando também que terá direito a indenização caso ocorra qualquer tipo de dano relacionado a esta pesquisa.

Não participam da pesquisa pessoas menores de 18 anos. Não haverá qualquer compensação financeira para os que decidirem participar da pesquisa e os benefícios serão obtidos quando os resultados da pesquisa forem usados pelos médicos que buscam novos tratamentos para a osteoartrite por alternativas inovadoras e mais eficientes. Sendo assim de suma importância a confidencialidade dos dados e resultados obtidos nesse estudo, até que sejam analisados e publicados em revistas, jornais, eventos, teses, salientando que em nenhum momento serão divulgados nomes, ou seja, os dados da pesquisa são anônimos e apenas o pesquisador e você, terão acesso a este documento em que consta o seu nome.

---

Rubrica do Participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para Laynna de Carvalho Schweich, telefone (67) 8109-2423 ou (67) 3356-2580, Roberto Antonioli Silva (67) Rodrigo Juliano Oliveira (67) 8417-6510. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67)3345-7187.

Como já informado, sua participação no estudo é voluntária. Caso não queira participar da pesquisa, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a fazer parte deste estudo. Declaro que estou recebendo uma via assinada deste termo de consentimento.

---

**Nome do Participante da pesquisa**

---

**Assinatura do Participante da pesquisa**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Telefone (opcional) \_\_\_\_\_

**Assinatura do pesquisador responsável**

---

**Laynna de Carvalho Schweich**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## ANEXO C – GRUPO CTM+PRP

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/TCLE

#### Prezado(a) Senhor(a)

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e do infiltrado de plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite não responsiva ao tratamento medicamentoso”. Você tem tempo para refletir, e a decisão final se gostaria ou não de participar da pesquisa é sua. Lembre-se que, à medida que surgirem dúvidas, você poderá perguntar ao pesquisador responsável.

Este estudo será conduzido pelos pesquisadores Laynna de Carvalho Schweich, Roberto Antonioli Silva, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva e Rodrigo Juliano Oliveira e visa conhecer os efeitos da aplicação das células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas na articulação do joelho. Atualmente, a osteoartrite é uma importante questão de saúde pública, principalmente em função das complicações decorrentes da mesma. Logo, há que se lançar mão de novos conhecimentos que possam ser mais efetivos, em especial na melhora do quadro da osteoartrite, buscando o benefício para o paciente. Caso a pesquisa seja um sucesso, a população poderá ser beneficiada com novos tratamentos (mais efetivos) para pacientes debilitados pela osteoartrite.

Nesta pesquisa em específico, os quarenta pacientes com diagnóstico de osteoartrite com indicação para cirurgia ortopédica, que já tiverem realizados os exames de risco cirúrgico serão convidados a realizar a cirurgia de artroscopia de joelho no Ambulatório de Ortopedia (HUMAP/EBSERH) para separação do plasma e uma amostra de 100mL de gordura abdominal, por lipoaspiração, junto ao Centro Cirúrgico (HUMAP/EBSERH) com pelo menos 45 dias anteriores à data da cirurgia. Sendo assim, caso decida participar desta pesquisa, no momento de seu procedimento cirúrgico as suas células de gordura estão prontas para o transplante. Reforço à ideia de que você não está sendo convidado(a) a fazer o procedimento cirúrgico completo de lipoaspiração abdominal, e sim, consentindo que algumas de suas células de gordura sejam coletadas

---

Rubrica do Participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

de uma determinada região abdominal. O material será encaminhado ao Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen/HUMAP/EBSERH) para adequado processamento e cultivo, formando assim um biorrepositório para o desenvolvimento da pesquisa.

No primeiro momento será realizada a avaliação da articulação por exame de imagem (ressonância magnética) e depois serão aplicados questionários de qualidade de vida e condição clínica, a fim de, coletar detalhes sobre a forma como esta patologia esta agravando a qualidade de vida do paciente. Ressaltando que o exame de imagem e a aplicação dos questionários acontecerão também ao fim do estudo, ambos no Ambulatório de Ortopedia do HUMAP/EBSERH.

Durante o procedimento cirúrgico, será coletado sangue do paciente para processamento e separação do plasma, ao final da artroscopia será realizada a aplicação de PRP com volume total máximo de 4mL na articulação. Todo o procedimento de manuseio e processamento do material biológico será realizado em ambiente e condições estéreis, afim de que eventos de contaminação do mesmo não aconteçam.

Como qualquer procedimento invasivo após a realização da videoartroscopia pode haver possíveis reações no pós-operatório tais como, hematomas, calor persistente ou vermelhidão ao redor do joelho, quadro algico persistente e edema na região da articulação acometida. Já na lipoaspiração podemos observar em certos casos edema prolongado, alterações na sensibilidade da pele, infecções locais, reações alérgicas, taquicardia e embolia gordurosa. Em relação ao transplante das células tronco e do plasma rico em plaquetas, a literatura consultada não indica nenhum risco ou efeito adverso visto que o material é autólogo, ou seja, do retirado e transplantado para o próprio paciente. Vale ressaltar que a equipe que compõe esta pesquisa é qualificada o suficiente para a realização destes procedimentos.

Caso algum desses eventos acontecerem à equipe estará prontamente a postos caso seja necessário, sendo direito do participante receber assistência e acompanhamento especializado de forma integral, pelo tempo que for necessário. Ressaltando que toda e qualquer prestação de assistência acontecerá sem ônus de qualquer espécie ao participante. É de responsabilidade do pesquisador e do HUMAP/EBSERH, a realização de todo e qualquer forma de suporte ao participante.

---

Rubrica do Participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

Ainda, fique sabendo que se você aceitar participar poderá desistir do estudo a qualquer momento sem prejuízos médicos ou pessoais, informando esta decisão à mim pessoalmente ou pelo telefone que encontra-se mais abaixo. Lembrando também que terá direito a indenização caso ocorra qualquer tipo de dano relacionado a esta pesquisa.

Não participam da pesquisa pessoas menores de 18 anos. Não haverá qualquer compensação financeira para os que decidirem participar da pesquisa e os benefícios serão obtidos quando os resultados da pesquisa forem usados pelos médicos que buscam novos tratamentos para a osteoartrite por alternativas inovadoras e mais eficientes. Sendo assim de suma importância a confidencialidade dos dados e resultados obtidos nesse estudo, até que sejam analisados e publicados em revistas, jornais, eventos, teses, salientando que em nenhum momento serão divulgados nomes, ou seja, os dados da pesquisa são anônimos e apenas o pesquisador e você, terão acesso a este documento em que consta o seu nome.

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para Laynna de Carvalho Schweich, telefone (67) 8109-2423 ou (67) 3356-2580, Roberto Antonioli Silva (67) Rodrigo Juliano Oliveira (67) 8417-6510. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67)3345-7187.

Como já informado, sua participação no estudo é voluntária. Caso não queira participar da pesquisa, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a fazer parte deste estudo. Declaro que estou recebendo uma via assinada deste termo de consentimento.

---

**Nome do Participante da pesquisa**

---

**Assinatura do Participante da pesquisa**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Telefone (opcional) \_\_\_\_\_

**Assinatura do pesquisador responsável**

---

**Laynna de Carvalho Schweich**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## ANEXO D – GRUPO CTM

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/TCLE

#### Prezado(a) Senhor(a)

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, e do infiltrado de plasma rico em plaquetas no tratamento da osteoartrite não responsiva ao tratamento medicamentoso”. Você tem tempo para refletir, e a decisão final se gostaria ou não de participar da pesquisa é sua. Lembre-se que, à medida que surgirem dúvidas, você poderá perguntar ao pesquisador responsável.

Este estudo será conduzido pelos pesquisadores Laynna de Carvalho Schweich, Roberto Antonioli Silva, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva e Rodrigo Juliano Oliveira e visa conhecer os efeitos da aplicação das células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas na articulação do joelho. Atualmente, a osteoartrite é uma importante questão de saúde pública, principalmente em função das complicações decorrentes da mesma. Logo, há que se lançar mão de novos conhecimentos que possam ser mais efetivos, em especial na melhora do quadro da osteoartrite, buscando o benefício para o paciente. Caso a pesquisa seja um sucesso, a população poderá ser beneficiada com novos tratamentos (mais efetivos) para pacientes debilitados pela osteoartrite.

Nesta pesquisa em específico, os quarenta pacientes com diagnóstico de osteoartrite e indicação para cirurgia ortopédica, que já tiverem realizados os exames de risco cirúrgico e com cirurgia marcada, serão convidados a coleta uma bolsa de sangue, junto ao Hemocentro (HUMAP/EBSERH) para separação do plasma e uma amostra de 100mL de gordura abdominal, por lipoaspiração, junto ao Centro Cirúrgico (HUMAP/EBSERH) com pelo menos 45 dias anteriores à data da cirurgia. Sendo assim, caso decida participar desta pesquisa, no momento de seu procedimento cirúrgico as suas células de gordura estão prontas para o transplante. Reforço à ideia de que você não está sendo convidado(a) a fazer o procedimento cirúrgico completo de lipoaspiração abdominal, e sim, consentindo que algumas de suas células de gordura sejam coletadas

---

Rubrica do Participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

de uma determinada região abdominal. O material será encaminhado ao Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen/HUMAP/EBSERH) para adequado processamento e cultivo, formando assim um biorrepositório para o desenvolvimento da pesquisa. Todo o procedimento de manuseio do material biológico será realizado em ambiente e condições estéreis, afim de que eventos de contaminação do mesmo não aconteçam.

No primeiro momento será realizada a avaliação da articulação por exame de imagem (ressonância magnética) e depois serão aplicados questionários de qualidade de vida e condição clínica, a fim de, coletar detalhes sobre a forma como esta patologia esta agravando a qualidade de vida do paciente. Ressaltando que o exame de imagem e a aplicação dos questionários acontecerão também ao fim do estudo, ambos no Ambulatório de Ortopedia do HUMAP/EBSERH.

Como qualquer procedimento invasivo após a realização da videoartroscopia pode haver possíveis reações no pós-operatório tais como, hematomas, calor persistente ou vermelhidão ao redor do joelho, quadro algico persistente e edema na região da articulação acometida. Na lipoaspiração podemos observar em certos casos edema prolongado, alterações na sensibilidade da pele, infecções locais, reações alérgicas, taquicardia e embolia gordurosa. Já em relação ao transplante das células tronco, a literatura consultada não indica nenhum risco ou efeito adverso visto que o material é autólogo, ou seja, do retirado e transplantado para o próprio paciente. Vale ressaltar que a equipe que compõe esta pesquisa é qualificada o suficiente para a realização destes procedimentos.

Caso algum desses eventos acontecerem à equipe estará prontamente a postos caso seja necessário, sendo direito do participante receber assistência e acompanhamento especializado de forma integral, pelo tempo que for necessário. Ressaltando que toda e qualquer prestação de assistência acontecerá sem ônus de qualquer espécie ao participante. É de responsabilidade do pesquisador e do HUMAP/EBSERH, a realização de todo e qualquer forma de suporte ao participante.

---

Rubrica do Participante da pesquisa

Rubrica do Pesquisador

Ainda, fique sabendo que se você aceitar participar, poderá desistir do estudo a qualquer momento sem prejuízos médicos ou pessoais, informando esta decisão à mim pessoalmente ou pelo telefone que encontra-se mais abaixo. Lembrando também que terá direito a indenização caso ocorra qualquer tipo de dano relacionado a esta pesquisa.

Não participam da pesquisa pessoas menores de 18 anos. Não haverá qualquer compensação financeira para os que decidirem participar da pesquisa e os benefícios serão obtidos quando os resultados da pesquisa forem usados pelos médicos que buscam novos tratamentos para a osteoartrite por alternativas inovadoras e mais eficientes. Sendo assim de suma importância a confidencialidade dos dados e resultados obtidos nesse estudo, até que sejam analisados e publicados em revistas, jornais, eventos, teses, salientando que em nenhum momento serão divulgados nomes, ou seja, os dados da pesquisa são anônimos e apenas o pesquisador e você, terão acesso a este documento em que consta o seu nome.

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para Laynna de Carvalho Schweich, telefone (67) 8109-2423 ou (67) 3356-2580, Roberto Antonioli Silva (67) Rodrigo Juliano Oliveira (67) 8417-6510. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67)3345-7187.

Como já informado, sua participação no estudo é voluntária. Caso não queira participar da pesquisa, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

Declaro que li e entendi este formulário de consentimento e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a fazer parte deste estudo. Declaro que estou recebendo uma via assinada deste termo de consentimento.

---

**Nome do Participante da pesquisa**

---

**Assinatura do Participante da pesquisa**

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Telefone (opcional) \_\_\_\_\_

**Assinatura do pesquisador responsável**

---

**Laynna de Carvalho Schweich**

Data \_\_/\_\_/\_\_

**Índice WOMAC para Osteoartrite****INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES**

Nas seções A, B e C as perguntas serão feitas da seguinte forma e você deverá respondê-las colocando um "X" em um dos quadrados.

**NOTA:****1. Se você colocar o "X" no quadrado da extrema esquerda, ou seja:**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**Então você está indicando que você não tem dor.**

**2. Se você colocar o "X" no quadrado da extrema direita, ex.:**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**Então você está indicando que sua dor é muito intensa.**

**3. Por favor, observe:**

- Que quanto mais à direita você colocar o "X", maior a dor que você está sentindo.
- Que quanto mais à esquerda você colocar o "X", menor a dor que você está sentindo.
- Favor não coloque o "X" fora dos quadrados. Você será solicitado a indicar neste tipo de escala a intensidade de dor, rigidez ou incapacidade que você está sentindo. Por favor lembre que quanto mais à direita você colocar o "X", você está indicando que está sentindo maior dor, rigidez ou incapacidade.

**SEÇÃO A****INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES**

As perguntas a seguir se referem a intensidade da dor que você está atualmente sentindo devido a artrite de seu joelho. Para cada situação, por favor, coloque a intensidade da dor que sentiu nas últimas 72 horas (Por favor, marque suas respostas com um "X").

**Pergunta: Qual a intensidade da sua dor?****1-Caminhando em um lugar plano.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**2- Subindo ou descendo escadas.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**3- A noite deitado na cama.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**4-Sentando-se ou deitando-se.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**5- Ficando em pé.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**SEÇÃO B****INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES**

As perguntas a seguir se referem a intensidade de rigidez nas juntas (não dor), que você está atualmente sentindo devido a artrite em seu joelho nas últimas 72 horas. Rigidez é uma sensação de restrição ou dificuldade para movimentar suas juntas (Por favor, marque suas respostas com um "X").

**1. Qual é a intensidade de sua rigidez logo após acordar de manhã?**

2

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**2. Qual é a intensidade de sua rigidez após se sentar, se deitar ou repousar no decorrer do dia?**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**SEÇÃO C**

**INSTRUÇÕES PARA OS PACIENTES**

As perguntas a seguir se referem a sua atividade física. Nós chamamos atividade física, sua capacidade de se movimentar e cuidar de você mesmo(a). Para cada uma das atividades a seguir, por favor, indique o grau de dificuldade que você está tendo devido à artrite em seu joelho durante as últimas 72 horas (Por favor, marque suas respostas com um "X").

**Pergunta: Qual o grau de dificuldade que você tem ao:**

**1- Descer escadas.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**2-Subir escadas.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**3-Levantar-se estando sentada,**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**4- Ficar em pé.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**5- Abaixar-se para pegar algo.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**6- Andar no plano.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**7- Entrar e sair do carro.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**8- Ir fazer compras.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**9- Colocar meias.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**10- Levantar-se da cama.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**11- Tirar as meias.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**12- Ficar deitado na cama.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**13- Entrar e sair do banho.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

3

**14 - Se sentar.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**15- Sentar e levantar do vaso sanitário.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**16- Fazer tarefas domésticas pesadas.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**17- Fazer tarefas domésticas leves.**

Nenhuma  Pouca  Moderada  Intensa  Muito intensa

**OBRIGADA POR RESPONDER ESTE QUESTIONÁRIO**

ANEXO F

Escala Visual Analógica de Dor (EVA)



ANEXO G

**Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida -SF-36**

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo obedecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

### CÁLCULO DOS ESCORES DO QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA

Fase 1: Ponderação dos dados

Questão	Pontuação	
01	Se a resposta for	Pontuação
	1	5,0
	2	4,4
	3	3,4
	4	2,0
	5	1,0
02	Manter o mesmo valor	
03	Soma de todos os valores	
04	Soma de todos os valores	
05	Soma de todos os valores	
06	Se a resposta for	Pontuação
	1	5
	2	4
	3	3
	4	2
	5	1

07	Se a resposta for 1 2 3 4 5 6	Pontuação 6,0 5,4 4,2 3,1 2,0 1,0
08	<p>A resposta da questão 8 depende da nota da questão 7</p> <p>Se 7 = 1 e se o valor da questão é (6)  Se 7 = 2 à 6 e o valor da questão é (5)  Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 2, o valor da questão é (4)  Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (3)  Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 4, o valor da questão é (2)  Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (1)</p> <p>Se a questão 7 não for respondida, o escorre da questão 8 passa a ser o seguinte:</p> <p>Se a resposta for (1), a pontuação será (6)  Se a resposta for (2), a pontuação será (4,75)  Se a resposta for (3), a pontuação será (3,5)  Se a resposta for (4), a pontuação será (2,25)  Se a resposta for (5), a pontuação será (1,0)</p>	
09	<p>Nesta questão, a pontuação para os itens a, d, e ,h, deverá seguir a seguinte orientação:</p> <p>Se a resposta for 1, o valor será (6)  Se a resposta for 2, o valor será (5)  Se a resposta for 3, o valor será (4)  Se a resposta for 4, o valor será (3)  Se a resposta for 5, o valor será (2)  Se a resposta for 6, o valor será (1)</p> <p>Para os demais itens (b, c,f,g, i), o valor será mantido o mesmo</p>	
10	Considerar o mesmo valor.	
11	<p>Nesta questão os itens deverão ser somados, porém os itens b e d deverão seguir a seguinte pontuação:</p> <p>Se a resposta for 1, o valor será (5)  Se a resposta for 2, o valor será (4)  Se a resposta for 3, o valor será (3)  Se a resposta for 4, o valor será (2)  Se a resposta for 5, o valor será (1)</p>	

#### Fase 2: Cálculo do Raw Scale

Nesta fase você irá transformar o valor das questões anteriores em notas de 8 domínios que variam de 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 = pior e 100 = melhor para cada domínio. É chamado de raw scale porque o valor final não apresenta nenhuma unidade de medida.

Domínio:

- Capacidade funcional
- Limitação por aspectos físicos
- Dor
- Estado geral de saúde
- Vitalidade
- Aspectos sociais
- Aspectos emocionais

- Saúde mental

Para isso você deverá aplicar a seguinte fórmula para o cálculo de cada domínio:

Domínio:

$$\frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{Limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

Na fórmula, os valores de limite inferior e variação (Score Range) são fixos e estão estipulados na tabela abaixo.

Domínio	Pontuação das questões correspondidas	Limite inferior	Variação
Capacidade funcional	03	10	20
Limitação por aspectos físicos	04	4	4
Dor	07 + 08	2	10
Estado geral de saúde	01 + 11	5	20
Vitalidade	09 (somente os itens a + e + g + i)	4	20
Aspectos sociais	06 + 10	2	8
Limitação por aspectos emocionais	05	3	3
Saúde mental	09 (somente os itens b + c + d + f + h)	5	25

Exemplos de cálculos:

- Capacidade funcional: (ver tabela)

$$\text{Domínio: } \frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

$$\text{Capacidade funcional: } \frac{21 - 10}{20} \times 100 = 55$$

O valor para o domínio capacidade funcional é 55, em uma escala que varia de 0 a 100, onde o zero é o pior estado e cem é o melhor.

- Dor (ver tabela)

- Verificar a pontuação obtida nas 07 e 08; por exemplo: 5,4 e 4, portanto somando-se as duas, teremos: 9,4

- Aplicar fórmula:

$$\text{Domínio: } \frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

$$\text{Dor: } \frac{9,4 - 2}{10} \times 100 = 74$$

O valor obtido para o domínio dor é 74, numa escala que varia de 0 a 100, onde zero é o pior estado e cem é o melhor.

Assim, você deverá fazer o cálculo para os outros domínios, obtendo oito notas no final, que serão mantidas separadamente, não se podendo soma-las e fazer uma média.

Obs.: A questão número 02 não faz parte do cálculo de nenhum domínio, sendo utilizada somente para se avaliar o quanto o indivíduo está melhor ou pior comparado a um ano atrás.

Se algum item não for respondido, você poderá considerar a questão se esta tiver sido respondida em 50% dos seus itens.