

RAFAELLA ROGATTO DE FARIA

Análise biomecânica do construto de engenharia tecidual (CET) para  
restauração de cartilagem articular: um estudo pré-clínico

São Paulo

2024

RAFAELLA ROGATTO DE FARIA

Análise biomecânica do construto de engenharia tecidual (CET) para  
restauração de cartilagem articular: um estudo pré-clínico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Tiago Lazzaretti  
Fernandes

São Paulo

2024

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Faria, Rafaella Rogatto de

Análise biomecânica do construto de engenharia tecidual  
(CET) para restauração de cartilagem articular : um estudo pré-  
clínico / Rafaella Rogatto de Faria; Tiago Lazzaretti Fernandes,  
orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade  
de São Paulo, 2024.

1.Avaliação biomecânica 2.Cartilagem articular  
3. Indentação 4.Compressão não confinada 5.Carregamento  
cíclico 6.Terapia celular 7.Células-tronco mesenquimais  
I.Fernandes, Tiago Lazzaretti, orient. II.Título

USP/FM/DBD-232/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Sonia**, por sempre acreditar em mim, ser minha maior inspiração e por seu amor, sua determinação e sua energia.

Ao meu orientador, **Tiago**, por todas as oportunidades oferecidas e por sempre me motivar a fazer o melhor.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Tiago Lazzaretti Fernandes**, pela tutoria e orientação nesta tese. Mais ainda, pela promoção de diversas atividades que permitiram meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Me. **João Sant'Anna**, pela paciência e ajuda constantes neste trabalho. Um exemplo de profissional.

Ao Eng. **Prashant Sharma**, pela transmissão de conhecimento e pelo apoio excepcional nas análises do estudo.

Ao Eng. **Sergio Tadeu Bernatavicius**, pela vasta experiência e contribuição desde o início do estudo.

Ao colega de pós-graduação **Alembert Lino**, que não mediu esforços para me auxiliar durante o projeto de pesquisa.

À Eng. **Marina Junko Shiotsu Maizato**, por abrir as portas de seu laboratório e por todos os esclarecimentos.

Aos Engs. **Cyro Albuquerque**, **Sandro Vatanabe** e **Roberto Bertolussi**, do Centro Universitário FEI, pela colaboração e transmissão de conhecimento.

À Dra. **Daniela Franco Bueno** e à Dra. **Carla Cristina Gomes Pinheiro**, do Hospital Sírio-Libanês, pela parceria e pelos ensinamentos ímpares.

À banca do exame de qualificação, em especial ao Prof. **Arnaldo José Hernandez**, por todos os comentários e reflexões.

Ao **Sergio Freitas de Siqueira** e ao **Francisco Aguerre**, por todo apoio e incentivo, sempre me fazendo seguir em frente.

À secretária do Instituto de Ortopedia e Traumatologia, **Tânia Borges**, por atender a todas as solicitações de ajuda durante os anos de pesquisa.

À querida **Fátima Rodrigues**, pelo auxílio na edição e revisão do texto.

A todos os **demais profissionais** que, de alguma forma, auxiliaram na concretização do projeto.

Aos meus **professores**, por todos os ensinamentos durante a minha jornada.

Aos meus **familiares**, por todo suporte e pela torcida durante a minha trajetória.

A todos(as) **os(as) amigos(as)**, pela cumplicidade de sempre e pela motivação nos momentos difíceis.

À minha mãe, **Sonia**, pelo apoio incansável durante todo o processo.

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese de doutorado está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP - Parte IV (VANCOUVER)*. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento e Suely Campos Cardoso. 3 ed. (rev. ampl. mod.) São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100p.

- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## RESUMO

Faria RR. Análise biomecânica do construto de engenharia tecidual (CET) para restauração de cartilagem articular: um estudo pré-clínico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

**INTRODUÇÃO:** A lesão condral é uma condição associada a um grande ônus econômico e, se não tratada, pode causar alterações na biomecânica da articulação e resultar em diversas lesões consideradas altamente incapacitantes para o indivíduo, como no caso da osteoartrite. A cartilagem articular é um material viscoelástico que pode sofrer alterações estruturais e de composição, sendo importante avaliar as propriedades físicas do tecido, que variam de acordo com as suas zonas (superficial, média e profunda). As células estromais mesenquimais (CEM) têm a capacidade imunomoduladora e a sinalização parácrina, que são úteis para a engenharia tecidual no tratamento de lesões cartilaginosas. Assim como as propriedades biológicas, a avaliação mecânica do construto formado é importante. **OBJETIVO:** Portanto, este estudo tem por objetivo descrever a análise biomecânica para restauração de cartilagem por engenharia tecidual em um estudo translacional, com animal de médio porte, pelas técnicas de boas práticas de manipulação. **MÉTODOS:** Realizou-se um estudo experimental controlado em quatorze porcos em miniatura. Um defeito de cartilagem de 6 mm de diâmetro foi efetuado nos dois joelhos (membros posteriores) de cada animal. Um construto de engenharia tecidual (CET) produzido pelas CEM e livre de arcabouço foi implantado no defeito em um dos joelhos de cada porco. Os porcos foram eutanasiados após seis meses do procedimento experimental e foi realizada a análise biomecânica. Para avaliação mecânica da cartilagem restaurada, o teste de indentação consistiu em três ciclos de força-deslocamento, realizados a uma velocidade constante de 0,5 mm/min, com um deslocamento fixo de 5% da espessura média da cartilagem. Em seguida, foi realizada compressão não confinada máxima, com deslocamento fixo de 50% da altura total do bloco osteocondral, a uma mesma velocidade, com célula de carga de 100 N. **RESULTADOS:** A partir do teste de indentação, o módulo dinâmico ( $E^*$ ) obtido do segundo ciclo foi de  $1,68 \pm 1,18$  MPa no grupo sem tratamento e de  $2,81 \pm 2,05$  MPa no grupo com tratamento ( $p < 0,05$ ). O módulo de elasticidade reduzido ( $E_r$ ) aos 10% da região superior da segunda curva



de descarga, no grupo sem tratamento, foi de  $2,56 \pm 1,43$  MPa, enquanto no grupo tratado com o CET foi de  $5,40 \pm 3,42$  MPa ( $p < 0,05$ ). No teste de compressão não confinada máxima o módulo de elasticidade (E) foi similar entre os grupos com tratamento e sem tratamento. **CONCLUSÃO:** O tratamento com CET a partir das CEM evidenciou maior capacidade de absorção de choque e resistência à deformação elástica em comparação ao grupo sem tratamento.

Palavras-chave: Avaliação biomecânica. Cartilagem articular. Indentação. Compressão não confinada. Carregamento cíclico. Terapia celular. Células-tronco mesenquimais.

## ABSTRACT

Faria RR. Biomechanical analysis of tissue engineering construct (TEC) for articular cartilage restoration: a pre-clinical study [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

**INTRODUCTION:** Chondral injury is a condition associated with a great economic burden, and if left untreated it can cause changes in the biomechanics of the joint and result in several injuries considered highly disabling for the individual, as in the case of osteoarthritis. Articular cartilage is a viscoelastic material that can undergo structural and compositional changes, and it is important to evaluate the physical properties of the tissue, which vary according to the zones (superficial, middle, and deep). Mesenchymal stromal cells (MSC) have the immunomodulatory capacity and paracrine signaling that are useful for tissue engineering in the treatment of cartilaginous lesions. As well as biological properties, the mechanical evaluation of the formed construct is important. **OBJECTIVE:** Therefore, this study aims to describe the biomechanical analysis for cartilage restoration by tissue engineering in a translational study, with a midsize animal, using the good manufacturing practice (GMP) techniques. **METHODS:** A controlled experimental study was carried out on fourteen miniature pigs. A 6mm diameter cartilage defect was performed in both knees (hind limbs) of each animal. A scaffold-free tissue engineering construct (TEC) produced by MSC was applied to the defect in one of the knees of each pig. The pigs were euthanized six months after the experimental procedure and biomechanical analysis was performed. For mechanical evaluation of the restored cartilage, the indentation test consisted of three force-displacement cycles performed at a constant loading rate of 0.5 mm/min with a fixed displacement of 5% of the mean cartilage thickness. Then, maximum unconfined compression test was performed with a fixed displacement of 50% of the total osteochondral block height, at the same speed, with a load cell of 100N. **RESULTS:** From the indentation test, the dynamic modulus ( $E^*$ ) obtained from the second cycle was  $1.68 \pm 1.18$  MPa in the untreated group and  $2.81 \pm 2.05$  MPa in the treated group ( $p < 0.05$ ). The reduced Young modulus at 10% of the upper region of the second unloading curve, in the untreated group, was  $2.56 \pm 1.43$  MPa, while in the group treated with TEC it was  $5.40 \pm 3.42$  MPa ( $p < 0.05$ ). In the maximum

unconfined compression test, the Young modulus was similar between the treated and untreated groups. **CONCLUSION:** Treatment with TEC from MSC showed greater shock absorption capacity and resistance to elastic deformation compared to the untreated group.

Keywords: Biomechanical testing. Articular cartilage. Indentation. Unconfined compression. Cyclic loading. Cell therapy. Mesenchymal stem cells.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Corte transversal da cartilagem articular saudável. (A) organização celular nas zonas da cartilagem articular; (B) arquitetura das fibras de colágeno.....	25
Figura 2 - Tríade biológica para projetar uma estrutura adequada para aplicações de engenharia tecidual .....	29
Figura 3 - Células-tronco mesenquimais. Aumento: 10x (Microscópio Olympus CK40) .....	32
Figura 4 - Representação gráfica da curva de tensão ( $\sigma$ ) x deformação ( $\epsilon$ ), destacando as zonas elástica e plástica.....	35
Figura 5 - Representação gráfica da curva de força-deslocamento em (A) materiais elásticos, e (B) materiais viscoelásticos .....	39
Figura 6 - Configurações comuns de teste mecânico compressivo: (A) compressão confinada; (B) compressão não confinada; (C) indentação.....	41
Figura 7 - Cálculo de área utilizando um indentador de ponta esférica.....	46
Figura 8 - Artrosopia de joelho para coleta de tecido sinovial .....	48
Figura 9 - Coleta da polpa do dente .....	49
Figura 10 - Diferenciação das células estromais mesenquimais em (A) osteogênica com Alizarin Red S (21 dias); (B) condrogênica com Alcian Blue 8G (21 dias); (C) adipogênica com oil red O (18 dias), e respectivos controles abaixo. As imagens foram obtidas por microscopia óptica (EVOSÔ XL Cell Imaging System).....	51
Figura 11 - Três amostras de construto de engenharia tecidual confluyente após 15 dias de cultura formando uma estrutura tridimensional .....	52
Figura 12 - Defeito da cartilagem (6 mm) na área de carga do côndilo femoral medial do membro posterior do porco em miniatura, após remoção da camada calcificada da cartilagem .....	53

- Figura 13 - (A) Equipamento de teste universal modelo Instron 3365 conectado ao acessório BioPuls™ contendo mecanismo pneumático, garras, recipiente com soro fisiológico, indentador e suporte; (B) monitor com software Bluehill 3 conectado ao equipamento Instron 3365™; (C) exemplo de dois blocos osteocondrais utilizados para avaliação biomecânica .....54
- Figura 14 - (A) Configuração do teste de indentação com amostra posicionada em um suporte; (B) indentador de ponta esférica medindo 2 mm de diâmetro ....55
- Figura 15 - Gráfico de uma amostra representativa obtida com o teste de indentação. (A) força (N) x deslocamento (mm); (B) força (N) x deslocamento (mm), com interceptação “y” de zero .....56
- Figura 16 - Gráfico de uma amostra representativa obtida com o teste de indentação, força (N) x deslocamento (%) com aplicação do modelo de Hertz .....56
- Figura 17 - Gráfico de força (N) x deslocamento (%), evidenciando as curvas de carga e descarga de uma amostra representativa. Em linhas verticais verdes, a região onde foi calculada a energia dissipada.....57
- Figura 18 - Gráfico de força (N) x deslocamento (%) de uma amostra representativa, evidenciando-se as regiões de análises. Em vermelho (menor elipse), o módulo de elasticidade da curva de carga a 5% de deslocamento. Em verde (maior elipse), o módulo de elasticidade reduzido ( $E_r$ ) dos 10% da região superior da curva de descarga. ....58
- Figura 19 - Configuração do teste de compressão não confinada máxima, com bloco osteocondral e compressor cilíndrico circular de 6,95 mm de diâmetro ...59
- Figura 20 - Gráfico de uma amostra representativa obtida com o teste de indentação e após aplicação do modelo de Hertz: (A) deslocamento (%) x tempo (s); (B) força (N) x tempo (s); (C) força (N) x deslocamento (%) .....63
- Figura 21 - Gráfico *boxplot* dos valores de módulo de armazenamento ( $E'$ , MPa) para o segundo ciclo, dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), obtidos com o teste de indentação .....65
- Figura 22 - Gráfico *boxplot* dos valores de módulo de perda ( $E''$ , MPa) para o segundo ciclo, dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), obtidos com o teste de indentação .....66

- Figura 23 - Gráfico *boxplot* dos valores de módulo de elasticidade reduzido ( $E_r$ , MPa) aos 10% da região superior da curva de descarga, para o segundo ciclo, dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET) obtidos com o teste de indentação .....71
- Figura 24 - Gráficos de tensão (MPa) x deformação (mm/mm) a partir do teste de compressão não confinada máxima do bloco osteocondral, representando (A) amostra com deformação apenas na região de cartilagem e (B) deformidade da espessura da cartilagem e do osso .....72
- Figura 25 - Gráfico *boxplot* dos valores de módulo de elasticidade ( $E$ , MPa) dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), considerando as zonas 0-5% e 30-40%, obtidos com o teste de compressão não confinada máxima .....74

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios de espessura da cartilagem dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), antes da avaliação biomecânica (média  $\pm$  desvio-padrão).....61
- Tabela 2 - Valores médios de peso e altura do bloco osteocondral das amostras sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), antes da avaliação biomecânica (média  $\pm$  desvio-padrão).....61
- Tabela 3 - Resumo dos resultados obtidos para frequência (mHz), força máxima (N), energia dissipada (N.mm), ângulo de fase ( $^{\circ}$ ), módulos dinâmico ( $E^*$ , MPa), de armazenamento ( $E'$ , MPa) e de perda ( $E''$ , MPa), para o segundo ciclo, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET) (média  $\pm$  desvio-padrão).....67
- Tabela 4 - Resumo dos resultados obtidos para frequência (mHz), força máxima (N), energia dissipada (N.mm), ângulo de fase ( $^{\circ}$ ), módulos dinâmico ( $E^*$ , MPa), de armazenamento ( $E'$ , MPa) e de perda ( $E''$ , MPa), para o terceiro ciclo, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET) (média  $\pm$  desvio-padrão).....68
- Tabela 5 - Valores médios do módulo de elasticidade ( $E$ , MPa) a 5% de deslocamento e pela reta total, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de indentação no segundo ciclo (média  $\pm$  desvio-padrão).....69
- Tabela 6 - Valores médios do módulo de elasticidade ( $E$ , MPa) a 5% de deslocamento e pela reta total, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de indentação no terceiro ciclo (média  $\pm$  desvio-padrão).....69
- Tabela 7 - Valores médios do módulo de elasticidade reduzido ( $E_r$ , MPa) derivados dos 10% da região superior da curva de descarga, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de indentação no segundo e terceiro ciclos (média  $\pm$  desvio-padrão).....70

Tabela 8 - Valores médios do módulo de elasticidade (E, MPa) a 0-5% e 30-40% de deformação relativa à espessura da cartilagem, nas amostras sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de compressão não confinada máxima (média  $\pm$  desvio-padrão)....73

Tabela 9 - Valores médios de tensão máxima (MPa) atingidos na região da cartilagem, independentemente da profundidade de deformação, nas amostras sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de compressão não confinada máxima (média  $\pm$  desvio-padrão)....74



## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

$\alpha$	Ângulo alfa
$\delta$	Ângulo de fase
$\nu$	Coefficiente de Poisson
k	Constante elástica
$\epsilon$	Deformação
$\frac{dv}{dy}$	Gradiente de velocidade
°C	Grau Celsius
0	Inicial
$\Delta$	Intervalo
™	Marca registrada
$\sigma$	Tensão
u	Viscosidade dinâmica
A	Área
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asc-2P	L-ácido ascórbico 2-fosfato
ASTM	American Society for Testing and Materials
BR1	Porco em miniatura brasileiro
CEM	Células estromais mesenquimais
CET	Construto de engenharia tecidual
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
c	Contato
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTM	Células-tronco mesenquimais
D	Deslocamento

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Módulo de elasticidade
E'	Módulo de armazenamento
E''	Módulo de perda
E*	Módulo dinâmico
Er	Módulo de elasticidade reduzido
F	Força
FDA	Food and Drug Administration
FEI	Fundação Educacional Inaciana
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Grama
GMP	Good Manufacturing Practice
h	Altura
hc	Altura de contato
HC	Hospital das Clínicas
Hz	Hertz
ICRS	International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society / Sociedade Internacional de Regeneração de Cartilagem e Preservação de Articulação
InCor	Instituto do Coração
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
ISAKOS	International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine / Sociedade Internacional de Artroscopia, Cirurgia do Joelho e Medicina do Esporte Ortopédica
ISCT	International Society for Cellular Therapy / Sociedade Internacional de Terapia Celular
J	Joule
L	Comprimento

máx	Máximo
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
mHz	Mili Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	Mega Pascal
MSC	Mesenchymal stromal cells
n	Número de amostras
N	Newton
nº	Número
NaCl	Cloreto de sódio
OATS	Transferência de Autoenxerto Osteocondral
p	Nível descritivo ou probabilidade de significância
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Raio
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
s	Segundos
S	Rigidez ou inclinação
t	Tempo
T	Tensão de cisalhamento
TEC	Tissue engineering construct
tg	Tangente
UI	Unidade Internacional
U\$	Dólar americano

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1. Sistema musculoesquelético .....	24
3.1.1. Cartilagem articular .....	24
3.1.2. Lesões da cartilagem .....	27
3.2. Engenharia tecidual .....	28
3.3. Avaliação mecânica.....	34
3.3.1. Propriedades mecânicas.....	34
3.3.1.1. Elasticidade.....	36
3.3.1.2. Viscosidade.....	37
3.3.1.3. Viscoelasticidade .....	37
3.3.1.3.1. Viscoelasticidade da cartilagem.....	39
3.3.2. Testes mecânicos .....	40
3.3.2.1. Normas técnicas e padronização.....	43
3.3.3. Modelos de análise .....	44
4. METODOLOGIA.....	47
4.1. Cultura de células: coleta, isolamento, expansão e diferenciação de células estromais mesenquimais (CEM) .....	47
4.2. Desenvolvimento do construto de engenharia tecidual (CET) .....	51
4.3. Modelo animal .....	52
4.4. Avaliação biomecânica .....	53
4.4.1. Teste de indentação.....	55
4.4.2. Teste de compressão não confinada máxima.....	59
4.5. Análise estatística.....	60
5. RESULTADOS .....	61

5.1. Dados amostrais.....	61
5.2. Avaliação biomecânica .....	62
5.2.1. Teste de indentação.....	62
5.2.2. Teste de compressão não confinada máxima.....	71
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS .....	111

## 1. INTRODUÇÃO

As lesões de cartilagem e a osteoartrite são muito prevalentes e consideradas um problema de saúde pública, por serem altamente incapacitantes, representarem ônus econômico para os sistemas de saúde e devido à expectativa de crescimento da população idosa (1,2). Estima-se que 15% da população mundial acima dos 60 anos é afetada pela osteoartrite. Acima dos 65 anos, a porcentagem aumenta para 80%, em países de alta renda (3). Somente nos Estados Unidos da América, as despesas médicas anuais atingem cerca de U\$ 136.8 bilhões (4).

Os defeitos da cartilagem podem gerar diversas complicações ao indivíduo, como alterações na biomecânica e na homeostase da articulação, sobrecarga no osso subcondral adjacente, perda de mobilidade, degeneração articular e osteoartrite do joelho, afetando diretamente a qualidade de vida (5,6). Por esses motivos, o estudo de novas terapêuticas para as lesões da cartilagem merece destaque e é de elevada relevância clínica.

Atualmente, o padrão-ouro para o tratamento de lesões de cartilagem por terapia celular inclui o implante autólogo de condrócitos. No entanto, esse procedimento requer cirurgia prévia para coleta da cartilagem do paciente e o número de células disponíveis diminui com o aumento da idade, tanto em relação à quantidade quanto à qualidade (7,8).

Como alternativa ao implante autólogo de condrócitos, a engenharia tecidual com células estromais mesenquimais (CEM) tem recebido maior atenção nas pesquisas recentes por diversos motivos, incluindo facilidade de coleta, capacidade de proliferação e diferenciação celular, baixa imunogenicidade pelo paciente e efeito parácrino no maquinário celular local (8,9).

As CEM podem ser isoladas de diferentes tecidos, como medula óssea, membrana sinovial, tecido adiposo e polpa dentária, entre outros (8,10). Essas possuem a habilidade, sob condições de cultura de linhagem-específica, de sintetizar moléculas que habitualmente são consideradas marcadores específicos de tecido musculoesquelético, como colágeno e proteoglicanos (11–14).

Além da escolha da área doadora das células, a entrega local de células tem sido amplamente discutida na engenharia tecidual. Sabe-se que o ambiente tridimensional apropriado é importante para otimizar a proliferação e a diferenciação celular (8). Ando et al. (2008) (8) e Shimomura et al. (2010) (15) mostram a viabilidade da construção de novos tecidos sem a necessidade de um arcabouço externo, tecnologia conhecida como construto de engenharia tecidual (CET), tridimensional, livre de arcabouço e com evidências para o reparo condral. Esse grupo de pesquisa da Universidade de Osaka, Japão, atua na translação do CET de modelo animal para o clínico, tendo iniciado um estudo piloto, em humanos, para a comprovação da segurança e da eficácia da tecnologia (16). Após 5 anos da implantação do CET, o grupo de pesquisadores destaca melhora significativa nos parâmetros clínicos, desde a avaliação pré-operatória, ressaltando sua eficácia e viabilidade (17).

A cartilagem é um tipo de tecido conjuntivo avascular e heterogêneo, composto por condrócitos e matriz extracelular (MEC). Essa matriz, dentre outros componentes, como colágeno e proteoglicanos, contém alta porcentagem de água, o que auxilia no sistema de absorção de choques mecânicos e confere uma das principais propriedades da cartilagem, que é o seu caráter viscoelástico (18,19). Todas essas características ressaltam a importância de se avaliar as propriedades físicas do novo tecido formado a partir da restauração tecidual, visto que são estas que fornecem as funções biomecânicas, como rigidez, suporte de carga, absorção de choque e resistência ao desgaste, tornando a avaliação mecânica essencial, bem como o foco deste estudo (20).

O grupo de pesquisa do presente estudo desenvolve atividades relacionadas à engenharia tecidual para realizar a translação do conhecimento da ciência básica para a aplicação nos tratamentos e na reabilitação dos pacientes com lesões condrais e osteoartrite (19,21–23). A hipótese do presente estudo é a de que o tratamento com o CET formado por CEM promoverá melhor reparo da cartilagem, pela observação da avaliação biomecânica a partir dos testes de indentação e compressão não confinada máxima.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo principal do estudo é comparar a restauração nos defeitos da cartilagem hialina articular a partir da avaliação biomecânica entre os grupos com tratamento (construto de engenharia tecidual) e sem tratamento após 6 meses, em um estudo translacional com animais de médio porte (suínos).



### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Sistema musculoesquelético**

A ação de caminhar é considerada simples para muitos indivíduos. No entanto, é uma capacidade complexa, que se desenvolve ao longo de vários anos e se relaciona com a interação e a coordenação de sistemas do corpo humano, como musculoesquelético, cardiovascular, pulmonar, neurológico e sensorial (24).

Diante desse contexto e enfatizando que são imprescindíveis os conhecimentos interdisciplinares para este estudo, destaca-se o sistema musculoesquelético e suas características fundamentais.

O sistema esquelético fornece sustentação e estabilidade para a marcha humana (25), enquanto o sistema muscular gera e absorve energia, auxiliando na movimentação (26). Em conjunto, esses sistemas possuem a capacidade de produzir postura e mobilidade articular adequadas para a realização das mais variadas tarefas do cotidiano.

Um dos principais componentes do sistema musculoesquelético (ou sistema locomotor) são as articulações, definidas como a parte do corpo em que dois ou mais ossos se unem para permitir a movimentação (27).

Referente à articulação do joelho, esta é uma estrutura complexa e fundamental para a sustentação do corpo e sua movimentação, garantindo estabilidade através da interação de seus componentes, entre eles as duas articulações – tibiofemoral e patelofemoral – revestidas por cartilagem hialina (28,29).

##### *3.1.1. Cartilagem articular*

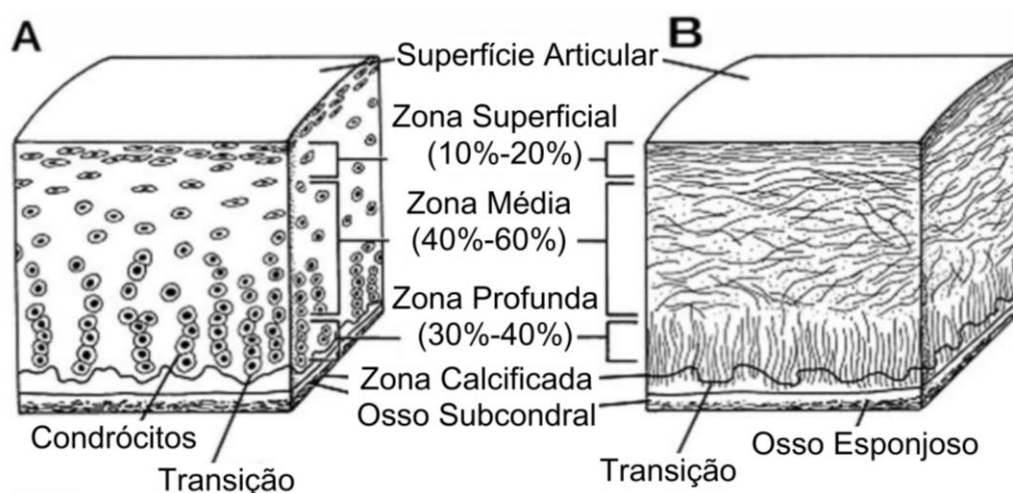
A cartilagem articular presente no joelho é uma cartilagem hialina e se forma a partir de células mesenquimais indiferenciadas, que originam os condroblastos,

células jovens com alto poder de síntese. Essas células se transformam em condrócitos, células maduras responsáveis pela manutenção da matriz extracelular e pelo controle metabólico (30).

A composição principal da cartilagem articular é uma densa matriz extracelular e condrócitos. A matriz extracelular apresenta alta porcentagem de água (66 a 80%), além de conter colágeno tipo II, proteoglicanos e outros elementos em menor quantidade (18,31).

Essa cartilagem pode ser dividida em quatro zonas: superficial, média, profunda e calcificada. Cada zona apresenta orientação celular, arranjo de fibras de colágeno e composição de matriz extracelular únicas, proporcionando diferentes funções biomecânicas em cada região (32) (Figura 1).

Figura 1 - Corte transversal da cartilagem articular saudável. (A) organização celular nas zonas da cartilagem articular; (B) arquitetura das fibras de colágeno



Fonte: adaptado de Fox et al. (2009) (30).

A zona superficial está em contato com o líquido sinovial e é responsável pela maior parte das propriedades de tração da cartilagem, protegendo as outras camadas das forças de cisalhamento, tração e compressão, transmitidas durante o movimento da articulação. Representa cerca de 10 a 20% da espessura da cartilagem, e é composta por finas fibras de colágeno alinhadas paralelamente à superfície, atuando

na distribuição de forças. Os condrócitos desta região são menores e de alta densidade. Há maior concentração de água e menor de proteoglicanos (30,33–38).

A zona média compõe cerca de 40 a 60% do volume total da cartilagem e é considerada uma zona de transição, sendo a primeira linha funcional de resistência às forças compressivas. É composta por fibras de colágeno mais grossas e não paralelas à superfície. Os condrócitos são esféricos e de menor densidade (30,33,36,38).

A zona profunda, ou região basal, ocupa 30% do volume da cartilagem e representa a maior resistência às forças compressivas. Contém a maior quantidade de proteoglicanos, e a menor concentração de água. As fibras de colágeno nesta região se alocam de forma perpendicular à superfície e apresentam o maior diâmetro (30,33–38).

A zona calcificada, também na região basal, é onde ocorre a fixação da cartilagem ao osso subcondral. Há poucas células e os condrócitos são hipertróficos (30,38).

A estrutura e a composição da cartilagem articular se caracterizam como sendo um tecido avascular, desprovido de vasos sanguíneos, linfáticos e nervosos; logo, não apresenta capacidade de regeneração, limitando o seu reparo. Além disso, apresenta metabolismo anaeróbico, então quando há lesão, forma-se tecido fibrociatrical, o que difere da origem do tecido cartilaginoso (39).

A cartilagem articular é um material viscoelástico (dependente do tempo e da taxa de deformação), não linear (dependente da magnitude de deformação), anisotrópico (dependente da orientação) e multifásico (composto por matriz sólida, líquida e íons), o que lhe confere propriedades biomecânicas extremamente importantes e complexas, que mudam de acordo com a tensão-deformação no tecido (40–43). Ao sofrer um estresse de compressão, por exemplo, o fluido se movimenta para fora do tecido. Quando este é removido, o fluido retorna, alterando as propriedades da cartilagem para cada momento. Em equilíbrio, não há fluxo de líquido e somente a matriz sólida suporta carga (20,44).

Essas interações com o tecido ressaltam as propriedades biomecânicas da cartilagem, cujas principais funções são rigidez, suporte de carga, absorção de choque, dissipação de energia e resistência ao desgaste (20).

### 3.1.2. Lesões da cartilagem

Estima-se que 63% da população submetida à artroscopia, e 36% dos atletas apresentem lesões da cartilagem (45,46), cuja causa é multifatorial, sendo provocadas por estímulos metabólicos, genéticos, vasculares ou traumáticos (47).

Os danos ao tecido geram alterações estruturais e composicionais, como aumento da quantidade de fluido intersticial devido ao aumento da permeabilidade, redução de proteoglicanos e das cadeias de agrecano e interrupção das cadeias de colágeno. Como consequência, há diminuição da rigidez e da resistência do tecido e perda da viabilidade celular (48–51).

Essas alterações impactam diretamente na biomecânica do joelho, podendo gerar aumento de carga e das demandas funcionais, provocando dores, inchaços e imobilidade. Devido a esses problemas físicos, os indivíduos são forçados a mudar de estilo de vida, havendo afastamento na prática de atividades físicas, perda de dias de trabalho e de outras atividades sociais. Como consequência desse processo, o impacto na saúde mental e no sono dos pacientes é grande, resultando em outras doenças como insônia, depressão e ansiedade (52).

A progressão das lesões condrais pode resultar no desenvolvimento da osteoartrite, uma doença articular degenerativa, reconhecida como doença grave em 2018 pela Academia Americana de Ortopedia e considerada, mundialmente, uma das principais causas de incapacidade (2).

Nos Estados Unidos da América, é previsto que 25% da população adulta, ou 67 milhões de pessoas, serão afetadas pela osteoartrite até o ano 2030 (53). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia, estima-se que há 12 milhões de pessoas com osteoartrite, o que representa cerca de 6,3% da população adulta. Esse número aumenta para a população idosa, com 85% da população acima de 75 anos apresentando osteoartrite (54). Além disso, aproximadamente 83% dos casos de osteoartrite são no joelho (55).

Atualmente, há diversas formas de tratamento dos defeitos da cartilagem – não operatórias e cirúrgicas (56). As terapias não operatórias envolvem tratamentos farmacológicos e não farmacológicos, com foco no controle da dor e no alívio dos

sintomas, mas não são capazes de promover a regeneração tecidual e nem prevenir a progressão do processo de degeneração (57).

Quando não existe melhora com o tratamento conservador, pode ser necessário realizar procedimentos cirúrgicos. A técnica cirúrgica mais utilizada para tratar defeitos sintomáticos da cartilagem é a microfratura, mas esta estratégia apresenta algumas limitações (58). Mustapich et al. (2021) e Richter et al. (2016) mostram que esse procedimento resulta em formação de fibrocartilagem, além de não recrutar quantidade suficiente de células reparadoras e fatores de crescimento para promoção do reparo do tecido cartilaginoso nativo. Isso impacta diretamente nas propriedades biomecânicas da cartilagem e em sua durabilidade (59,60).

Referente aos tratamentos existentes por terapia celular, o padrão-ouro para o tratamento das lesões condrais inclui o implante autólogo de condrócitos, mas essa estratégia requer cirurgia prévia para coleta da cartilagem do paciente e o número de células disponível diminui com a idade avançada, tanto em relação à quantidade quanto à qualidade (60).

Por esses motivos, o estudo de novas terapêuticas para as lesões da cartilagem merece destaque e é de elevada relevância clínica. Como alternativa ao implante autólogo de condrócitos, a engenharia tecidual com CEM tem recebido maior atenção nas pesquisas recentes por vários motivos, incluindo facilidade na coleta do tecido, expansão e diferenciação celular (61).

### **3.2. Engenharia tecidual**

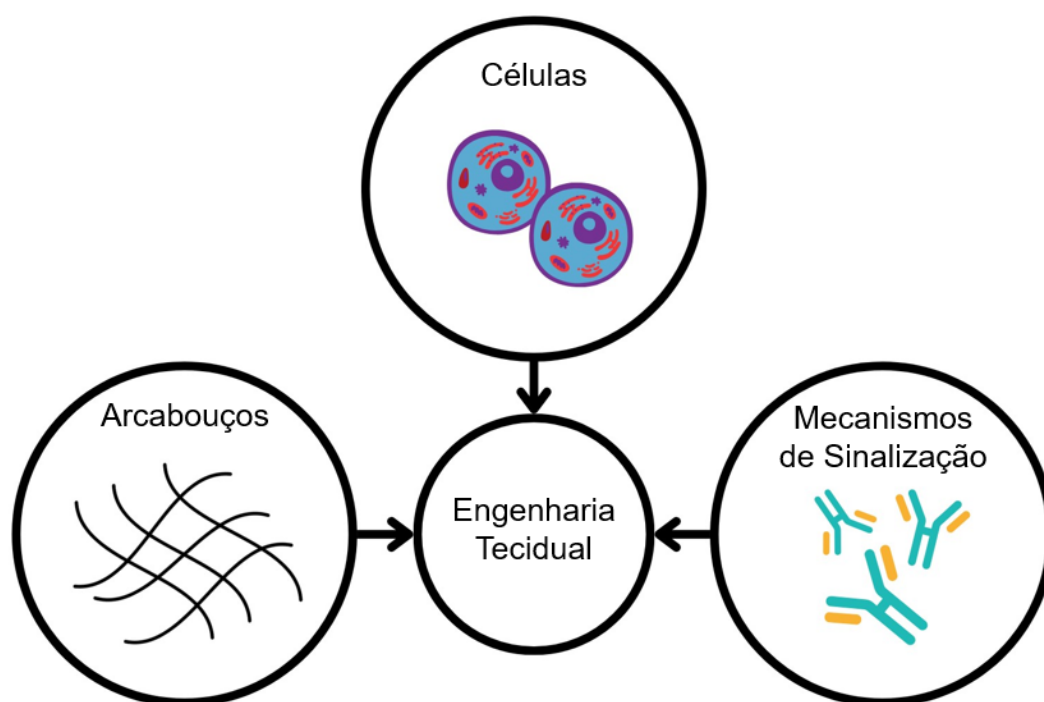
De acordo com Langer e Vacanti (1993), a engenharia tecidual pode ser definida como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios de biologia e engenharia para o desenvolvimento de substitutos funcionais para tecidos danificados” ((62), p. 920, tradução nossa).

---

\* Texto original: “*a new field, tissue engineering, applies the principles of biology and engineering to the development of functional substitutes for damaged tissue*” (62).

Esta área do conhecimento visa a mimetizar o ambiente original do tecido ou órgão danificado, buscando reparar, manter ou melhorar sua função. Desta forma, sua aplicação baseia-se na tríade biológica composta por arcabouços, mecanismos de sinalização e células (63) (Figura 2).

Figura 2 - Tríade biológica para projetar uma estrutura adequada para aplicações de engenharia tecidual



Fonte: adaptado de Gleeson e O'Brien (2011) (63).

Os arcabouços fornecem sustentação para o novo tecido, a partir de sua arquitetura tridimensional, que influencia nos processos de migração, proliferação e diferenciação celular (64). Os arcabouços devem apresentar propriedades físicas e composicionais específicas para cumprir com sua função. Destacam-se a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, as propriedades mecânicas, a porosidade e a permeabilidade (63).

No entanto, o uso de materiais sintéticos para a construção dos arcabouços pode gerar problemas relacionados a contaminações e reações imunológicas, além de seus efeitos a longo prazo serem desconhecidos. O tecido cartilaginoso apresenta

uma organização matricial complexa, o que também dificulta a adesão celular ao arcabouço (65).

Dessa forma, Ando et al. (2007) mostram a viabilidade da construção de novos tecidos sem a necessidade de um arcabouço externo, tecnologia conhecida como construto de engenharia tecidual (CET), tridimensional e livre de arcabouço (65).

O CET é composto por células e matriz extracelular sintetizada por elas mesmas, que formam uma estrutura tridimensional. A partir de avaliações histológica, macroscópica e mecânica, descritas nos estudos de Shimomura et al. (2010) e Katakai et al. (2009), o CET mostra-se viável e eficaz no tratamento de lesões condrais de porcos em miniatura, apresentando propriedades mecânicas similares à cartilagem normal (15,66). Ando et al. (2007) (65) e Ando et al. (2008) (8), em ambos os estudos, demonstram seu potencial condrogênico com a aplicação de testes *in vitro*, a partir de células estromais mesenquimais (CEM) provenientes de humanos.

Os mecanismos de sinalização, como fatores de crescimento, auxiliam na formação do tecido através da comunicação celular, podendo também contribuir em sua diferenciação e proliferação e, até mesmo, na atração de células que impactam nos processos anti-inflamatórios (64,67). Grande parte dos fatores de crescimento utilizados no desenvolvimento de tecido cartilaginoso são proteínas (68).

As células são as responsáveis pela criação do tecido. Um grande avanço surgiu na área com o uso das células-tronco, que podem ser classificadas de acordo com a sua potencialidade (totipotentes, pluripotentes ou multipotentes) ou origem (adultas ou embrionárias). As células-tronco são caracterizadas por apresentarem alto poder de proliferação, autorrenovação por longos períodos e capacidade de diferenciação em células especializadas (67).

As células-tronco totipotentes são capazes de se diferenciar em todos os tecidos do corpo; no entanto, esse processo pode ocorrer de forma desorganizada, resultando em teratomas (67,69).

As células-tronco pluripotentes são capazes de se diferenciar em todos os tecidos do corpo, com exceção da placenta e dos anexos embrionários (67). Conforme publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e Genética, é o caso das células-tronco embrionárias e das células-tronco pluripotentes induzidas (70). As células-tronco embrionárias são derivadas de embriões em estágio de blastocisto, o

que gera problemas éticos em relação ao seu uso em pesquisas e tratamentos (2,58,71). As células pluripotentes induzidas são de natureza indiferenciada e podem levar ao desenvolvimento de teratomas (58,71,72).

As células multipotentes se diferenciam em vários tecidos do corpo, a partir de uma linhagem específica, podendo ser obtidas de diferentes tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária, cordão umbilical, sinóvia, entre outros. Enquadram-se nesta categoria as células-tronco hematopoiéticas, que originam quaisquer células do sangue, como hemácias, plaquetas e leucócitos (73), e as células-tronco mesenquimais (CTM), que originam os tecidos sólidos do corpo (2,67,74,75).

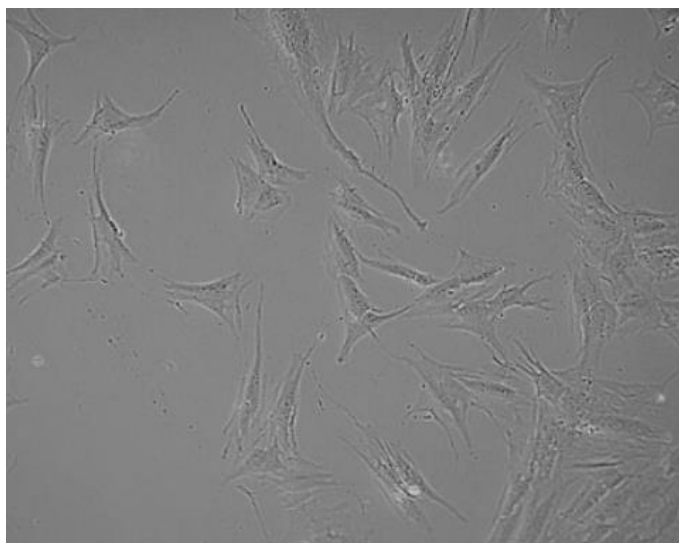
As células-tronco multipotentes são fáceis de serem isoladas, exibem potencial de imunomodulação, além de apresentarem a função de reparo de lesão e integridade nos tecidos em que estão alojadas (74,76).

Dominici et al. (2006) (77) designaram o termo “células estromais mesenquimais multipotentes” como o correto para se referir às células que seguem alguns critérios: serem aderentes ao plástico; expressarem marcadores de superfície em condições específicas; e se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*.

Em 2017, Arnold Caplan, um dos pesquisadores pioneiros no campo de medicina regenerativa e o primeiro a descrever sobre as células-tronco mesenquimais, expôs que o termo “células-tronco” é utilizado erroneamente nos estudos. As células-tronco mesenquimais representavam uma classe de células que poderiam ser isoladas e expandidas em cultura, mantendo sua capacidade *in vitro* de serem induzidas a formarem fenótipos e tecidos mesodérmicos. Caplan propôs a utilização do termo “células sinalizadoras medicinais” ao se referir às mesmas, visto que a função principal dessas células é a de envio de sinais e estímulos para modificação do ambiente em que se encontram, e não a de diferenciação celular em tecidos regenerativos ou de substituição (75) (Figura 3).



Figura 3 - Células-tronco mesenquimais. Aumento: 10x (Microscópio Olympus CK40)



Fonte: adaptado de Fernandes et al. (2018) (9).

Sendo assim, as células utilizadas nesta pesquisa serão designadas como CEM seguindo os critérios propostos no estudo de Dominici et al. (2006) (77) e em recomendação às orientações de Arnold Caplan (75). Essa mesma nomenclatura é utilizada pelas sociedades de especialidades, como a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (78), a Sociedade Internacional de Artroscopia, Cirurgia do Joelho e Medicina do Esporte Ortopédica (ISAKOS) e a Sociedade Internacional de Regeneração de Cartilagem e Preservação da Articulação (ICRS).

As CEM são células derivadas de tecido expandido em cultura e ganham espaço nas pesquisas atuais por diversos motivos. Destacam-se pela facilidade de coleta, capacidade de proliferação e diferenciação celular, não rejeição pelo paciente e efeito parácrino no maquinário celular local que possibilita ações imunomoduladoras (9,76).

Fernandes et al. (2018) (9) demonstraram a habilidade dessas células em modular a resposta imunológica e inflamatória através da comunicação parácrina. Essas células apresentam baixa expressão de receptores, que reconhecem células imunes que atuam na rejeição, mas estimulam células que atuam na regulação da inflamação (15). Sendo assim, são capazes de regular a imunidade local ao induzir o fenótipo anti-inflamatório dos macrófagos (22). Além disso, têm a capacidade de manter suas propriedades para terapia celular após criopreservação (12,79).

Dentre as áreas doadoras das CEM, destacam-se as células provindas da polpa dentária, que são facilmente coletadas, apresentam multipotencialidade, capacidade de autorrenovação e regeneração dos tecidos, baixa imunogenicidade e imunossupressão, e demonstram maior capacidade proliferativa e imunomoduladora do que as CEM da medula óssea (19,76,80). Estas têm a capacidade de se diferenciar em condroblastos e osteoblastos, sugerindo que esse tipo de CEM seja útil para a engenharia tecidual no tratamento de lesões ósseas e cartilaginosas (19).

Destacam-se os trabalhos de Pinheiro et al. (2019) (12) e Bueno et al. (2019) (21), em que foi demonstrado alto potencial osteogênico das CEM da polpa do dente, sendo benéficas no tratamento de pacientes com fissura labiopalatina. O estudo de Fernandes et al. (2020) (19) comprova o potencial terapêutico dessas células para o reparo da cartilagem articular. Esses estudos ressaltam a vantagem translacional da incorporação de CEM em protocolos de engenharia tecidual (12,19,21).

As células do tecido adiposo e da membrana sinovial podem ser facilmente acessadas por meio de artroscopia de rotina e podem ser coletadas com complicações mínimas na área doadora. Células isoladas da sinóvia apresentam alto potencial condrogênico em comparação às CEM isoladas de outros tecidos (8,11). Destaca-se o trabalho de Ando et al. (2008) (8), em que CEM provindas da sinóvia, utilizadas no desenvolvimento do CET livre de arcabouço, apresentaram elevada expressão de genes marcadores condrogênicos, sendo considerada uma fonte tecidual promissora para aplicação clínica (8).

Sendo assim, as CEM isoladas possuem a habilidade, sob condições de cultura linhagem-específica, de sintetizar moléculas que habitualmente são consideradas marcadores específicos de tecido musculoesquelético, formando tecido cartilaginoso e sendo útil para a engenharia tecidual no tratamento de lesões condrais (8).

Atualmente, um dos maiores desafios da engenharia tecidual para cartilagem é desenvolver um tecido que mimetize toda a sua arquitetura composicional e estrutural, incluindo as propriedades mecânicas similares às do tecido natural (81).

### 3.3. Avaliação mecânica

Sabe-se que cada tecido do corpo tem uma função e uma composição únicas. Assim, para se fazer medicina translacional e implementar uma tecnologia na prática clínica, é extremamente importante realizar estudos interdisciplinares que abrangem diferentes tipos de avaliações, como por imagem, histológica, imuno-histoquímica, mecânica e outras (82).

As avaliações biomecânicas visam a analisar as propriedades de compressão, tração, flexão ou cisalhamento de um tecido ou material, sendo utilizadas na medicina para inúmeros propósitos. As informações fornecidas por esses testes sustentam que a tecnologia é adequada às demandas físicas e biológicas, garantem integridade estrutural para que não haja comprometimento da segurança do indivíduo, além de simular o comportamento em condições clínicas relevantes (83,84).

#### 3.3.1. Propriedades mecânicas

A compreensão do comportamento mecânico dos materiais é necessária para a análise dos resultados das avaliações biomecânicas, e é dada pela relação entre tensão e deformação.

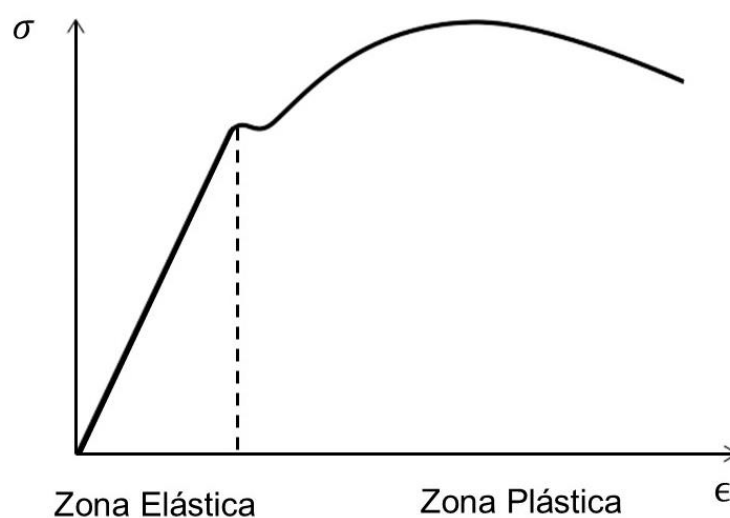
Tensão ( $\sigma$ ) representa a força ( $F$ ) aplicada em uma determinada área ( $A$ ) (Equação 1), enquanto a deformação ( $\epsilon$ ) representa a razão entre a diferença no comprimento ( $\Delta L$ ) para o comprimento inicial ( $L_0$ ) (Equação 2), ou seja, relaciona-se à resposta do material ao ser submetido à tensão, podendo ocorrer estiramento ou compressão do mesmo. Essa deformação se associa à estrutura e ligação químicas existentes próprias do material (85,86).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (1)$$

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (2)$$

Ao retirar a tensão em que o material foi exposto, podem ocorrer dois tipos de deformação, a elástica e a plástica (Figura 4).

Figura 4 - Representação gráfica da curva de tensão ( $\sigma$ ) x deformação ( $\epsilon$ ), destacando as zonas elástica e plástica



Fonte: adaptado de Callister (2008) (85).

A deformação elástica ocorre quando o material é submetido a uma tensão que não supera a de sua elasticidade; assim, retorna ao seu estado original após cessar esse efeito (85).

A deformação plástica ocorre quando o material é submetido a uma força superior à de deformação elástica, conhecida como tensão de plasticidade, e deforma-se permanentemente, não retornando ao seu estado original (85).

### 3.3.1.1. Elasticidade

Ao considerar a região de deformação elástica, demonstra-se o comportamento linear de diversos materiais, descrito pela Lei de Hooke (Equação 3), em que a força (F) aplicada no material é proporcional à sua deformação ( $\Delta L$ ). Essa proporção é dada pela constante elástica ou constante de proporcionalidade (k) (87).

$$F = -k \cdot \Delta L \quad (3)$$

A partir dessa lei é possível determinar a elasticidade linear do sistema e aplicá-la seguindo modelos constitutivos, ou seja, modelos capazes de interpretar ou prever o comportamento do material.

O modelo mais simples é conhecido como isotrópico e é aplicado apenas quando há pequenas tensões. Consideram-se duas constantes elásticas para definir a mecânica do material: módulo de elasticidade (E) (ou módulo de Young), e coeficiente de Poisson ( $\nu$ ) (86).

A constante de proporcionalidade entre a tensão ( $\epsilon$ ) e a deformação ( $\sigma$ ) é conhecida como E (Equação 4). Essa variável representa a rigidez ou a resistência do material à deformação elástica e é dada pela inclinação do segmento linear na região de deformação elástica, também conhecida como módulo tangente ( $tg$ ) (43).

$$E = \frac{\Delta \epsilon}{\Delta \sigma} = tg(\alpha) \quad (4)$$

Há também o  $\nu$  (Equação 5), único para cada material, que descreve a tendência do material em se deformar na direção perpendicular à direção de aplicação da carga. A aplicação desse coeficiente considera a geometria tridimensional do sistema (43).

$$\nu = \frac{\epsilon \text{ transversal}}{\epsilon \text{ axial}} \quad (5)$$

### 3.3.1.2. Viscosidade

A viscosidade é uma propriedade em que a deformação linear se dá com o tempo, em oposição à elasticidade, cuja deformação é instantânea. O comportamento de materiais viscosos é descrito pela lei de viscosidade de Newton e está presente em fluidos quando expostos a uma tensão de cisalhamento e se deformam a uma velocidade específica (88).

Os fluidos newtonianos são aqueles que obedecem a uma relação linear entre tensão de cisalhamento ( $T$ ) e gradiente de velocidade ( $\frac{dv}{dy}$ ). A razão entre essas duas variáveis é a constante de proporcionalidade conhecida como viscosidade dinâmica ( $u$ ), que rege a equação da viscosidade (Equação 6).

$$T = u \frac{dv}{dy} \quad (6)$$

### 3.3.1.3. Viscoelasticidade

Os fluidos não newtonianos são aqueles que não seguem a lei de Hooke, nem a lei de viscosidade de Newton. Estes materiais podem ser subdivididos em grupos distintos, entre eles materiais denominados viscoelásticos (89).

Os materiais viscoelásticos apresentam comportamentos tanto elásticos quanto viscosos ao sofrerem deformações, podendo ser caracterizados de diferentes formas, inclusive pela Análise Mecânica Dinâmica, quando se tem um carregamento cíclico (20,31,90–92).

As variáveis que podem ser obtidas com a Análise Mecânica Dinâmica e que caracterizam as propriedades viscoelásticas do material são módulo dinâmico ( $E^*$ ), atraso de fase e histerese ou energia dissipada (93).

O  $E^*$  (Equação 7) é determinado pela razão entre o pico de tensão ( $\sigma \text{ máx}$ ) e o pico de deformação ( $\epsilon \text{ máx}$ ). Essa variável, assim como o  $E$ , é uma medida de resistência à deformação de um material e representa a soma vetorial do módulo de armazenamento ( $E'$ ) (Equação 8) e do módulo de perda ( $E''$ ) (Equação 9), assim representando a combinação entre rigidez e amortecimento do material, respectivamente.

O  $E'$  é o componente elástico em fase e representa a quantidade de energia elástica armazenada à medida que a amostra sofre deformação. Essa variável está associada com a capacidade do material em absorver choque, aspecto importante para a cartilagem, que recebe impactos mecânicos a todo momento. Já o  $E''$ , componente viscoso defasado, representa a quantidade de energia dissipada como calor durante o processo de deformação. É fator também importante na estrutura condral, para que não haja sobrecarga e consequente fratura (94).

O atraso de fase consiste na diferença entre as fases de tensão e deformação, considerando o período de um ciclo, e pode ser representado pelo ângulo de fase ( $\delta$ ) (Equação 10) (95,96). Em materiais puramente elásticos esse ângulo é igual a 0 e, para materiais viscosos, é igual a 90°. O ângulo de fase é determinado a partir da frequência do ciclo e pela diferença intervalar ( $\Delta t$ ) do pico de tensão e do pico de deformação (94,97–101).

$$E^* = \frac{\sigma \text{ máx}}{\epsilon \text{ máx}} \quad (7)$$

$$E' = \frac{\sigma \text{ máx}}{\epsilon \text{ máx}} \cos \delta \quad (8)$$

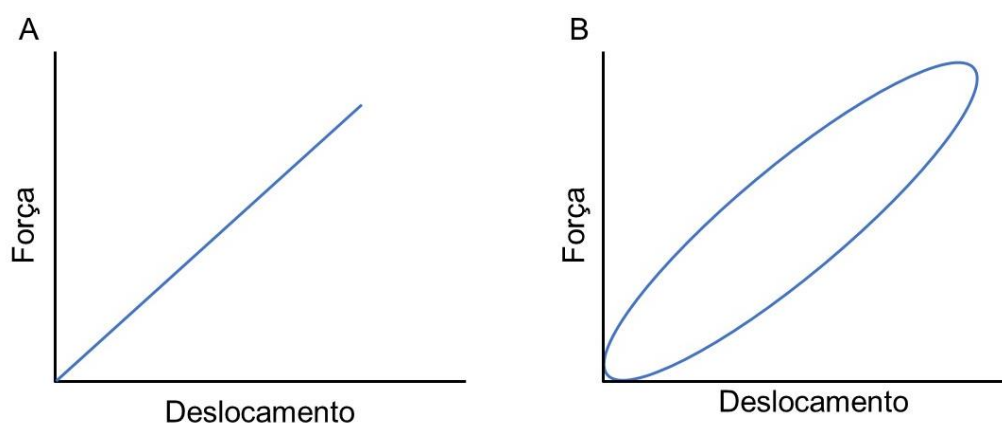
$$E'' = \frac{\sigma \text{ máx}}{\epsilon \text{ máx}} \sin \delta \quad (9)$$

$$\delta = 360^\circ \cdot \text{frequência} \cdot \Delta t \quad (10)$$

Ao aplicar vários ciclos de força-deslocamento em materiais elásticos, as curvas de carga e descarga coincidem, ou seja, não há perda de energia (Figura 5-A)

(102). Já em materiais viscoelásticos é possível observar o fenômeno de histerese (Figura 5-B) (102).

Figura 5 - Representação gráfica da curva de força-deslocamento em (A) materiais elásticos, e (B) materiais viscoelásticos



Fonte: Autoria própria.

Histerese é a capacidade do material em preservar suas propriedades na ausência de um estímulo gerado. Esse fenômeno descreve as curvas de carga e descarga, e a diferença entre as áreas de ambas caracteriza a perda de energia do material (92,103).

Nas análises desses materiais, as curvas de carga e descarga tendem a um estado de estabilidade quanto maior for a repetição, ou seja, as curvas entre um ciclo e outro passam a não ter divergência. Este é conhecido como o ponto ideal para realizar o cálculo da área de histerese (104,105). Apenas o primeiro ciclo apresenta um valor anormal para cálculo da energia dissipada, enquanto os outros têm seu valor estabilizado e reduzido conforme há aumento dos ciclos (104–107).

#### 3.3.1.3.1. Viscoelasticidade da cartilagem

As propriedades da cartilagem são regidas por dois mecanismos principais. O primeiro é dependente do fluxo intersticial ao receber uma resposta mecânica; já o



segundo associa-se à arquitetura estrutural, provinda do atrito intermolecular da matriz sólida. O atrito interno no material, entre fluido e sólido, somado às características viscoelásticas da matriz sólida, ocasiona a dissipação de energia vista através do fenômeno de histerese (34,91,108–111).

A dissipação de energia da cartilagem, quando submetida a um estímulo mecânico, é dada na forma de calor. O aumento da temperatura na região condral pode ocasionar aumento das taxas de síntese de ácido hialurônico e glicólise e do metabolismo de condrócitos, sugerindo uma associação da temperatura com homeostase da cartilagem. No dia a dia esse processo pode ser representado durante uma caminhada, em que a temperatura na região da cartilagem do joelho saudável pode aumentar de 33°C até 36,7°C; já quando a cartilagem está danificada, essa variação da temperatura não é significativa (112).

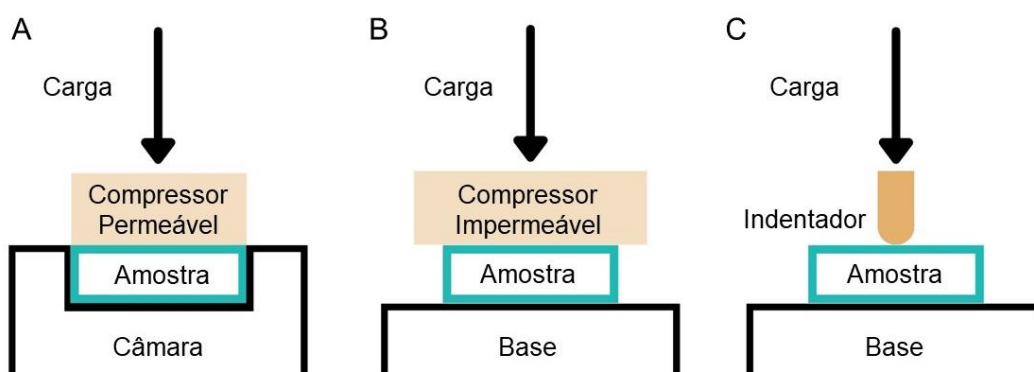
Os módulos dinâmicos ( $E^*$ ) ou de elasticidade ( $E$ ) são uma das variáveis mais importantes de caracterização mecânica, já que estão associados com a habilidade do material em resistir à deformação. Considerando o tecido condral, se sua rigidez for muito baixa, a carga submetida ao tecido pode ser transmitida diretamente ao osso subjacente.

A cartilagem apresenta diferentes propriedades de acordo com as suas zonas, é um material viscoelástico, não linear, multifásico e anisotrópico que desempenha uma função mecânica clara de absorção e distribuição de cargas, capaz de reduzir os impactos no osso subjacente (40,41,113,114). Essas propriedades são caracterizadas pelos testes mecânicos, que podem descrever o comportamento dos materiais, incluindo os biológicos, como o da cartilagem.

### 3.3.2. Testes mecânicos

Os testes mecânicos mais utilizados para avaliar tecidos moles, como o da cartilagem, são os de compressão, tais quais os confinados (Figura 6-A), não confinados (Figura 6-B) e de indentação (Figura 6-C), que buscam avaliar a matriz extracelular a partir de suas propriedades compressivas (93,115).

Figura 6 - Configurações comuns de teste mecânico compressivo: (A) compressão confinada; (B) compressão não confinada; (C) indentação



Fonte: adaptado de Griffin (2016) (40).

O teste de compressão não confinada é capaz de simular as condições de contato *in situ* por restringir o fluxo de fluido intersticial nas extremidades, função semelhante a do osso subcondral (116,117). Esse ensaio fornece informações que não se limitam à região superficial da amostra de cartilagem e que podem descrever sobre falha tecidual, já que é considerado destrutivo (40,86,118). Durante a avaliação é utilizado um compressor impermeável maior do que a amostra, que se desloca perpendicularmente. O fluido se movimenta de forma radial, em oposição ao teste de compressão confinada, em que o fluido se movimenta predominantemente na vertical (40,119).

O teste de indentação é um dos mais utilizados para avaliação das propriedades biomecânicas da cartilagem por diversos motivos. Este é capaz de preservar a estrutura fisiológica do material, fornecendo valores que simulam um ambiente mais real de teste. É uma avaliação não destrutiva, tendo uma aplicação potencial no ambiente clínico, além de utilizar um indentador menor do que o raio da amostra, eliminando quaisquer efeitos de borda e evitando possíveis erros experimentais (34,38,40,43,93,120).

A partir da escolha das configurações dos testes, diferentes protocolos podem ser aplicados, como rampa, relaxamento de tensão, fluência e dinâmica. Estes três últimos testes são capazes de descrever o comportamento viscoelástico da cartilagem (91,93).

Sucintamente, o teste de rampa associa-se com a aplicação de uma taxa de deformação constante, enquanto há a medição da resposta de tensão. O teste de relaxamento de tensão relaciona-se com a aplicação de deformação a um nível alvo, para depois mantê-la constante, enquanto a tensão atinge o pico e relaxa até o equilíbrio. A fluência envolve a aplicação de uma tensão fixa, enquanto analisa-se a variação da deformação com o tempo. O teste dinâmico envolve a aplicação de uma tensão ou deformação cíclica, enquanto a resposta do sistema é medida (93,121).

Esses diferentes protocolos impactam diretamente nos resultados das avaliações, tornando importante compreender os parâmetros para cada variação. A resposta do sistema pode ser instantânea ou em equilíbrio, sendo dependente da taxa de deformação e considerando as diferentes zonas do tecido, os locais de teste e as regiões de análises, dentre outras variáveis (93).

Em relação ao teste dinâmico, este é um dos mais promissores e que atrai interesse por parte dos pesquisadores ao avaliar a cartilagem mecanicamente, tendo em vista a natureza cíclica do tecido. A cartilagem articular sofre um padrão repetitivo de força durante atividades diárias, como caminhadas e corridas (122).

Usualmente, o teste dinâmico é implementado com o tecido em estado de equilíbrio, após a análise de um teste de tensão-relaxamento e com o material sujeito a uma deformação ou tensão senoidal. No entanto, é importante considerar outros mecanismos de análise, considerando a funcionalidade do tecido condral, que está sempre em movimento (91,123). Para esse teste, os parâmetros de entrada incluem frequência do ciclo, número de ciclos e amplitude de deformação (93,98,124).

No entanto, há estudos publicados para amostras biológicas e poliméricas em que o teste dinâmico é executado sem relaxação da amostra e a uma velocidade constante. Evans e Quinn (2006) (125) avaliaram o transporte intersticial na cartilagem articular, a partir da aplicação de uma carga dinâmica de perfil triangular, pelo teste de compressão não confinada. Efremov et al. (2020) (126) compararam diferentes curvas obtidas em modelos viscoelásticos, pelo teste de indentação, variando a geometria do indentador e o perfil de rampa (triangular e senoidal). Weizel et al. (2020) (105) investigaram as propriedades mecânicas de três materiais, incluindo cartilagem humana, pela aplicação de diferentes protocolos, incorporando variação de perfil e relaxação da amostra. Jeng et al. (2013) (94) e Franke et al. (2011) (127) realizaram teste de indentação dinâmico, mas sem relaxação prévia da amostra.

### 3.3.2.1. Normas técnicas e padronização

Um dos desafios atuais ao estudar testes biomecânicos e propriedades de cartilagem é a falta de normas técnicas e padronização para o procedimento, sendo o oposto visto para materiais metálicos e cimentícios, por exemplo (41,93,128).

A *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América e a ICRS publicaram documentos de orientação acerca de estudos pré-clínicos envolvendo testes mecânicos, focando nos testes de compressão (129,130).

Além disso, há a norma F2451-05, da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), que descreve apenas o ensaio de fluência (128), e a norma E2546-15, da ASTM, com as etapas para a realização do teste de indentação instrumentada (131).

Apesar dessas diretrizes, os quatro documentos não informam sobre parâmetros importantes e determinantes para a realização das avaliações. Assim, há uma grande variedade de métodos e protocolos aplicados, o que dificulta a comparação entre os estudos já realizados, tendo em vista as diversas variáveis que influenciam nos resultados de caracterização (40,93,132).

Alguns parâmetros que podem influenciar na resposta final das análises são: preparação, armazenamento e hidratação da amostra, que impactam na rigidez (133,134); tamanho da amostra e do indentador, já que é um teste localizado em que podem surgir heterogeneidades, logo, o indentador deve ser menor para que não haja efeito de borda (40,86,106,135); formato do indentador, que impacta na distribuição de força e área de contato (102,136–138); espessura e maturação da cartilagem (86,139,140); protocolo aplicado – cada um tem uma resposta e uma variável final a serem analisadas (93,102); aplicação de modelo matemático (138,141–146); composição da cartilagem (147); localização da amostra (148,149); taxa de carregamento, visto que quanto maior for a velocidade, mais acentuada é a inclinação da curva (93,118,119); entre outros.

### 3.3.3. Modelos de análise

Outro desafio atual no estudo da cartilagem articular é a demonstração de seu comportamento viscoelástico em modelos de análise, ou seja, modelos teóricos ou computacionais utilizados no estudo da composição e estrutura do tecido. Existem diversos modelos já criados, desde aqueles que caracterizam a cartilagem como um modelo de fase única até modelos multifásicos, em que se considera o fluxo de íons e os efeitos mecânicos não lineares (106,135,142–144,150,151).

Além desses modelos para caracterização da cartilagem, outros são utilizados na mecânica para os testes de indentação instrumentada, considerando as diferentes geometrias do indentador (152).

O indentador de ponta esférica produz uma distribuição de deformação mais uniforme, assim gerando resultados mais confiáveis (94,153), além de promover uma deformação quase elástica em pequenas cargas e deslocamento (154). Em oposição ao indentador plano, o esférico produz uma área de contato na amostra variável de acordo com a carga aplicada ou o deslocamento do teste (138).

Devido à variação da área de contato durante o ensaio, criaram-se modelos matemáticos para estimar essa profundidade e a área de contato para cálculo de variáveis como  $E$  e  $E_r$  (módulo de elasticidade reduzido), a partir de uma curva ajustada (155). Seguindo a norma E2546-15, da ASTM, outra forma de calcular a rigidez do material é pelo  $E_r$ , ou seja, módulo da curva de descarga. A consideração do  $E_r$  é empregada por assumir que a área de contato entre o indentador e a amostra permanece constante durante a retirada inicial do indentador (156).

O modelo de Hertz (146) é o mais amplamente aplicado nas análises mecânicas considerando amostras biológicas, e está contido na norma ASTM E2546-15 (131,157,158). Esse modelo se aplica parcialmente à geometria esférica, além de restringir à condição de que a profundidade de penetração deve ser pequena em relação ao raio da esfera e não excedendo 5 a 10% da espessura da amostra (159–161).

O modelo de Hertz (109) relaciona  $F$ ,  $E$ , raio da esfera ( $R$ ) e profundidade de penetração do indentador ( $D$ ), onde  $E$  associa-se com  $\nu$  da amostra ( $\nu_a$ ) e do

indentador ( $v_i$ ). Esse modelo considera a deformação elástica em materiais esféricos, em que há mudança do raio de contato (131,152,162).

$$F = \frac{4}{3} E \sqrt{R} D^{\frac{3}{2}} \quad (11)$$

$$\frac{1}{E} = \frac{(1 - \nu_a^2)}{E_a} + \frac{(1 - \nu_i^2)}{E_i} \quad (12)$$

O modelo de Oliver e Pharr surgiu em 1992 (145) e passou por refinamentos (156,159), no entanto o estudo de Cheng et al. (2005) demonstrou que este não é aplicável à indentação esférica de materiais viscoelásticos (163).

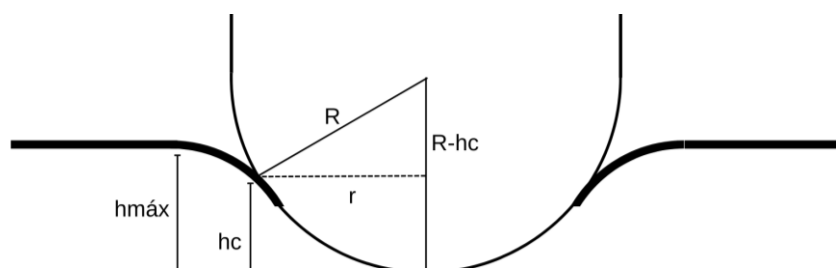
O modelo inicial de Oliver-Pharr (145) considera parâmetros de ajustes de acordo com o indentador e a amostra, onde S é a rigidez ou a inclinação da reta, e A é a área de contato projetada entre o indentador e a amostra (141,155,164).

$$E = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A}} \quad (13)$$

A área (A) projetada pode ser calculada seguindo a Equação 14, onde R é o raio do indentador e hc é a altura ou profundidade em que há contato entre o indentador e a amostra (Figura 7).

$$A = \pi(2Rhc - hc^2) \quad (14)$$

Figura 7 - Cálculo de área utilizando um indentador de ponta esférica



Fonte: adaptado de Ebenstein et al. (2004) (141).

Nota:  $R$  = raio do indentador;  $h_c$  = altura de contato;  $h_{máx}$  = altura máxima de indentação, e  $r$  = raio da área de contato projetada do indentador na amostra.

Na literatura também encontram-se métodos para ajuste da curva de indentação, como é o caso do modelo criado por Hayes et al. (1972) (138). Ressalta-se que a análise biomecânica, considerando os modelos matemáticos e o indentador de ponta esférica, é complexa e muitas vezes realizada pelo próprio equipamento de teste, não havendo, ainda, um modelo ideal (127,154,165).

Como descrito, a cartilagem articular é um tecido avascular e um material viscoelástico que pode sofrer alterações estruturais e composicionais, sendo comum a aplicação de abordagens *in vitro*, *in situ*, *in vivo* e *ex vivo* para avaliação da restauração da cartilagem. Porém, também é importante avaliar as propriedades físicas do novo tecido formado, uma vez que elas fornecem as funções biomecânicas, como rigidez, suporte de carga, absorção de choque e resistência ao desgaste. Portanto, a avaliação mecânica é essencial e está descrita neste estudo (43,93).

#### **4. METODOLOGIA**

Estudo experimental controlado em animais que foi desenvolvido de 2017 a 2020. Utilizaram-se no presente estudo quatorze suínos de denominação BR-1 e desenvolvidos especificamente para pesquisa, com idade esquelética compatível com a maturidade sexual (8 a 12 meses), do sexo feminino e com peso de 19 a 22 quilogramas (*Minipig* Pesquisa e Desenvolvimento, Ltda., Campina do Monte Alegre, SP, Brasil). Totalizaram-se 28 cirurgias, sendo os dois joelhos das duas patas traseiras de cada animal, comparados de forma pareada em relação ao grupo sem tratamento e experimental com tratamento.

Os procedimentos experimentais e os cuidados com os animais foram conduzidos de acordo com a Lei nº 11.794/2008 da Constituição Federal Brasileira, que regulamenta e estabelece “Procedimentos para o Uso Científico de Animais”.

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, IOT nº 1336 (Anexo A) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês, número de aprovação CEUA P 2017-05 (Anexo B).

##### **4.1. Cultura de células: coleta, isolamento, expansão e diferenciação de células estromais mesenquimais (CEM)**

A coleta de tecido sinovial de joelhos humanos incluiu sete pacientes submetidos a cirurgias artroscópicas do joelho. Excluíram-se pacientes com história prévia de cirurgia, infecção, artrite inflamatória e gestantes (23).

A sinóvia do joelho foi coletada no início da artroscopia (Figura 8), através do portal ântero-lateral. Uma amostra de até 1 g da sinóvia foi armazenada em um tubo cônico estéril de 50 mL contendo solução salina 0,9% à temperatura ambiente. As amostras foram enviadas imediatamente para o Laboratório de Processamento Celular do Hospital Sírio-Libanês (São Paulo, Brasil) e processadas em até 6 horas após a coleta (23).



Figura 8 - Artrosopia de joelho para coleta de tecido sinovial



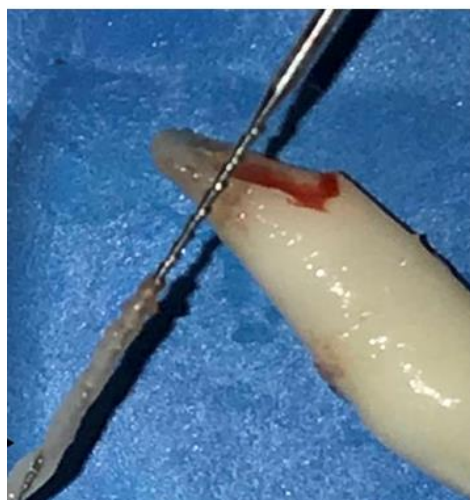
Fonte: Arquivo pessoal, artrosopia do joelho, 2016.

Cada amostra foi lavada duas vezes em solução salina com 4% de penicilina-estreptomicina. A digestão foi realizada com 0,2% *Colagenase NB 4G Proved Grade* (*Serva Electrophoresis*, Alemanha) por 90 minutos a 37°C. Este processo terminou com a adição de 4 mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado com 15% de soro fetal bovino (*HyClone U.S. Origin Cytiva*) e centrifugado a 1.500 rotações por minuto, por 5 minutos. Em seguida, houve a diluição em DMEM/F-12 e soro fetal bovino, antes do plaqueamento das células em um frasco de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> (23).

A coleta da polpa do dente (Figura 9) foi feita em sete crianças saudáveis (cinco meninos e duas meninas, de 7 a 9 anos). Uma antisepsia bucal foi conduzida, com bochecho com clorexidina 0,12%, seguido pela extração dental (exodontia). A polpa do dente foi retirada utilizando limas endodônticas e o tecido foi acondicionado em um frasco identificado com dados do paciente. As amostras foram adicionadas a um coletor estéril com 2 mL de solução DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12*—Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) suplementada com 100 UI/mL de penicilina-estreptomicina (*Penicillin-Streptomycin*; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY). Esse material foi acondicionado em caixa de transporte e transportado até o Laboratório de Processamento Celular do Hospital Sírio-Libanês (São Paulo,

Brasil) em temperatura de 4°C a 8°C e em no máximo 24 horas após a coleta, para evitar perda celular e possível contaminação cruzada (12,23).

Figura 9 - Coleta da polpa do dente



Fonte: Arquivo pessoal, Hospital Sírio-Libanês, 2018.

No laboratório, as amostras de polpa dentária foram lavadas duas vezes em solução salina e digeridas com uma solução contendo 1 mg/mL de TrypLE (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) em solução salina (Phosphate Buffered Salin, pH:7,4; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY) por 30 min a 37°C. Após a digestão dos tecidos, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos. Em seguida, a polpa dentária foi fragmentada com bisturi estéril e os fragmentos adicionados a uma placa de 12 poços, onde cada fragmento foi depositado em um poço e preenchido por meio basal para manutenção e nutrição do tecido composto por: Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY), suplementado com 15% soro fetal bovino (FSB; HyClone™ - Cytiva, U.S origin) e aminoácido não essencial (MEM Non-Essential Amino Acids Solution; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY). Mantiveram-se as amostras em incubadora úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> (12,23).

Após 15 dias as CEM iniciaram a expansão para fora dos fragmentos da polpa. As células foram cultivadas até completarem a confluência de 70 a 80% de toda a área da placa de cultura. Após atingir essa confluência, as CEM foram expandidas até atingirem o número necessário para o experimento. Durante a expansão celular uma

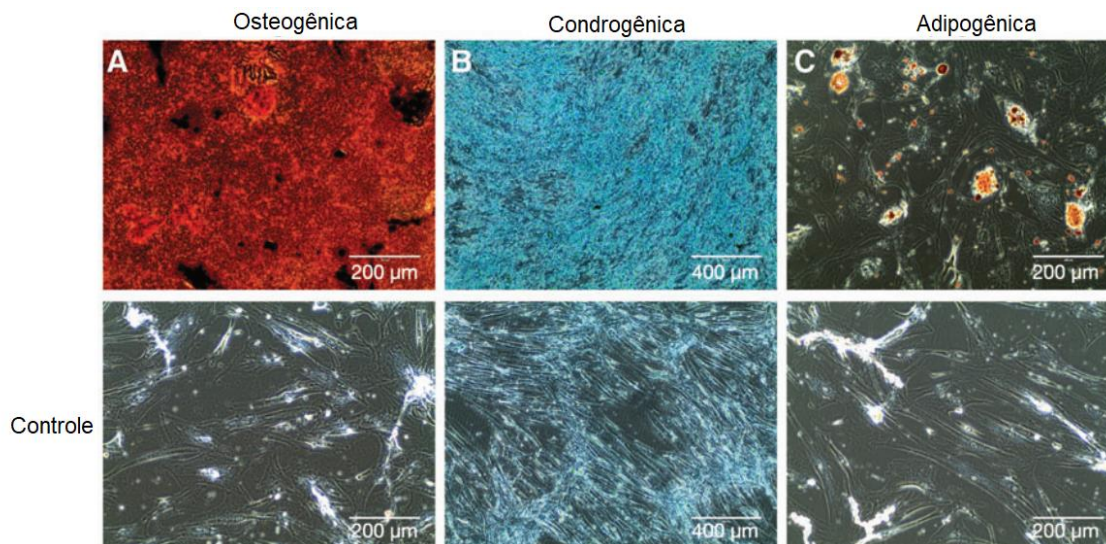
parte das células foi criopreservada lentamente com uma solução composta por 5% de dimetilsulfóxido (DMSO – CryoPur, Origen Biomedical) diluída em DMEM/F-12 até atingir a temperatura de -80°C. Após atingir essa temperatura, as amostras foram transferidas e mantidas no biorrepositório a uma temperatura de -196°C, no Centro de Terapia Celular Avançada do Hospital Sírio-Libanês (12,23).

Após descongelamento, as 14 amostras de CEM foram lavadas, para retirar a solução contendo DMSO e cultivadas em meio basal composto por DMEM/F12 (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY), suplementado com 10% soro humano (Sigma-Aldrich, USA), plaqueado em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e mantido em uma atmosfera umidificada a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. A manutenção do meio basal de cultivo foi realizada três vezes por semana (12,23).

Após atingirem a confluência entre 70 e 80%, as células foram expandidas até atingirem o número de células necessárias para os experimentos. A cada passagem foi observado, através de microscópio óptico (Olympus CK40), se as células mantiveram morfologia alongada típica de fibroblastos. Em seguida, realizou-se a caracterização da população celular através da imunofenotipagem por citometria de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, EUA), e analisaram-se os dados usando o software Cell Quest (BD Biosciences, EUA) (23).

A caracterização celular das CEM foi realizada também através da indução *in vitro* para a diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica, complementando a demonstração da capacidade de multipotencialidade característica das CEM (Figura 10) (9,23).

Figura 10 - Diferenciação das células estromais mesenquimais em (A) osteogênica com Alizarin Red S (21 dias); (B) condrogênica com Alcian Blue 8G (21 dias); (C) adipogênica com oil red O (18 dias), e respectivos controles abaixo. As imagens foram obtidas por microscopia óptica (EVOSÔ XL Cell Imaging System)



Fonte: adaptado de Santanna et al. (2022) (23).

As CEM obtidas foram isoladas e cultivadas em um laboratório de boas práticas de manipulação. Todos esses processos de coleta, isolamento, expansão e caracterização das CEM da sinóvia do joelho e da polpa dentária já foram descritos em detalhes nos artigos anteriores do grupo (9,12,21,23). Na presente pesquisa, utilizaram-se ambas as linhagens celulares para o grupo de intervenção, ou seja, com tratamento.

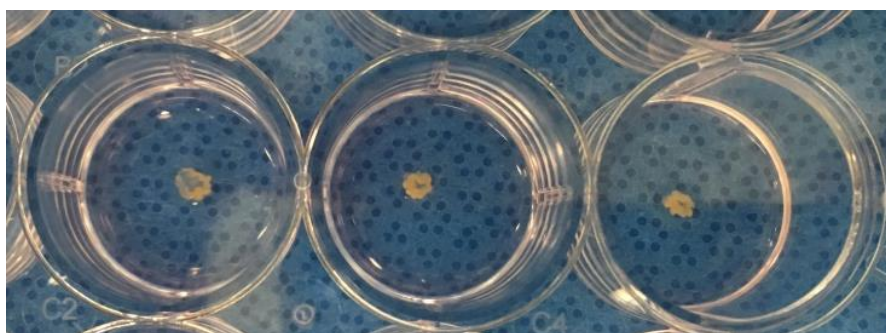
#### 4.2. Desenvolvimento do construto de engenharia tecidual (CET)

As CEM derivadas da polpa do dente e do tecido sinovial foram semeadas em uma placa de cultura de 12 poços a uma densidade de  $4,0 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> no meio de crescimento, com 0,2 milimolar de ácido ascórbico 2-fosfato (Asc-2P; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri). Em alguns dias, as células tornaram-se confluentes.

Após aproximadamente 15 dias, destacaram-se os construtos de células e matriz extracelular sintetizados pelas próprias células do substrato pela aplicação de

tensão de cisalhamento na interface célula-substrato com auxílio de uma pipeta. Os construtos separados ficaram em suspensão para formação de uma estrutura tridimensional por contração ativa do tecido. Esse tecido foi denominado CET, composto de células e matriz extracelular feito por engenharia tecidual (Figura 11).

Figura 11 - Três amostras de construto de engenharia tecidual confluyente após 15 dias de cultura formando uma estrutura tridimensional



Fonte: Arquivo pessoal, IOT-HC-FMUSP e Hospital Sírio-Libanês, 2018.

#### 4.3. Modelo animal

As informações sobre características, cuidados e procedimentos relacionados aos animais nesta pesquisa foram coletadas a partir do *ARRIVE Guideline Checklist* (166) e mantidas em um repositório digital (167). Os animais se mantiveram em baias individuais e alimentados duas vezes ao dia com ração e água *ad libitum*.

No momento da cirurgia, informou-se ao cirurgião qual seria o lado e o primeiro grupo, e se somente defeito ou com tratamento por CET, a partir de randomização prévia. A randomização foi gerada por programa do site [www.randomization.com](http://www.randomization.com) por pesquisador não envolvido no procedimento cirúrgico (168).

Um defeito de cartilagem de espessura total medindo 6 mm de diâmetro foi efetuado na área de carga do côndilo femoral medial, nos dois membros posteriores de cada animal, utilizando um tubo de corte para extração dos cilindros de cartilagem (Sistema OATS, Arthrex, Naples, Florida, EUA). Em seguida, a camada basal

calcificada da cartilagem foi removida com uma cureta e o CET foi colocado no defeito da cartilagem (Figura 12) (168).

Figura 12 - Defeito da cartilagem (6 mm) na área de carga do côndilo femoral medial do membro posterior do porco em miniatura, após remoção da camada calcificada da cartilagem



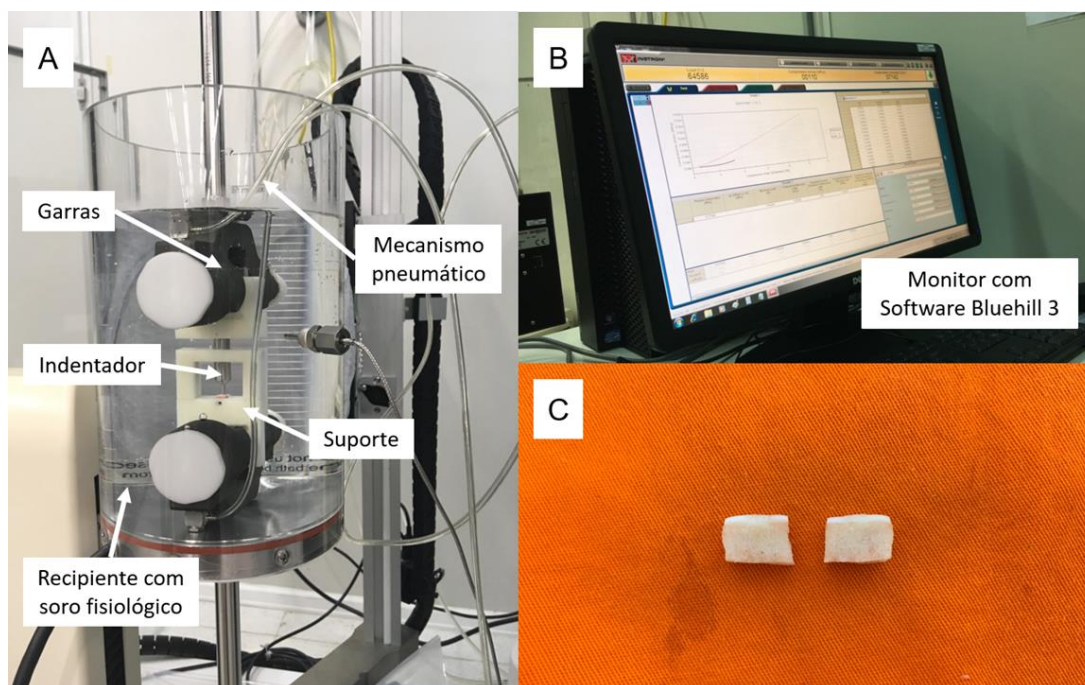
Fonte: Arquivo pessoal, IOT-HC-FMUSP e Hospital Sírio-Libanês, 2018.

Os animais foram tratados no pós-operatório com medicação analgésica e antibiótico. Foram capazes de realizar descarga do peso após 12 horas do procedimento e de andar normalmente após 10 dias. Aos 6 meses após a cirurgia, os animais foram eutanasiados com propofol e cloridrato de potássio e os membros posteriores foram desarticulados na altura do quadril.

#### **4.4. Avaliação biomecânica**

A avaliação biomecânica da cartilagem com tratamento e sem tratamento por implante do CET foi realizada por meio de um equipamento de teste universal Instron 3365 (Instron Corporation, Norwood, MA, EUA) (Figura 13-A) e software Bluehill 3™ (Instron Corporation, Norwood, MA, EUA) (Figura 13-B). O acessório BioPuls™ (Instron Corporation, Norwood, MA, EUA) para controle do banho de temperatura foi utilizado. Aplicaram-se os testes de indentação e de compressão não confinada máxima para analisar as propriedades mecânicas (115,169).

Figura 13 - (A) Equipamento de teste universal modelo Instron 3365 conectado ao acessório BioPuls™ contendo mecanismo pneumático, garras, recipiente com soro fisiológico, indentador e suporte; (B) monitor com software Bluehill 3 conectado ao equipamento Instron 3365™; (C) exemplo de dois blocos osteocondrais utilizados para avaliação biomecânica



Fonte: Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

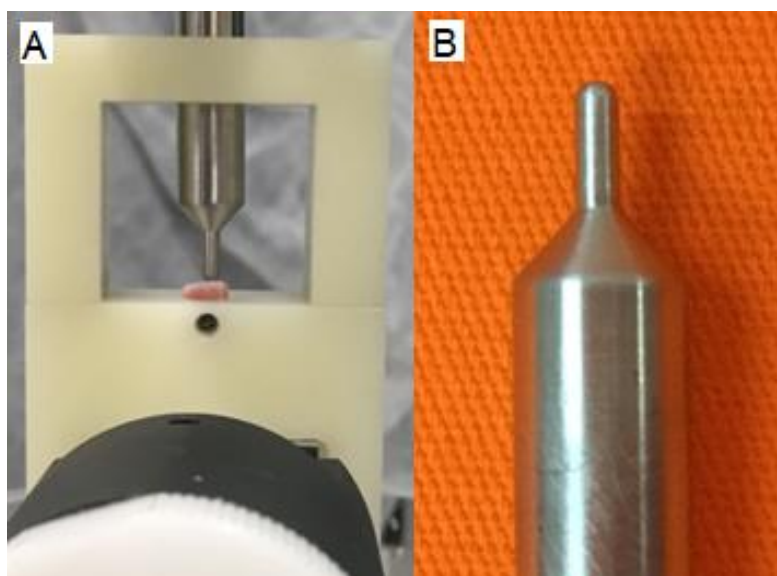
Corpos de prova foram construídos utilizando-se aproximadamente 5 mm de altura de osso subcondral. Espessura da cartilagem, peso, largura e altura da amostra total foram medidos três vezes. As médias dessas quatro principais medidas e a densidade óssea ( $1,1 \text{ g/cm}^3$ ) foram obtidas e inseridas no programa Bluehill 3™ para processamento do teste. O bloco osteocondral (Figura 13-C), que consiste no conjunto de osso e cartilagem, foi colocado sobre um suporte com a parte da cartilagem voltada para cima e posicionado no Instron (106).

Para realizar o teste, a estrutura foi imersa em solução salina (0,9% NaCl), a uma temperatura de  $36^\circ\text{C}$ , para simular a condição fisiológica do corpo (65). Uma carga mínima foi aplicada para garantir o alinhamento e o contato total entre a superfície da cartilagem e o indentador.

#### 4.4.1. Teste de indentação

O teste de indentação (Figura 14-A) seguiu a Norma E2546-15 da ASTM e consistiu em três ciclos de força-deslocamento, a uma velocidade constante de 0,5 mm/min, com um deslocamento fixo de 5% da média da espessura da cartilagem. Utilizou-se um indentador de ponta esférica de 2 mm de diâmetro (Figura 14-B) (105,131,139,170).

Figura 14 - (A) Configuração do teste de indentação com amostra posicionada em um suporte; (B) indentador de ponta esférica medindo 2 mm de diâmetro

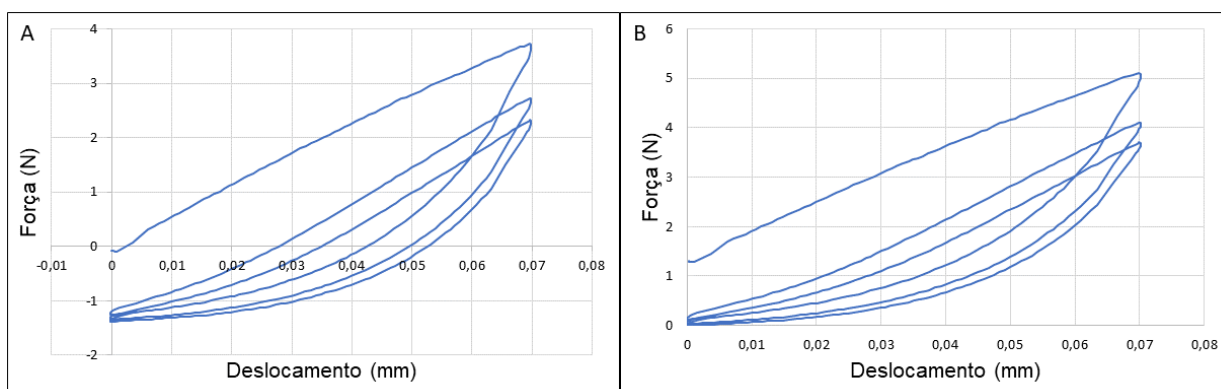


Fonte: Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Os dados obtidos em função de força (N) por deslocamento (mm) (Figura 15-A) foram deslocados graficamente para começar em “zero”, utilizando um fator de correção variável para cada amostra. Conforme observado na Figura 15-B, as expressões passaram a ter interceptação “y” de zero (103).



Figura 15 - Gráfico de uma amostra representativa obtida com o teste de indentação. (A) força (N) x deslocamento (mm); (B) força (N) x deslocamento (mm), com interceptação “y” de zero

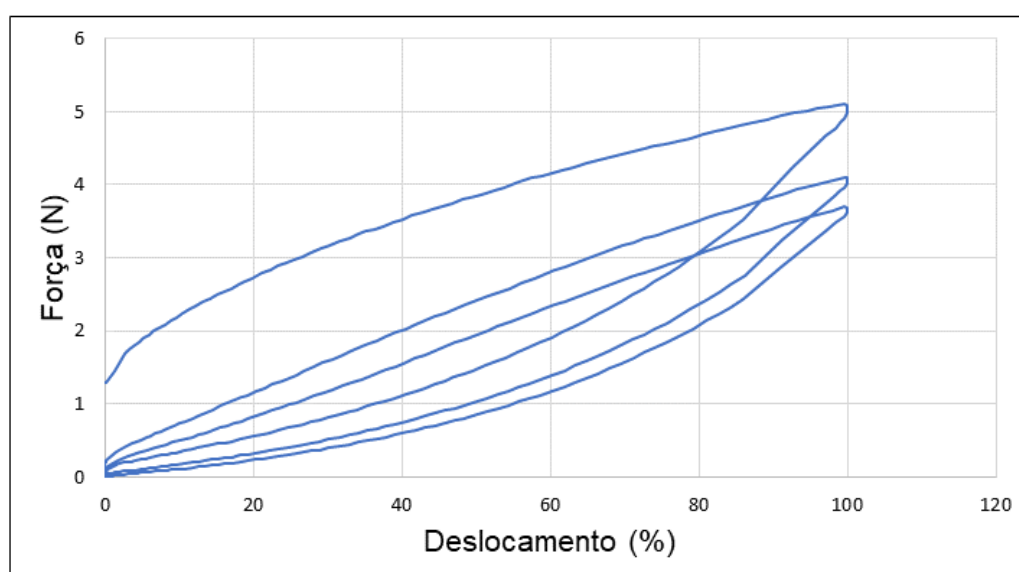


Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: N = Newton; mm = milímetros.

A partir desse processo, aplicou-se o modelo de Hertz (Equação 11), que considera a geometria esférica do indentador (Figura 16) (146,162). O coeficiente de Poisson ( $\nu$ ) adotado para a cartilagem articular foi de 0,5; já o  $\nu$  do indentador, por ser considerado um material infinitamente rígido, foi desconsiderado (Equação 12) (171).

Figura 16 - Gráfico de uma amostra representativa obtida com o teste de indentação, força (N) x deslocamento (%) com aplicação do modelo de Hertz



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: N = Newton; % = porcentagem.

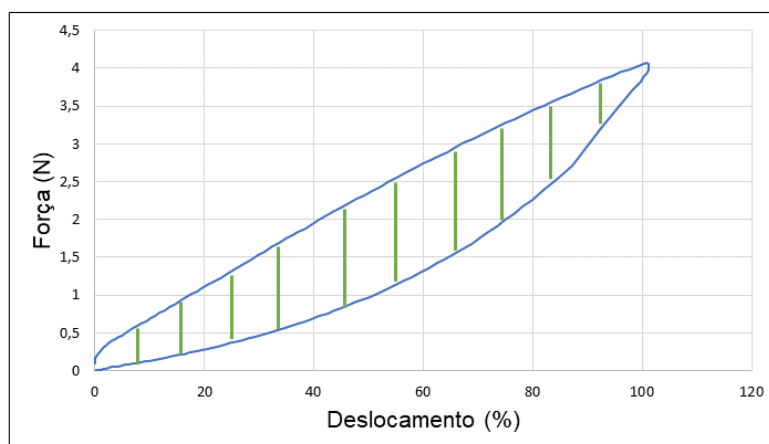
Seguindo os estudos de Meloni et al. (2017) (106), Weizel et al. (2020) (105) e Kelm (2002) (104), o primeiro ciclo de força-deslocamento no teste de indentação apresenta um comportamento com maior quantidade de erro, com valores altos de dissipação de energia. Dessa forma, descartou-se o primeiro ciclo das análises e utilizaram-se o segundo e o terceiro ciclos para os cálculos das variáveis (103).

Neste estudo, optou-se por avaliar as propriedades viscoelásticas da cartilagem pelo cálculo das seguintes variáveis: energia dissipada; módulo dinâmico ( $E^*$ ), seguindo a equação apresentada por Fakult e Ronken (2012) (Equação 15); ângulo de fase ( $\delta$ ) (Equação 10), permitindo a determinação do módulo de armazenamento ( $E'$ ) (Equação 8) e módulo de perda ( $E''$ ) (Equação 9) (65,66,91,93,135).

$$E^* = (1 - \nu^2) \frac{3F_{\text{máx}}}{4\sqrt{RDm_{\text{máx}}^3}} \quad (15)$$

O total de energia dissipada durante o ciclo foi calculado pela área entre as curvas de carga e descarga, por integração numérica trapezoidal (103,172). A Figura 17 apresenta o ciclo de histerese de uma amostra representativa, onde é possível visualizar, pelas linhas verticais em verde, qual foi a área mensurada.

Figura 17 - Gráfico de força (N) x deslocamento (%), evidenciando as curvas de carga e descarga de uma amostra representativa. Em linhas verticais verdes, a região onde foi calculada a energia dissipada



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

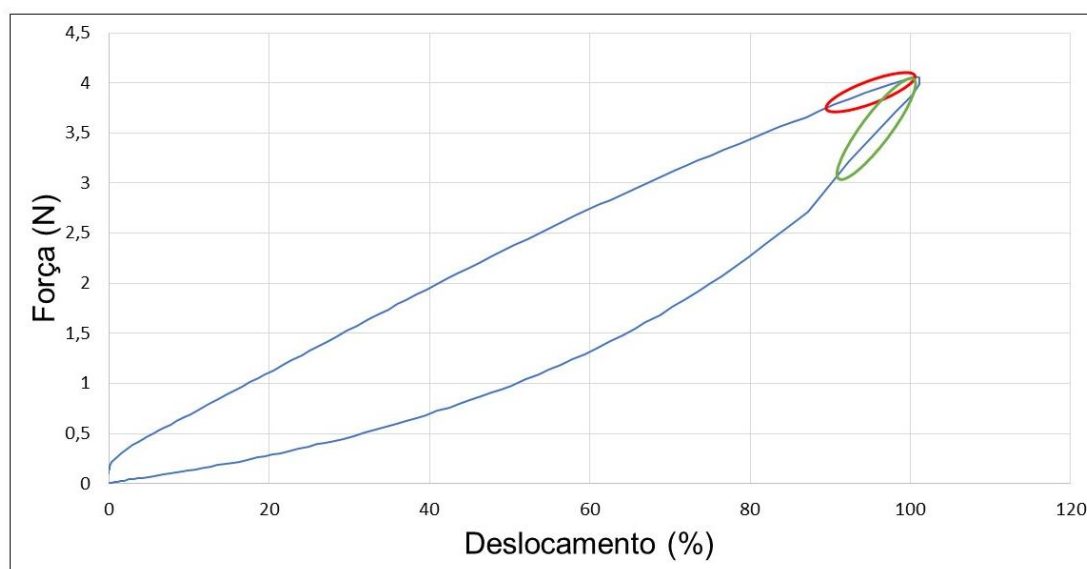
Nota: N = Newton; % = porcentagem.

As propriedades da cartilagem, considerando-se as regiões lineares, foram determinadas pelo módulo de elasticidade (E) e pelo módulo de elasticidade reduzido (Er) (Equação 11 e 12) através do cálculo do módulo tangente da curva de carga e descarga, respectivamente (65,103,131,171). Todos os pontos de dados incluídos nas análises lineares visaram a atingir um valor de  $R^2 > 0,98^\dagger$ , caracterizando o comportamento linear do material (40).

O cálculo do E foi determinado a partir do módulo tangente com a inclinação da curva a 5% de deslocamento (65) e com base na inclinação da reta total (Figura 18) (66,103).

O cálculo do Er, ou seja, o E da parte inicial da curva de descarga, foi determinado a partir do módulo tangente, considerando a inclinação da curva dos 10% da região superior (133) (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico de força (N) x deslocamento (%) de uma amostra representativa, evidenciando-se as regiões de análises. Em vermelho (menor elipse), o módulo de elasticidade da curva de carga a 5% de deslocamento. Em verde (maior elipse), o módulo de elasticidade reduzido (Er) dos 10% da região superior da curva de descarga.



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

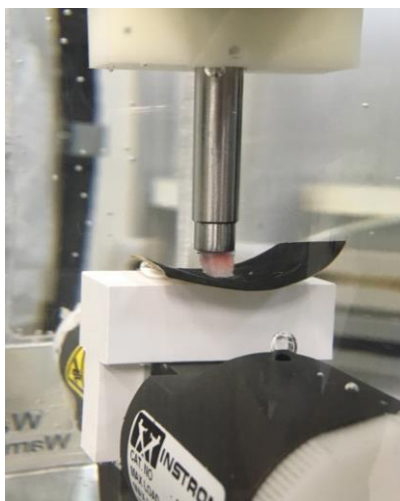
Nota: N = Newton; % = porcentagem.

<sup>†</sup> Valor de  $R^2$ , também conhecido como coeficiente de determinação, indica o quão próximos os dados estão da linha de regressão. É uma expressão numérica que varia de 0 a 1, sendo o maior valor, o mais próximo do modelo linear.

#### 4.4.2. Teste de compressão não confinada máxima

Em seguida do teste de indentação, o ensaio de compressão não confinada máxima (Figura 19) foi realizado com um deslocamento fixo de 50% da altura do bloco osteocondral, a 0,5 mm/min de velocidade, com célula de carga de 100 N (173). Foi utilizado um compressor cilíndrico circular de 6,95 mm de diâmetro, maior do que as amostras de cartilagem.

Figura 19 - Configuração do teste de compressão não confinada máxima, com bloco osteocondral e compressor cilíndrico circular de 6,95 mm de diâmetro



Fonte: Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

A partir dos resultados obtidos, as cargas de compressão foram divididas pela área da secção transversal do corpo de prova (Equação 1) para obter os valores de tensão e os valores de deslocamento convertidos em deformação utilizando a medida de comprimento inicial da amostra (Equação 2). Assim, os dados de força e deslocamento do bloco osteocondral transformaram-se em dados de tensão e deformação (65).

No teste de compressão não confinada máxima, o cálculo do módulo de elasticidade foi determinado a partir do módulo tangente com a inclinação da curva em 0 a 5% e 30 a 40% de deformação relativa da cartilagem, a fim de demonstrar a não linearidade do tecido (35,93,158). Os intervalos escolhidos de acordo com as

zonas do tecido (superficial e média) demonstram a não linearidade através da diferença regional na amostra de cartilagem. Além disso, esse teste possibilita a caracterização da falha tecidual (119).

#### **4.5. Análise estatística**

A análise estatística do presente estudo visa a comparar o lado com tratamento por implante do CET e o lado sem tratamento, somente defeito. Utilizou-se o Software JASP (174) para os cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, os resultados dos testes foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

O tamanho amostral foi definido por conveniência, de acordo com estudos similares pré-clínicos com animais de médio porte e estudos em humanos, fases I e II, publicados em revistas de alto fator de impacto (175,176).

As técnicas utilizadas para comparação entre as amostras foram teste de normalidade, seguido de teste-t de *student* pareado caso confirmada a normalidade, ou *Wilcoxon signed-rank*, caso não houvesse normalidade. Esses testes foram os escolhidos, visto que os joelhos comparados eram dos mesmos porcos, submetidos aos mesmos estímulos externos. Desconsideraram-se os outliers identificados nas análises, em conjunto com o seu par do outro grupo.

O ANOVA de medidas repetidas serviu para comparar dados envolvendo mais de dois grupos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Dados amostrais

Antes da realização dos testes de indentação e compressão não confinada máxima analisaram-se, pelo teste-t pareado, as características dos grupos sem tratamento (somente o defeito) e com tratamento (defeito com construto de engenharia tecidual – CET). Na Tabela 1 é possível observar os valores médios referentes à espessura da cartilagem ( $p=0,585$ ). Na Tabela 2 é possível observar os valores médios referentes ao bloco osteocondral, tanto para peso ( $p=0,876$ ), quanto para altura total ( $p=0,969$ ).

Tabela 1 - Valores médios de espessura da cartilagem dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), antes da avaliação biomecânica (média  $\pm$  desvio-padrão)

Dados amostrais da cartilagem	Defeito (n=14)	Defeito + CET (n=14)
Espessura (mm)	1,3 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,3

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; n = número de amostras; mm = milímetros.

Tabela 2 - Valores médios de peso e altura do bloco osteocondral das amostras sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), antes da avaliação biomecânica (média  $\pm$  desvio-padrão)

Dados amostrais do bloco osteocondral	Defeito (n=14)	Defeito + CET (n=14)
Peso (g)	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
Altura (mm)	6,3 $\pm$ 1,1	6,2 $\pm$ 1,1

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; n = número de amostras; g = gramas; mm = milímetros.

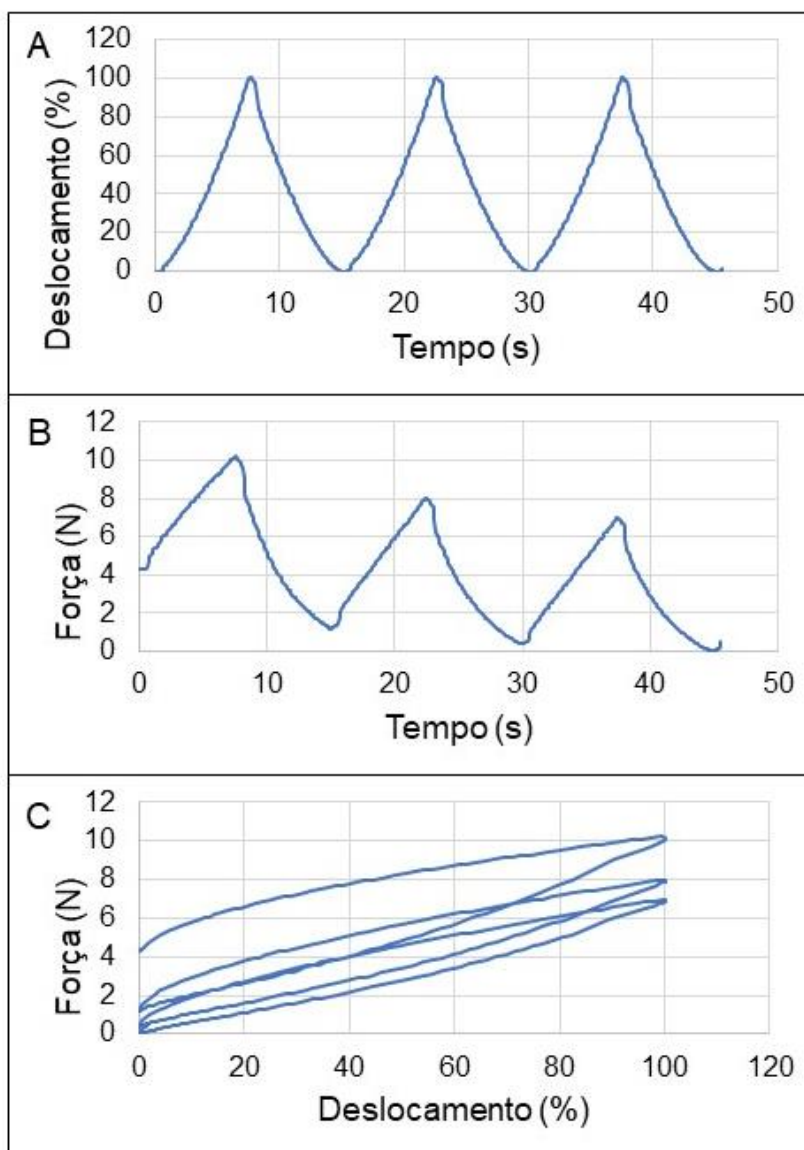
## 5.2. Avaliação biomecânica

Teste de indentação e teste de compressão não confinada máxima avaliaram as propriedades mecânicas da cartilagem do reparo tecidual nos grupos com tratamento pelo implante de CET e sem tratamento, somente com o defeito realizado no modelo.

### 5.2.1. Teste de indentação

A partir do teste de indentação, os dados obtidos foram em função de tempo, força e deslocamento. Assim, é possível avaliar o comportamento do material em três diferentes representações gráficas: deslocamento por tempo; força por tempo; e força por deslocamento. Na Figura 20, observam-se as curvas características de uma amostra representativa após aplicação do modelo de Hertz.

Figura 20 - Gráfico de uma amostra representativa obtida com o teste de indentação e após aplicação do modelo de Hertz: (A) deslocamento (%) x tempo (s); (B) força (N) x tempo (s); (C) força (N) x deslocamento (%)



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: N = Newton; s = segundos; % = porcentagem.

Na Figura 20-A, pelo gráfico de deslocamento por tempo, é possível observar os dois principais estágios do experimento, descritos pelas curvas de carga, seguidas imediatamente pelas curvas de descarga, formando uma rampa de perfil triangular para cada um dos três ciclos realizados.

Na Figura 20-B, observa-se a resposta em força, após a aplicação de um deslocamento máximo fixo, a uma velocidade constante.



Na Figura 20-C, é possível observar as curvas de carga e descarga, caracterizando o fenômeno de histerese, ao aplicar os três ciclos de força-deslocamento, evidenciando a propriedade viscoelástica da cartilagem articular.

Considerando a velocidade aplicada no teste de indentação (0,5 mm/min), foi possível calcular a taxa de deformação em função da espessura da cartilagem, nas amostras sem tratamento e com tratamento por CET (n=13). Pelo teste-t pareado, os valores médios obtidos foram de  $0,007.s^{-1}$ , com desvio-padrão de  $0,001.s^{-1}$  para o grupo sem tratamento, e de  $0,008.s^{-1}$ , com desvio-padrão de  $0,002.s^{-1}$  para o grupo com tratamento por CET ( $p=0,113$ ).

Além disso, a partir das curvas obtidas foi possível determinar o período e, conseqüentemente, a frequência do ciclo de cada amostra. Os valores médios obtidos pelo teste-t pareado podem ser observados tanto para o segundo ciclo ( $p=0,084$ ) (Tabela 3), quanto para o terceiro ciclo ( $p=0,115$ ) (Tabela 4), não havendo diferença estatística entre os grupos.

Os parâmetros que podem ser mensurados ao aplicar um deslocamento cíclico e que estão associados ao caráter viscoelástico da cartilagem incluem energia dissipada, módulo dinâmico ( $E^*$ ), módulo de armazenamento ( $E'$ ), módulo de perda ( $E''$ ) e ângulo de fase ( $\delta$ ).

A análise estatística dos resultados de dissipação de energia, a partir do teste-t pareado, demonstrou não haver diferença estatística entre os grupos, tanto no segundo ( $p=0,384$ ), quanto no terceiro ( $p=0,409$ ) ciclos. No entanto, há uma tendência de menor dissipação de energia no grupo sem tratamento em comparação com o grupo com tratamento por CET (Tabela 3).

O valor absoluto de força máxima para cada grupo, de acordo com os ciclos, pode ser observado nas Tabela 3 e Tabela 4. A força máxima foi superior no grupo com tratamento por CET, tanto para o segundo ( $p=0,012$ ), quanto para o terceiro ciclos ( $p=0,014$ ). Em ambos os grupos, houve uma redução de seu valor do ciclo dois para o ciclo três. O valor de força máxima absoluta referente a cada amostra, em conjunto com o deslocamento máximo, serviu de parâmetro para o cálculo do  $E^*$ . As análises apresentadas a seguir foram realizadas pelo teste-t pareado.

Em relação ao  $E^*$ , seu valor para o segundo ciclo no grupo com tratamento foi superior em comparação ao grupo sem tratamento ( $p=0,012$ ). Já no terceiro ciclo,

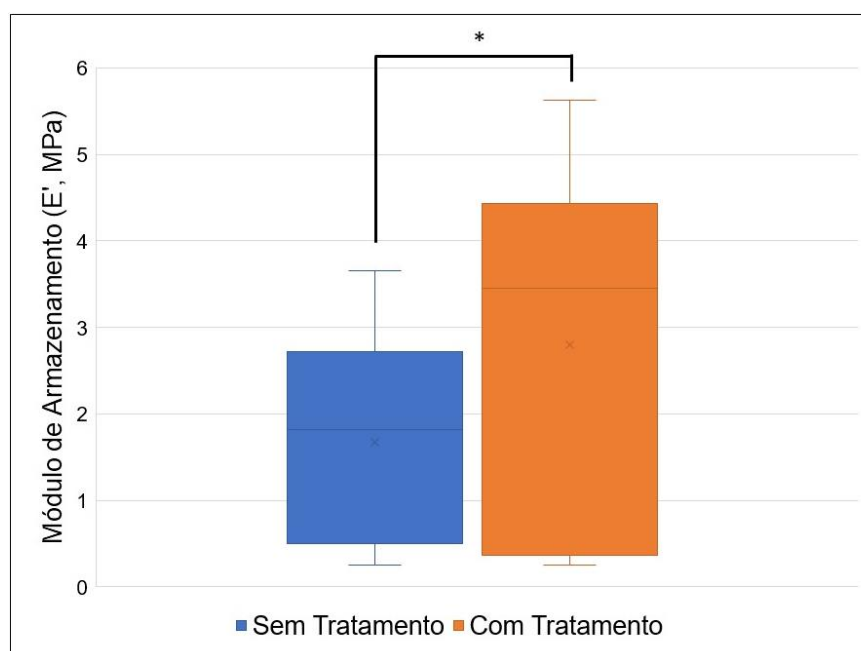
houve uma tendência de superioridade no grupo com tratamento ( $p=0,092$ ). O valor médio do  $E^*$  diminuiu entre um ciclo e outro para ambos os grupos (Tabela 3 e Tabela 4).

Em relação aos valores obtidos para o  $\bar{\sigma}$ , há uma tendência de superioridade nas amostras do grupo com tratamento, tanto no segundo ( $n=13$ ,  $p=0,086$ ), quanto no terceiro ciclos ( $n=11$ ,  $p=0,090$ ) (Tabela 3 e Tabela 4).

A partir de ambos os parâmetros mencionados foi possível calcular o  $E'$  e  $E''$ . O valor médio do  $E'$  foi superior ao  $E''$ , tanto comparando os grupos, quanto os ciclos.

O grupo com tratamento por CET apresentou valores de  $E'$  (Figura 21) e  $E''$  (Figura 22) superiores em comparação ao grupo sem tratamento, havendo diferença estatística em ambos para o segundo ciclo, com  $p=0,012$  e  $p=0,036$ , respectivamente (Tabela 3). No terceiro ciclo houve uma tendência de superioridade nas amostras do grupo com tratamento, tanto para o  $E'$  ( $n=12$ ,  $p=0,093$ ), quanto para o  $E''$  ( $n=12$ ,  $p=0,052$ ), em comparação ao grupo sem tratamento (Tabela 4).

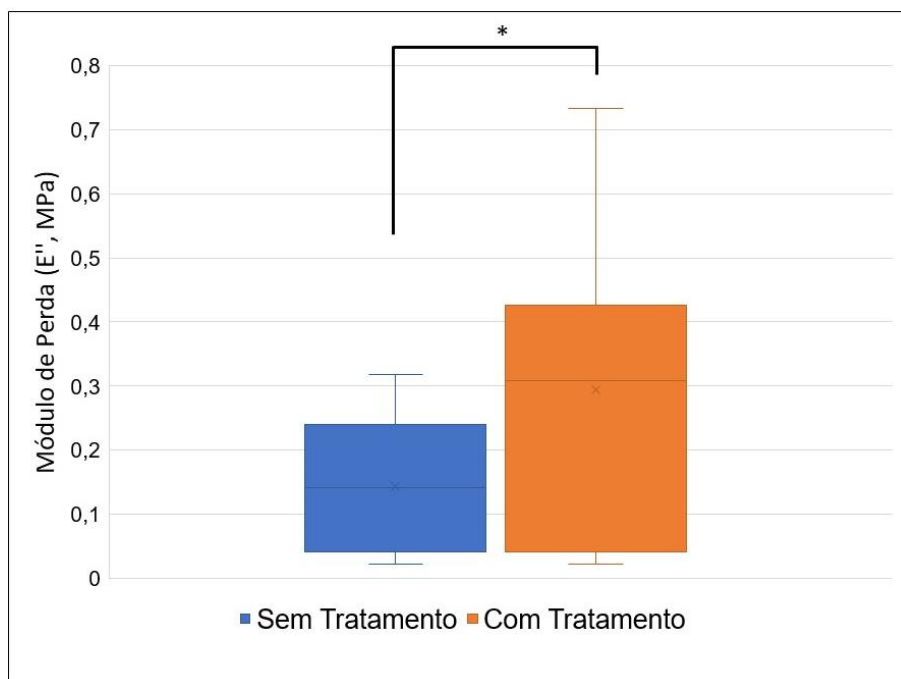
Figura 21 - Gráfico *boxplot* dos valores de módulo de armazenamento ( $E'$ , MPa) para o segundo ciclo, dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), obtidos com o teste de indentação



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: \*: probabilidade de significância = 0,012;  $E'$  = módulo de armazenamento; CET = construto de engenharia tecidual; MPa = mega Pascal.

Figura 22 - Gráfico *boxplot* dos valores de módulo de perda ( $E''$ , MPa) para o segundo ciclo, dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), obtidos com o teste de indentação



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: \*: probabilidade de significância = 0,036;  $E''$  = módulo de perda; CET = construto de engenharia tecidual; MPa = mega Pascal.

Tabela 3 - Resumo dos resultados obtidos para frequência (mHz), força máxima (N), energia dissipada (N.mm), ângulo de fase ( $^{\circ}$ ), módulos dinâmico ( $E^*$ , MPa), de armazenamento ( $E'$ , MPa) e de perda ( $E''$ , MPa), para o segundo ciclo, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET) (média  $\pm$  desvio-padrão)

Parâmetros	Ciclo 2			p
	n	Defeito	Defeito + CET	
Frequência (mHz)	13	64 $\pm$ 15	76 $\pm$ 16	n.s.
Força máxima (N)	12	3,04 $\pm$ 2,14	5,06 $\pm$ 3,70	< 0,05
Energia dissipada (N.mm)	13	0,10 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,11	n.s.
Ângulo de fase ( $^{\circ}$ )	13	5,0 $\pm$ 1,2	6,2 $\pm$ 1,2	n.s.
$E^*$ (MPa)	12	1,68 $\pm$ 1,18	2,81 $\pm$ 2,05	< 0,05
$E'$ (MPa)	12	1,68 $\pm$ 1,18	2,79 $\pm$ 2,04	< 0,05
$E''$ (MPa)	12	0,14 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,24	< 0,05

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; n = número de amostras; mHz = mili Hertz; N = Newton; mm = milímetros;  $^{\circ}$  = graus;  $E^*$  = módulo dinâmico;  $E'$  = módulo de armazenamento;  $E''$  = módulo de perda; MPa = mega Pascal; p = probabilidade de significância; n.s. = não significante.

Tabela 4 - Resumo dos resultados obtidos para frequência (mHz), força máxima (N), energia dissipada (N.mm), ângulo de fase ( $^{\circ}$ ), módulos dinâmico ( $E^*$ , MPa), de armazenamento ( $E'$ , MPa) e de perda ( $E''$ , MPa), para o terceiro ciclo, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET) (média  $\pm$  desvio-padrão)

Parâmetros	Ciclo 3			
	n	ST	CT	p
Frequência (mHz)	13	65 $\pm$ 12	76 $\pm$ 17	n.s.
Força máxima (N)	12	2,92 $\pm$ 2,05	4,85 $\pm$ 3,57	< 0,05
Energia dissipada (N.mm)	13	0,10 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,11	n.s.
Ângulo de fase ( $^{\circ}$ )	11	5,1 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 1,2	n.s.
$E^*$ (MPa)	12	1,62 $\pm$ 1,14	2,45 $\pm$ 2,12	n.s.
$E'$ (MPa)	12	1,61 $\pm$ 1,13	2,43 $\pm$ 2,11	n.s.
$E''$ (MPa)	12	0,13 $\pm$ 0,10	0,25 $\pm$ 0,24	n.s.

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; n = número de amostras; mHz = mili Hertz; N = Newton; mm = milímetros;  $^{\circ}$  = graus;  $E^*$  = módulo dinâmico;  $E'$  = módulo de armazenamento;  $E''$  = módulo de perda; MPa = mega Pascal; p = probabilidade de significância; n.s. = não significante.

Em relação à análise linear, foi possível determinar o módulo de elasticidade (E) com base na inclinação da reta, considerando o segmento linear, e a 5% de deslocamento da segunda e da terceira rampas do teste de indentação.

Para o cálculo do E a 5% de deslocamento e pelo segmento linear, somente algumas amostras atingiram o valor de  $R^2 > 0,98$ . Os resultados podem ser observados para o segundo (Tabela 5) e o terceiro (Tabela 6) ciclos.

Tabela 5 - Valores médios do módulo de elasticidade (E, MPa) a 5% de deslocamento e pela reta total, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de indentação no segundo ciclo (média  $\pm$  desvio-padrão)

Parâmetros (MPa)	Ciclo 2			
	n	Defeito	Defeito + CET	p
E em 5%	8	0,90 $\pm$ 0,79	1,41 $\pm$ 1,07	n.s.
E da reta	14	1,18 $\pm$ 0,85	1,35 $\pm$ 1,19	n.s.

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; n = número de amostras; E = módulo de elasticidade; MPa = mega Pascal; p = probabilidade de significância; n.s. = não significante.

Tabela 6 - Valores médios do módulo de elasticidade (E, MPa) a 5% de deslocamento e pela reta total, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de indentação no terceiro ciclo (média  $\pm$  desvio-padrão)

Parâmetros (MPa)	Ciclo 3			
	n	Defeito	Defeito + CET	p
E em 5%	11	0,95 $\pm$ 0,72	1,34 $\pm$ 0,92	n.s.
E da reta	13	1,13 $\pm$ 0,87	1,52 $\pm$ 1,20	n.s.

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; n = número de amostras; E = módulo de elasticidade; MPa = mega Pascal; p = probabilidade de significância; n.s. = não significante.

Ao realizar as análises lineares pelo cálculo do E, a aplicação do teste-t pareado demonstrou não haver diferença estatística entre os valores encontrados para as amostras sem tratamento e com tratamento por CET.

Ao analisar o módulo de elasticidade reduzido ( $E_r$ ) aos 10% da região superior da curva, tanto para o segundo quanto para o terceiro ciclos, apenas algumas amostras pareadas atingiram o valor de  $R^2 > 0,98$ . Os dados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores médios do módulo de elasticidade reduzido ( $E_r$ , MPa) derivados dos 10% da região superior da curva de descarga, nas amostras de cartilagem sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de indentação no segundo e terceiro ciclos (média  $\pm$  desvio-padrão)

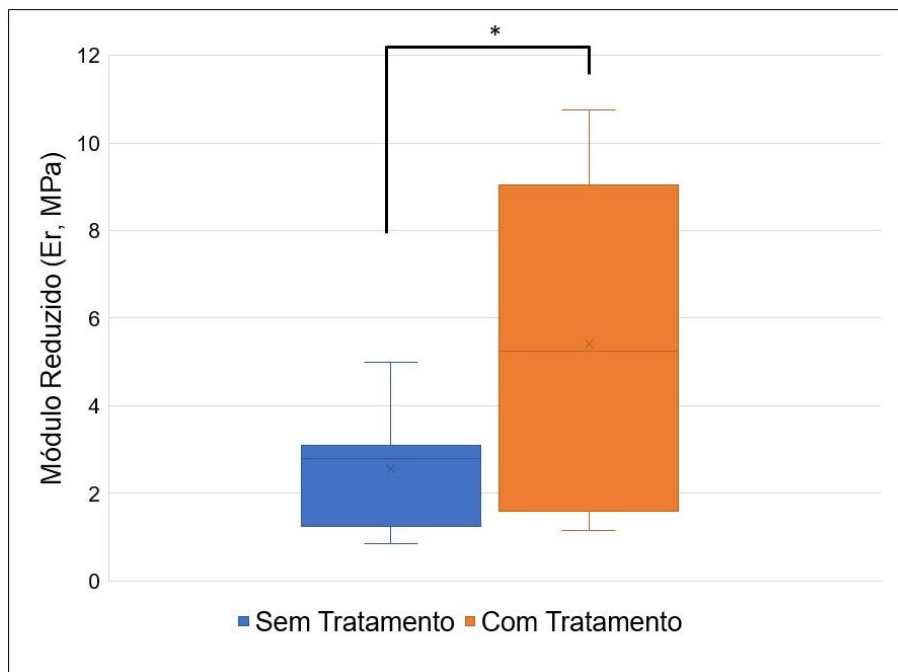
$E_r$ (MPa)	n	Defeito	Defeito + CET	p
Ciclo 2	11	2,56 $\pm$ 1,43	5,40 $\pm$ 3,42	< 0,05
Ciclo 3	10	3,65 $\pm$ 3,38	5,46 $\pm$ 3,74	n.s.

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; n = número de amostras;  $E_r$  = módulo de elasticidade reduzido; MPa = mega Pascal; p = probabilidade de significância; n.s. = não significante.

A aplicação do teste-t pareado demonstrou diferença estatística entre os valores encontrados para as amostras com tratamento por CET (n=11) e sem tratamento (n=11) aos 10% superiores da curva de descarga para o segundo ciclo (p=0,016), com um valor superior das amostras com tratamento por CET (Figura 23). Em relação ao terceiro ciclo, houve uma tendência de superioridade das amostras com tratamento em relação às amostras sem tratamento (p=0,072).

Figura 23 - Gráfico *boxplot* dos valores de módulo de elasticidade reduzido (Er, MPa) aos 10% da região superior da curva de descarga, para o segundo ciclo, dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET) obtidos com o teste de indentação



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

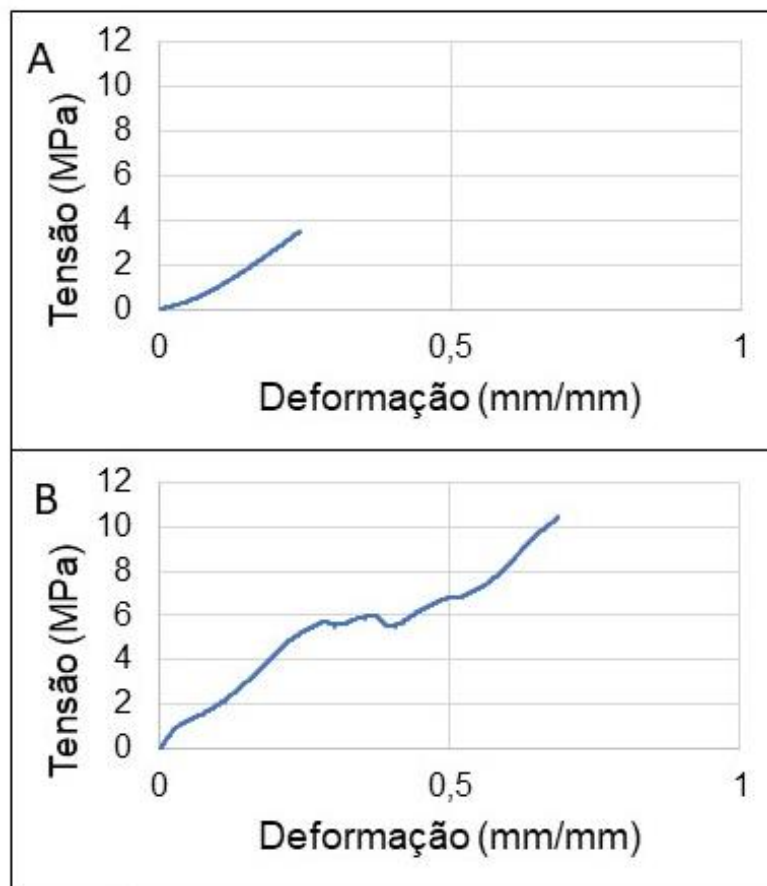
Nota: \*: probabilidade de significância = 0,016; Er = módulo de elasticidade reduzido; CET = construto de engenharia tecidual; MPa = mega Pascal.

### 5.2.2. Teste de compressão não confinada máxima

Pelo teste de compressão não confinada máxima, é possível observar como se comporta a curva de tensão-deformação do bloco osteocondral quando a amostra é submetida a uma carga de célula maior (100 N). Na Figura 24, observam-se as duas principais situações encontradas relativas ao comportamento do tecido, em amostras representativas, sem diferenciação entre as que foram ou não tratadas com CET.



Figura 24 - Gráficos de tensão (MPa) x deformação (mm/mm) a partir do teste de compressão não confinada máxima do bloco osteocondral, representando (A) amostra com deformação apenas na região de cartilagem e (B) deformidade da espessura da cartilagem e do osso



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: MPa = mega Pascal; mm = milímetros.

Na Figura 24-A, é possível observar a curva de tensão-deformação mostrando um comportamento quase-linear, cuja tensão submetida na amostra se restringiu à região de cartilagem ao atingir o carregamento máximo, ou seja, não encontrou o osso. Esse tipo de comportamento foi observado em 8 amostras tratadas com CET e em 9 amostras sem tratamento.

Na Figura 24-B, é possível observar a diferença entre a curva de tensão-deformação quando o compressor está na região de cartilagem, e a transição para a região óssea. Esse tipo de comportamento foi observado em 3 amostras tratadas com CET e 3 amostras sem tratamento.

As análises de compressão não confinada máxima objetivaram demonstrar a não linearidade da cartilagem articular, pelos diferentes valores obtidos do E, conforme deformação na amostra.

Assim, calculou-se o módulo tangente em duas regiões distintas pelo teste ANOVA de medidas repetidas, no intervalo de 0 a 5% e no de 30 a 40% de deformação relativa à espessura da cartilagem. As amostras consideradas para análise foram aquelas que atingiram o mínimo de 40% de deformação da cartilagem em ambos os grupos, sem tratamento e com tratamento por CET.

O E de ambos os grupos foi menor com o aumento da deformação e foi estatisticamente diferente considerando as duas zonas (n=8, p=0,016) (Tabela 8), resultado obtido a partir do teste ANOVA de medidas repetidas, comprovando a não linearidade do tecido na região da cartilagem (Figura 25). Comparativamente, o E entre os grupos com tratamento e sem tratamento considerando as zonas do tecido não teve diferença significativa.

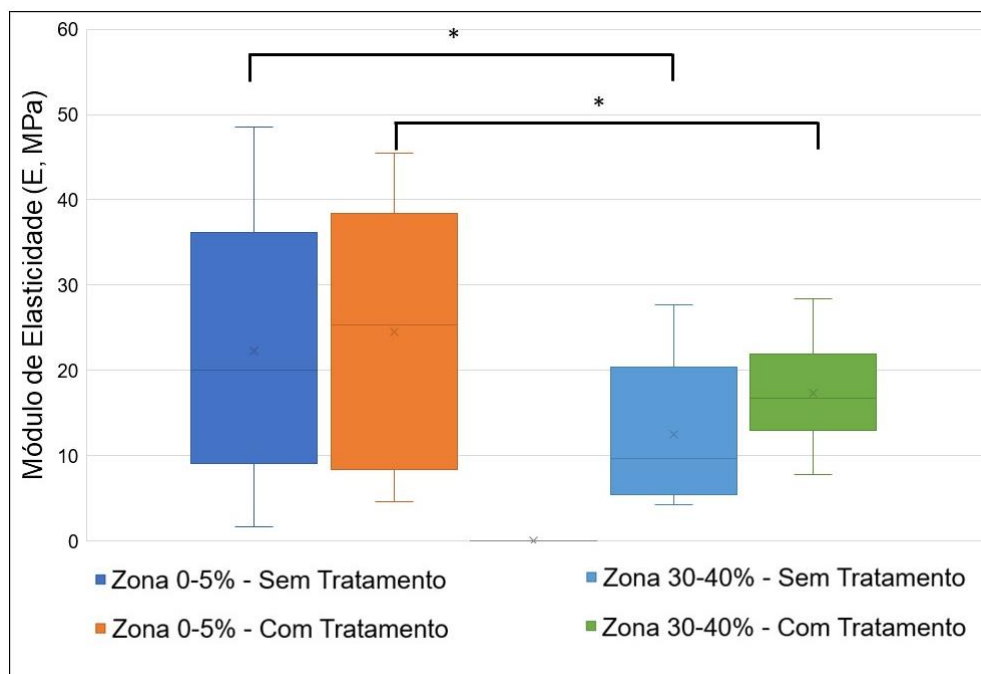
Tabela 8 - Valores médios do módulo de elasticidade (E, MPa) a 0-5% e 30-40% de deformação relativa à espessura da cartilagem, nas amostras sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de compressão não confinada máxima (média  $\pm$  desvio-padrão)

Parâmetro	Defeito (n=8)	Defeito + CET (n=8)	p
E em 0-5% (MPa)	22,3 $\pm$ 15,7	24,6 $\pm$ 15,4	n.s.
E em 30-40% (MPa)	12,5 $\pm$ 8,7	17,4 $\pm$ 6,3	n.s.

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; n = número de amostras; E = módulo de elasticidade; MPa = mega Pascal; p = probabilidade de significância; n.s. = não significante.

Figura 25 - Gráfico *boxplot* dos valores de módulo de elasticidade (E, MPa) dos grupos sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), considerando as zonas 0-5% e 30-40%, obtidos com o teste de compressão não confinada máxima



Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: \*: probabilidade de significância = 0,016; E = módulo de elasticidade; CET = construto de engenharia tecidual; MPa = mega Pascal.

A seguir, encontram-se os valores de tensão máxima obtidos para todas as amostras na região da cartilagem, independentemente da profundidade de deformação (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios de tensão máxima (MPa) atingidos na região da cartilagem, independentemente da profundidade de deformação, nas amostras sem tratamento (somente defeito) e com tratamento (defeito com CET), pelo teste de compressão não confinada máxima (média  $\pm$  desvio-padrão)

Parâmetro	Defeito (n=12)	Defeito + CET (n=11)	p
Tensão Máxima (MPa)	3,6 $\pm$ 0,9	3,7 $\pm$ 0,9	n.s.

Fonte: dados da pesquisa – Laboratório de Bioengenharia do InCor HC-FMUSP, mar/2018 a nov/2019.

Nota: CET = construto de engenharia tecidual; MPa = mega Pascal; n = número de amostras; p = probabilidade de significância; n.s. = não significante.

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo apresenta relevância por descrever testes mecânicos e propriedades da cartilagem após tratamento com engenharia tecidual, utilizando as técnicas de boas práticas de manipulação, sendo uma etapa fundamental ao considerar novas terapêuticas para as lesões da cartilagem, tendo em vista o impacto dessas patologias na biomecânica.

As diretrizes de boas práticas de manipulação são extremamente importantes ao considerar a translação de modelo animal para uso clínico em humanos. Estas garantem segurança e eficácia ao desenvolvimento de terapias celulares avançadas durante os processos de cultura celular. As diretrizes de boas práticas aplicadas por agências regulatórias como a ANVISA consideram as instalações laboratoriais em função da regularidade de inspeção, treinamento dos profissionais, manutenção dos equipamentos, avaliação de riscos e eventos adversos, entre outras categorias (9,12,177,178).

No presente estudo, utilizou-se modelo animal de médio porte. Conforme relatado por Mariano (2003) (179), Chu et al. (2010) (180) e Li et al. (2009), o modelo de joelho suíno apresenta características próximas a do joelho humano, tanto anatomicamente, quanto mecanicamente (181). Apesar de haver poucos estudos avaliando suas propriedades biomecânicas, Fakult & Roken (2012) (91), Ando et al. (2007) (65) e Machado (2015) (119) foram alguns dos autores que demonstraram em pesquisas prévias sua adequação para ensaios pré-clínicos e para esse tipo de avaliação.

O estudo de Fernandes et al. (2018) (80) avaliou o reparo da cartilagem com células provenientes da polpa do dente no mesmo modelo animal e relatou não haver intercorrências durante o procedimento cirúrgico ou no pós-operatório dos animais monitorados. Li et al. (2009) (181) demonstraram não haver reações imunológicas nos porcos em miniatura quando submetidos ao recebimento de células estromais mesenquimais (CEM) humanas, devido às suas atividades imunossupressoras, especificamente suprimindo atividades de linfócitos.

Esta pesquisa faz parte de um projeto temático que visa a comparar as estratégias de engenharia tecidual para restauração da cartilagem articular, utilizando CEM provenientes da polpa dentária e da sinóvia. Trata-se da continuidade de um trabalho previamente apresentado e aprovado pela banca sobre avaliação por imagem e histologia do construto de engenharia tecidual (CET) para restauração da cartilagem, em que identificou-se a importância de se estudar os parâmetros mecânicos (9,19,182).

Optou-se por utilizar duas linhagens celulares no grupo de intervenção, derivadas da polpa do dente e da sinóvia, comparando-se o grupo sem tratamento com apenas um único grupo de intervenção, sem distinção da origem das CEM, para aumentar o número do tamanho da amostra.

A comparação da restauração da cartilagem articular, após seis meses de implante do CET, foi avaliada através do teste de indentação e de compressão não confinada máxima, que fornecem informações valiosas e significativas para caracterização do tecido (38,118).

No presente estudo, houve a aplicação de deslocamento a uma velocidade constante, enquanto simultaneamente media-se a resposta ao estresse, caracterizando-se um perfil de rampa triangular (105,139,183), e houve a aplicação de três ciclos de força-deslocamento, caracterizando-se um teste dinâmico (93,105,107,126).

A velocidade aplicada para a avaliação mecânica foi de  $0,5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  (cerca de  $0,0083 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ), equivalente a uma taxa de deformação normalizada para espessura da cartilagem de  $0,007\cdot\text{s}^{-1}$ . Segundo a revisão sistemática feita por Patel et al. (2019) (93), os valores de velocidade aplicados nos testes mecânicos variam de  $0,001 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$  a aproximadamente  $1.000 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ , sendo que valores mais baixos, como o adotado neste estudo, podem ser aplicados a modelos lineares.

O teste de indentação do presente estudo está dentro do intervalo considerado clinicamente relevante e se enquadra como de pequena deformação, já que o deslocamento máximo foi de apenas 5% da média da espessura da cartilagem (65,66). Segundo Patel et al. (2019) (93), a cartilagem de um joelho saudável sofre deformações abaixo de 10%, com um pico de no máximo de 17%.

Neste estudo, a frequência obtida com os ciclos de força-deslocamento foi cerca de 0,07 Hz, enquadrando-se à proposta dos testes dinâmicos. Os valores de frequência impactam diretamente nas análises dinâmicas e usualmente variam de 0,01 a 100 Hz. O aumento da frequência está associado a um aumento na rigidez dos materiais (94), e valores muito altos não detectam as regiões viscoelásticas (93,184).

No presente estudo, o primeiro ciclo de força e deslocamento foi descartado e as análises foram baseadas no segundo e no terceiro ciclos. A diferença entre o pico máximo de força do segundo ciclo para o terceiro não ultrapassou 10%, indicando uma repetibilidade nos resultados. Por não haver grande variação entre os ciclos, é possível reproduzir o método para condições similares às fisiológicas e realizar as análises necessárias nesse intervalo (103,105).

Há poucas referências na literatura que descrevem a energia dissipada em tecidos biológicos. Reportam-se análises em tendão de ovelha, calcanhar humano (185), músculo do miocárdio (186), tecido cerebral (187) e tecido pulmonar (188). Os estudos encontrados para a descrição desse fenômeno em cartilagem são vagos e poucos reportam o valor absoluto da energia dissipada.

Entende-se, pela literatura, que valores mais altos de energia dissipada podem indicar maior capacidade do material em reduzir picos de carga e comportamento mais viscoso. Já valores mais baixos associam-se a danos mecânicos e estruturais, capazes de danificar o colágeno e reduzir proteoglicanos, desencadeando falta de resistência, ou seja, tecido mais mole (50). Além disso, o aumento repentino de dissipação de energia é encontrado em amostras fraturadas, sendo estas identificadas pela variação entre um ciclo e outro (91).

Ressalta-se que as amostras sem tratamento apresentaram valor médio de energia dissipada menor do que as amostras com tratamento por CET, mas sem significância estatística. Não houve aumento da dissipação de energia entre um ciclo e outro, indicação de que não houve fratura das amostras.

O presente estudo é um dos únicos a estudar a dissipação de energia na comparação de amostras sem e com tratamento por engenharia tecidual. Assim, o resultado apresentado sobre as análises de histerese é valioso e pode ser indicativo de reparo mecânico da cartilagem em amostras com tratamento por CET.

Oyen-Tiesma e Cook (2001) (172) indicam que a energia dissipada para um ciclo único foi de 20 a 25% da energia total para neocartilagem e, em estado de fratura, a energia dissipada dobrou para 40 a 60%. Além disso, antes de sofrerem rachadura ou fratura, as amostras tiveram decaimento da dissipação de energia. Han et al. (2021) (189) demonstraram como os mecanismos de dissipação de energia da cartilagem podem atrasar a ocorrência de fratura, através da estimativa de liberação de energia crítica na cartilagem intacta e com rachaduras. Em taxas de carregamento lentas, o processo de dissipação ocorre e é capaz de acomodar a carga, retardando as fraturas.

Simha et al. (1999) (190) demonstram apenas que atingiu o estado de estabilidade após cinco ciclos. Kelm (2002) (104), com um estudo mais abrangente, demonstra a energia dissipada em modelo bovino em diferentes taxas de deformações. A uma taxa de 5 mm/min, a média da histerese de quatro amostras foi menor do que  $100 \text{ J/mm}^3$  após o sexto ciclo. Weizel et al. (2020) (105) mostram a redução da área de histerese com os ciclos, sendo a maior queda entre o primeiro e o segundo. Hwang et al. (2022) (96) mostram que o aumento da osmolaridade e da viscosidade acarretam em um aumento da dissipação de energia.

Vazquez et al. (2018) (103) e Han et al. (2018) (134) sugerem que menor dissipação de energia reflete danos na matriz extracelular. A dissipação de energia é relatada como vital para retardar o início ou propagação da fratura e para a redução de picos de carga na cartilagem e no osso subcondral (91). Vazquez et al. (2018) (103) utiliza um modelo suíno para demonstrar que o aumento no número de ciclos pode ocasionar danos estruturais e amolecimento da cartilagem, devido à fadiga. A dissipação de energia diminuiu significativamente após 50.000 ciclos, de  $15,40 \pm 3,27 \text{ kJ/m}^3$  para  $12,28 \pm 4,26 \text{ kJ/m}^3$ . Han et al. (2018) (134) mostram como a cartilagem desidratada reduz a energia dissipada.

A partir da análise mecânica dinâmica também é possível calcular os valores de ângulo de fase, módulo dinâmico, módulo de armazenamento e módulo de perda. Para a descrição de um material viscoelástico, pelo menos dois desses parâmetros devem ser calculados (95).

No presente estudo, os ângulos de fases obtidos em ambos os grupos foram próximos de zero, em torno de  $5^\circ$  a  $6^\circ$ , indicando viscoelasticidade da cartilagem durante todo o experimento, com predomínio de comportamento elástico. Esse

mesmo comportamento foi observado em outros estudos, adicionando-se que em frequências acima de 40 Hz observa-se um comportamento inteiramente linear, com ângulo de fase igual a 0 (100,123).

Sabe-se que há uma relação direta entre a viscosidade dos materiais e a dissipação de energia. Logo, os resultados desta análise estão de acordo com os dados da literatura, tendo em vista que tanto a média do ângulo de fase, quanto a média de dissipação de energia foram maiores para um mesmo grupo, no caso, o grupo com tratamento (96,134).

Considerando os outros parâmetros da análise mecânica dinâmica do presente estudo, como módulo dinâmico, de armazenamento e de perda, foram encontrados resultados estatísticos significativos ao comparar o grupo com tratamento por CET e sem tratamento para o segundo ciclo, e houve tendência de superioridade do grupo com tratamento para o terceiro ciclo, suportando a ideia de restauração da cartilagem nas amostras tratadas com CET.

Acredita-se que um maior valor de módulo dinâmico esteja associado com maior suporte de carga, visto que uma das funções da cartilagem, mais especificamente da região superficial, é limitar a expansão radial (191). Além disso, segundo Sadeghi et al. (2015) (192), o módulo dinâmico obtido a uma frequência acima de 0,01 Hz é relevante para a marcha. Um valor superior de módulo dinâmico foi obtido no grupo com tratamento.

Em relação aos parâmetros de módulo de armazenamento e módulo de perda, os estudos de Jeng et al. (2013) (94), Fulcher et al. (2009) (100), entre outros descritos por eles, demonstraram valores superiores em amostras com tratamento ou saudáveis, em comparação às amostras sem tratamento ou danificadas (99,127).

Jeng et al. (2013) (94) demonstraram, pelo valor inferior de módulo de armazenamento na cartilagem danificada, que esta possui menor capacidade de recondicionar o tecido à sua origem. Assim, inferiram que um menor valor de módulo de perda, nessa mesma condição, indica menor viscosidade e menor capacidade de proporcionar um efeito de absorção de choque durante a movimentação (94).

Temple et al. (2016) (99), Sadeghi et al. (2015) (192) e outros estudos apontam valores superiores de módulo de armazenamento em relação ao módulo de perda, o mesmo encontrado no presente trabalho.



Além dos parâmetros viscoelásticos descritos, um dos principais parâmetros de análises de testes mecânicos para tecidos biológicos é a determinação do módulo de elasticidade e do módulo de elasticidade reduzido, baseado na resposta linear inicial do teste mecânico (102). Apesar de se ter conhecimento de que a cartilagem é um tecido heterogêneo, não linear, dependente do tempo e anisotrópico, muitos estudos, inclusive este, também a considera homogênea e linear (34,119,126,193).

Sabe-se que lesões da cartilagem, mais especificamente a osteoartrite, reduzem a rigidez do tecido (148). Assim, um valor superior de módulo de elasticidade (E) e módulo de elasticidade reduzido (Er) indica maior capacidade do tecido em armazenar energia quando deformado, maior rigidez e resistência à deformação elástica. Além disso, diversos estudos mostram uma redução do módulo de elasticidade de 20 a 80% quando o tecido apresenta osteoartrite inicial, em comparação a um tecido saudável (50,94,115,148,172,194,195).

No presente trabalho, observou-se uma tendência de superioridade no valor de módulo de elasticidade para as amostras que receberam tratamento com CET, com variação de até 29% de seu valor médio em relação ao grupo sem tratamento.

Fakult e Ronken (2012) (91) e Brown et al. (2007) (196) demonstraram que, em estágio inicial de degradação do tecido, as propriedades mecânicas da cartilagem podem estar dentro da variação normal do tecido, havendo dificuldade de destacar a divergência mecânica. Sendo assim, acredita-se que o grupo com tratamento por CET tenha uma tendência maior de reparo em comparação ao grupo sem tratamento.

Diversos trabalhos comparam amostras com defeito na cartilagem em relação a amostras tratadas com engenharia tecidual. O tipo de intervenção similar ao presente estudo foi reportado nos trabalhos do grupo de pesquisa de Ando et al. (2007) (65), Katakai et al. (2009) (66), Shimomura et al. (2010) (15) e Nansai et al. (2011) (140). Eles avaliaram o módulo de elasticidade da cartilagem articular em modelo suíno maduro e imaturo, a diferentes taxas de compressão, comparando amostras com defeito, com tratamento por CET e cartilagem normal, a 5% de deformação e para o segmento linear.

No presente estudo, pelo teste de indentação, obteve-se uma tendência de superioridade do módulo de elasticidade nas amostras com tratamento, em todos os casos analisados, tanto a 5% de deslocamento, quanto pelo segmento linear.

Nansai et al. (2011) (140) utilizaram teste de indentação e histológico para comparação entre suínos maduros e imaturos. Em oposição aos resultados do presente estudo, eles encontraram um valor médio de módulo de elasticidade maior na cartilagem normal, seguida do grupo com defeito e depois tratado com CET. Em suínos imaturos, houve diferença significativa entre a cartilagem normal e os grupos com defeito e tratados com CET. Já em suínos maduros, a diferença foi somente entre cartilagem normal e grupo com CET.

Com esses resultados combinados aos dados histológicos, surgiu a discussão de que o CET potencializa o reparo em defeitos condrais, mas com influência de fatores localizados no fundo do defeito, atrasando o reparo superficial (140). Essa discussão contribui com os resultados obtidos no presente estudo.

Ando et al. (2007) (65), Katakai et al. (2009) (66) e Shimomura et al. (2010) (15) aplicaram teste de compressão não confinada, considerando taxa de compressão de 0,04 mm/s e 0,1 mm/s. Esse protocolo foi diferente do aplicado no presente estudo para cálculo do módulo de elasticidade, mas o tipo de intervenção e as regiões de análises foram as mesmas.

Assim como no presente estudo, eles demonstraram, em todos os casos, uma tendência de superioridade do módulo de elasticidade nas amostras com tratamento por CET em relação ao grupo somente com defeito. A significância estatística foi encontrada por eles em apenas dois casos: o primeiro entre amostra de cartilagem normal e com defeito, em suínos maduros e imaturos, a uma taxa de 0,04 mm/s, considerando 5% de deformação (15); o segundo entre amostra com tratamento com CET e defeito, sem diferenciar a maturidade, a uma taxa de 0,1 mm/s, a 5% de deformação e pelo segmento linear (65,66).

Nesse segundo caso, similar ao presente estudo devido à comparação entre grupo com tratamento e grupo somente com defeito, a significância estatística foi encontrada a uma taxa de 0,1 mm/s, mas não a 0,04 mm/s, taxa inferior. Destaca-se que a taxa utilizada no presente estudo foi inferior a 0,04 mm/s, contribuindo para os resultados.

Como referência, nos estudos de Ando et al. (2007) (65) e Katakai et al. (2009) (66), o módulo tangente (ou módulo de elasticidade) encontrado a uma taxa de 0,1 mm/s no grupo tratado com CET foi de 0,875 MPa a 5% de deslocamento e,

considerando o segmento linear, foi de 1,65 MPa. Já nas amostras com defeito, o valor médio exato não é esclarecido (65,66). No presente estudo, considerando o segmento linear para o segundo ciclo, o valor de módulo de elasticidade (média  $\pm$  desvio-padrão) obtido no grupo com tratamento foi de  $0,90 \pm 0,79$  MPa a 5% de deslocamento e de  $1,35 \pm 1,19$  MPa para o segmento linear, valores próximos ao da literatura.

Schaefer et al. (2002) (197), pelo teste de indentação, compararam o módulo de elasticidade em equilíbrio de modelo animal em coelho entre o grupo somente com defeito, três grupos com tratamento e grupo controle. Os valores obtidos por Schaefer et al. (2002) (197) no grupo com tratamento se aproximaram ao do grupo controle, havendo diferença significativa apenas entre o grupo sem tratamento ( $0,37 \pm 0,17$ , MPa) e o controle ( $0,84 \pm 0,28$ , MPa) (média  $\pm$  desvio-padrão).

Já o trabalho de Mixon et al. (2021) (198) avalia o módulo de elasticidade pelo teste de indentação em amostras bovinas *in vitro*. Dentre os três grupos de amostras degradadas comparadas no estudo, apenas um foi estatisticamente diferente, apontando um valor 33% inferior às amostras controle. Nos outros grupos, o módulo de elasticidade teve tendência de superioridade nas amostras controle (198).

Tanto Schaefer et al. (2002) (197) quanto Mixon et al. (2021) (198) realizaram teste de indentação e demonstraram a tendência de superioridade do módulo de elasticidade no grupo com tratamento por engenharia tecidual ou grupo controle, em relação ao grupo somente com defeito. Esses resultados estão próximos aos obtidos no presente estudo.

O módulo de elasticidade pode ser calculado com a amostra em equilíbrio ou de forma instantânea. Quando a amostra está em equilíbrio, indica-se a ausência de fluxo de líquido durante a avaliação, somente a matriz sólida suporta carga. Já quando há fluxo de líquido na matriz sólida durante o experimento, diz-se que o sistema produz uma resposta instantânea

No presente estudo, os valores obtidos do módulo de elasticidade foram calculados pela resposta instantânea do sistema. Como referência e considerando o cálculo do módulo de elasticidade a 5% de deslocamento para o segundo ciclo, obtiveram-se os valores de (média  $\pm$  desvio-padrão)  $0,90 \pm 0,79$  para o grupo sem tratamento, e  $1,41 \pm 1,07$  para o grupo com tratamento.

Segundo o estudo de Jin e Lewis (2004) (171), o módulo de elasticidade em resposta instantânea acarreta um valor superior em comparação à resposta em equilíbrio, tendo eles obtido os valores para cartilagem saudável (média  $\pm$  desvio-padrão) de  $1,79 \pm 0,59$  MPa e  $0,45 \pm 0,26$  MPa, respectivamente, pelo teste de indentação em modelo animal bovino. O mesmo comportamento foi demonstrado no estudo de Irianto et al. (2014) (199).

Ressalta-se que os estudos de Kelm et al. (2002) (104) e Mansour (2003) (34) apresentam variação no valor do módulo de elasticidade em equilíbrio da cartilagem articular humana entre 0,3 e 1 MPa. Já o estudo de Edelsten et al. (2010) (81) avalia como sendo entre 1 e 10 MPa as taxas de carregamento baixas. Os valores apresentados na literatura para cartilagem humana são próximos dos obtidos neste estudo.

Os dados das análises lineares reportados anteriormente consideraram o módulo de elasticidade da curva de carga, o E. No entanto, seguindo o método do teste de indentação instrumentada padronizado pela ASTM E2546-15, o cálculo do módulo de elasticidade realizado no início da curva de descarga, conhecido como módulo de elasticidade reduzido,  $E_r$ , é a região mais significativa de análise (200).

No presente estudo, o cálculo do módulo de elasticidade reduzido, no início da curva de descarga, foi superior no grupo com tratamento em comparação ao grupo somente com defeito.

Nos estudos de Jeng et al. (2013) (94) e Franke et al. (2007) (133), foi utilizado teste de indentação mesoescalar com indentador de raio de 100 micrometros, categorizando um diâmetro entre a escala macro e microscópica, e nanoescalar com um indentador de raio na escala nanométrica. Ambos utilizaram modelo suíno e o módulo reduzido encontrado nas amostras danificadas foi inferior às amostras saudáveis. No presente estudo, houve diferença significativa entre os grupos com tratamento e sem tratamento ao analisar os 10% da região superior da curva de carga, mesmo intervalo reportado por Franke et al. (2007) (133). Pode-se dizer que o grupo com tratamento já se encontra com uma capacidade superior de suportar mais carga sem sofrer deformação permanente, reduzindo possíveis danos ao tecido.

Em relação ao ensaio de compressão máxima, este é pouco encontrado na literatura, mas é um importante ensaio mecânico de caracterização, estando na

diretriz da Food and Drug Administration (FDA) e utilizado nesta pesquisa tanto para avaliar a diferença entre as zonas, quanto as condições mais extremas (119,201).

Na literatura encontram-se diferentes trabalhos que avaliam as zonas da cartilagem por teste de compressão confinada (202–204), não confinada (116,119,173,205,206) e indentação (35,158,201,207). Park et al. (2003), que aplicam o teste de compressão não confinada, tiveram o objetivo principal de avaliar a pressurização do fluido intersticial nas diferentes zonas, visto que impacta na rigidez da cartilagem quando submetida a cargas dinâmicas (116).

O presente trabalho demonstra menor módulo de elasticidade conforme há aumento da deformação, com diferença estatística entre as zonas superficiais (0 a 5% de deformação relativa à espessura da cartilagem) e médias (30 a 40% de deformação relativa à espessura da cartilagem) em ambos os grupos, sem tratamento e com tratamento. Resultado similar a esse é encontrado em dois estudos que utilizaram modelo suíno. O primeiro é no estudo de McLeod et al. (2013) (35), onde foi possível observar decaimento do módulo de elasticidade com a profundidade, sem significância estatística entre as zonas, a partir do teste de microindentação na cartilagem. O segundo é no estudo de Gannon et al. (2015) (191)(206), em que foi determinado o módulo de elasticidade em equilíbrio do bloco osteocondral através do teste de compressão não confinada e também foi observada redução do valor com a profundidade.

Em oposição a esses resultados, estudos anteriores, que também analisaram a dependência do módulo de elasticidade de acordo com as zonas da cartilagem, demonstraram haver aumento dessa variável com o aumento da deformação na amostra. Esses estudos foram realizados em cartilagem humana, bovina e de coelho, a partir dos testes de indentação e compressão confinada (158,202,203,207).

A matriz extracelular da cartilagem varia com a profundidade, tanto em relação à estrutura, quanto à composição. Assim, a diferença de gradiente pode ser justificada pelo tipo de teste mecânico aplicado, pela variação da composição da matriz extracelular e pelo modelo de cartilagem utilizado, visto que os estudos da literatura em modelo suíno, incluindo este, apresentaram o mesmo comportamento do módulo de elasticidade (30,34,35,95).

Em relação à caracterização de falha da cartilagem articular, na literatura encontrou-se um estudo realizado pelos testes de compressão confinada e não confinada (119), e outro para caracterização de falha da cartilagem articular executado através de um teste de indentação cíclico (201).

O estudo de Machado (2015) (119) é o que mais se aproxima deste, visto que se utilizou amostras de bloco osteocondral de modelo suíno submetidas à compressão não confinada contínua. A falha das amostras ocorreu com a desidratação do tecido e a um valor de tensão (média  $\pm$  desvio-padrão) de  $63,5 \pm 34,6$  MPa. No presente estudo, a tensão máxima atingida foi de  $3,7 \pm 0,9$  MPa, no grupo com tratamento, e  $3,6 \pm 0,9$  MPa, no grupo sem tratamento. Um diferencial foi que as amostras de Machado (2015) (119) foram submetidas a uma carga de 4.900 N, com falha do tecido a partir de 1.250 N de carga, e não houve comparação entre amostras tratadas e não tratadas.

Considerando que a carga máxima do equipamento do presente estudo foi de 100 N, as amostras de ambos os grupos apresentaram comportamento dentro do esperado, visto que a carga de falha tecidual reportada por Machado (2015) (119) é cerca de 20 vezes maior do que a reportada no presente estudo, e a tensão de ruptura sem alterações no tecido é a partir de 35 MPa, aproximadamente.

O estudo de Kerin et al. (1998) (201) utilizou amostras de cartilagem bovina (e não bloco osteocondral) submetidas a um teste de indentação cíclica. A falha ocorreu a uma tensão de 35,7 MPa, com um módulo de elasticidade de 119 MPa (201), reforçando os dados obtidos por Machado (2015) (119).

Há também o estudo de Han et al. (2021) (189), já mencionado, que teve como um dos objetivos entender os mecanismos de falha da cartilagem. Foi demonstrado que pequenas rachaduras na cartilagem não tendem a crescer quando são inferiores a 100 microns, sugerindo que a cartilagem é capaz de tolerar pequenas falhas, antes de sua fratura total.

Dessa forma, sugere-se que a aplicação de 100 N de carga no bloco osteocondral pode ter ocasionado fratura óssea e produzido pequenas falhas na cartilagem que não levaram a sua fratura, logo não foi visualizada na avaliação mecânica do presente estudo. Estudos como os de Hu et al. (2021) (208), Stewart & Kawcak (2018) (209), Kazemi & Williams (2021) (210) e Johnston et al. (2016) (211)

mostram que há uma relação direta e indireta entre o osso subcondral e a cartilagem, tanto no aspecto biológico quanto no mecânico. A aplicação de carga na cartilagem é transmitida para o osso subcondral e este se adapta através do processo de remodelação de acordo com a intensidade e a direção da carga, de forma a distribuir as forças e minimizar tensões de cisalhamento na camada mais profunda da cartilagem. No entanto, quando essa carga é muito elevada, o osso engrossa, havendo diminuição da sua elasticidade e afetando a capacidade da cartilagem em suportar cargas. Há um aumento das tensões na base da cartilagem articular, resultando em falhas na zona profunda que, com carga contínua, progridem para a superfície do tecido (208–211).

Este estudo apresenta algumas limitações. Apesar de ser um desafio escolher o protocolo ideal para a realização dos testes mecânicos, a recomendação para avaliação da cartilagem, seguindo os documentos da FDA e da ICRS, envolve testes dinâmicos e estáticos, incluindo aqueles dependentes do tempo e de caracterização de falha tecidual. Neste estudo foi realizado apenas um teste dinâmico e um de falha tecidual. Os testes estáticos incluem ensaios de fluência ou relaxação de tensão para caracterizar a variável dependente do tempo e envolvem a extração de outros parâmetros, que não foram escopo do presente trabalho (93,129,130,133,170,212). Além disso, Patel et al. (2019) (93) realizaram uma revisão sistemática sobre testes mecânicos aplicados à cartilagem articular e publicaram algumas recomendações acerca dos parâmetros e protocolos de teste que não são encontrados nas normas mencionadas, como especificações acerca das taxas de deformação e do tempo de equilíbrio para testes dependentes de tempo, que não foram realizados no presente estudo, e de deformação máxima, já relatado. Todavia, essas recomendações foram publicadas posteriormente à realização dos testes contidos no presente trabalho; desta forma, seguiu-se o preconizado na norma E2546-15 da American Society for Testing and Materials (ASTM) (131).

O teste de indentação do presente estudo foi macroescalar, mas para se ter mais precisão e melhor resolução de imagens para outras análises, o uso de um microscópio de força atômica seria interessante (94,140,152).

O teste de compressão máxima não confinada mostrou-se um desafio a ser avaliado em relação à falha tecidual, tanto pela falta de estudos similares, quanto pela quantidade de amostras passíveis de serem analisadas.

Uma última limitação foi a não coleta de amostras de cartilagem saudável para comparação com as amostras somente com defeito e com implantação do CET.

Apesar dessas limitações, o presente estudo foi capaz de realizar as comparações entre os grupos sem tratamento e com tratamento por implantação do CET, semelhante a pesquisas anteriores. Os resultados apresentados contribuem para a linha de estudo de avaliação mecânica da cartilagem após tratamento com engenharia tecidual utilizando a técnica de boas práticas de manipulação.

A continuidade dessa linha de pesquisa poderá ser realizada de diferentes formas, tanto pela combinação com a análise histológica, quanto pela modelagem de elementos finitos.

Como próximos passos, a comparação dos resultados histológicos com os biomecânicos para avaliação da qualidade da cartilagem em combinação com suas propriedades físicas pode trazer inúmeros benefícios para o estudo (195,198). Segundo Athanasiou et al. (2000) (41), a formação de fibrocartilagem de reparo serve apenas como correção biomecânica temporária, mas não a longo prazo, podendo esse tipo de tecido influenciar nas respostas mecânicas obtidas. Conforme mencionado, o estudo de Brown et al. (2007) (196) demonstrou que muitas vezes as propriedades de amostras com degradação se assemelham às amostras normais, sendo a avaliação histológica interessante para essa distinção.

Também seria interessante realizar a modelagem por elementos finitos. Esta é uma análise numérica que visa a obter soluções aproximadas para diversos problemas da engenharia, a partir da simulação computacional de um sistema. Esse tipo de avaliação tem vasta aplicação na área de engenharia tecidual e pode ser utilizado para mimetizar as estruturas e os comportamentos de órgãos e tecidos e para investigar patologias, como lesões da cartilagem e osteoartrite. Outra aplicação é para a caracterização biomecânica de amostras biológicas, em que é possível visualizar a distribuição de carga em tecidos cartilagosos normais e danificados (171). Segundo Cheng et al. (2004) (213), o uso de elementos finitos com métodos estatísticos é interessante para extrair as propriedades da cartilagem a partir do teste de indentação e em ambiente *ex-vivo*.



Espera-se que, em breve, esses resultados contribuam para a translação da tecnologia do construto de engenharia tecidual para intervenções em lesões da cartilagem em humanos na prática clínica.

## 7. CONCLUSÃO

As propriedades viscoelásticas da cartilagem de não linearidade e heterogeneidade em diferentes zonas foi confirmada pelos testes mecânicos. Observou-se que o grupo com tratamento por construto de engenharia tecidual (CET), em comparação ao grupo sem tratamento somente com defeito, apresentou maior capacidade de absorção de choque, rigidez e resistência à deformação elástica.

## REFERÊNCIAS‡

1. Perera JR, Gikas PD, Bentley G. The present state of treatments for articular cartilage defects in the knee. *Ann R Coll Surg Engl.* 2012;94(6):381–7.
2. Chu CR, Rodeo S, Bhutani N, Goodrich LR, Huard J, Irrgang J, et al. Optimizing Clinical Use of Biologics in Orthopaedic Surgery: Consensus Recommendations from the 2018 AAOS/NIH U-13 Conference. *J Am Acad Orthop Surg.* 2019;27(2):E50–63.
3. Arthritis Foundation. Arthritis by the numbers. Arthritis Found [Internet]. 2019;1–70. Available from: <https://www.arthritis.org/getmedia/e1256607-fa87-4593-aa8a-8db4f291072a/2019-abtn-final-march-2019.pdf>
4. United States Bone and Joint Initiative. The Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States [Internet]. Available from: <https://www.boneandjointburden.org/fact-sheets>
5. Flanigan DC, Harris JD, Trinh TQ, Siston RA, Brophy RH. Prevalence of chondral defects in Athletes' Knees: A systematic review. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(10):1795–801.
6. Gomoll AH, Madry H, Knutsen G, van Dijk N, Seil R, Brittberg M, et al. The subchondral bone in articular cartilage repair: Current problems in the surgical management. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):434–47.
7. Niethammer TR, Limbrunner K, Betz OB, Gülecüyüz MF, Pietschmann MF, Feist M, et al. Analysis of the autologous chondrocyte quality of matrix-based autologous chondrocyte implantation in the knee joint. *Int Orthop.* 2016;40(1):205–12.
8. Ando W, Tateishi K, Katakai D, Hart DA, Higuchi C, Nakata K, et al. In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: Biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Eng - Part A.* 2008;14(12):2041–9.

---

‡ De acordo com Estilo Vancouver.

9. Fernandes TL, Kimura HA, Pinheiro CCG, Shimomura K, Nakamura N, Ferreira JR, et al. Human synovial mesenchymal stem cells good manufacturing practices for articular cartilage regeneration. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2018;24(12):709–16.
10. Zainal Ariffin SH, Kermani S, Megat Abdul Wahab R, Senafi S, Zainal Ariffin Z, Abdul Razak M. In vitro chondrogenesis transformation study of mouse dental pulp stem cells. *Sci World J*. 2012;2012.
11. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;412(412):196–212.
12. Pinheiro CCG, Leyendecker Junior A, Tanikawa DYS, Ferreira JRM, Jarrahy R, Bueno DF. Is There a Noninvasive Source of MSCs Isolated with GMP Methods with Better Osteogenic Potential? *Stem Cells Int*. 2019;2019.
13. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2521–9.
14. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005;80(6):836–42.
15. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, et al. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials* [Internet]. 2010;31(31):8004–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.017>
16. Shimomura K, Yasui Y, Koizumi K, Chijimatsu R, Hart DA, Yonetani Y, et al. First-in-Human Pilot Study of Implantation of a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Generated From Autologous Synovial Mesenchymal Stem Cells for Repair of Knee Chondral Lesions. *Am J Sports Med*. 2018;46(10):2384–93.
17. Shimomura K, Ando W, Hart DA, Yonetani Y, Horibe S, Nakamura N. Five-Year Outcomes After Implantation of a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct Generated From Autologous Synovial Mesenchymal Stromal Cells for Repair of

- Knee Chondral Lesions. *Orthop J Sport Med.* 2023;11(8):1–7.
18. Rezende MU of, Hernandez AJ, Camanho GL, Amatuzzi MM. Cartilagem Articular e Osteoartrose. *Acta Ortopédica Bras.* 2000;8(2):100–4.
  19. Fernandes TL, Cortez De Santanna JP, Frisene I, Gazarini JP, Gomes Pinheiro CC, Gomoll AH, et al. Systematic Review of Human Dental Pulp Stem Cells for Cartilage Regeneration. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2020;26(1):1–12.
  20. Pal S. Mechanical Properties of Biological Materials. *Des Artif Hum Joints Organs.* 2014;9781461462:1–419.
  21. Bueno DF. Bone Tissue Engineering With Dental Pulp Stem Cells for Alveolar Cleft Repair [Internet]. *ClinicalTrials.gov.* 2019. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03766217?id=NCT03766217&rank=1&load=cart>
  22. Fernandes TL, Gomoll AH, Lattermann C, Hernandez AJ, Bueno DF, Amano MT. Macrophage: A Potential Target on Cartilage Regeneration. *Front Immunol.* 2020;11(February):1–9.
  23. Santanna JPC, Faria RR, Assad IP, Pinheiro CCG, Aiello VD, Albuquerque-Neto C, et al. Tissue Engineering and Cell Therapy for Cartilage Repair: Preclinical Evaluation Methods. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2022;28(2):73–82.
  24. Carter RE, Lubinsky J, Domholdt E. *Rehabilitation Research: Principles and Applications.* 4th ed. 1. Carter RE, Lubinsky J, Domholdt E. *Rehabilitation Research: Principles and Applications.* 4th ed. St. Louis MES 2011., editor. St. Louis, Mo: Elsevier Saunders; 2011.
  25. Marieb E, Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology.* Pearson; 2018. 1264 p.
  26. Sousa ASP, Silva A, Tavares JMRS. Biomechanical and neurophysiological mechanisms related to postural control and efficiency of movement: A review. *Somatosens Mot Res.* 2012;29(4):131–43.
  27. Kerkman JN, Daffertshofer A, Gollo LL, Breakspear M, Boonstra TW. Network structure of the human musculoskeletal system shapes neural interactions on multiple time scales. *Sci Adv.* 2018;4(6):1–11.
  28. Chhabra A, Elliott CC, Miller MD. Normal anatomy and biomechanics of the

- knee. *Sports Med Arthrosc.* 2001;9(3):166–77.
29. Flandry F, Hommel G. Normal anatomy and biomechanics of the knee. *Sports Med Arthrosc.* 2011;19(2):82–92.
30. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1(6):461–8.
31. Meyers M, Engineering A, Diego S, Conferences E, Senior H, Award S, et al. Mechanical behavior of materials. Vol. 46, Choice Reviews Online. 2009. 46-6830-46–6830 p.
32. Jacob G, Shimomura K, Nakamura N. Osteochondral Injury, Management and Tissue Engineering Approaches. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(November):1–14.
33. Fujie H, Nansai R, Ando W, Shimomura K, Moriguchi Y, Hart DA, et al. Zone-specific integrated cartilage repair using a scaffold-free tissue engineered construct derived from allogenic synovial mesenchymal stem cells: Biomechanical and histological assessments. *J Biomech* [Internet]. 2015;48(15):4101–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.10.015>
34. Mansour JM. Biomechanics of Cartilage in: *Kinesiol. Mech. pathomechanics Hum. Mov. Kinesiol Mech pathomechanics Hum Mov* [Internet]. 2003;66– 75. Available from: [http://web.mit.edu/cortiz/www/3.052/3.052CourseReader/27\\_BiomechanicsofCartilage.pdf](http://web.mit.edu/cortiz/www/3.052/3.052CourseReader/27_BiomechanicsofCartilage.pdf)
35. McLeod MA, Wilusz RE, Guilak F. Depth-dependent anisotropy of the micromechanical properties of the extracellular and pericellular matrices of articular cartilage evaluated via atomic force microscopy. *J Biomech* [Internet]. 2013;46(3):586–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.09.003>
36. Simon TM, Jackson DW. Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options. *Sports Med Arthrosc.* 2018;26(1):146–54.
37. Muir H, Bullough P, Maroudas A. The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. *J Bone Joint Surg Br.* 1970;52(3):554–63.

38. Eschweiler J, Horn N, Rath B, Betsch M, Baroncini A, Tingart M, et al. The Biomechanics of Cartilage — An Overview. *Life*. 2021;11(302):1–14.
39. Cruz IBM da, Severo AL, Azzolin VF, Garcia LFM, Kuhn A, Lech O. Regenerative potential of the cartilaginous tissue in mesenchymal stem cells: update, limitations, and challenges. *Rev Bras Ortop (English Ed)*. 2017;52(1):2–10.
40. Griffin M, Premakumar Y, Seifalian A, Butler PE, Szarko M. Biomechanical characterization of human soft tissues using indentation and tensile testing. *J Vis Exp*. 2016;2016(118):1–8.
41. Athanasiou KA, Darling EM, Hu JC. Articular Cartilage Tissue Engineering. Vol. 1, e-biomed: The Journal of Regenerative Medicine. 2000. 99–114 p.
42. Wineman A. Nonlinear viscoelastic solids - A review. Vol. 14, Mathematics and Mechanics of Solids. 2009. 300–366 p.
43. Lu XL, Mow VC. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc*. 2008;40(2):193–9.
44. Olvera D, Daly A, Kelly DJ. Mechanical testing of cartilage constructs. *Methods Mol Biol*. 2015;1340:279–87.
45. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 1997;13(4):456–60.
46. Mithoefer K, Peterson L, Zenobi-Wong M, Mandelbaum BR. Cartilage issues in football - Today's problems and tomorrow's solutions. *Br J Sports Med*. 2015;49(9):590–6.
47. Da Cunha Cavalcanti Filho MM, Doca D, Cohen M, Ferretti M. Updating on diagnosis and treatment of chondrallesion of the knee [Atualização no diagnóstico e tratamento das lesões condrais do joelho]. *Rev Bras Ortop [Internet]*. 2012;47(1):12–20. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84860492273&partnerID=40&md5=db5c38e397b69fe28bc837a1efc329f1>
48. Niederauer GG, Niederauer GM, Cullen LC, Athanasiou KA, Thomas JB, Niederauer MQ. Correlation of cartilage stiffness to thickness and level of

- degeneration using a handheld indentation Probe. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):352–9.
49. Hardin JA, Cobelli N, Santambrogio L. Consequences of metabolic and oxidative modifications of cartilage tissue. 2016;11(9):1–10.
  50. Kaplan JT, Neu CP, Drissi H, Emery NC, Pierce DM. Cyclic loading of human articular cartilage: The transition from compaction to fatigue. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2017;65(September 2016):734–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.09.040>
  51. Martínez-Moreno D, Jiménez G, Gálvez-Martín P, Rus G, Marchal JA. Cartilage biomechanics: A key factor for osteoarthritis regenerative medicine. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2019;1865(6):1067–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.011>
  52. Zhang L, Liu G, Han B, Wang Z, Yan Y, Ma J, et al. Knee Joint Biomechanics in Physiological Conditions and How Pathologies Can Affect It: A Systematic Review. *Appl Bionics Biomech.* 2020;2020.
  53. Kotlarz H, Gunnarsson CL, Fang H, Rizzo JA. Osteoarthritis and absenteeism costs: Evidence from US national survey data. *J Occup Environ Med.* 2010;52(3):263–8.
  54. Sociedade Brasileira de Reumatologia. Osteoartrite (Artrose) [Internet]. Available from: <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/osteoartrite-artrose/>.
  55. Farpour HR, Rajabi N, Ebrahimi B. The Efficacy of *Harpagophytum procumbens* (Teltonal) in Patients with Knee Osteoarthritis: A Randomized Active-Controlled Clinical Trial. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2021;2021.
  56. Patel JM, Dunn MG. Cartilage tissue engineering [Internet]. *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces.* Elsevier Ltd; 2015. 135–160 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-301-0.00006-9>
  57. Harrell CR, Markovic BS, Fellabaum C, Arsenijevic A, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;109(November 2018):2318–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.099>



58. Tuan RS, Chen AF, Klatt BA. Cartilage Regeneration. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013;21(5):303–11.
59. Mustapich T, Schwartz J, Palacios P, Liang H, Sgaglione N, Grande DA. A Novel Strategy to Enhance Microfracture Treatment With Stromal Cell-Derived Factor-1 in a Rat Model. *Front Cell Dev Biol*. 2021;8(February):1–9.
60. Richter DL, Schenck RC, Wascher DC, Treme G. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature. *Sports Health*. 2016;8(2):153–60.
61. Roberts S, Colombier P, Sowman A, Mennan C, Rölfing JHD, Guicheux J, et al. Ageing in the musculoskeletal system: Cellular function and dysfunction throughout life. *Acta Orthop*. 2016;87(February 2017):15–25.
62. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science (80- )*. 1993;260(1):920–6.
63. Gleeson JP, O'Brien FJ. Composite Scaffolds for Orthopaedic Regenerative Medicine. *Adv Compos Mater Med Nanotechnol*. 2011;
64. De Isla N, Huseltein C, Jessel N, Pinzano A, Decot V, Magdalou J, et al. Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering. *Biomed Mater Eng*. 2010;20(3–4):127–33.
65. Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, et al. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007;28(36):5462–70.
66. Katakai D, Imura M, Ando W, Tateishi K, Yoshikawa H, Nakamura N, et al. Compressive properties of cartilage-like tissues repaired in vivo with scaffold-free, tissue engineered constructs. *Clin Biomech [Internet]*. 2009;24(1):110–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2008.07.003>
67. Levin G, Belchior GG, Sogayar MC, Carreira ACO. *Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos. Genética na Esc*. 2019;14(1):26.
68. Bos PK, Verhaar JAN, Osch GJVM van. Age-Related Differences in Articular Cartilage Wound Healing: A Potential Role for Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in Adult Cartilage Repair. *Tissue Engineering*. Boston, MA: Springer; 2006. 297–309 p.

69. Cheng N, Yao H lei, Reid LM. Hepatic Stem Cells. Lineage Biology and Pluripotency. *Princ Regen Med*. 2008;344–84.
70. Ng NHJ, Teo AKK. Under the Microscope: Human Pluripotent Stem Cell-Derived Pancreatic Islet Cells [Internet]. International Society for Cell and Gene Therapy. 2023 [cited 2024 Feb 8]. Available from: <https://www.isctglobal.org/telegraphthub/blogs/lauren-reville/2023/11/08/under-the-microscope-human-pluripotent-stem-cell-d>
71. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Reports*. 2020;16(1):3–32.
72. Toh WS, Lee EH, Cao T. Potential of Human Embryonic Stem Cells in Cartilage Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(3):544–59.
73. Pereira LDV. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Cienc e Saude Coletiva*. 2008;13(1):7–14.
74. Mirzaei H, Sahebkar A, Sichani LS, Moridikia A, Nazari S, Nahand JS, et al. Therapeutic application of multipotent stem cells. *J Cell Physiol*. 2018;233(4):2815–23.
75. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1445–51.
76. Dave JR, Tomar GB. Dental tissue-derived mesenchymal stem cells: Applications in tissue engineering. *Crit Rev Biomed Eng*. 2018;46(5):429–68.
77. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>
78. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393–5.
79. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation

- potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006;12(10):2813–23.
80. Fernandes TL, Shimomura K, Asperti A, Pinheiro CCG, Caetano HVA, Oliveira CRGCM, et al. Development of a Novel Large Animal Model to Evaluate Human Dental Pulp Stem Cells for Articular Cartilage Treatment. *Stem Cell Rev Reports.* 2018;14(5):734–43.
  81. Edelsten L, Jeffrey JE, Burgin L V., Aspden RM. Viscoelastic deformation of articular cartilage during impact loading. *Soft Matter.* 2010;6(20):5206–12.
  82. Liebschner M, Bucklen B, Wettergreen M. Mechanical Aspects of Tissue Engineering. *Semin Plast Surg.* 2005;19(03):217–28.
  83. Butler DL, Goldstein SA, Guldberg RE, Guo XE, Kamm R, Laurencin CT, et al. The Impact of Biomechanics in tissue engineering and Regenerative medicine. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2009;15(4):477–84.
  84. Butler DL, Goldstein SA, Guilak F. Functional tissue engineering: The role of biomechanics in reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;961(December 2000):193–5.
  85. William D. Callister J. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.* 5th ed. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.* LTC; 2008. 705 p.
  86. Korhonen RK, Laasanen MS, Töyräs J, Helminen HJ, Jurvelin. Comparison of the equilibrium response of articular cartilage in unconfined compression, confined compression and indentation. *Trans Orthop Res Soc [Internet].* 2002;27(79):903–9. Available from: <http://luotain.uef.fi/content/abstracts/ORS/0079.pdf>
  87. Rychlewski J. On Hooke's law. *J Appl Math Mech.* 1984;48(3):303–14.
  88. Oliveira RM de. *Compósito de Poliuretano Elastomérico Reforçado com Fibra de Juta: Estudo das Propriedades Dinâmico-Mecânicas e Viscoelásticas.* [Sorocaba-SP]: Universidade Federal de São Carlos; 2013.
  89. Fernandes RR. *Relação Entre o Limite de Viscoelasticidade Linear e o Limite de escoamento de um Material Elastoviscoplastico.* Dissertação. 2015.
  90. Freutel M, Seitz AM, Galbusera F, Bornstedt A, Rasche V, Tate MLK, et al.

- Medial meniscal displacement and strain in three dimensions under compressive loads: MR assessment. *J Magn Reson Imaging*. 2014;40(5):1181–8.
91. Fakult M, Ronken S. Dynamic stiffness of articular cartilage and potential repair materials. 2012;
  92. Basoli F, Giannitelli SM, Gori M, Mozetic P, Bonfanti A, Trombetta M, et al. Biomechanical characterization at the cell scale: Present and prospects. *Front Physiol*. 2018;9(NOV):1–21.
  93. Patel JM, Wise BC, Bonnevie ED, Mauck RL. A Systematic Review and Guide to Mechanical Testing for Articular Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2019;25(10):593–608.
  94. Jeng YR, Mao CP, Wu K Te. Instrumented indentation investigation on the viscoelastic properties of porcine cartilage. *J Bionic Eng [Internet]*. 2013;10(4):522–31. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1672-6529\(13\)60239-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1672-6529(13)60239-5)
  95. Ronken S, Arnold MP, Ardura García H, Jeger A, Daniels AU, Wirz D. A comparison of healthy human and swine articular cartilage dynamic indentation mechanics. *Biomech Model Mechanobiol*. 2012;11(5):631–9.
  96. Hwang JW, Chawla D, Han G, Eriten M, Henak CR. Effects of solvent osmolarity and viscosity on cartilage energy dissipation under high-frequency loading. *J Mech Behav Biomed Mater [Internet]*. 2022;126(July 2021):105014. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.105014>
  97. Mealy NE, Bayés M. *Mechanical Testing and Evaluation*. Vol. 8, ASM international. 2000. 2253 p.
  98. Stolz M, Raiteri R, Daniels AU, VanLandingham MR, Baschong W, Aeb U. Dynamic Elastic Modulus of Porcine Articular Cartilage Determined at Two Different Levels of Tissue Organization by Indentation-Type Atomic Force Microscopy. *Biophys J*. 2004;86(May):3269–3283.
  99. Temple DK, Cederlund AA, Lawless BM, Aspden RM, Espino DM. Viscoelastic properties of human and bovine articular cartilage: a comparison of frequency-dependent trends. *BMC Musculoskelet Disord [Internet]*. 2016;17(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12891-016-1279-1>

100. Fulcher GR, Hukins DWL, Shepherd DET. Viscoelastic properties of bovine articular cartilage attached to subchondral bone at high frequencies. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009;10(1):1–7.
101. Frampton RC. The dynamic testing of elastomers [Internet]. Alpha Testing Systems. 2013. p. 1–19. Available from: [www.alphatestingsystems.com](http://www.alphatestingsystems.com)
102. McKee CT, Last JA, Russell P, Murphy CJ. Indentation versus tensile measurements of young's modulus for soft biological tissues. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2011;17(3):155–64.
103. Vazquez KJ, Andrae JT, Henak CR. Cartilage-on-Cartilage Cyclic Loading Induces Mechanical and Structural Damage. *Rev del Col Am Cardiol*. 2018;72(23):2964–79.
104. Kelm LN. Hysteretic response of articular cartilage to cyclic loading [Internet]. 2002. Available from: <https://scholarship.rice.edu/handle/1911/17515>
105. Weizel A, Distler T, Schneidereit D, Friedrich O, Bräuer L, Paulsen F, et al. Complex mechanical behavior of human articular cartilage and hydrogels for cartilage repair. *Acta Biomater*. 2020;118:113–28.
106. Meloni GR, Fisher MB, Stoeckl BD, Dodge GR, Mauck RL. Biphasic Finite Element Modeling Reconciles Mechanical Properties of Tissue-Engineered Cartilage Constructs Across Testing Platforms. *Tissue Eng - Part A*. 2017;23(13–14):663–74.
107. Amini A, Cheng C, Kan Q, Naebe M, Song H. Phase transformation evolution in NiTi shape memory alloy under cyclic nanoindentation loadings at dissimilar rates. *Sci Rep*. 2013;3:1–7.
108. Gadjanski I, Spiller K, Vunjak-Novakovic G. Time-Dependent Processes in Stem Cell-Based Tissue Engineering of Articular Cartilage. *Stem Cell Rev Reports*. 2012;8(3):863–81.
109. Correia CR, Reis RL, Mano JF. Multiphasic, multistructured and hierarchical strategies for cartilage regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2015;881:143–60.
110. Mikos AG, Herring SW, Ochareon P, Elisseeff J, Lu HH, Kandel R, et al. Engineering complex tissues. *Tissue Eng*. 2006;12(12):3307–39.

111. Han L, Frank EH, Greene JJ, Lee HY, Hung HHK, Grodzinsky AJ, et al. Time-dependent nanomechanics of cartilage. *Biophys J* [Internet]. 2011;100(7):1846–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.031>
112. Abdel-Sayed P, Moghadam MN, Salomir R, Tchernin D, Pioletti DP. Intrinsic viscoelasticity increases temperature in knee cartilage under physiological loading. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2014;30:123–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.10.025>
113. Shaktivesh, Malekipour F, Lee PVS. Shock absorbing ability in healthy and damaged cartilage-bone under high-rate compression. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2019;90:388–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.10.023>
114. Malekipour F, Whitton C, Oetomo D, Lee PVS. Shock absorbing ability of articular cartilage and subchondral bone under impact compression. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2013;26:127–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.05.005>
115. Knecht S, Vanwanseele B, Stüssi E. A review on the mechanical quality of articular cartilage - Implications for the diagnosis of osteoarthritis. *Clin Biomech.* 2006;21(10):999–1012.
116. Park S, Krishnan R, Nicoll SB, Ateshian GA. Cartilage interstitial fluid load support in unconfined compression. *J Biomech.* 2003;36(12):1785–96.
117. Park S, Nicoll SB, Mauck RL, Ateshian GA. Cartilage mechanical response under dynamic compression at physiological stress levels following collagenase digestion. *Ann Biomed Eng.* 2008;36(3):425–34.
118. Korhonen RK, Saarakkal S. Biomechanics and Modeling of Skeletal Soft Tissues. *Theor Biomech.* 2011;
119. Machado JCF. Caracterização das propriedades mecânicas das cartilagens do joelho e da sua interação com os tecidos circundantes. 2015;149. Available from: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/79623/2/35830.pdf>
120. Chen X. Determine the Mechanical Properties of Articular Cartilage Using Indentation Testing. 2016;58.
121. Altenbach H, Eisenträger J. Introduction to Creep Mechanics. *Encycl Contin*

- Mech. 2020;1337–44.
122. Suh JK, Li Z, Woo SLY. Dynamic behavior of a biphasic cartilage model under cyclic compressive loading. *J Biomech.* 1995;28(4):357–64.
  123. Park S, Hung CT, Ateshian GA. Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading at physiological stress levels. *Osteoarthr Cartil.* 2004;12(1):65–73.
  124. Mauck RL, Yuan X, Tuan RS. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14(2):179–89.
  125. Evans RC, Quinn TM. Dynamic compression augments interstitial transport of a glucose-like solute in articular cartilage. *Biophys J.* 2006;91(4):1541–7.
  126. Efremov YM, Kotova SL, Timashev PS. Viscoelasticity in simple indentation-cycle experiments: a computational study. *Sci Rep [Internet].* 2020;10(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70361-y>
  127. Franke O, Göken M, Meyers MA, Durst K, Hodge AM. Dynamic nanoindentation of articular porcine cartilage. *Mater Sci Eng C [Internet].* 2011;31(4):789–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2010.12.005>
  128. ASTM International. ASTM F2451-05: Standard Guide for in vivo Assessment of Implantable Devices Intended to Repair or Regenerate Articular Cartilage [Internet]. 2010. Available from: <https://www.astm.org/f2451-05.html>
  129. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry: Preparation of IDEs and INDs for products intended to repair or replace knee cartilage. [wwwFDA.gov](http://www.fda.gov) [Internet]. 2011;(December):45. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/preparation-ides-and-inds-products-intended-repair-or-replace-knee-cartilage>
  130. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, et al. Preclinical studies for cartilage repair: Recommendations from the international cartilage repair society. *Cartilage.* 2011;2(2):137–52.
  131. ASTM E2546-15. Standard Practice for Instrumented Indentation Testing. *ASTM B Stand.* 2015;1(December):1–23.

132. Chokhandre S, Erdemir A. A comprehensive testing protocol for macro-scale mechanical characterization of knee articular cartilage with documented experimental repeatability. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2020;112(August):104025. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104025>
133. Franke O, Durst K, Maier V, Göken M, Birkholz T, Schneider H, et al. Mechanical properties of hyaline and repair cartilage studied by nanoindentation. *Acta Biomater*. 2007;3(6):873–81.
134. Han G, Hess C, Eriten M, Henak CR. Uncoupled poroelastic and intrinsic viscoelastic dissipation in cartilage. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2018;84(February):28–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.04.024>
135. Töyräs J, Lyyra-Laitinen T, Niinimäki M, Lindgren R, Nieminen MT, Kiviranta I, et al. Estimation of the Young's modulus of articular cartilage using an arthroscopic indentation instrument and ultrasonic measurement of tissue thickness. *J Biomech*. 2001;34(2):251–6.
136. Pharr GM, Bolshakov A. Understanding nanoindentation unloading curves. *J Mater Res*. 2002;17(10):2660–71.
137. Sneddon IN. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int J Eng Sci*. 1965;3(1):47–57.
138. Hayes WC, Keer LM, Herrmann G, Mockros LF. A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage. *J Biomech*. 1972;5(5):541–51.
139. Gao LL, Lin XL, Liu DD, Chen L, Zhang CQ, Gao H. Depth-dependent ratcheting strains of young and adult articular cartilages by experiments and predictions. *Biomed Eng Online* [Internet]. 2019;18(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0705-7>
140. Nansai R, Suzuki T, Shimomura K, Ando W, Nakamura N, Fujie H. Surface morphology and stiffness of cartilage-like tissue repaired with a scaffold-free tissue engineered construct. *J Biomech Sci Eng*. 2011;6(1):40–8.
141. Ebenstein DM, Pruitt LA. Nanoindentation of soft hydrated materials for



- application to vascular tissues. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2004;69(2):222–32.
142. Mak AF, Lai WM, Mow VC. Biphasic indentation of articular cartilage-I. Theoretical analysis. *J Biomech*. 1987;20(7):703–14.
143. Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: Theory and experiments. *J Biomech Eng*. 1980;102(1):73–84.
144. Huang CY, Soltz MA, Kopacz M, Mow VC, Ateshian GA. Experimental verification of the roles of intrinsic matrix viscoelasticity and tension-compression nonlinearity in the biphasic response of cartilage. *J Biomech Eng*. 2003;125(1):84–93.
145. Pharr GM, Oliver WC, Brotzen FR. On the generality of the relationship among contact stiffness, contact area, and elastic modulus during indentation. *J Mater Res*. 1992;7(3):613–7.
146. Hertz H. H. Hertz, Über die Berührung fester elastischer Körper, *Journal für die reine und angewandte Mathematik* 92, 156-171 (1881). *J für die reine und Angew Math*. 1881;171:156–71.
147. Silver FH, Bradica G, Tria A. Elastic energy storage in human articular cartilage: Estimation of the elastic modulus for type II collagen and changes associated with osteoarthritis. *Matrix Biol*. 2002;21(2):129–37.
148. Mieloch AA, Richter M, Trzeciak T, Giersig M, Rybka JD. Osteoarthritis severely decreases the elasticity and hardness of knee joint cartilage: A nanoindentation study. *J Clin Med*. 2019;8(11):1–11.
149. Nurgent GE, Law AW, Wong EG, Temple MM, Bae WC, Chen AC, et al. Site- and exercise-related variation in structure and function of cartilage from equine distal metacarpal condyle. *Osteoarthr Cartil*. 2004;12(10):826–33.
150. Navarro RF. Modelos Viscoelásticos Aplicáveis a Materiais Reais: uma Revisão. *Rev Eletrônica Mater e Process [Internet]*. 2017;12(1):1–20. Available from: [www.ufcg.edu.br](http://www.ufcg.edu.br)
151. Macêdo SCM de. Identificação de um Modelo Viscoelástico para o Comportamento de Relaxação de Tensões do PTFE Sob Compressão e em

- Temperatura Ambiente. Universidade Federal de São Carlos; 2019.
152. Kontomaris S V., Stylianou A, Malamou A, Nikita KS. An alternative approach for the Young's modulus determination of biological samples regarding AFM indentation experiments. *Mater Res Express*. 2019;6(2).
  153. Li LP, Herzog W. Arthroscopic evaluation of cartilage degeneration using indentation testing -Influence of indenter geometry. *Clin Biomech*. 2006;21(4):420–6.
  154. Boughton OR, Ma S, Zhao S, Arnold M, Lewis A, Hansen U, et al. Measuring bone stiffness using spherical indentation. *PLoS One*. 2018;13(7):1–18.
  155. VanLandingham MR. Review of instrumented indentation. *J Res Natl Inst Stand Technol*. 2003;108(4):249–65.
  156. Oliver WC, Pharr GM, Introduction I. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Mater Res*. 1992;7(6):1564–83.
  157. Kontomaris S-V. The Hertz Model in AFM Nanoindentation Experiments: Applications in Biological Samples and Biomaterials. *Micro Nanosyst*. 2018;10(1):11–22.
  158. Antons J, Marascio MGM, Nohava J, Martin R, Applegate LA, Bourban PE, et al. Zone-dependent mechanical properties of human articular cartilage obtained by indentation measurements. *J Mater Sci Mater Med [Internet]*. 2018;29(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-018-6066-0>
  159. Oliver WC, Pharr GM. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. 2004;
  160. Kontomaris S V., Malamou A. Hertz model or Oliver & Pharr analysis? Tutorial regarding AFM nanoindentation experiments on biological samples. *Mater Res Express*. 2020;7(3).
  161. Wu CE, Lin KH, Juang JY. Hertzian load-displacement relation holds for spherical indentation on soft elastic solids undergoing large deformations. *Tribol Int [Internet]*. 2016;97:71–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.triboint.2015.12.034>

162. Bonnevie ED, Baro VJ, Wang L, Burris DL. Fluid load support during localized indentation of cartilage with a spherical probe. *J Biomech* [Internet]. 2012;45(6):1036–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.12.019>
163. Cheng YT, Cheng CM. Relationships between initial unloading slope, contact depth, and mechanical properties for spherical indentation in linear viscoelastic solids. *Mater Sci Eng A*. 2005;409(1–2):93–9.
164. Kan Q, Yan W, Kang G, Sun Q. Oliver-Pharr indentation method in determining elastic moduli of shape memory alloys - A phase transformable material. *J Mech Phys Solids* [Internet]. 2013;61(10):2015–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmps.2013.05.007>
165. Kossman S, Coorevits T, Iost A, Chicot Di. A new approach of the Oliver and Pharr model to fit the unloading curve from instrumented indentation testing. *J Mater Res*. 2017;32(12):2230–40.
166. Kilkenney C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010;160(7):1577–9.
167. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)-A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42(2):377–81.
168. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: Its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18(1):64–73.
169. Instron. Submersible Side Action Grips and Temperature-Controlled BioBath. 2017;2–3. Available from: [www.instron.com](http://www.instron.com)
170. Armitage OE, Oyen ML. Indentation across interfaces between stiff and compliant tissues. *Acta Biomater* [Internet]. 2017;56:36–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.036>
171. Jin H, Lewis JL. Determination of Poisson's Ratio of Articular Cartilage by Indentation Using Different-Sized Indenters. *J Biomech Eng*. 2004;126(2):138–45.

172. Oyen-Tiesma M, Cook RF. Technique for estimating fracture resistance of cultured neocartilage. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12(4):327–32.
173. Rolauffs B, Muehleman C, Li J, Kurz B, Kuettner KE, Frank E, et al. Vulnerability of the superficial zone of immature articular cartilage to compressive injury. *Arthritis Rheum*. 2010;62(10):3016–27.
174. JASP Software [Internet]. The JASP Team; 2022. Available from: <https://jasp-stats.org/>
175. Murray MM, Magarian EM, Harrison SL, Mastrangelo AN, Zurakowski D, Fleming BC. The effect of skeletal maturity on functional healing of the anterior cruciate ligament. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2010;92(11):2039–49.
176. Park Y-B, Ha C-W, Lee C-H, Yoon YC, Park Y-G. Cartilage Regeneration in Osteoarthritic Patients by a Composite of Allogeneic Composite of Allogeneic Umbilical Cord Blood-Derived Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronate Hydrogel: *Stem Cells Transl Med*. 2016;6(2):613–21.
177. Sensebé L, Bourin P, Tarte K. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther*. 2011;22(1):19–26.
178. Gouveia BG, Rijo P, Gonçalo TS, Reis CP. Good manufacturing practices for medicinal products for human use. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(2):87–96.
179. Mariano M. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental: o Minipig br1. *Acta Cir Bras*. 2003;18(5):387–91.
180. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2010;16(1):105–15.
181. Li W-J, Chiang H, Kuo T-F, Lee H-S, Jiang C-C, Tuan RS. Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(1):1–7.
182. Sant'Anna JPC. Avaliação por imagem de composto de engenharia tecidual para o reparo da cartilagem em modleo pré-clínico. 2021.
183. Oyen ML. Analytical techniques for indentation of viscoelastic materials. *Philos Mag*. 2006;86(33-35 SPEC. ISSUE):5625–41.

184. Apter JT, Marquez E. A relation between hysteresis and other visco elastic properties of some biomaterials. *Biorheology*. 1968;5(4):285–301.
185. Ker RF. The design of soft collagenous load-bearing tissues. *J Exp Biol*. 1999;202(23):3315–24.
186. Miller CE, Wong CL. Trabeculated embryonic myocardium shows rapid stress relaxation and non-quasi-linear viscoelastic behavior. *J Biomech*. 2000;33(5):615–22.
187. Darvish K, Takhounts E, Crandall J. A Dynamic Method to Develop Nonlinear Viscoelastic Model of Brain Tissue. In: *ASME 1998 International Mechanical Engineering Congress and Exposition*. Anaheim, California, USA; 1998. p. 245–6.
188. Chiumello D, Arnal JM, Umbrello M, Cammaroto A, Formenti P, Mistraretti G, et al. Hysteresis and lung recruitment in acute respiratory distress syndrome patients: A CT scan study. *Crit Care Med*. 2020;48(10):1494–502.
189. Han G, Chowdhury U, Eriten M, Henak CR. Relaxation capacity of cartilage is a critical factor in rate- and integrity-dependent fracture. *Sci Rep [Internet]*. 2021;11(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88942-w>
190. Simha NK, Fedewa M, Leo PH, Lewis JL, Oegema T. A composites theory predicts the dependence of stiffness of cartilage culture tissues on collagen volume fraction. *J Biomech*. 1999;32(5):503–9.
191. Gannon AR, Nagel T, Bell AP, Avery NC, Kelly DJ. The changing role of the superficial region in determining the dynamic compressive properties of articular cartilage during postnatal development. *Osteoarthr Cartil [Internet]*. 2015;23(6):975–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.02.003>
192. Sadeghi H, Espino DM, Shepherd DE. Variation in viscoelastic properties of bovine articular cartilage below, up to and above healthy gait-relevant loading frequencies. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med*. 2015;229(2):115–23.
193. Clift SE. Finite-element analysis in cartilage biomechanics. *J Biomed Eng*. 1992;14(3):217–21.
194. Cao L, Youn I, Guilak F, Setton LA. Compressive properties of mouse articular cartilage determined in a novel micro-indentation test method and biphasic finite

- element model. *J Biomech Eng.* 2006;128(5):766–71.
195. Kleeman RU, Krockner D, Cedrano A, Tuischer J, Duda GN. Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: Relation to clinical assessment (ICRS Grade). *Osteoarthr Cartil.* 2005;13(11):958–63.
  196. Brown CP, Crawford RW, Oloyede A. Indentation stiffness does not discriminate between normal and degraded articular cartilage. *Clin Biomech.* 2007;22(7):843–8.
  197. Schaefer D, Martin I, Jundt G, Seidel J, Heberer M, Grodzinsky A, et al. Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis Rheum.* 2002;46(9):2524–34.
  198. Mixon A, Savage A, Bahar-Moni AS, Adouni M, Faisal T. An in vitro investigation to understand the synergistic role of MMPs-1 and 9 on articular cartilage biomechanical properties. *Sci Rep [Internet].* 2021;11(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93744-1>
  199. Irianto J, Ramaswamy G, Serra R, Knight MM. Depletion of chondrocyte primary cilia reduces the compressive modulus of articular cartilage. *J Biomech [Internet].* 2014;47(2):579–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.11.040>
  200. Fischer-Cripps AC. Critical review of analysis and interpretation of nanoindentation test data. *Surf Coatings Technol.* 2006;200(14–15):4153–65.
  201. Kerin AJ, Wisnom MR, Adams MA. The compressive strength of articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med.* 1998;212(4):273–80.
  202. Chen AC, Bae WC, Schinagl RM, Sah RL. Depth- and strain-dependent mechanical and electromechanical properties of full-thickness bovine articular cartilage in confined compression. *J Biomech.* 2001;34(1):1–12.
  203. Chen SS, Falcovitz YH, Schneiderman R, Maroudas A, Sah RL. Depth-dependent compressive properties of normal aged human femoral head articular cartilage: relationship to fixed charge density. *Osteoarthr Res Soc Int.* 2001;9:561–9.
  204. Farquhar T, Dawson PR, Torzilli PA. A microstructural model for the anisotropic drained stiffness of articular cartilage. *J Biomech Eng.* 1990;112(4):414–25.

205. Gao LL, Zhang CQ, Dong LM, Jia YW. Description of depth-dependent nonlinear viscoelastic behavior for articular cartilage in unconfined compression. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2012;32(2):119–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.10.005>
206. Gannon AR, Nagel T, Bell AP, Avery NC, Kelly DJ. Postnatal changes to the mechanical properties of articular cartilage are driven by the evolution of its Collagen network. *Eur Cells Mater*. 2015;29:105–23.
207. Tomkoria S, Patel R V., Mao JJ. Heterogeneous nanomechanical properties of superficial and zonal regions of articular cartilage of the rabbit proximal radius condyle by atomic force microscopy. *Med Eng Phys*. 2004;26(10):815–22.
208. Hu Y, Chen X, Wang S, Jing Y, Su J. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Res* [Internet]. 2021;9(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41413-021-00147-z>
209. Stewart HL, Kawcak CE. The importance of subchondral bone in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Vet Sci*. 2018;5(AUG):1–9.
210. Kazemi M, Williams JL. Properties of Cartilage–Subchondral Bone Junctions: A Narrative Review with Specific Focus on the Growth Plate. *Cartilage*. 2021;13(2):16S-33S.
211. Johnston JD, Burnett WD, Kontulainen SA. Subchondral Bone Features and Mechanical Properties as Biomarkers of Osteoarthritis. *Expo Heal*. 2016;2016.
212. Elahi SA, Tanska P, Mukherjee S, Korhonen RK, Geris L, Jonkers I, et al. Guide to mechanical characterization of articular cartilage and hydrogel constructs based on a systematic in silico parameter sensitivity analysis. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2021;124(August):104795. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104795>
213. Cheng YT, Cheng CM. Scaling, dimensional analysis, and indentation measurements. *Mater Sci Eng R Reports*. 2004;44(4–5):91–149.

## ANEXOS

ANEXO A - Aprovação da Comissão Científica do IOT HC-FMUSP, número de aprovação 1336

DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

## COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO      Protocolo IOT nº 1336  
CEUA P2017-05 do Hospital Sírio Libanês – (animais)

**(ADENDO PARA FINS DE PÓS-GRADUAÇÃO)**

**Pesquisador Responsável:** Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes  
**Pesquisadora Executante:** Rafaella Rogatto de Faria  
**Título:** Análise biomecânica do construto de engenharia de tecidos (TEC) para restauração da cartilagem articular: estudo pré-clínico  
**Grau de Pesquisa:** Mestrado  
**Título do Projeto Original:** *Comparação entre estratégias de bioengenharia de tecido para regeneração da cartilagem articular utilizando células tronco provenientes da polpa de dente e da sinóvia: estudo pré-clínico – aprovado ad referendum pela Comissão Científica em 31/10/2017*

## PARA USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO CIENTÍFICA

Parecer da Comissão Científica do IOT:

- Aprovado *ad referendum*  
 Aprovado com restrições (corrigir e/ou completar)  
 Indeferido

São Paulo, 13 de abril de 2021.

  
Prof. Raphael Martus Marcon  
Presidente  
Comissão Científica - DOT

## APROVAÇÃO DO DEPARTAMENTO

São Paulo, 13 de *abril* de 2021

  
Prof. Olavo Pires de Camargo  
Chefe do Departamento  
Ortopedia e Traumatologia  
FMUSP



ANEXO B - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês, número de aprovação CEUA P 2017-05



**INSTITUTO SÍRIO-LIBANÊS  
DE ENSINO E PESQUISA**

São Paulo, 02 de outubro de 2017.

**Título do Projeto:** CEUA P 2017-05 "Comparação entre estratégias de bioengenharia de tecido para regeneração da cartilagem articular utilizando células tronco provenientes da polpa de dente e da sinovial: estudo pré-clínico"

**Pesquisador:** Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes

**Histórico do Processo**

- Processo inicial recebido pela CEUA em: 26/09/2017
- Avaliado na reunião da CEUA de 02-10-2017

**CONSIDERAÇÕES:**

A Comissão de Ética no Uso de Animais avaliou os documentos apresentados, onde foram descritos os procedimentos e está de acordo com vínculo do projeto supracitado.

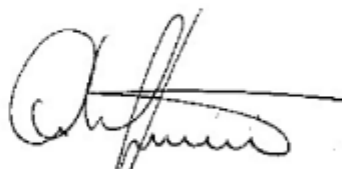
Cabe ressaltar que o pesquisador deverá manter a CEUA informada sobre o andamento de seu projeto através do envio de relatórios parciais (anualmente ou sempre que solicitado pela CEUA) e relatório final, além de comunicação sobre eventos inesperados e alterações no protocolo durante a execução do projeto.

Esta comissão avaliou o projeto proposto e solicita o máximo empenho para tentar minimizar o "N" de animais. Caso possível sugerimos a utilização de N=5 por grupo (N aprovado = 14, N sugerido = 10 animais)

Quanto ao formulário da CEUA favor, no item 9.4 adequar o tempo verbal do projeto, uma vez que esse projeto será realizado.

O projeto foi considerado "APROVADO" pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital Sírio Libanês, para ser executado conforme o planejamento apresentado.

**Número de animais aprovados – 14 suínos**



**Prof. Dr. André Luis Montagnini**  
**Coordenador da CEUA**

## ANEXO C – Lista de publicações da autora

### Artigos completos publicados em periódicos

De Faria, Rafaella Rogatto; De Siqueira, Sergio Freitas; Haddad, Francisco Aguerre; Del Monte Silva, Gustavo; Spaggiari, Caio Vitale; Martinelli, Martino. Os Seis Pilares da Medicina do Estilo de Vida no Manejo de Doenças Não Transmissíveis - As Lacunas nas Diretrizes Atuais. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 120, p. 1-8, 2023.

SantAnna, J.P.C. et al. (2022) 'Tissue engineering and cell therapy for Cartilage Repair: Preclinical evaluation methods', Tissue Engineering Part C: Methods, 28(2), pp. 73–82. doi:10.1089/ten.tec.2021.0208.

Fernandes, T.L. et al. (2022) 'State of the art for articular cartilage morphological and composition imaging evaluation in football players', Journal of Cartilage & Joint Preservation, 2(2), p. 100067. doi:10.1016/j.jcjp.2022.100067.

Fleury, A.L. et al. (2022) 'Innovation in orthopedics: Part 1—design thinking', Current Reviews in Musculoskeletal Medicine, 15(2), pp. 143–149. doi:10.1007/s12178-022-09748-5.

Fernandes, T.L. et al. (2022) 'Innovation in orthopaedics: Part 2—how to translate ideas and research into clinical practice', Current Reviews in Musculoskeletal Medicine, 15(2), pp. 150–155. doi:10.1007/s12178-022-09749-4. Encontro Nacional de Pesquisa em Oncologia (ENPO) | Brasília (DF)

### Capítulos de livros publicados

De Faria, Rafaella Rogatto. Innovation Pathways, Real-Life Neuroscience Startups, and Applications. In: Tiago Lazzaretti; Paulo S. de Melo; Anna Marduy; Rafaella Rogatto de Faria; Marcel Simis; Felipe Fregni. (Org.). Innovation Pathways, Real-Life Neuroscience Startups, and Applications. 1ed., 2023, v. , p. 48-62.

De Faria, Rafaella Rogatto; Fernandes, T. L. Inspiração e Liderança. In: Tiago Lazzaretti Fernandes e Felipe Fregni. (Org.). Porque e Como Inovar na Saúde: trilha do empreendedorismo e inovação. 1ed. São Paulo: Independente, 2022, v. 1, p. 23-36.

Faria, R. R.; M. J. S. Maizato; I. A. Cestari ; Hernandez, A. ; Bueno, D. F. ; Bortolussi, R. ; Albuquerque, C. ; Fernandes, T. L. . Biomechanical Analysis of Tissue Engineering Construct for Articular Cartilage Restoration - A Pre-clinical Study. In: Teodiano Freire Bastos-Filho; Eliete Maria de Oliveira Caldeira; Anselmo Frizera-Neto. (Org.). XXVII Brazilian Congress on Biomedical Engineering. 1ed.: Springer Cham, 2020, v. 83, p. 1-2440.

#### Resumos expandidos publicados em anais de congressos

De Faria R.R., Oliveira SRD, Higa FGR, Bernatavicius ST. Desenvolvimento de um dispositivo de plga (poli ácido láctico-co-glicólico) para liberação controlada de medicação para o câncer de mama. Rev Inic Cient Ext [Internet]. 10 de junho de 2019 [citado 19º de julho de 2020];2(Esp.1):53. Disponível em: <https://revistasfacesa.senaaires.com.br/index.php/iniciacao-cientifica/article/view/229>

R. R. de Faria; M.J. S. Maizato; I.A. Cestari; A. J. Hernandez; D.F. Bueno; R. Bortolussi; C. Albuquerque and T.L. Fernandes. Biomechanical Analysis of Tissue Engineering Construct for Articular Cartilage Restoration - A Pre-Clinical Study. Disponível em: <http://cbeb2020.org/ProceedingsCBEB2020.pdf>. (1º Lugar Prêmio Cândido de Pinto Melo)

#### Outras produções bibliográficas

Faria, R. R.; Fernandes, T. L. Comparison Between Tissue Bioengineering Strategies For The Regeneration of Articular Cartilage Using Cell Architecture and Mesenchymal Cells: Pre-Clinical Study – Biomechanical Analysis. 28º SIICUSP, 2020. ISSN 2448-072X

Louro, V. O. N.; Faria, R. R.; Wahbe, N. R.; Martins, R. C.; Lima, J. P. H. Modelagem e Simulação de um Exoesqueleto de Membros Inferiores para Crianças com Dificuldades de Locomoção. Congresso Nacional de Iniciação Científica. 2020

Faria, R. R.; Aguerre, F. H.; Nolasco, E.; Lima, A. B.; Siqueira, S. Sistema Especialista de Inteligência Artificial em Diretrizes Médicas Baseado em Algoritmos de Deep Learning. Congresso de Inteligência Artificial da PUC-SP. 2020

Faria, R. R.; Santanna, J. P.; Assad, I. P., Pinheiro, C. C., Fernandes, T. L., Bueno, D. F., Hernandez, A. J. Biomechanical Analysis Of A Cell Therapy And Tissue Engineering Strategy For Articular Cartilage Restoration - A Pre-clinical Study. Mary Ann Liebert, 2022 (Abstract).