

Renata Aparecida de Camargo Bittencourt

**CULTURA DE CONDRÓCITOS PARA O USO TERAPÊUTICO:  
RECONSTITUIÇÃO DE CARTILAGEM**

**Orientador: Prof. Dr. Hamilton da Rosa Pereira (Departamento de Ortopedia)  
Co-orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune (Hemocentro).**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP ao Programa de pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia, área de concentração: Agressão, Reparação, Regeneração e Transplante de Tecidos e de Órgãos, desenvolvida junto ao Departamento de Cirurgia e Ortopedia e Divisão Hemocentro, para a obtenção do título de doutor.

**Botucatu  
Estado de São Paulo – Brasil  
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus**

Bittencourt, Renata Aparecida de Camargo.

Cultura de condrócitos para o uso terapêutico: reconstituição de cartilagem/ Renata Aparecida de Camargo Bittencourt. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Hamilton da Rosa Pereira

Co-orientador: Elenice Deffune

Assunto CAPES: 40101186

1. Articulações - Cirurgia - Estudos experimentais 2. Cartilagem - Doenças 3. Ortopedia

CDD 616.72

Palavras chave: Cartilagem articular: Cultura de condrócitos; Engenharia de tecidos; Hidrogel de alginato; Plasma rico em plaquetas; Regeneração

# Epígrafe

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los.

Dalai-Lama  
1998

# **Dedicatória**

### *A Deus*

Força inexplicável em nossas vidas, em todos momentos, sejam momentos de tristezas, fraquezas, felicidades e principalmente conquistas.

À minha mãe Edna e ao meu pai Elyseu (*in memoriam*), por terem sido os precursores de toda esta história construída em minha vida. Sem sombra de dúvidas os pais são considerados o alicerce que permanecem por toda vida de um filho.

A o meu esposo Altair:

As pessoas não se precisam.  
Elas se completam,  
Não por serem metades,  
Mas por serem pessoas inteiras,  
Dispostas a dividir objetivos comuns,  
Alegrias e vidas.

Uma pessoa maravilhosa que esteve presente ao longo dos anos, sempre me apoiando e incentivando, sendo inteiramente paciente com a minha ausência.



# **Agradecimento Especial**



A todos animais incluídos nesta pesquisa !!!

# **Agradecimentos**

## Meus sinceros agradecimentos

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Hamilton da Rosa Pereira, por ser um grande professor e orientador, mostraste-me a cada momento, compreensão, paciência, comprometimento e dedicação.

À querida Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Deffune, que como ninguém, exerce com maestria a função de ensinar, tendo contribuído muito ao longo destes dez anos para o meu enriquecimento intelectual. Literalmente pode ser considerada uma pessoa que transforma, esclarece, compreende e vence todos desafios. É o suave mistério da sua vocação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino que me acompanhou desde o início neste trabalho, sempre à disposição para compartilhar o seu imenso conhecimento.

Ao Hemocentro de Botucatu, local onde pude me especializar, descobrir o que realmente é pesquisar e crescer profissionalmente.

Ao meu irmão Francisco e à minha cunhada Marlene, que são pessoas muito especiais a minha vida e que contribuíram muito para o meu crescimento como pessoa.

À toda minha família, em especial à minha avó Tereza e Tia Eliana, que foram pessoas presentes em todos momentos da minha vida.

À minha sogra Laurinda e ao meu sogro Aparecido, que são pessoas de uma enorme bondade, sempre me apoiando a seguir em frente no meu futuro profissional.

À minhas cunhadas Lucinéia, Lucilene e Lucimara, pessoas que tenho minha estima consideração, sempre ao meu lado indicando os rumos que deveria seguir para chegar até este momento.

À Nadir, uma grande pessoa, que torceu para o meu desenvolvimento profissional a cada momento.

À Equipe do Laboratório de Engenharia Celular – Tata, Andrei, Gabrielle, Rosana, Priscila, Valdir, Daniel, Vitória e até mesmo as pessoas que por ali permaneceram por um tempo como a Ana Paula e Marina, agradeço pela imensa colaboração de todos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Ednelson e toda equipe do Laboratório de Cirurgia Experimental, pela atenção, comprometimento e disponibilidade em todos momentos os quais precisei para poder finalizar este trabalho.

À minha querida amiga Májorie, uma pessoa sincera, sempre alegre, persistente, lutadora e de uma bondade extrema. Pode-se dizer que é uma pessoa iluminada por Deus. Agradeço imensamente por você ter me ajudado, pois uma das alegrias da amizade é saber em quem confiar.

Às minhas amigas Tata e Léia, pessoas extremamente confiáveis, otimistas, sinceras com espírito fraterno, sempre me ajudando em todos os momentos que precisei.

À minha querida amiga Priscila, pela sua dedicação, sinceridade e alegria que sempre transmitiu em nossa amizade.

À amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Rossi Ferreira, que além de amizade verdadeira constitui uma grande professora ao longo destes anos.

À Mara, secretária do Dr. Hamilton, sempre atenciosa e dedicada, uma grande pessoa que me ajudou em todos momentos.

Ao meu amigo Andrei, que me acompanhou desde o início neste trabalho, sempre ao meu lado, me ajudando.

Às minhas eternas amigas Cristiane, Marcinha, Marina, pessoas que contribuíram muito para que eu pudesse alcançar este objetivo em minha vida.

À Cleonice, uma pessoa que sempre esteve ao meu lado, ajudando em todos momentos, demonstrando ser minha amiga.

Ao Departamento de Cirurgia e Ortopedia pela oportunidade à conclusão deste curso.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FMB, pela paciência e comprometimento.

À Bilbiotecária Meire, pela atenção, eficiência, simpatia e comprometimento.

À Rita de Cássia Alvarado, por sua dedicação, comprometimento e competência.

Às amigas Rejane e Adriana, Laboratório de Biologia Molecular – Hemocentro de Botucatu, por compartilhar os seus conhecimentos.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

√ Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

√ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

# Prefácio

## PREFÁCIO

A biomédica Renata optou por defender seu doutoramento não num formato convencional de “Tese”, e sim com demonstração de sua trajetória científica.

São seis trabalhos científicos, alguns já publicados, que denotam o árduo caminho percorrido pela candidata, no tempo e no espaço. Durante alguns anos ela transitou entre o “in vitro” e o “in vivo”.

Sob a co-orientação de pesquisadores com perfis bastante diversos – um clínico-laboratorial, outro cirúrgico-experimental – não foram poucas as vezes em que ela deve ter duvidado do sentido a seguir. O certo é que, apesar desta aparente desvantagem, a candidata soube aproveitar os diferentes pontos de vista para construir sua própria direção. Esta autonomia a credencia a tornar-se doutora.

Seus trabalhos mostram cada passo de seu crescimento. Passam por técnicas diferentes de captação de condrócitos: células mesenquimais e/ou lise de cartilagem diferenciada. Avançam por identificar e utilizar diferentes suportes: alginato e gel de plaquetas. E culminam com a aplicação “in vivo” (coelhos) do material que ela própria cultivou.

Não se pode atribuir toda a responsabilidade a uma só pessoa quando o projeto do qual ela participa envolve numerosas frentes. Mas é possível afirmar a grande catalizadora do processo foi a biomédica Renata.

Se não fosse o histórico que envolve o laboratório de Biologia Celular, as lutas do Prof. Dr. Paulo Machado, da Profa. Dra. Elenice Deffune e tantos outros que contribuíram, nada do que foi feito seria possível.



A multidisciplinaridade que ainda sobrevive no Campus de Botucatu permitiu a integração entre Morfologia (Histologia), Bioestatística, Ortopedia e Traumatologia (Dr. Ricardo), Laboratório de Cirurgia Experimental, etc.. Por aí andou a biomédica Renata.

E, por fim, e não menos importante, posso testemunhar que o que permeou a produção de todos os trabalhos aqui apresentados foi o forte sentido ético – humano e científico –

O que está dito foi o que se viu.

**Prof. Dr. Hamilton da Rosa Pereira**

**2008**

# Sumário

Resumo.....	I
.....	
Abstract.....	II
.....	
Artigo de Revisão: Regeneração da cartilagem articular – uma visão geral.....	01
Artigo I: Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato.....	21
Artigo II: Caracterização imunohistoquímica da cultura de condrócitos em pellet tridimensional.....	41
.....	
Artigo III: Platelet lysate gel (PLG): New methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage Implants.....	54
Artigo IV: Tratamento de lesões osteocondrais da cartilagem articular do joelho através da engenharia tecidual: transplante alogênico de condrócitos embebidos em gel de plaquetas versus gel de alginato.....	68
Artigo VI: Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	103

#### Artigos em Colaboração:

Artigo VII: Avaliação de morte programada de células: comparação do índice apoptótico progressivo em cultura de condrócitos.....	106
Artigo VIII: Gel de plaquetas: nova tecnologia em arcabouços 3D para cultivo de cartilagem - engenharia de tecidos.....	122

## Resumo

A cartilagem articular é um tecido avascular com números limitados de condrócitos, com capacidade limitada de reparo após uma lesão aguda. As técnicas disponíveis atualmente para o tratamento de lesões de cartilagem articular podem resultar em alívio dos sintomas, mas não na regeneração do tecido lesado. A geração de um substituto biológico que recomponha a cartilagem articular nativa requer células vivas que sejam capazes de sintetizar e manter a matriz cartilaginosa. A engenharia de tecidos constitui recentemente uma metodologia para reconstrução de novos órgãos e tecidos que foram lesados e apresentam dificuldades na reparação. Um dos maiores avanços no campo da engenharia de tecidos e dentro da medicina ortopédica, tem sido, o recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds*, para posterior realização de implante de condrócitos, com intuito de regenerar o tecido cartilaginoso lesado. Uma variedade de *scaffolds* como hidrogel e polímeros sintéticos, têm sido investigadas para a expansão dos condrócitos “in vitro” para o reparo da cartilagem lesada. Tais matrizes incluem: arcabouços à base de colágeno: gel de colágeno tipo I e II, esponjas de colágeno tipo II, ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, fibrina, peptídeos, alginato e gel de plaquetas. No presente trabalho desenvolvemos diferentes metodologias de cultura de condrócitos utilizando *scaffold* sintético “hidrogel de alginato” e biológico “gel de plaquetas” obtido a partir do Plasma Rico em Plaquetas - PRP, além da cultura de condrócitos em *pellet* tri-dimensional, objetivando encontrar a melhor metodologia para a realização de implantes de condrócitos. Como modelo experimental escolhemos coelhos, tanto para coleta da cartilagem articular como para obtenção do plasma sanguíneo e realização dos implantes alogênicos. Em relação à cultura celular, obtivemos resultados satisfatórios e termos de viabilidade celular e produção de matriz pericelular da cartilagem, quando utilizamos hidrogel de alginato. Na cultura em gel de plaquetas, os resultados também foram satisfatórios no tocante da viabilidade celular e produção de matriz extracelular. A cultura em *pellet* tri-dimensional demonstrou ser eficiente para estudo da histogênese dos condrócitos, constituindo-se de uma massa celular com pouca resistência. Para a realização dos implantes em lesões osteocondrais efetuadas na cartilagem articular dos animais, utilizou-se como *scaffold* “hidrogel de alginato” contendo condrócitos (grupo tratado) ou não (grupo controle) e “gel de plaquetas” contendo condrócitos (grupo tratado) ou não (grupo controle), implantados respectivamente em joelhos esquerdos e direitos em grupos distintos de animais. Efetuou-se avaliação macroscópica e microscópica dos implantes em um prazo de 30, 60 e 90 dias pós-cirurgia, observando resultados de reparação satisfatórios nos implantes os quais usou-se gel de plaquetas.

## Abstract

Articular cartilage is an avascular tissue with limited numbers of chondrocytes, and limited recuperative capacity after a severe lesion. The techniques currently available for treatment of articular cartilage lesions can result in relief of symptoms, but not in regeneration of injured tissue. The generation of biological substitute that would reconstitute native articular cartilage requires live cells capable of synthesizing and maintaining cartilaginous matrix. The engineering of tissues has recently constituted a methodology for constructing new organs and tissues that had been injured and present recuperative difficulties. One of the greatest advances in the field of tissue engineering, and within orthopedic medicine, has been the recruitment of tissue from the patient him- or herself, that are dissociated in cells and cultured on biological or synthetic supports, known as *scaffolds*, for subsequent realization of implantation of chondrocytes, in order to regenerate injured cartilaginous tissue. A variety of scaffolds, such as hydrogel and synthetic polymers, have been investigated for expansion of chondrocytes *in vitro* to repair injured cartilage. Such matrices include: collagen-based scaffolds: gel of collagen types I and II, sponges of collagen type II, polylactic acid and polyglycolic acid, fibrin, polyethylene oxide, peptides, alginate and gel of platelets. In the present work we developed different methodologies of chondrocyte culture utilizing the synthetic *scaffold* "alginate hydrogel" and biological "gel of platelets" obtained from Platelet-Rich Plasma - PRP, in addition to chondrocyte culture in a tri-dimensional *pellet*, aiming to find the best methodology for accomplishing chondrocyte implants. We chose rabbits for the experimental model, as much for collection of articular cartilage as for obtaining blood plasma and realization of allogenic implants. In relation to cell culture, we obtained satisfactory results in terms of cellular viability and production of pericellular matrix of cartilage, by using alginate hydrogel. In platelet gel culture, the results in relation to cell viability and extracellular matrix production were also satisfactory. The culture in tri-dimensional pellet was demonstrated efficient for the study of chondrocyte histogenesis, constituting a cellular mass with little resistance. For the accomplishment of implants in osteochondral lesions induced in articular cartilage of animals, the scaffold consisted of alginate hydrogel containing chondrocytes (treated group) or not (control group) and "platelet gel" containing chondrocytes (treated group) or not (control group), implanted, respectively, in left and right knees in distinct animal groups. Macroscopic and microscopic evaluations of implants were performed at 30, 60 and 90 days post-surgery, displaying satisfactory recuperative results in implants that used platelet gel.

**Regeneração da Cartilagem Articular - Uma Visão Geral**

[Artigo de Revisão]

*Status: a ser submetido a Periódico Nacional Brazilian Journal of  
Medical and Biological Research*

## REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR – UMA VISÃO GERAL

### ARTICULAR CARTILAGE REGENERATION - AN OVERVIEW

Renata Aparecida de Camargo Bittencourt<sup>1</sup>; Hamilton Rosa Pereira<sup>2</sup>; Sérgio Luís Felisbino<sup>3</sup>; Elenice Deffune<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda do Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>2</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Cirurgia e Ortopedia - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>3</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu./ <sup>4</sup>Professora Assistente Doutora, Departamento de Urologia/ Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Endereço para correspondência: Renata Aparecida de Camargo Bittencourt, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Hemocentro, Rubião Júnior s/n, Telefone: (14) 38116041, Fax: (14) 38116041, E-mail: [rentcourt2000@yahoo.com.br](mailto:rentcourt2000@yahoo.com.br)

#### Resumo

A limitada capacidade de regeneração da cartilagem articular tem sido caracterizada como uma das maiores preocupações na área da ortopedia. Existem várias metodologias sendo empregadas na tentativa de reparar lesões focais da cartilagem articular. Tais metodologias incluem o tratamento cirúrgico que vão desde métodos clássicos de estimulação da medula óssea como desbridamento, perfurações múltiplas, abrasões, microfaturas, até métodos biológicos modernos como transplantes periosteais e pericondrais, implante de condrócitos autólogos cultivados e enxertos autólogos osteocondrais. Vários métodos biológicos modernos encontram-se associados à engenharia de tecidos, também conhecida como medicina regenerativa, consistindo na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecidos do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes), para então serem reinsertidos no paciente. Vários tipos de

suportes têm sido utilizados na cultura de condrócitos, dentre eles, hidrogel de alginato, quitosana, fibrina, colágeno, agarose, ácido poliglicólico, ácido polilático etc... No entanto, cada suporte apresenta propriedades específicas na produção de cartilagem *in vitro*. As pesquisas que englobam a engenharia tecidual estão amplamente avançadas, trazendo benefícios no que diz respeito ao uso de suportes para o estudo do desenvolvimento do tecido cartilaginoso e aplicação *in vivo* de tais suportes com o objetivo de regenerar a cartilagem articular.

**Palavras chaves:** regeneração, cartilagem articular, engenharia de tecidos.

## 1. Características do Tecido Cartilaginoso

O tecido cartilaginoso é um tipo especializado de tecido conjuntivo de consistência semi-rígida, avascular, contendo muita matriz extracelular esparsamente povoada por células (condrócitos) (1,2).

A matriz cartilaginosa é composta por 48% a 62% de colágeno tipo II e 22 a 38% de proteoglicanos (1). Outros tipos de colágenos como V, VI, IX, X e XI, e outros colágenos secundários fazem parte da composição da matriz cartilaginosa em menor concentração (3). As glicosaminoglicanas presentes são condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato, heparam-sulfato e ácido hialurônico (4,5).

A matriz cartilaginosa divide-se em matriz territorial (em torno das lacunas) e interterritorial. No caso da cartilagem hialina, a matriz territorial é composta por grande quantidade de condroitim-sulfato e pouco colágeno, deixando-a basófila, ao passo que, a matriz interterritorial, é mais rica em colágeno tipo II e pobre em proteoglicanas (4). Nas zonas intermediárias e profundas da cartilagem articular, a matriz pericelular é separada da matriz territorial por uma cápsula fibrosa. Os condrócitos juntamente com a matriz pericelular e a cápsula que os envolvem formam unidades estruturais da cartilagem denominadas cêndrons (6).

A interação dos condrócitos com a matriz extracelular mantém o fenótipo diferenciado dessas células (7).

No tecido cartilaginoso adulto normal a homeostase da matriz é balanceada de forma que não haja nem perda, nem ganho de tecido. Estes processos são controlados por uma variedade de fatores de crescimento como [(Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) e Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )] que estimulam a síntese



de agregana e citocinas como interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) que estimulam a degradação da matriz (8-10).

## 2. Estrutura e Função da Cartilagem Articular Normal:

A cartilagem hialina que reveste a superfície das articulações sinoviais pode medir no adulto de 2 a 4mm de espessura, os condrócitos apresentam-se em disposição zonal, a matriz é composta de 68 a 85% de água, o que confere elasticidade ao tecido cartilaginoso (3,11). Macroscopicamente, a cartilagem articular é brilhante, lisa, branca e semi-rígida (12). Microscopicamente, a cartilagem articular divide-se em várias zonas (Figura 1):

- **Zona superficial:** contém células fusiformes com estrutura citoplasmática semelhante ao fibroblasto. Tanto os condrócitos quanto as fibras de colágenos estão organizados paralelamente à superfície articular;
- **Zona intermediária:** os condrócitos são arredondados, apresentando prolongamentos citoplasmáticos, e se dispõem em filas alongadas e irregulares. As fibras colágenas se organizam de modo perpendicular à superfície articular;
- **Zona mais profunda:** os condrócitos tendem a hipertrofiar e degenerar. Quando observadas pela microscopia eletrônica, há um acúmulo de glicogênio e material lipídico no citoplasma. Há o acúmulo de cristais de hidroxapatita, levando à calcificação da matriz cartilaginosa (13). Durante o período de crescimento esta região é substituída por tecido ósseo, enquanto que as células da zona intermediária dividem-se por mitose, permitindo o aumento da epífise óssea (14).

As fibras de colágeno, na zona mais profunda, estão firmemente inseridas no osso subcondral, dando estabilidade à cartilagem articular (15).

As articulações sinoviais também apresentam ligamentos intra e extracapsulares, e como no caso da articulação do joelho contém meniscos intra-articulares, de natureza fibrocartilaginosa (14).

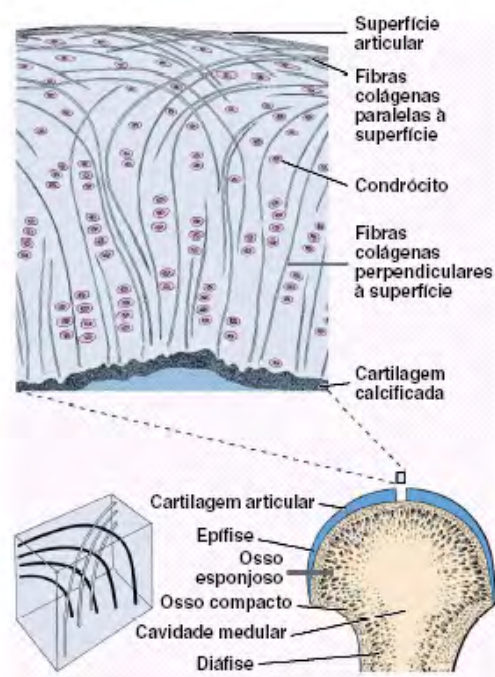


Figura 1. Organização da cartilagem articular. Fonte: Junqueira & Carneiro (2).

## 2.1. Degeneração da cartilagem articular

As patologias que envolvem lesão da cartilagem articular têm freqüentemente associadas o prognóstico reservado, devido à dificuldade de plena regeneração da cartilagem hialina e à possível evolução para doença articular degenerativa, resultando em hipofunção da articulação e comprometimento e bem estar de um indivíduo (16).

Vellutini (17) deixa explícita em seu trabalho a importância da diferenciação entre alterações cartilaginosas decorrentes do envelhecimento e as de ordem degenerativa. A cartilagem articular hialina humana de articulações sinoviais apresenta alterações progressivas com a idade. Com o envelhecimento há diminuição progressiva e importante do número de condrocitos da cartilagem articular, que passa de  $24 \times 10^6$  células por grama de tecido cartilaginoso no feto para  $0,4 \times 10^6$  no tecido adulto (17). Inúmeras alterações também ocorrem na matriz extracelular como diminuição do peso seco do colágeno e desequilíbrio nas quantidades de proteoglicanas (17,18).

Egri e colaboradores (18) relataram em seu estudo que o tamanho dos condrócitos, o índice de divisão celular e a taxa de utilização de oxigênio não são afetados pelo processo de envelhecimento, em contrapartida há uma diminuição na atividade sintética dos condrócitos.

A osteoartrite, doença articular degenerativa, artrose ou osteoartrose (OA) , como ainda é designada, acomete grande parte da população acima dos 45 anos. Entre as alterações morfológicas, a cartilagem articular perde sua natureza homogênea e é rompida e fragmentada, com fibrilação, fissuras e ulcerações (10). Quando se trata da histologia do tecido a OA está associada a alterações do colágeno, de proteoglicanas, da síntese de condrócitos, da hidratação e das propriedades mecânicas da cartilagem. Apesar de não existirem evidências de alteração do conteúdo de colágeno, o aumento importante da hidratação tecidual resulta provavelmente do enfraquecimento e ruptura da trama de fibrilas. Desequilíbrios entre ativadores e inibidores enzimáticos levam à degradação da matriz cartilaginosa (17). As metaloproteinases têm grande participação na degradação excessiva dos componentes da matriz (5).

Fernandez e colaboradores (19), citam em seu trabalho que a maioria das tentativas terapêuticas desenvolvidas, algumas com resultados controversos e até insatisfatórios, objetiva intervir na patogenia, ou seja, agir no metabolismo dos condrócitos, atuar nas citocinas IL-1 e IL-6 e alguns fatores de crescimentos, inibir metaloproteinases, além de estimular fibras colágenas, proteoglicanas e células da matriz, entre outros. As técnicas de cultura e transplante de condrócitos avaliadas em seu artigo de revisão parecem serem promissoras para o tratamento de lesões decorrentes da osteoartrite.

Quanto às lesões traumáticas, estas podem ocorrer diretamente ou indiretamente em conseqüência de uma fratura intra-articular, impacto de alta intensidade ou seguidas de lesões no ligamento, afetando a cartilagem articular (20).

## **2.2. Classificação dos Defeitos da Cartilagem**

Outerbridge na década de 60 fez uma classificação dos defeitos articulares de acordo com a profundidade da lesão (Figura 2); grau 0: normal, grau I: lesão articular branda, grau II: lesões são caracterizadas por fibrilação, fissuras menor que 1.5 cm

de diâmetro, grau III: lesões com fissuras profundas até o osso subcondral; grau IV: lesões são diferenciadas por expor o osso subcondral (3,21).

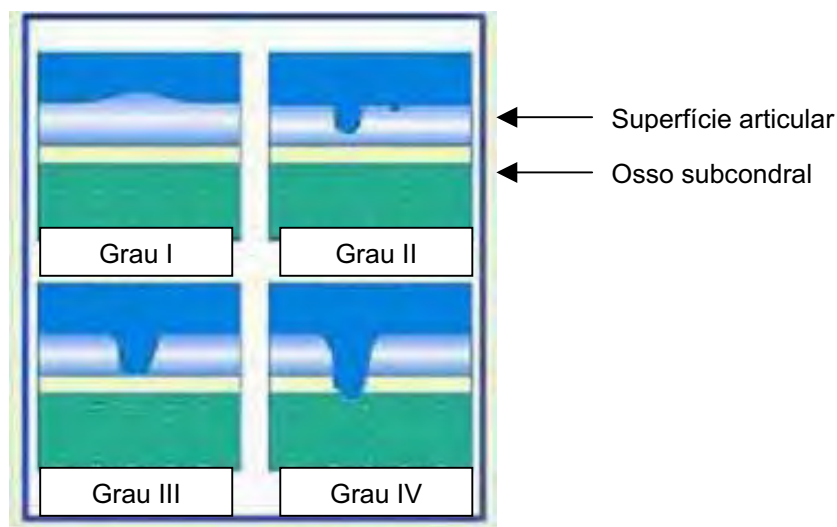


Figura 2 – Classificação dos defeitos articulares. Fonte: Smith e colaboradores (22)  
- modificado por Bittencourt 2008.

### 2.3. Processo de Reparo da Cartilagem Articular

O tratamento cirúrgico das lesões condrais e osteocondrais que acometem articulações que suportam carga, principalmente o joelho, ainda representa um desafio para a medicina ortopédica.

A cicatrização de uma lesão restrita à cartilagem hialina articular (defeito condral) não obedece inteiramente às três fases naturais que são necrose, inflamação e reparação, justamente por causa da sua condição avascular, limitando a capacidade de cicatrização. Quando se trata de um defeito osteocondral, muito vascularizado, todas as três fases ocorrem naturalmente. (23).

As lesões focais da cartilagem articular requerem tratamento cirúrgico que vão desde métodos clássicos de estimulação da medula óssea como desbridamento, perfurações múltiplas, abrasões, microfaturas, até métodos biológicos modernos como transplantes periosteais e pericondrais, implante de

condrócitos autólogos cultivados (IAC), e enxertos autólogos osteocondrais (20, 21,23).

Para a realização do IAC, a cartilagem das margens da articulação do joelho é colhida através de artroscopia (Figura 3). Posteriormente, os condrócitos são cultivados durante quatro semanas, e depois são transplantados na área lesada. As células são sustentadas por uma membrana de perióstio retirada da parte superior da tíbia. Esta membrana é suturada sobre o defeito da cartilagem, antes da injeção dos condrócitos isolados (15,24).

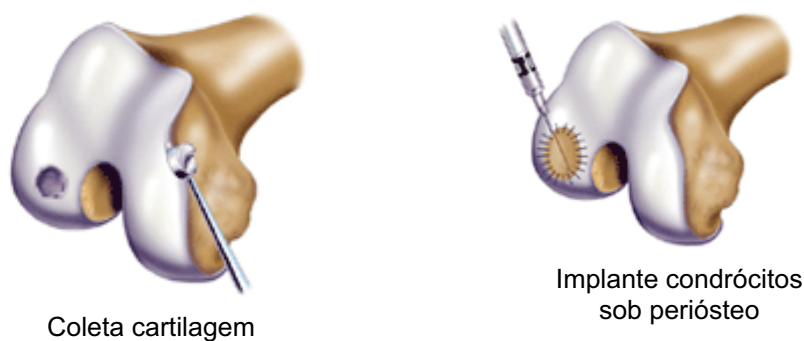


Figura 3 - Implante Autólogo de Condrócitos (IAC).

Fonte: <http://cartilagecenter.com/repairing.htm> (25) – modificado por Bittencourt 2008)

Brittberg e colaboradores (24) foram os pioneiros na realização do implante de condrócitos autólogos em humanos, obtendo resultados satisfatórios no tratamento de pacientes com lesões no côndilo femoral. No entanto o procedimento não foi considerado eficiente para o tratamento de condromalácia patelar.

As explicações mais prováveis para o processo de reparação da cartilagem articular através do IAC são as seguintes (19):

- Os condrócitos transplantados repopulariam a área da lesão e sintetizariam matriz cartilaginosa; o perióstio “selaria” o defeito;
- O perióstio estimularia a replicação dos condrócitos cultivados e implantados;
- O perióstio e os condrócitos implantados estimulariam os condrócitos da cartilagem adjacente ou as células das camadas calcificadas mais profundas da cartilagem articular a entrarem na área defeituosa, dividirem-se e reparar o defeito.

Recentemente tem-se usado no lugar do periósteo a cola de fibrina (21).

Segundo os dados de WROBLE (26) cerca de 80% dos pacientes seguidos num período de 5 a 10 anos após o IAC, tiveram bom ou excelente resultado. Complicações referentes à adesão ou a artrofibrose foram encontrados em 5% deles. Houve registro de falha no transplante em 2% dos pacientes.

Outerbridge e colaboradores (27) foram os primeiros a relatarem a técnica que envolve o enxerto autólogo osteocondral (EAO). Esta técnica é baseada na transferência de fragmentos de cartilagem de áreas do joelho onde não há desgaste e sobrecarga e implante em áreas de lesão. Entretanto, é uma técnica de uso limitado pelos ortopedistas devido à baixa quantidade de doadores disponíveis.

Outra metodologia é o enxerto alogênico osteocondral, freqüentemente as amostras são obtidas de cadáveres podendo causar reações imunológicas (20).

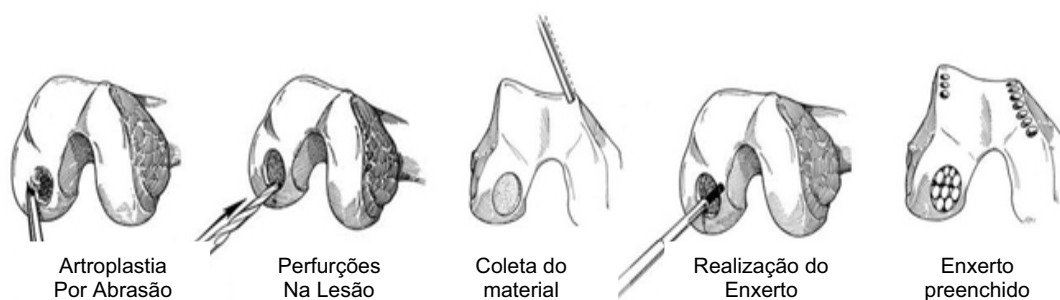


Figura 4 – Enxerto Autólogo Osteocondral (EAO). Fonte: Smith e colaboradores (22) - modificado por Bittencourt 2008

Shah e colaboradores (21) citaram em seu trabalho de revisão um modelo de algoritmo de tratamento de lesões na cartilagem articular, de acordo com as técnicas já existentes na medicina ortopédica (Figura 5). De acordo com os pesquisadores deve-se levar em consideração o tamanho da lesão e as características dos pacientes como idade e nível de atividade.

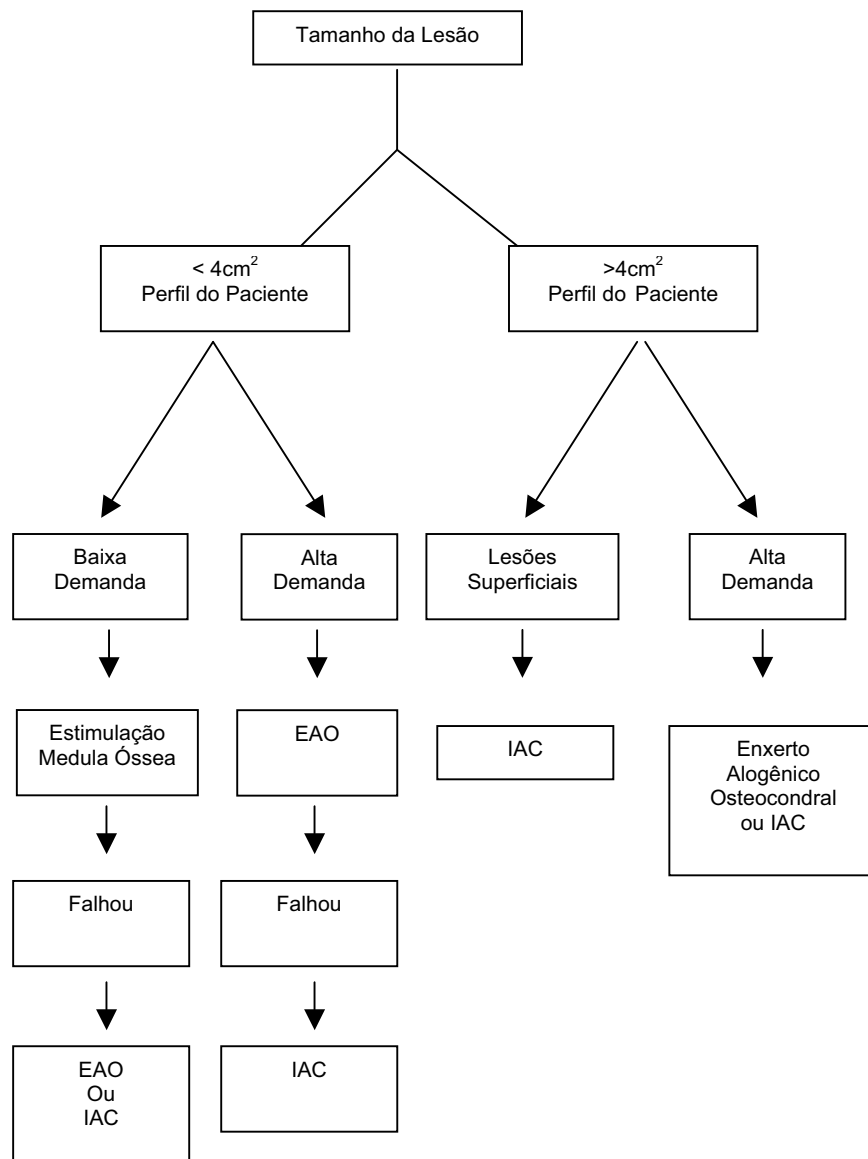


Figura 5 – Algoritmo de tratamento de defeitos na cartilagem articular: Estimulação da Medula Óssea, Enxerto Autólogo Osteocondral (EAO). Implante Autólogos de Condrócitos (IAC). Fonte: Shah e colaboradores (22) - modificado por Bittencourt 2008.

A tabela 1 representa as vantagens e desvantagens do uso de todos tratamentos em questão para o reparo da cartilagem articular.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos tratamento que visam reparar lesões na cartilagem articular. Fonte: Smith e colaboradores (22), modificada por Bittencourt, 2008.

<b>Tratamento</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Microfratura</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• custo alto;</li> <li>• técnica aplicável.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• não produz cartilagem hialina confiável;</li> <li>• mobilidade restrita.</li> </ul>
<b>Enxerto Osteocondral Autólogo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• alta taxa de sobrevida dos condrócitos na articulação;</li> <li>• características do tecido cartilaginoso hialino.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• morbidade da área doadora;</li> <li>• reabilitação a longo prazo;</li> <li>• lesão na superfície articular devido ao implante dos fragmentos levando aos processos de inflamação e restrição na mobilidade da articulação.</li> </ul>
<b>Enxerto Osteocondral Alogênico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• alta taxa de sobrevida dos condrócitos na articulação;</li> <li>• características do tecido cartilaginoso hialino.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• reações imunológicas e transmissão de doenças;</li> <li>• problemas na fixação e viabilidade celular;</li> <li>• reabilitação longa;</li> <li>• lesão na superfície articular devido ao implante dos fragmentos levando aos processos de inflamação e restrição na mobilidade da articulação.</li> </ul>
<b>Implante Autólogo de Condrócitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• característica de tecido cartilaginoso hialino de reparo;</li> <li>• implante de células autólogas;</li> <li>• um ano de tratamento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• atividades restritas durante um ano para permitir a integração das células;</li> <li>• custo alto;</li> <li>• realização de dois procedimentos cirúrgicos.</li> </ul>



### 3. Engenharia de Tecidos

A técnica, conhecida como *Engenharia de Tecidos*, consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecidos do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc), para então serem reinseridos no paciente. De uma forma geral, a preparação dos produtos da engenharia de tecidos segue as seguintes etapas (28):

- Seleção e processamento do suporte;
- Inoculação da população celular sobre o suporte;
- Crescimento do tecido prematuro;
- Crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (bioreator);
- Re-implante cirúrgico;
- Assimilação do produto.

O suporte deverá ser biocompatível de maneira que minimize o máximo de reações imunológicas, biodegradável, onde os produtos de degradação não devam ser citotóxicos, tumorigênicos, nefrotóxicos ou causar qualquer outro efeito tóxico ao organismo (29).

Segundo Vert e colaboradores (30) dentro da engenharia de tecidos os termos biodegradação, bioabsorção e bioreabsorção apresentam definições distintas:

- Biodegradável: é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo;
- Bioreabsorvível: são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*; ex: materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo.
- Bioabsorvível: são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluídos corpóreos sem qualquer clivagem das cadeias macromoleculares ou diminuição de massa molecular.

A primeira etapa na engenharia de tecidos inicia-se com o desenvolvimento, seleção e processamento dos suportes para cultura de células, que podem ser

polímeros naturais (colágeno, agarose, alginato, fibrina, hialuronato, gelatina e glicosaminoglicana) suportes de polímeros sintéticos degradáveis [poli ( $\alpha$  - hidroxí ácidos)] (31-33).

Existem inúmeros suportes que podem ser utilizados na cultura de células para produção de tecidos *in vitro*, todos classificados de acordo com suas características químicas, como polímeros à base de proteínas, polímeros à base de carboidratos e polímeros artificiais (tabela 2). Pode-se também fazer combinações entre suportes distintos, efetuando-se algumas alterações químicas para produção de matrizes específicas como exemplo o tri-copolímero utilizado na cultura de condrócitos contém três componentes: gelatina, condroitim sulfatado e hialuronato (20,29). Outras características são de suma importância para a escolha de um suporte adequado, como ilustrada na tabela 3.

Tabela 2 – Suportes utilizados em engenharia tecidual. Fonte: Hunziker (20), modificada por Bittencourt 2008.

<b>1. Polímeros a base de proteínas</b>
<i>Fibrina</i>
<i>Colágeno</i>
<i>Gelatina</i>
<b>2. Polímeros a base de carboidratos</b>
<i>Ácido Polilático</i>
<i>Ácido Poliglicólico</i>
<i>Hialuronato</i>
<i>Agarose</i>
<i>Alginato</i>
<i>Quitosana</i>
<b>3. Polímeros Artificiais</b>
<i>Dácron (Tereftalato de polietileno)</i>
<i>Teflon (politetrafluoroetileno)</i>
<i>Fibras de Carbono</i>
<i>Hidroxiapatita</i>

Tabela 3 – Propriedades dos suportes para utilização em engenharia tecidual. Fonte: Hunziker (20), modificada por Bittencourt 2008.

<i>Propriedades do suporte</i>	<i>Base Biológica</i>
<b>1. Porosidade</b>	Migração Celular
<b>2. Carreadora</b>	Liberação e transporte de substâncias sinalizadoras
<b>3. Adesão</b>	Fixação da célula
<b>4. Biodegradabilidade</b>	Remodelamento fisiológico
<b>5. Estabilidade do volume</b>	Contorno da superfície lisa, no caso de reparo da cartilagem articular
<b>6. Biocompatibilidade</b>	Bom contato com os compartimentos do tecido nativo
<b>7. Ligação</b>	Aumenta a integração entre fibrilas de colágeno nos compartimentos do tecido de reparo e nativo
<b>8. Elasticidade</b>	De acordo com as propriedades do tecido

### 3.1. Suportes Utilizados na Cultura de Condrócitos

A cultura de condrócitos permite identificar condições sob as quais o reparo da cartilagem ocorre e descobrir meios específicos para a prevenção de danos ou mesmo a interrupção de sua destruição e aumentar a celularidade para possível implante (19).

A cultura de condrócitos em um suporte tri-dimensional baseia-se em cultivar os condrócitos em uma matriz artificial, biodegradável, que pode suportar o crescimento da cartilagem durante alguns meses, enquanto os condrócitos e a matriz se estabelecem, sem a alteração fenotípica. A matriz degrada gradualmente em 8 a 10 semanas após o implante de cartilagem (15).

Vários sistemas de cultura são usados na expansão dos condrócitos: a denominada cultura de condrócitos em monocamadas, (34) cultura em sistema tridimensional em esponjas de colágeno, fibrina, gel de agarose, hidrogel de alginato, quitosana, etc... (20,29).

A cultura de condrócitos em monocamadas, baseada na aderência destas células numa placa de plástico tem algumas desvantagens, pois é possível manter o

fenótipo condrocitário por somente algumas semanas. O tecido formado neste tipo de cultura apresenta características de tecido fibroso ou mais propriamente fibrocartilagem (35).

Há mais de 20 anos, têm-se usado suportes ou esponjas de colágeno, compostos por fibrilas de colágeno (tipo I ou II). Tal suporte tem sido usado no reparo de lesões osteocondrais de coelhos, obtendo-se resultados satisfatórios (20). O suporte de colágeno estimula a produção de colágeno na cultura de condrócitos, sendo que, o uso de colágeno tipo II tem apresentados melhores resultados que matriz contendo colágeno tipo I (36).

Já a cultura em gel de agarose é um método propício para manutenção da síntese de colágenos tipo II e agrecanas contendo queratan-sulfato que são marcadores do fenótipo dos condrócitos (34). No entanto apresenta pobre biodegradabilidade, devido à falta de enzimas de degradação nos tecidos de mamíferos (29).

A quitosana é um polissacarídeo natural, estruturalmente similar as glicosaminoglicanas, derivada de carapaças de crustáceos, atóxica e bioabsorvível. Na cultura de condrócitos, tem-se demonstrado ser eficiente na manutenção da morfologia dos condrócitos, no entanto, não estimula a proliferação celular (37). Geralmente é usada em associação com sulfato de condroitim (20).

O gel de fibrina ou cola de fibrina é formado através da interação entre fibrinogênio e trombina (29). Sua formação ocorre no final da cascata de coagulação, onde a trombina converte o fibrinogênio solúvel em fibrina, formando uma trama fibrilar tridimensional, que pode servir como suporte para cultura de condrócitos e células mesenquimais. Apresenta vantagens de biocompatibilidade e biodegradação, principalmente por ser um componente próprio do organismo (38). O suporte de gel de fibrina tem sido empregado não somente para incorporação de condrócitos *in vitro* quanto *in vivo*, além de ser um importante carreador de fatores de crescimento (29). Estudos experimentais utilizando fibrina exógena têm demonstrado a ocorrência de reações imunológicas na aplicação de tal gel (20).

O alginato é um polissacarídeo linear [n - ácido gulurônico (G) – ácido manurônico (M)] arranjado em blocos (Figura 6), aniônico isolado e purificado de algas marrons (Phaeophyta), em particular das seguintes espécies: *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata* e *Fucus serratus* (34,39,40).

Tal hidrogel apresenta a capacidade de gelatinizar-se de maneira reversível, na presença de cálcio ou outros cátions divalentes (34,39,40). Pode ser utilizado na concentração de 1-20% (29), no entanto a concentração ideal para proliferação dos condrócitos é 1,5% (41).

Os condrócitos suspensos em alginato não aderem à matriz, facilitando a sua recuperação depois de cultivados, permitindo o estudo da expressão protéica e genética. Através deste método, consegue-se manter a expressão do fenótipo diferenciado, restaurar condrócitos não diferenciados e formar uma matriz extracelular similar à encontrada na cartilagem articular (42).

O hidrogel de alginato apresenta característica biocompatível, podendo ser utilizado na indústria de alimentos, cosméticos, produção de anticorpos monoclonais e produção de cartilagem (40).

Haüselmann e colaboradores (34), obtiveram excelentes resultados cultivando condrócitos retirados da cartilagem articular bovina em pérolas de alginato num período de oito meses. Neste trabalho tanto o fenótipo dos condrócitos quanto a síntese de colágenos e proteoglicanas foram mantidos identificando-se presença de duas populações de condrócitos com diferenças morfológicas dependendo da sua localização nas pérolas de alginato.

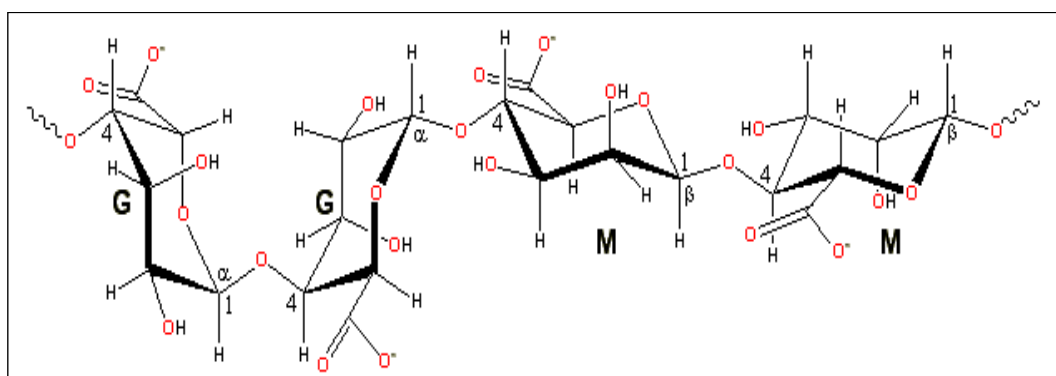


Figura 6 - Fórmula estrutural do alginato consistindo de resíduos do ácido manurônico (M) e gulurônico (G) arranjado em blocos lineares. Fonte: <http://curatec.com.br> (43).

O hialuronato é um componente fisiológico da matriz cartilaginosa, que pode ser usado para formação de suporte para o cultivo de condrócitos. Entretanto, o hialuronato na forma modificada pode comprometer sua biocompatibilidade e pode levar a condrólise. Deste modo, utiliza-se a forma não modificada do hialuronato (20,29).

Filova e colaboradores (44), associaram colágeno tipo I, fibrina e hialuronato para produção de um suporte contendo os três componentes, obtendo resultados satisfatórios no reparo da cartilagem quando utilizaram tal suporte contendo condrócitos autólogos implantados em defeitos osteocondrais do joelho.

Os polímeros sintéticos que foram mais investigados para serem utilizados como suportes para cultura de condrócitos têm sido poli ( $\alpha$  - hidroxí ácidos) que incluem o poli (ácido láctico) (PLLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). Esses três materiais, têm uma longa história no uso de suturas cirúrgicas degradáveis e são aprovados para uso em humanos pela Food and Drug Administration (FDA) (29,45).

O polímero mais usado na produção de cartilagem é o PGA. No entanto existem alguns problemas relacionados a tais suportes: adesão da célula ao polímero, integração deste ao tecido adjacente é mínima e reações que levam a formação de células sinciciais (29).

## **Conclusão**

- A limitada capacidade de regeneração da cartilagem articular ainda continua sendo um grande problema dentro da medicina ortopédica;
- Vários métodos que visam a regeneração da cartilagem articular têm sido descobertos e alguns têm demonstrado resultados satisfatórios no reparo de lesões cartilaginosas;
- As pesquisas que englobam a engenharia tecidual estão amplamente avançadas, trazendo benefícios no que diz respeito ao uso de suportes para o estudo do desenvolvimento do tecido cartilaginoso e aplicação *in vivo* de tais suportes com o objetivo de regenerar a cartilagem articular.

## Referências

1. Camanho GL. Tratamento de osteartrose do joelho. *Rev Bras Orthop* 2001; 36: 135-140.
2. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido cartilaginoso. In: Junqueira LC, Carneiro J, *Histologia básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p 130-135.
3. Mandelbaum BR, Browne JE, Fu F, Micheli L, Mosely JC, Erggelet C, et al. Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med* 1998; 26: 853-861.
4. Gartner P, Hiatt JL. Cartilagem e osso. In: Gartner P, Hiatt JL, *Tratado de histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p 104-123.
5. Felisbino SL, Carvalho HF. Condrócito. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Barueri: Manole; 2005. p 11-21.
6. Lee GM, Loeser RF. Interactions of the chondrocyte with its pericellular matrix. *Cells and Mater* 1998; 8: 135-149.
7. Martinez-Hernandez A. Reparação, regeneração e fibrose. In: Rubin E, Farber JL. *Patologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p 75-101.
8. Morales TI. Cartilage proteoglycan homeostasis: role of growth factors. In: Brandt, K D, *Cartilage Changes in Osteoarthritis*. Indianapolis: Indiana University School of medicine; 1990. p 17-21.
9. Pelletier JP, Dibatista JA, Roughley P, McCollum, R, Martel-Pelletier, J. Cytokines and inflammation in the cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19: 545-565.
10. Rezende MU, Hernandez AJ, Camanho, GL, Amatatuzzi, MM. Cartilagem articular e osteoartrose. *Acta Orthop Bras* 2000; 8: 100-104.
11. Lemos C, Filho JSA, Aymoré IL, Barbosa CSP. Sistema ósteo-articular. In: Brasileiro Filho G, Bogliolo L. *Bogliolo: patologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p: 873-927.
12. Schiller AL, Teitelbaum SL. Ossos e articulações. In: Rubin E, Farber JL, *Patologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p 1289-1363.
13. Hirohata K, Morimoto K, Kimura H. Normal tissue. In: *Ultrastructure of bone and joint diseases*. 2<sup>nd</sup> ed. Tokyo: Igaku-Shoin, 1981. p 1-26.
14. Ham AW. Articulações. In: *Histologia*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1977. p 310-317.

15. Bentley G, Minas T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. *Br Med J* <http://www.bmj-pt.com>; 2001.
16. Souza TD, Del Carlo RJ, Vitoria MIV. Eletroterapia no processo de reparação da superfície articular de coelhos. *Ciênc Rural* 2001; 31; 819-824.
17. Vellutini WC. Envelhecimento e degeneração da cartilagem articular. *Acta Ortop Bras* 1997; 5:1-4.
18. Egri D, Battistella LR, Yoshinari NH. O envelhecimento da cartilagem articular. *Rev Bras Reumatol* 1999; 39: 45-48.
19. Fernandez RN, Ximenes AC, Rassi CM, Silva NA. Perspectivas terapêuticas para osteoartrose. *Rev Bras Reumatol* 1997; 37: 97-102.
20. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr Cartil* 2001; 10: 432-463.
21. Shah MR, Kaplan KM, Meislin RJ, Bosco JA. Articular cartilage restoration of the knee. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007; 65: 51-60.
22. Smith B, Lee C, Solomon D, Whitson M, Chang S. Cartilage repair. [http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108\\_2004\\_Groups/Group01/crCC.htm](http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2004_Groups/Group01/crCC.htm); 2004.
23. Ribeiro JL, Camanho GL, Takita LC. Estudo Macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. *Acta Orthop Bras* 2004; 12: 16-21.
24. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl Med* 1994; 331: 889-895.
25. Implante Autólogo de Condrócitos. <http://cartilagecenter.com/repairing.htm>; 2008.
26. Wroble RR. Articular cartilage injury and autologous chondrocyte implantation. *Phys Sports Med* <http://physsportsmed.com/issues>; 2000.
27. Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE. The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the Knee. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77: 65-72.
28. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Ciênc e Tecnol* 2005; 15:13-21.
29. Chang CH, Lin FH, Kuo TF, Liu HC. Cartilage tissue engineering. *Biomed Eng Appl Basis Commun* 2005; 17:1-11.
- 30 - Vert M, Li MS, Spenlehauer G, Guerin P. *J Mater Sci* 1992; 3: 432.



31. Risbud MV, Sitterling M. Tissue engineering: advances in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol* 2002; 20:351-356.
32. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Degradação acelerada de suportes de poli(e-caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. *Polímeros* 2006; 16: 141-148.
33. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14: 61-86.
34. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107: 17-27.
35. Green WT. Articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 1977; 124:237-250.
36. Gogolewski S. Polymeric matrices in the treatment of articular cartilage defects. *Eur Cells Mat* 2002; 4:17.
37. Lee JE, Jeong MH, Ahn HJ, Kim JK, Choi K, Chang CB. *Tissue Eng Regen Med* 2005; 2: 41 –49.
38. Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*, 2000; 24, p: 2497-2502.
39. Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Shastri P. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 887-894.
40. Mulder L. Cell adhesion on alginate scaffolds for the tissue engineering of aortic valve – a review. *Eindhoven: Eindhoven University of Technology*, 2002.
41. Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Moroz A, Guilherme GRB, Deffune E. Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. *Acta Ortop Bras* 2008 (in press).
42. Freshney RI. Specialized cells. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Liss; 2000. 22, p 367-370.
43. Fórmula estrutural alginato. [http:// curatec.com.br](http://curatec.com.br). Accessed May 5, 2008.
44. Filová E, Jelínek F, Handl M, Lytvynets A, Rampichová M, Varga F. Novel composite hyaluronan/type I collagen/fibrin scaffold enhances repair of osteochondral defect in rabbit knee. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008 (in press).

45. Sakata MM, Alberto-Rincon MC, Duek EA. Estudo da interação polímero/cartilagem/osso utilizando poli (ácido lático-co-ácido glicólico) e poli (p-dioxanoma) em cômulo femoral de coelhos. *Polímeros* 2004; 14: 176-180.

**Cultura de Condrócitos em Arcabouço Tridimensional:  
Hidrogel de Alginato**

[Artigo I]

*Status: submetido a Periódico Nacional Acta Ortopédica Brasileira*

## **CULTURA DE CONDRÓCITOS EM ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL: HIDROGEL DE ALGINATO**

### **CHONDROCYTE CULTURES IN TRI-DIMENSIONAL SCAFFOLD: ALGINATE HYDROGEL**

Renata Aparecida de Camargo Bittencourt<sup>1</sup> ; Hamilton Rosa Pereira<sup>2</sup> ; Sérgio Luís Felisbino<sup>3</sup> ; Andrei Moroz<sup>4</sup>; Gabrielle Reinoldes Bizarria Guilherme<sup>4</sup>, Elenice Deffune<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda do Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>2</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Cirurgia e Ortopedia - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>3</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu./ <sup>4</sup>Alunos de Mestrado em Biotecnologia Médica - Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>5</sup>Professora Assistente Doutora, Departamento de Urologia/ Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu, Laboratório de Cultura Celular, Hemocentro - UNESP – São Paulo - Brasil.

Endereço para correspondência: Renata Aparecida de Camargo Bittencourt, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Hemocentro, Rubião Júnior s/n, Telefone: (14) 38116041, Fax: (14) 38116041, E-mail: [rentcourt2000@yahoo.com.br](mailto:rentcourt2000@yahoo.com.br)

Agradecimentos: Nós agradecemos à Fátima Regina Guimarães, Maria Helena Spadot de Lima e Ednelson Henrique Bianchi pela excelente assistência técnica em todo desenvolvimento do trabalho.

#### **[Resumo]**

O hidrogel de alginato tem sido usado como arcabouço na cultura de condrócitos com a propriedade de manter o formato esférico dessas células, o fenótipo diferenciado e a expressão de proteínas específicas do tecido cartilaginoso. O presente estudo teve como objetivo cultivar condrócitos retirados da articulação do joelho do coelho encapsulados em hidrogel de alginato e caracterizar a produção de matriz extracelular (ECM). A cartilagem articular foi removida do joelho do coelho, com três a seis meses de idade, fragmentada em pedaços de 1mm e submetida a digestão enzimática seqüencial com tripsina (0,25%), hialuronidase (2mg/mL) e

colagenase tipo I (0,45%) a 37°C. Após a digestão enzimática a suspensão de células foi filtrada em filtro de nylon e ressuspensas a uma densidade de  $1 \times 10^6$  céls/mL em uma solução de alginato de sódio a 1,5% (w/v). A suspensão de células em alginato não polimerizado foi colocada em uma seringa de 10 cc equipada com uma agulha de 21 g, e posteriormente foi dispensada da seringa por gotejamento dentro da solução de gelatinização ( $\text{CaCl}_2$  - 102 mM), permitindo a polimerização do alginato. Os hidrogéis foram cultivados em meio DMEM-F12 suplementado com ácido ascórbico (50  $\mu\text{g/mL}$ ) e 10% de SBF. A cultura foi mantida em estufa de 37° C em uma atmosfera úmida a 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar durante quatro semanas. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. A distribuição das células e a ECM foram acessadas através das secções histológicas coradas com e azul de toluidina hematoxilina e eosina (HE). Observou-se a presença de várias células durante a cultura celular formando grupos de células, assemelhando-se a grupos isógenos da cartilagem hialina. Houve um aumento no número e na viabilidade dos condrócitos durante as quatro semanas de cultura. Através das análises histológicas dos hidrogéis de alginato corados com azul de toluidina e HE foi possível observar a distribuição definida dos condrócitos no hidrogel e a formação de matriz territorial. Este estudo demonstrou a eficiência do hidrogel de alginato como arcabouço para ser usado na cultura de condrócitos. Tal arcabouço pode ser aplicável no reparo de lesões na cartilagem articular.

**Descritores:** cartilagem articular, condrócitos, alginatos, hidrogel, regeneração, engenharia tissular.

## **[Abstract]**

Hydrogels such as alginate have been used for culture of anchorage-independent cells like chondrocytes and can keep chondrocytes in a spherical conformation, supporting differentiated phenotype and expression of cartilage-specific proteins. The aim of this study was acquire chondrocytes culture from rabbit knee articular cartilage encapsulated in alginate beads and to characterize the production of extracellular matrix (ECM). Articular cartilage was obtained from rabbit knee, aged three to six months. Cartilage removed from femoral condyles was diced into small fragments and the chondrocytes were isolated by sequential enzymatic digestion of the ECM with trypsin (0,25%), hyaluronidase (2mg/ml) type I collagenase (0,45%) at 37°C. The resulting cell suspension was filtered through a nylon mesh, centrifuged, and the cells resuspended at density  $1 \times 10^6$  cells/mL of 1.5% (w/v) sodium alginate solution. Alginate hydrogels were made by dropping alginate-cell suspension through an injection needle (21g) into  $\text{CaCl}_2$  suspension (102mM). The beads were cultured in DMEM-F12 medium supplemented with ascorbic acid (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and 10% SBF, kept in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  incubator at 37°C for four weeks. The ECM and cell distributions within alginate hydrogels were assessed from staining with toluidine blue and hematoxyline-eosin (H&E) in the histological sections. The presence of many cells was observed during the cellular culture forming cellular groups, resembling it to isogenous groups of hyaline cartilage. It had an increase in the number and the viability of the chondrocytes during the four weeks of culture. Through the staining of the histological sections of alginate hydrogels with toluidine blue and HE it was possible to observe the well definite distribution of the chondrocytes in the gel and the formation of territorial matrix. In this study, the alginate was shown to be an

efficacious scaffold to use in a chondrocytes culture. Such scaffold may be a good application for repairing articular cartilage defects.

**Key words:** cartilage, articular, chondrocytes, alginates, hydrogel, regeneration, tissue engineering.

## **Introdução**

Uma vez danificada, a cartilagem não cicatriza espontaneamente, provavelmente devido à baixa eficiência de reparo da rede de colágeno, já que a deficiência das proteoglicanas é reversível <sup>(1)</sup>. Estima-se que cerca de um milhão de pessoas por ano necessitam de tratamento relacionado a defeitos em cartilagens, principalmente as das articulações do joelho <sup>(2)</sup>. Estudos experimentais têm mostrado que há um declínio na atividade de crescimento da cartilagem com o aumento da idade. No entanto, a engenharia de tecidos oferece novas oportunidades para restauração funcional e estrutural do tecido lesionado <sup>(3)</sup>

Na literatura, relata-se que os condrócitos necessitam de um arcabouço em três dimensões (3D) para crescerem e preservarem a morfologia e produção de componentes de matriz próprios de condrócitos quando em cultura celular <sup>(4)</sup>. Caso contrário, quando cultivados em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente de cultura, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características morfológicas e passam a produzir componentes de matriz fibroblásticas como colágeno tipo I <sup>(5, 6, 7)</sup>. Para se conseguir a produção de um tecido cartilaginoso funcional, é crucial evitar a desdiferenciação dos condrócitos durante o processo de engenharia de cartilagem <sup>(8)</sup>.

A cultura de condrócitos em um arcabouço tridimensional baseia-se em cultivar tais células em uma matriz artificial, biodegradável, que possa suportar o crescimento da cartilagem durante alguns meses, enquanto os condrócitos e a matriz se estabelecem. O princípio consiste em produzir células através da matriz para implantá-las num defeito articular. A matriz degrada gradualmente em 8 a 10 semanas após o implante de cartilagem <sup>(9)</sup>.

Recentemente, uma variedade de matrizes como hidrogel e polímeros sintéticos, têm sido investigadas para a expansão dos condrócitos “in vitro” para o reparo da cartilagem lesada. Tais matrizes incluem: arcabouços à base de colágeno: gel de colágeno tipo I e II, esponjas de colágeno tipo II, ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídeos e alginato <sup>(10, 11)</sup>.

A cultura de condrócitos em hidrogel de alginato constitui o método mais indicado para o isolamento destas células <sup>(12)</sup>. O alginato é um polissacarídeo linear (n - ácido gulurônico – ácido manurônico), aniônico, capaz de gelatinizar-se de maneira reversível, na presença de cálcio ou outros cátions divalentes <sup>(13, 14)</sup>.

A vantagem deste polissacarídeo polimerizado é a sua constituição atóxica, biocompatível e injetável em modelos animais. Os condrócitos suspensos em alginato não aderem à matriz, facilitando a sua recuperação depois de cultivados, permitindo o estudo da expressão protéica e genética. Através deste método, consegue-se manter a expressão do fenótipo diferenciado, restaurar condrócitos não diferenciados e formar uma matriz extracelular similar à encontrada na cartilagem articular <sup>(12,15)</sup>.

O presente estudo teve como objetivo cultivar condrócitos encapsulados em hidrogel de alginato, caracterizar a produção de matriz extracelular (ECM) do tecido



produzido *in vitro* para que possivelmente este hidrogel possa ser usado em implantes autólogos visando a regeneração da cartilagem articular lesada.

## **Materiais e Métodos**

### **Materiais**

Os meios de cultura utilizados foram: DMEM:Ham's F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (1:1), meio Ham's F12, soro bovino fetal (SBF), antibióticos: 10U/ml de penicilina G, 10µg/ml de estreptomicina and 25µg/ml de anfotericina B, tripsina 0,25%/EDTA, colagenase tipo I, todos obtidos da GIBCO® Invitrogen Corporation. Ácido Algínico Sal Sódio de Baixa Viscosidade obtido de Macrocisti sp, hialuronidase, ácido ascórbico todos da Sigma®. Cloreto de cálcio dihidratado (Fluka®) e cloreto de sódio (LABSYNTH®).

**Animais:** Foram utilizados neste estudo 10 coelhos da raça Botucatu com 3 a 6 meses de idade. Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/ Kg) administrado nas veias central ou marginal da orelha. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu segundo o protocolo n° 345.

**Isolamento dos Condrócitos:** A cartilagem articular foi removida do côndilo femoral, fragmentada em pedaços de ± 1mm e submetida a digestão da matriz extracelular com as seguintes enzimas: tripsina (0,25%), hialuronidase (2mg/mL) por 45 minutos cada enzima e colagenase tipo I (0,45%) a 37°C por 16 horas.

**Cultura dos Condrócitos em Hidrogel de Alginato:** Após a digestão enzimática a suspensão de células foi filtrada em filtro de nylon de 70  $\mu\text{m}$ , centrifugada, e as células foram ressuspensas a uma densidade de  $1 \times 10^6$  céls/mL em uma solução de alginato de sódio a 1,5% (w/v). A suspensão de células em alginato não polimerizado foi colocada em uma seringa de 10 cc equipada com uma agulha de 21 g, e posteriormente foi dispensada da seringa por gotejamento dentro da solução de gelatinização ( $\text{CaCl}_2$  - 102 mM) com moderados movimentos magnéticos, permitindo a polimerização do alginato durante 10 minutos até formar os "hidrogéis". A solução de gelatinização foi desprezada, e os "hidrogéis" foram lavados 3 vezes em 5 vol. de NaCl a 0,15 M. Os hidrogéis foram cultivados em meio DMEM-F12 suplementado com ácido ascórbico (50  $\mu\text{g/mL}$ ) e 10% de SBF. A cultura foi mantida em estufa de 37° C em uma atmosfera úmida a 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar durante quatro semanas. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

**Recuperação dos condrócitos após cultura em hidrogel:** a recuperação dos condrócitos do hidrogel para acessar a viabilidade celular foi realizada através da dissolução do hidrogel em citrato de sódio (155mM), por 20 minutos em estufa de 37° C. Posteriormente foi realizada a centrifugação da amostra e diluição na solução de azul de tripano.

**Contagem e Viabilidade Celular:** A contagem de células e determinação da viabilidade celular foi realizada utilizando a câmara de Neubauer. O número de células vitais foi determinado pela técnica de exclusão de células não vitais coradas por solução de azul de tripano, seguindo as recomendações de Freshney, 2001 <sup>(12)</sup>.

**Análises Morfológicas:** Análises morfológicas das células foram realizadas rotineiramente utilizando microscopia de fase em microscópio invertido (Axiovert 200 – Carl Zeiss). As culturas celulares foram fotografadas semanalmente.

**Caracterização da Matriz Extracelular:** Para avaliar a produção dos componentes da matriz extracelular, as amostras foram fixadas em formaldeído a 4%, passadas por soluções crescentes de álcool (70%, 95% e 100%), incluídas em resina Historesina™ - Leica e posteriormente seccionadas no micrótomo da marca Leica. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina a 0,3%, pH 3.65 e Hematoxilina e Eosina (HE).

## **Resultados**

### **Isolamento dos condrócitos**

Houve dificuldades na padronização da digestão enzimática da cartilagem articular. Nos primeiros ensaios fazia-se a digestão sob agitação utilizando duas enzimas: tripsina e colagenase tipo I, conseguia-se uma baixa celularidade e viabilidade, média 60%. Após tentativas de padronização, conseguiu-se determinar o uso de três enzimas para o processo de digestão: tripsina, hialuronidase e colagenase em concentrações e tempos distintos, usando o modelo estático de digestão. Obteve-se uma viabilidade celular superior a 90% na maioria das amostras digeridas pelo último protocolo. Em todas coletas conseguiu-se obter amostras de cartilagens pesando entre 170mg e 475 mg (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de peso das biópsias do tecido cartilaginoso, número inicial de células e viabilidade inicial.

<b>Peso da Biópsia (mg)</b>	<b>Número Inicial de Células/mm<sup>3</sup></b>	<b>Viabilidade Inicial</b>
221	1.600.000	99%
300	1.780.000	94%
391	975.000	63%
475	1.948.000	97%
402	2.840.000	93%
326	3.725.000	92%
473	2.765.000	99%
170	460.000	96%
234	590.000	84%
288	1.186.000	94%

### **Cultura de Condrócitos**

Quando foram realizadas culturas em monocamadas os condrócitos após 12 horas de cultura aderiram à placa de Petri, formando colônias de células com morfologia fibroblastóide, indicando a perda do seu fenótipo arredondado, conforme demonstrada na Figura 1A e 1B. Os condrócitos desdiferenciados apresentam inicialmente longos filopódios. Após uma semana de cultura observou-se a confluência celular na placa de cultura com morfologia fibroblastóide (Figura B).

Obteve-se 40 hidrogéis de alginato em uma média de 400 mg de cartilagem articular coletada. Cada hidrogel apresentava 3mm de diâmetro Figura 2. Após a

polimerização do hidrogel de alginato foi possível observar no microscópio a distribuição homogênea dos condrócitos em cada hidrogel (Figura 1C). Os condrócitos permaneceram com a morfologia esférica semelhante á cartilagem nativa (Figura 1C e 1D) quando comparados à cultura em monocamada (Figura 1A e 1B), mantendo-se fixo no polímero. Já nos primeiros dias de cultura a presença de aglomerados celulares nas pérolas de alginato, demonstrou a intensa divisão celular, assemelhando-se aos grupos isógenos da cartilagem hialina em formação (Figura 1D). Ao acessar a viabilidade celular semanalmente das pérolas de alginato com azul de tripano, pode-se confirmar o aumento da celularidade e a manutenção da viabilidade ao comparar com o número de células iniciais (Quadro 1). Na quarta semana de cultura observou-se por microscopia a alta celularidade em relação à primeira semana e todas os hidrogéis estavam intactos, além da retenção do fenótipo arredondado dos condrócitos.

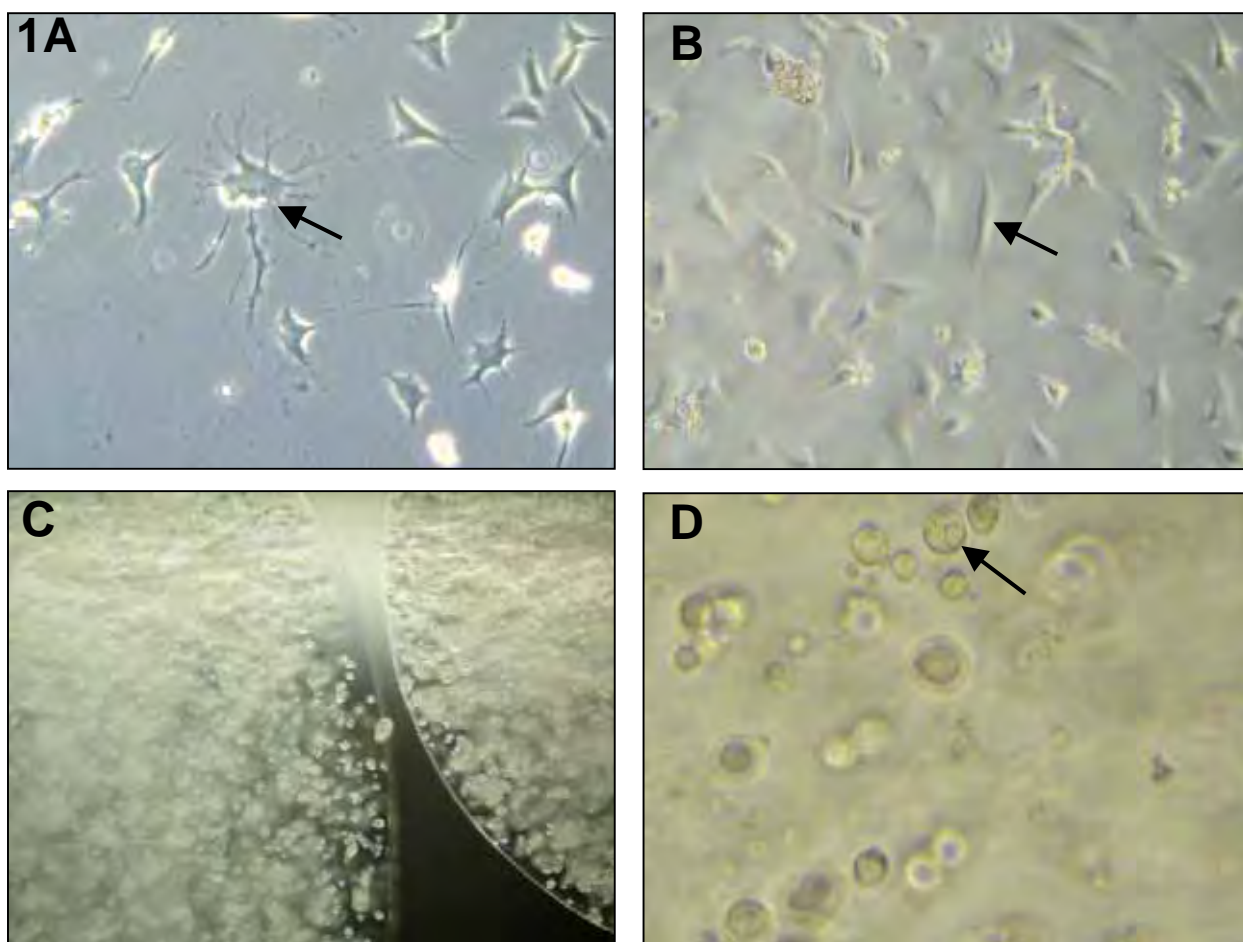


Figura 1. Fotomicrografia de contraste de fase. (A) Cultura de condrócitos em monocamada. Observar células alongadas e com muitos prolongamentos (seta) (Aumento 1.000x). (B) Cultura em monocamada, confluenta após 2 semanas em cultura, apresentando condrócitos com morfologia fibroblastóide (seta) (Aumento 1.000x). (C) Cultura de condrócitos em hidrogel de alginato. A seta indica a delimitação do hidrogel de alginato de característica translúcida. No interior dos hidrogéis de alginato, observar inúmeras estruturas esféricas e arredondadas esbranquiçadas que representam a alta celularidade no início da cultura (Aumento 100x). (D) Observar o fenótipo arredondado dos condrócitos (seta) no interior do hidrogel de alginato (Aumento 1.000x).

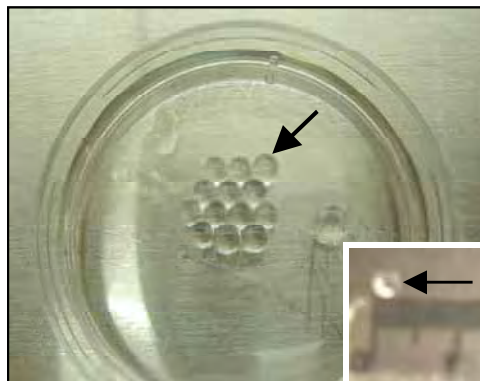
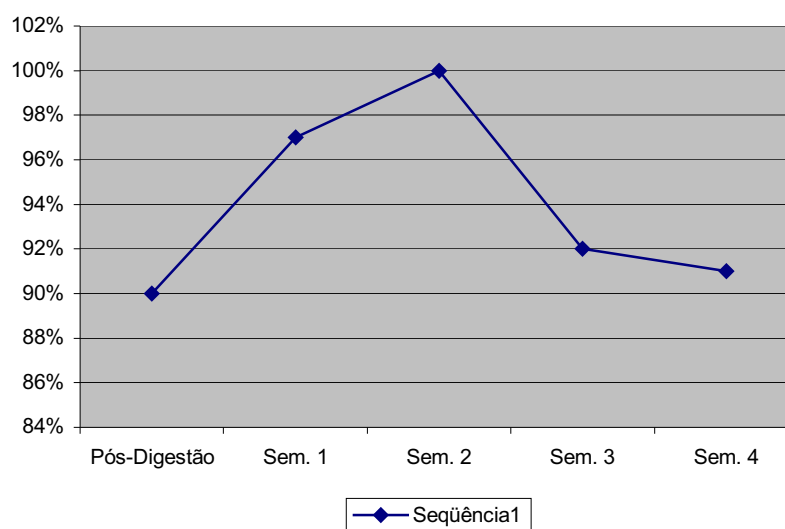


Figura 2. (A) Várias esferas de hidrogel de alginato após gelatinização (seta). (B) Uma esfera de hidrogel de alginato com ~3mm de diâmetro (seta).

Quadro 1. Viabilidade dos condrócitos cultivados em hidrogel de alginato por 4 semanas



### Caracterização da Matriz Extracelular

A figura 3A apresenta uma visão ampla de todo hidrogel de alginato corado com azul de toluidina onde demonstra a alta celularidade e a distribuição de forma organizada dos condrócitos dentro do hidrogel.

Nas secções histológicas (Figura 3B e 3C) foi possível observar uma coloração mais intensa nas áreas da matriz pericelular e/ou territorial ao redor dos

condrócitos denominando-os de grupos de condrócitos (grupos isógenos). Na figura 3B esta bem evidente a formação da matriz pericelular com formação da lacuna ao redor dos condrócitos e a retenção do fenótipo arredondado. A morfologia das lacunas é similar ao do tecido cartilaginoso nativo. Na figura 3C observou-se um grupo de condrócitos com alta celularidade indicando a multiplicação dessas células no hidrogel, com produção de matriz pericelular e territorial, conforme corado com azul de toluidina. A matriz pericelular e territorial corada com azul de toluidina revelou a produção de proteoglicanas, componente principal desta região.

Conforme demonstrado na figura 3D, secções coradas com HE, demonstraram não haver a produção da matriz interterritorial, e sim os condrócitos presos em suas lacunas produzindo matriz pericelular e territorial.



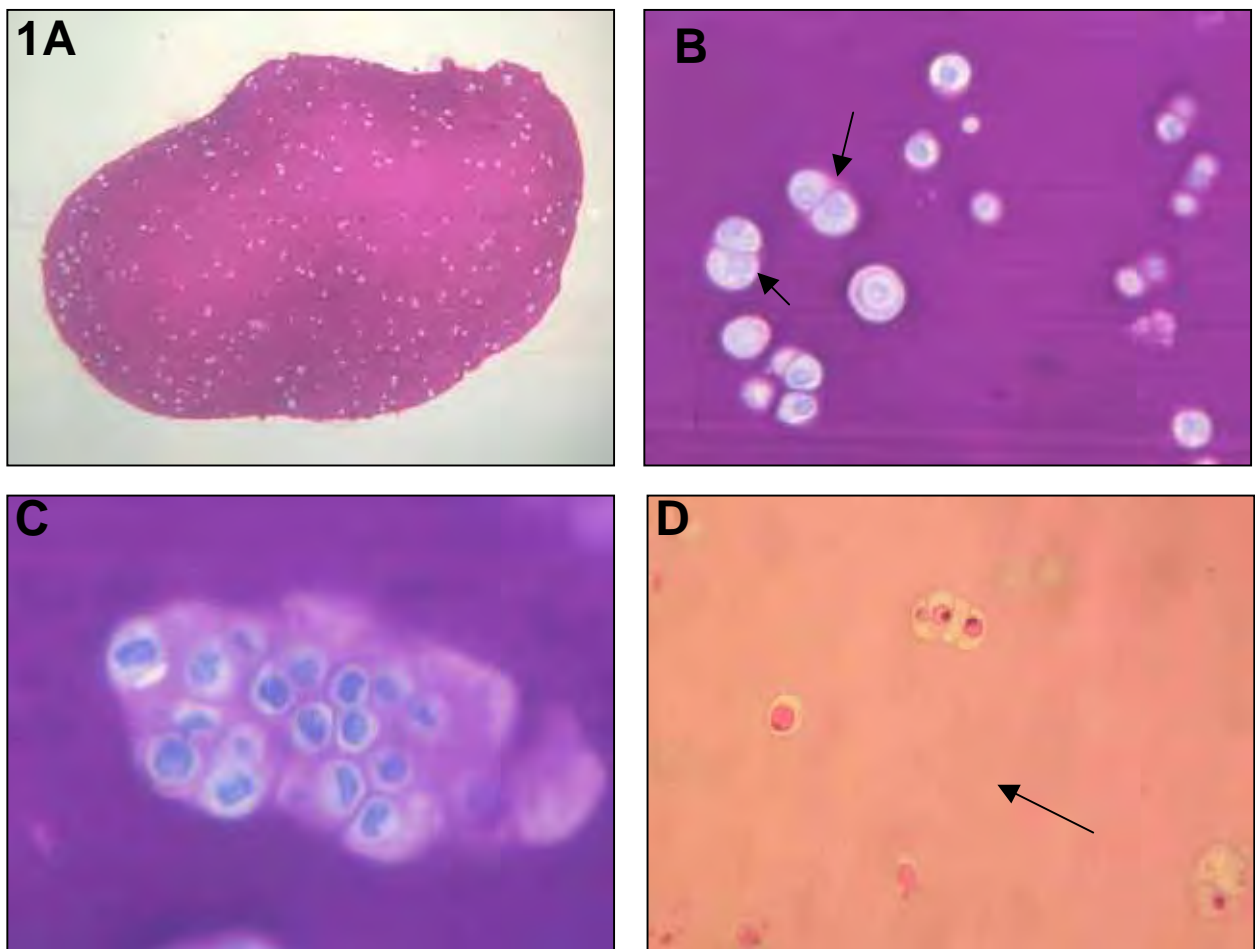


Figura 3. Análise histológica da cultura de condrócitos em hidrogel de alginato. (A, B e C) coloração com azul de toluidina, (D) coloração com HE. (A) Corte histológico do hidrogel de alginato inteiro, mostrando a distribuição uniforme dos condrócitos no hidrogel (Aumento 25x). (B) Evidência da formação da matriz pericelular e interterritorial (seta) (Aumento 1.000x). (C) Grupos de condrócitos em divisão (Grupos isógenos) (Aumento 1.400x). (D) Ausência de matriz territorial (seta) (Aumento 1.000x).

## Discussão

A engenharia de tecidos representa um método promissor para a construção de enxertos condrogênicos autólogos dentro da cirurgia ortopédica reconstrutiva. A existência de várias matrizes e fatores de crescimento específicos proporciona a produção de tecido cartilaginoso *in vitro* e *in vivo*.

Os condrócitos são células que necessitam de cultivo tri-dimensional, para a manutenção do seu fenótipo original, pois em monocamadas estas células desdiferenciam, produzindo componentes da matriz como o colágeno tipo I característico da fibrocartilagem e não da cartilagem hialina, portanto, sendo consequência de alteração da expressão gênica<sup>(3)</sup>. Quando se trabalha com cartilagem articular, o interesse é somente tecido cartilaginoso hialino, pois em um implante articular a produção de colágeno tipo I, indica fibrose, ou seja, a transformação do tecido hialino em fibroso.

A matriz de alginato pode ser utilizada tanto em implantes como em estudos da condrogênese, fato importante para o entendimento da fisiologia do tecido cartilaginoso<sup>(10)</sup>.

De acordo com MASUDA<sup>(17)</sup>, a cultura de condrócitos em alginato, estabiliza por até oito meses, o fenótipo condrocítico dessas células. No presente artigo demonstramos resultados de 4 semanas de cultura, mas em outros experimentos conseguimos cultivar condrócitos por até 4 meses sem a perda do fenótipo desta célula.

A concentração do alginato influencia muito no metabolismo da célula e difusão dos componentes necessários provenientes do meio de cultura. A melhor concentração encontrada em todo experimento foi 1,5%, tendo sido usada 1,0%, 1,2%, 1,5% e 2,%. Outro fator importante é que o preparo do alginato deve ser

realizado no dia, pois em experimentos usando alginato preparado em dias anteriores demonstrou a perda da consistência do gel e formação de grupo células alongadas, adquirindo fenótipo fibroblastóide. Um estudo realizado por DOMM et al., 2004 demonstrou em seus experimentos que o tipo de alginato pode influenciar na cultura de condrócitos, fato este também observado neste trabalho.

O tecido cartilaginoso consiste de condrócitos distribuídos de maneira esparsa envolvidos por matriz extracelular (ECM). Os condrócitos são responsáveis pela manutenção da ECM e conseqüentemente do tecido cartilaginoso. A ECM pode ser dividida em compartimentos pericelular, territorial e interterritorial, contendo colágeno tipo II e a proteoglicana agrecana (<sup>3</sup>). O hidrogel de alginato foi eficiente na manutenção do fenótipo dos condrócitos, na proliferação celular, na produção de matriz pericelular e territorial, no entanto, foi considerado ineficiente do ponto de vista de produção de matriz interterritorial.

Muitos pesquisadores têm usado o hidrogel de alginato como arcabouço de sustentação dos condrócitos para implante em articulações lesadas em modelos animais. A vantagem desse hidrogel é a sua propriedade atóxica e a sua utilização de maneira injetável. Tal arcabouço pode ser injetado juntamente com os condrócitos *in situ*, permitindo a sua gelatinização com cloreto de cálcio no local da lesão (<sup>3,15</sup>). O alginato é degradado por vias enzimáticas no próprio tecido em duas subunidades monoméricas: ácido gulurônico e ácido manurônico.

Neste estudo foi possível obter dados *in vitro* do hidrogel de alginato. Para aplicação clínica do hidrogel de alginato, será necessária a realização de implantes em áreas pré-lesionadas nas articulações do joelho, usando como modelo animal coelhos, para confirmação da sua eficiência na produção de tecido cartilaginoso hialino *in vivo*, o que de fato constitui a próxima fase deste estudo.

## **Conclusão**

A cultura de condrócitos em hidrogel de alginato demonstrou alta celularidade e um aumento na produção de matriz pericelular e territorial quando comparada a interterritorial.

O hidrogel de alginato constituiu um eficiente arcabouço de sustentação e cultura de condrócitos, mantendo seu fenótipo arredondado, assemelhando-se a cartilagem nativa, sendo um importante arcabouço para uso em implante articular.

## Referências Bibliográficas

1. Lafeber FP, van Roy H, Wilbrink B, Huber-Bruning O, Bijlsma JW. Human osteoarthritic cartilage is synthetically more active but in culture less vital than normal cartilage. *J Rheumatol.* 1992; 19:123-9.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260: 920-926.
3. Goessler UR, Hörmann K, Riedel F. Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (Review). *Intern J Mol Med.* 2004;13: 505-513.
4. Yang IH, Kim, Su-Hyang, Kim, YH, Sun, HJ, Kim SJ, Lee JW. Comparison of phenotypic characterization between alginate bead and pellet culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med. J.* 2004; 45: 891-900.
5. Benya P, Shaffer, J.. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 1982; 30: 215-224.
6. Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger, PC, McPherson, JM, Tubo R. Expression of a stable articular phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J. Orthop. Res.* 1998; 16: 207-216.
7. Mandl EW, Van Der Veen SW, Verhaar JAN, Van Osch GJVM. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng.* 2004; 10: 109-118.
8. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological,

- immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J. Anat.* 2004; 205: 229-237.
9. Bentley G, Minas T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. *Br. Med. J.*, London, v. 10, 2001. [cited 22 may 2003]. Available from: URL: <http://www.bmj-pt.com>
  10. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials.* 2000; 21:795-801.
  11. Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, et al. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 9996-10001.
  12. Freshney RI. Specialized cells. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* 4th. ed. New York: Wiley-Liss, chap. 22, 2000; 367-370.
  13. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell Sci.* 1994; 107: 17-27.
  14. Mulder L. Cell adhesion on alginate scaffolds for tissue engineering of aortic valve – a review. Faculty Biomedical Engineering, Eindhoven University Technology. 2002; 22-34.
  15. Park K, Huang J, Azar F, Jin Ri L, Min Byoung-Hyun, Han DK, et al. Scaffold free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair – in vitro and in vivo study. *Artif. Organs.* 2006; 30: 586-596.
  16. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* 3<sup>rd</sup>. Ed. New York: Wiley-Liss; 2001.

17. Masuda K, Sah RL, Hejna MJ, Thonar EJ. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J. Orthop. Res.* 2003; 21: 139-148.
18. Domm C, Schünke M, Steinhagen J, Freitag S, Kurz B. Influence of various alginate brands on the redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate bead culture under high and low oxygen tension. *Tissue Eng.* 2004; 10: 1796-1805.

**Caracterização Imunohistoquímica da Cultura de Condrócitos em  
Pellet Tridimensional**

[Artigo II]

*Status: a ser submetido a Periódico Nacional Biotecnologia Ciência  
e Desenvolvimento*



**CARACTERIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA CULTURA DE CONDRÓCITOS  
EM PELLET TRIDIMENSIONAL  
IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CHONDROCYTE THREE-  
DIMENSIONAL PELLET CULTURE SYSTEM**

Renata Aparecida de Camargo Bittencourt<sup>1</sup>; Hamilton Rosa Pereira<sup>2</sup>; Sérgio Luís Felisbino<sup>3</sup>; Andrei Moroz<sup>4</sup>; Elenice Deffune<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda do Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>2</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Cirurgia e Ortopedia - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>3</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu./ <sup>4</sup>Aluno de Mestrado em Biotecnologia Médica - Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>5</sup>Professora Assistente Doutora, Departamento de Urologia/ Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu, Laboratório de Cultura Celular, Hemocentro - UNESP – São Paulo - Brasil.

Endereço para correspondência: Renata Aparecida de Camargo Bittencourt, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Hemocentro, Rubião Júnior s/n, Telefone: (14) 38116041, Fax: (14) 38116041, E-mail: [rentcourt2000@yahoo.com.br](mailto:rentcourt2000@yahoo.com.br)

Agradecimentos: Nós agradecemos à Fátima Regina Guimarães, Maria Helena Spadot de Lima e Ednelson Henrique Bianchi pela excelente assistência técnica em todo desenvolvimento do trabalho.

**Resumo:**

Neste presente trabalho desenvolvemos um sistema de cultura de condrócitos em *pellet*, onde os condrócitos ficam condensados similarmente ao processo de condrogênese embrionária, e avaliamos a síntese dos componentes da matriz cartilaginosa através dos métodos clássicos de histologia e imunohistoquímica. Condrócitos foram isolados da cartilagem articular de coelhos e cultivados em pellet ( $2 \times 10^5$  céls por pellet) por 21 dias. Após 21 dias de cultura, o pellet apresentava um formato discóide e volume maior quando comparado ao volume inicial. O fenótipo condrocítico permaneceu estável durante o período da cultura, pois demonstrou através da análise imunohistoquímica produção de colágeno tipo II e condroitim-

sulfato, além de morfologia arredondada. Concluímos que, a cartilagem hialina sintetizada pela cultura em pellet, sem o uso de scaffolds, apresentam fenótipo similar a cartilagem nativa quanto a morfologia celular e matriz extracelular, sendo importante seu uso no estudo do processo de desenvolvimento do tecido cartilaginoso.

**Palavras chaves:** imunohistoquímica, cultura de condrócitos, pellet, cartilagem articular.

### **Abstract**

In the present work we developed a system of chondrocyte culture in *pellet*, where chondrocytes were condensed similarly to the process of embryonic chondrogenesis, and we evaluated the synthesis of cartilaginous matrix components by classic methods of histology and immunohistochemistry. Chondrocytes were isolated from articular cartilage of rabbits and cultivated in a pellet ( $2 \times 10^5$  cells per pellet) for 21 days. After 21 days of culture, the pellet presented a discoid form and greater volume when compared to the initial volume. The chondrocytic phenotype remained stable throughout the culture period, as immunohistochemical analysis demonstrated production of collagen type II and chondroitin sulfate, besides rounded morphology. We conclude that hyaline cartilage synthesized by culture in pellet, without the use of scaffolds, presents a phenotype similar to native cartilage in its cellular morphology and extracellular matrix, and its use is important in the study of the development process of cartilaginous tissue.

**Key words:** immunohistochemistry, chondrocyte culture, pellet, articular cartilage.

### **Introdução**

A cartilagem articular é um tecido avascular com números limitados de condrócitos, com capacidade limitada de reparo após uma lesão aguda (Kaps et al., 2002, Akeda et al., 2006). Há um aumento crescente de doenças degenerativas que acometem a cartilagem, e a frequência de lesões articulares, principalmente em atletas, levando um grande interesse médico em obter-se um tratamento eficaz da reparação da cartilagem. (Mandelbaum et al., 1998) A engenharia de tecidos é uma possível solução, pois pode-se expandir os condrócitos de um paciente, e em seguida realizar um transplante autólogo na área lesada da articulação. Esta possibilidade de isolar células do próprio paciente e posteriormente implantá-las,

para o reparo tecidual, pode resolver um dos maiores problemas “a rejeição imunológica de tecidos e órgãos” (Carvalho, 2001).

Na literatura, relata-se que os condrócitos necessitam de um arcabouço em três dimensões (3D) para crescerem e preservarem a morfologia e produção de componentes de matriz próprios de condrócitos quando em cultura celular. Caso contrário, se cultivados em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características morfológicas e passam sintetizar colágeno tipo I, componente da matriz do tecido fibroso (Benya & Shaffer, 1982, Zhang et al., 2004). Assim, perde-se a funcionalidade do tecido. Recentemente, inúmeros arcabouços são empregados na cultura de condrócitos: arcabouços à base de colágeno: gel de colágeno tipo I e II, esponjas de colágeno tipo II, ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídeos e alginato (Kisiday et al., 2002).

O sistema de cultivo celular em *pellets* é outra maneira de cultivo em 3D que aumenta expressão de glicosaminoglicanas (GAGs) e colágeno II (Capito & Spector, 2006) sem precisar utilizar uma arcabouço artificial, o que diminui os riscos de possíveis complicações por respostas imunes e inflamatórias (Zhang et al., 2004).

A condensação dos condrócitos pelo método de centrifugação daria condições ao processo de formação de tecido cartilaginoso *in vitro* juntamente com o uso de fatores de crescimento específicos como Fator de Crescimento Transformante-Beta (TGF $\beta$ ), importante no processo de condrogênese (Nakayama et al., 2003, Zhang et al., 2004, Capito & Spector, 2006), evitando o processo de desdiferenciação-rediferenciação, mantendo o fenótipo da cartilagem hialina (Zhang et al., 2004). Outras vantagens da cultura de condrócitos em *pellet* são: a utilização de uma menor densidade celular pré-cultura, simplicidade da técnica e obtenção de tecido cartilaginoso de boa qualidade (Park et al., 2006).

O trabalho proposto teve como objetivo cultivar condrócitos em *pellet* tridimensional e avaliar a produção de matriz cartilaginosa através da análise imunohistoquímica.

## **Materiais e Métodos**

### **Materiais**

Os materiais utilizados para a realização das culturas celulares foram: meio de cultura DMEM:Ham's F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (1:1), meio Ham's F12, soro bovino fetal (FBS), antibióticos: 10U/ml de penicilina G, 10ug/ml de estreptomicina and 25µg/ml de anfotericina B, piruvato de sódio, tripsina 0,25%/EDTA, colagenase tipo I, todos obtidos da GIBCO® Invitrogen Corporation, filtros de nylon de 70 µm (BD®), ácido ascórbico e hialuronidase (Sigma®), Fator de Crescimento Transformante-β<sub>3</sub> (TGFβ<sub>3</sub>) (Sigma®), insulina bovina (IOLIN®). Anticorpos usados na análise em imunohistoquímica (IH): Anticorpos primários: IgG policlonal (cabra) anti-colágeno tipo I e II, anticorpo secundário IgG policlonal bovino anti-cabra complexado a HRP, todos da Santa Cruz®. Anticorpo primário monoclonal (camundongo) anti-condroitim sulfato e anticorpo secundário IgG policlonal bovino anti-camundongo complexado a HRP, albumina de soro bovino (BSA), diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio todos da Sigma®.

**Animais:** Foram utilizados neste estudo 5 coelhos da raça Botucatu com 3 a 6 meses de idade. Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/ Kg) administrado nas veias central ou marginal da orelha. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu segundo o protocolo n° 345.

**Isolamento dos Condrócitos:** A cartilagem articular foi removida do côndilo femoral, fragmentada em pedaços de ± 1mm e submetida a digestão da matriz extracelular com as seguintes enzimas: tripsina (0,25%), hialuronidase (2mg/mL) por 30 minutos cada enzima e colagenase tipo I (0,45%) a 37°C por 16 horas.

**Cultura dos condrócitos em *pellet* tridimensional:** Após a digestão enzimática a suspensão de células foi filtrada em filtro de nylon de 70 µm, centrifugada por cinco minutos a 1000 rpm a 4°C por duas vezes, e ressuspensas a uma concentração final de  $2 \times 10^5$  células por pellet, em tubos cônicos de polipropileno de 15 mL. O meio de cultura usado foi DMEM-F12 suplementado com ácido ascórbico (50 µg/mL),

TGF $\beta_3$  (10 ng/mL), 1% de soro bovino fetal, penicilina G (10 U/ml), estreptomicina (10  $\mu$ g/ml) e anfotericina B (25  $\mu$ g/ml), insulina bovina (100 ng/mL) e piruvato de sódio (100  $\mu$ g/mL). Os *pellets* foram cultivados durante 21 dias em estufa de 37° C em uma atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. As tampas dos tubos ficaram semi-abertas para permitir trocas gasosas. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

### **Caracterização da Matriz Cartilaginosa pelo Método de Imunohistoquímica (IH):**

Os “*pellets*” foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo. Os corantes utilizados foram hematoxilina-eosina (HE), azul de alcian e picrossírius.

Para análise em IH, realizou-se a marcação da matriz extracelular utilizando-se os seguintes anticorpos: anti-colágeno tipo I, anti-colágeno tipo II e anti-condroitim sulfato. Primeiramente as secções foram incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio em metanol para bloquear as peroxidases endógenas. Depois secções individuais foram incubadas com anticorpo primário (anticorpo IgG policlonal (cabra) anti-colágeno tipo I ou anti-colágeno tipo II), em BSA 1%, e posteriormente anticorpo secundário (anticorpo IgG policlonal bovino anti-cabra complexado a HRP). A reação foi revelada com diaminobenzidina, e as secções foram coradas com HE.

Para a marcação da glicosaminoglicana (GAG) presente na matriz extracelular específica da cartilagem utilizou-se anticorpo anti-condroitim sulfato marcando primeiramente o anticorpo primário (anticorpo monoclonal (camundongo) anti-condroitim sulfato) e o anticorpo secundário (anticorpo IgG policlonal bovino anti-camundongo complexado a HRP).

## **Resultados e Discussão**

### **Cultura de Condrócitos em *pellet* tridimensional**

Obteve-se cinco *pellets* em uma média de 300 mg de cartilagem articular coletada.

A centrifugação a 4°C permitiu uma melhor condensação das células, pois em experimentos anteriores os quais utilizou-se a centrifugação a temperatura

ambiente, houve uma desagregação celular durante a troca do meio de cultura, desfazendo-se os *pellets*, por isso optamos por 4°C. Observou-se o crescimento do *pellet* a cada troca do meio de cultura comparando com o volume inicial, e após 21 dias a aparência era hialina, sólida com morfologia discóide.

A engenharia de tecidos representa um método promissor para a construção de enxertos condrogênicos autólogos dentro da cirurgia ortopédica reconstrutiva. A existência de várias matrizes e fatores de crescimento específicos proporciona a produção de tecido cartilaginoso *in vitro* e *in vivo*.

Os condrócitos são células que necessitam de cultivo tri-dimensional, para a manutenção do seu fenótipo original, pois em monocamadas estas células desdiferenciam, produzindo componentes da matriz como o colágeno tipo I característico da fibrocartilagem e não da cartilagem hialina. Quando se trabalha com cartilagem articular, o interesse é somente tecido cartilaginoso hialino, pois em um implante articular a produção de colágeno tipo I, indica fibrose, ou seja, a transformação do tecido hialino em fibroso.

Os membros da superfamília TGF $\beta$  desenvolvem uma função importante na formação da cartilagem durante o período embrionário podendo também estimular o reparo da cartilagem *in vivo* (Ma PX & Langer, 1999). O TGF $\beta$  é uma molécula da matriz extracelular muito abundante na cartilagem articular (Goessler et al., 2004). Quando os condrócitos foram cultivados em *pellet*, com 10% SBF com ou sem TGF $\beta$ 3, não houve crescimento do *pellet*. O aumento do *pellet* só foi possível após padronizar o uso de fator de crescimento TGF $\beta$ 3 com SBF a 1%. Provavelmente a concentração de SBF 1%, permite uma melhor ação do TGF $\beta$ 3.

Segundo Zhang et al., 2004, a cultura em *pellet* imita o processo de embriogênese da cartilagem, onde várias células estão em íntimo contato como às células mesenquimais no embrião, oferecendo uma melhor interação entre as células e célula-matriz. Em seu estudo foi possível cultivar no sistema em *pellet* condrócitos obtidos do esterno de embriões de galinhas, mantendo o fenótipo dos condrócitos e a expressão dos componentes da matriz durante todo o período de cultura.

No trabalho de Ballock & Reddi, 1994, condrócitos obtidos da epífise de ratos foram cultivados em *pellet* com fatores de crescimentos específicos, insulina e o hormônio tiroxina, possibilitou o aumento da síntese de colágeno X, a organização

dos condrócitos em um padrão colunar, assemelhando-se a cartilagem de crescimento *in vivo*.

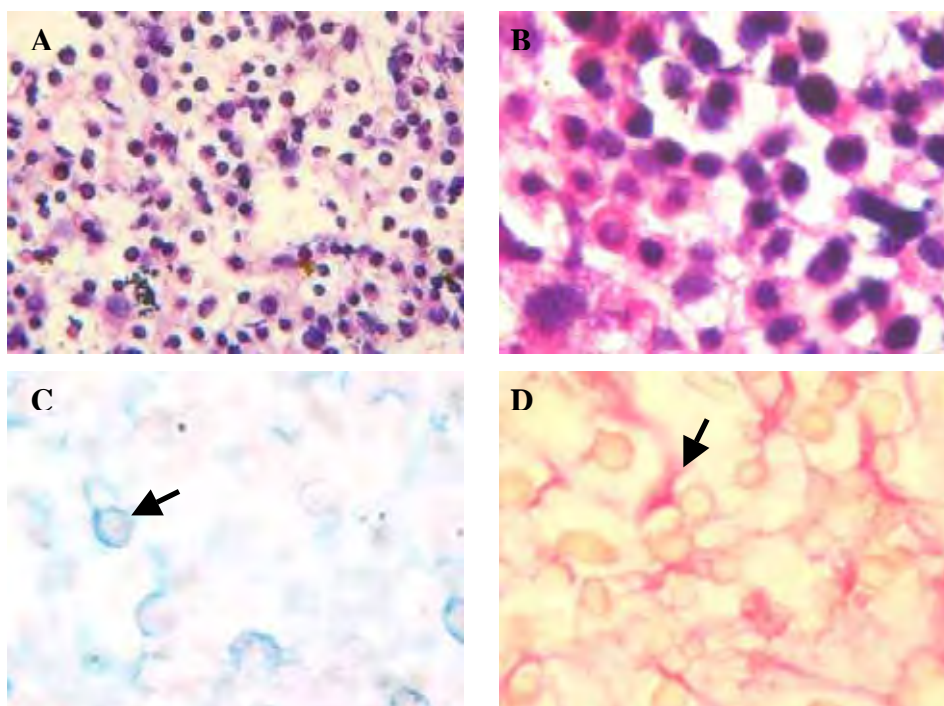


Figura 1 – Secção histológica do *pellet* após 21 dias de cultura demonstrada pela coloração com hematoxilina e eosina (A e B), azul de alcian (C) e picrossírius (D). Pellet com alta celularidade contendo células com morfologia arredondadas específico do fenótipo condrocítico (A e B, aumento 40x e 100x respectivamente). Matriz pericelular corada em azul (seta) evidenciando a presença de GAGs ao redor dos condrócitos não corados (C, aumento 100x). Evidencia de focos fibrosos corados em vermelho (seta), correspondendo ao colágeno na matriz interterritorial, e marcação discreta da matriz pericelular (D, aumento 100x).

### **Caracterização Imunohistoquímica (IH) da Matriz Extracelular**

A secção histológica do *pellet* celular corada com HE demonstrou alta celularidade, morfologia arredondada das células, característica específica dos condrócitos (Figura 1A e 1B), semelhante ao trabalho de Capito e Spector, 2006. Não se observou a separação das células em grupos isógenos observado no trabalho de Capito e Spector, 2006, onde foram observadas as células em lacunas.

Neste trabalho, os autores testaram diferentes fatores de crescimento, como TGF $\beta$ -1, Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF). Sabe-se que os TGF $\beta$ s participam como fatores cruciais no estímulo de produção de GAGs e colágeno tipo II por condrócitos da cartilagem articular (Grimaud *et al*, 2002; Quiao *et al*, 2005 ), regulando o reparo de lesões de cartilagem por produção de matriz extracelular (Grimaud *et al*, 2002).

A secção histológica corada com o azul de alcian nos evidencia as GAGs marcadas em azul concentrando-se na região pericelular, e as regiões não coradas (Figura 1C) correspondem aos condrócitos. A secção corada em picrossírius (Figura 1D) também evidencia a matriz, embora seja um corante diferencial para colágeno. Nela visualizamos focos fibrosos corados em vermelho, aos quais correspondem ao colágeno na matriz interterritorial, e marcação discreta da matriz pericelular.

Na análise por imunohistoquímica, as secções histológicas caracterizadas como controle, foram marcadas apenas com anticorpo secundário (anticorpo bovino anti-cabra) para verificação de reações inespecíficas, observou-se não haver nenhuma marcação na matriz extracelular, corando-se apenas os núcleos que foram contra-corados com hematoxilina (Figura 2A e 2B). Nas lâminas imunomarcadas com anti-colágeno tipo I verificamos uma leve marcação em algumas áreas da lâmina (Figura 2C). Isso significa que algumas células da cultura estão secretando colágeno I, que não é prioritário em condrócitos, no entanto, é aceitável algum grau de produção deste tipo de colágeno.

Na imunomarcação com anticorpo anti-colágeno II (Figura 2D) a reação foi positiva em alguns pontos da lâmina, com uma marcação mais forte que o anti-colágeno tipo I, indicando que as células estão secretando colágeno tipo II na matriz extracelular com maior intensidade, o que reforça que as células estão mantendo-se com fenótipo de cartilagem hialina. Todavia, a marcação indica que, assim como diversos outros trabalhos, a produção de GAGs é intensa durante a cultura celular, mas a quantidade de colágeno II produzida é limitada (Jenniskens *et al*, 2006).

Obtemos resultados satisfatórios quando utilizamos anti-condroitim sulfato como anticorpo primário (2E e 2F). Os núcleos foram contra-corados com hematoxilina, e por toda a matriz uma intensa coloração castanha, evidenciando a grande quantidade de condroitim-sulfato na matriz extracelular.

Percebeu-se que o acúmulo de colágeno II deu-se na forma de camadas contínuas ao redor dos condrócitos, enquanto o condroitim sulfato espalhou-se de



fato pela matriz extracelular, como uma massa amorfa e fibrosa em um padrão próprio do tecido cartilaginoso, de acordo aos resultados prévios relatados na literatura (Dessau *et al*, 1980). Em um trabalho mais recente (Capito & Spector, 2006) os autores cultivaram condrócitos transfectados com genes codificadores de diferentes fatores de crescimento, em *pellets*, e na imunohistoquímica conseguiram obter resultados mais satisfatórios, quando testaram anticorpos anti-colágeno II apresentando uma coloração intensa na matriz extracelular.

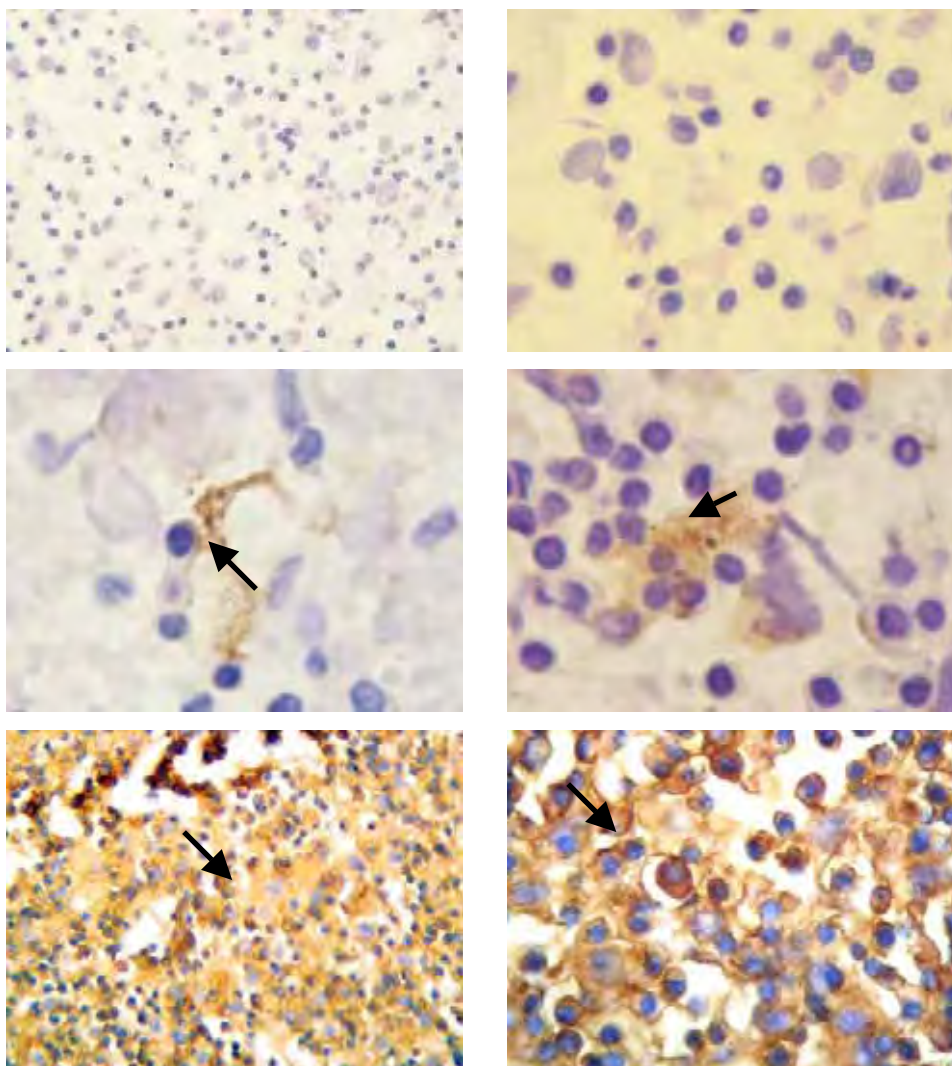


Figura 2 – Imunohistoquímica após 21 dias de cultura em *pellet*, seção controle com uso do anticorpo secundário (A e B) marcação com anti-colágeno tipo I e II (B e C) e anti-condroitim sulfato (E e F). Não houve marcação inespecífica na matriz extracelular, corando-se apenas os núcleos que foram contra-corados com hematoxilina (aumento 100x). Imunomarcação fraca com anti-colágeno tipo I (seta) (C) e forte com colágeno tipo II (seta) (D) (aumento 100x respectivamente). Evidencia de condroitim-sulfato na matriz extracelular (setas) (E e F, aumento 40x e 100x).

## Conclusão

- Neste estudo o TGF $\beta$ 3 mostrou ser eficiente no aumento do volume do *pellet in vitro*.
- Através da análise histológica e imunohistoquímica pode-se concluir que a cultura em *pellet* tridimensional permite a manutenção do fenótipo característico de condrócitos sem organização em grupos isógenos, a produção da matriz contendo uma maior presença de proteoglicana e pouca concentração de colágeno tipo II.
- O sistema de cultura em *pellet* tri-dimensional é viável para o estudo da histogênese da cartilagem hialina.

## **Referências:**

Akeda, k, An, HS, Okuma, M, Attawia, M, Miyamoto, K, Thonar, A, Lenz, ME, Sah, RL, Massuda, K. (2006), Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthr Cartil.*, **14**, 1272-1280.

Ballock, R.T., Reddi, A. H. (1994), Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J Cell Biol.*, **126**, 1311-1318.

Benya, P., Shaffer, J. (1982), Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, **30**, 215-224.

Capito, R.M., Spector, M. (2006). Effect of expansion medium on ex vivo gene transfer and chondrogenesis in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthr Cartil.*, **14**,1203-13.

**Carvalho, A.C.C. (2001), Células-tronco: a medicina do futuro. *Ciênc. Hoje*, 29, 27-31.**

Dessau, W., Vertel, B.M., von der Mark, H., von der Mark K. (1981), Extracellular matrix formation by chondrocytes in monolayer culture. *J Cell Biol.*, **90**, 78-83.

Goessler, U.R., Hörmann, K., Riedel, F. (2003), Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (Review). *Intern J Mol Med.*, **13**, 505-513.

Grimaud, E., Heymann, D., Redini, F., (2002), Recent advances in TGF-beta effects chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13**, 241-257.

Jenniskens, Y.M., Koevoet W., de Bart, A.C.W., Weinans H., Jahr, H., Verhaar, J.A.N., DeGroot, J., van Osch, G.J.V.M. (2006), Biochemical and functional

modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGF $\beta$ 2 and FGF2. *Osteoarth Cartil.*, **14**, 1136-1146.

Kisiday, J., Jin, M., Kurz, B., Hung, H., Semino, C., Zhang, S., Grodzinsky, A.J. (2002), Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci.*, **99**, 9996-10001.

Ma, P.X., Langer, R. (1999), Morphology and mechanical function of long-term in vitro engineered cartilage. *J Biomed Mater Res.*, **44**, 217-221.

Mandelbaum, B.R., Browne, J.E., Fu, F., Micheli, L., Mosely J.B., Erggelet, C., Minas, T., Peterson, L. (1998), Articular cartilage lesions of the Knee. *Am J Sports Med.*, **26**, 853-859.

Nakayama, N., Duryea, D., Manoukian, R., Chow, G., Han, C.Y. (2003), Macroscopic cartilage formation with embryonic stem-cell-derived mesodermal progenitor cells. *J Cell Sci.*, **116**, 2015-2028.

Park, K., Huang, J., Azar, F., Jin, Ri L., Min, Byoung-Hyun, Han, D.K., Hasty, K. (2006), Scaffoldfree, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair – in vitro and in vivo study. *Artif Organs*, **30**, 586-596.

Qiao, B., Padilla, SR., Benya, PD. (2005), Transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1 mimics and mediates TGF-beta-induced stimulation of type II collagen synthesis in chondrocytes independent of Col2a1 transcription and Smad3 signaling. *J Biol Chem.*, **280**, 62-71.

Zhang, Z., McCaffery, J.M., Spencer, R.G.S., Francomano, C.A. (2004), Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat.*, **205**, 229-237.

**Platelet Lysate Gel (PLG): New Methodology for Chondrocyte Culture and Preparation of Cartilage Implants**

**[Artigo III]**

***Status: a ser submetido a Periódico Internacional Journal of Orthopaedic Research***

## **PLATELET LYSATE GEL (PLG): NEW METHODOLOGY FOR CHONDROCYTE CULTURE AND PREPARATION OF CARTILAGE IMPLANTS**

<sup>1</sup>BITTENCOURT, RAC; <sup>2</sup>PEREIRA, HR; <sup>3</sup>FELISBINO, S; <sup>4</sup>MOROZ, A; <sup>5</sup>DEFFUNE, E.

<sup>1</sup>Post-Graduate in the Department of Surgery – UNESP School of Medicine at Botucatu –/ <sup>2</sup>Assistant Professor Doctor – Department of Orthopedic Surgery - UNESP School of Medicine at Botucatu / <sup>3</sup>Assistant Professor Doctor – Department of Morphology – Bioscience Institute at Botucatu – UNESP/ <sup>4</sup>Researcher – Blood Center - UNESP School of Medicine at Botucatu / <sup>5</sup>Assistant Professor Doctor – Department of Urology/Blood Center - UNESP School of Medicine at Botucatu

Work Performed at School of Medicine, Botucatu Campus, Laboratory of Cellular Culture, Blood Center – UNESP – São Paulo - Brazil.

**Address for Correspondence:** Renata Aparecida de Camargo Bittencourt, Medicine College of Botucatu – UNESP, Blood Center, Rubião Júnior s/n, Telephone: (14) 38116041, Fax: (14) 38116041, e-mail: rentcourt2000@yahoo.com.br

**Acknowledgments:** We thanks Fátima Regina Guimarães and Ednelson Henrique Bianchi for excellent technical assistance.

### **ABSTRACT:**

Platelet-rich plasma (PRP) is a fraction of plasma that contains multiple growth factors (GFs) that regulate cell proliferation, differentiation, and morphogenesis in the cartilage tissue. Our goal was to culture chondrocytes in a new three-dimensional scaffold: platelet lysate gel (PLG) obtained by PRP for application in cartilage implants. Articular cartilage and PRP was obtained from rabbits. After digestion of cartilage extracellular matrix (ECM), the cells were resuspended at a density of  $1 \times 10^6$  cells/mL in PRP containing lysate platelets then mixed with calcium gluconate and thrombin to make the gel. The chondrocytes embedded in PLG were cultured for

four weeks. The ECM and cell distributions within PLG were assessed by staining with toluidine blue and Hematoxyline-Eosin (HE) in histological sections. The presence of high numbers of cells was observed throughout the culture period. The PLG remained unbroken. Staining of histological sections revealed well-defined chondrocyte distribution in the gel and ECM production. In this study, the PLG was an efficacious scaffold to use in chondrocytes culture. This scaffold may be an apt approach to repair articular cartilage defects using autologous plasma.

**KEY WORDS:** Platelet-rich plasma, platelet lysate gel, chondrocytes culture, tissue engineering.

## **INTRODUCTION**

Damage to and subsequent degeneration of articular cartilage as well as its relationship to osteoarthritis constitute a significant health problem (1). Approximately 70% of the population aged 65 years and older is affected in some way by osteoarthritis (OA). Currently, there is no cure for osteoarthritis and no treatments that have been proven to retard disease progression (2).

The principal function of articular cartilage is to reduce stress on subchondral bone and to minimize friction. Normal articular cartilage is composed of matrix, cells, and water; it is contiguous with and overlies the subchondral bone. The matrix is principally composed of type II collagen fibers (3), but types V, VI, IX, X, and XI collagen are present in smaller amounts. Sulfated proteoglycans are linked to hyaluronate (4).

Properties inherent to adult articular cartilage, such as lack of vascularity and limited numbers of chondrocytes, restrict the tissue's intrinsic capacity for healing after acute damage, especially if the injury does not penetrate into the subchondral bone (5). In addition, the tissues formed by spontaneous repair are fibrocartilaginous, composed of abnormal biochemical composition and inferior biomechanical function (5,6).

Tissue engineering holds the promise of regenerating articular cartilage defects. There are two / three / four methods to produce cartilage using tissue engineering: implantation of cells alone or scaffolds alone, or in combination as a



cell-seeded scaffold, to promote regeneration *in vivo*; or to produce cartilaginous tissue *in vitro* for subsequent implantation (7, 8).

Therefore, various scaffolds were tested for cartilage engineering: agarose gel, collagen, alginate, chitosan, hyaluron and fibrin (2, 8, 9, 10).

Joint homeostasis depends in many ways on the adequate expression of various growth factors (GFs) (11, 12). Platelets are non-nuclear cellular fragments derived from megakaryocytes in bone marrow through controlled cellular fragmentation. In addition to their function in hemostasis, platelets release substances that promote tissue repair, angiogenesis, and inflammation (13).

The platelet-rich plasma (PRP) is an autologous product that concentrates a high number of platelets in a small volume of plasma (14), which contains multiple growth factors including transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ ) that regulate cell proliferation, differentiation, and morphogenesis in cartilage tissue, platelet-derived growth factor (PDGF), insulin growth factor (IGF-I) and fibroblastic growth factor (FGF) promote proliferation, cell migration and synthesis of extracellular matrix (ECM) proteins including collagen (5, 15).

To trigger the release of these GFs, platelets must be activated. Thrombin, the most potent platelet activator, induces platelets to release growth factors (PGF) from the PRP in a dose-dependent fashion. Mixing PRP with thrombin and calcium chloride to antagonize the anticoagulant effect of citrate results in the activation of the platelet concentrate with the development of viscous platelet gel (PG) solution. Thereafter, the PG can be exogenously applied with a syringe or as a solid clotted jelly mass applied to soft tissues, bone, or synthetic bone (16). The PG can be as a scaffold for cartilage engineering.

PRP has been utilized to treat intra-articular injuries. Examples include arthritis, arthrofibrosis, articular cartilage defects, meniscal injury and chronic synovitis or joint inflammation (16).

Autologous PG is safe, non-toxic to tissue, easily prepared, readily available and cost effective; it promotes a firm seal in minutes, is reabsorbed by the body in a period of days to a few short weeks and promotes local tissue growth and repair (17). Choi et al., 1980 (18), have previously reported that platelet lysates stimulate cell proliferation of chondrocytes.

The present work aimed to culture chondrocytes in a new three-dimensional scaffold: platelet lysate gel (PG) obtained by PRP for application in cartilage implants.

## **Materials and methods**

### **Animal model**

Articular cartilage from knee and whole blood were obtained from five New Zealand white rabbits, aged three to six months, weighing 4kg, from the Experimental Laboratory in the Department of Orthopedic Surgery of the UNESP School of Medicine at Botucatu - - São Paulo - Brazil. The Animal Research Ethics Committees for the School of Medicine at Botucatu approved this research according to protocol n° 345.

### **Preparation of PRP**

The animals were weighed and anesthetized with sodium pentobarbital (30mg/kg) in the central veins of the ear in order to initiate blood collection. After blood collection the animals were sacrificed with a lethal dose of sodium pentobarbital for cartilage harvest. Intracardiac blood was collected with an 18G x 3.5mm Angiocath needle (BD™) into 3.8% (wt/vol) sodium citrate under strict aseptic conditions. Total volume was 50 ml per animal. Samples were centrifuged (FANEM® centrifuge) at 1000rpm for 10min to separate PRP. The centrifugation resulted in the following three layers: an inferior layer composed of red cells, an intermediate one composed of white cells and a superior layer consisting of plasma. The 20 ml plasma layer was collected and centrifuged for another 10 minutes at 3000rpm in order to obtain two plasma portions: the upper portion consisting of platelet-poor plasma (PPP) and the lower portion consisting of platelet-rich plasma (PRP). The PPP (16ml) was first aspirated to avoid mixing it with the PRP. The PRP (4ml) was then gently aspirated with another pipette and placed in a sterile tube.

Platelet counts were performed with Horiba ABX Diagnostics Micros 60 automated hematology analyzer not only on peripheral blood but also PRP.

## **A method to prepare blood platelet lysate from PRP**

The PRP was frozen at -80°C. After 24 hours the PRP was thawed at 37°C, centrifuged for 10min at 5000rpm at 4°C, for the disruption of platelet membrane and consequent release of the growth factors resulting in the platelet lysate gel (PLG).

## **Preparation of human thrombin**

Human thrombin was produced in the Blood Transfusion Center, Medical School - UNESP, Botucatu-SP, Brazil. The plasma was diluted in distilled water and the pH adjusted to 5.3. After 15 minutes centrifugation was performed at 1000rpm/30 minutes. The precipitate was dissolved in 25ml of saline, the pH adjusted to 7.0 with sodium carbonate 2% before adding 3ml of CaCl<sub>2</sub> (0.25M). After 2 hours at room temperature, to maximize development of thrombin, an equal volume of acetone was added carefully under agitation and another centrifugation was carried out for 1 minute at 2000rpm. The thrombin was kept in a freezer.

## **Chondrocyte isolation**

Cartilage was harvested from femoral condyles and collected in Ham's F12 (1vol:1vol) (GIBCO® Invitrogen Corporation) culture medium supplemented with antibiotics (Penicillin –Streptomycin solution and amphotericin B GIBCO® Invitrogen Corporation). After fragmentation the chondrocytes were isolated by sequential enzymatic digestion of the ECM with trypsin (45min; 0.25% EDTA) (GIBCO®), hyaluronidase (45min;2mg/ml) (Sigma® Chemical Company, St. Louis, IL, USA) and type I collagenase (overnight; 0.45%) (GIBCO® Invitrogen Corporation) at 37°C.

The resulting cell suspension was filtered through a 70µm nylon mesh (BD™), centrifuged, and the chondrocytes were mixed with PRP solution to generate chondrocytes/PRP composites with final cellular density of 1x10<sup>6</sup> cells/mL.

## ***In vitro* culture of chondrocytes in platelet lysate gel (PLG) scaffold**

Human thrombin and calcium gluconate 10% (Hypofarma®, 100mg/mL) were used as cross-linking agents to produce a gel composed of chondrocytes/PRP. The

chondrocyte/PRP composites (100 $\mu$ L) were mixed with thrombin (100 $\mu$ L) and calcium gluconate (10 $\mu$ L), pipetting the suspension into each well of a 96-well culture microplate.

The chondrocyte/PRP scaffolds were cultured in DMEM-F12 (GIBCO<sup>®</sup> Invitrogen Corporation) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 50mg/mL ascorbic acid and a penicillin/streptomycin solution and amphotericin B (GIBCO<sup>®</sup> Invitrogen Corporation). The culture plates were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for four weeks, with the culture medium replaced every 2 days.

The chondrocyte cultures were observed daily in an Axiovert 200 (Zeiss<sup>®</sup>) inverted microscope and photographically documented on days 1, 7, 14 and 30 using a Canon Power Shot A620 Digital Camera.

### **Histological analysis**

After four weeks in the culture, the PG specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated using different concentrations of ethanol (70%, 80%, 90% and 100%), transferred into xylol and embedded in historesin liquid (Leica<sup>®</sup>). Thin sections (7 $\mu$ m) were prepared with a microtome (Leica, Bensheim, Germany), then stained with hematoxylin and eosin (H&E) and toluidine blue, and examined with AxioStar Plus (Zeiss<sup>®</sup>) microscope.

## **RESULTS:**

### **Platelet count analysis of PRP**

Due to the eventual euthanasia of the animals and difficulty of reaching peripheral rabbit veins, we opted to collect blood by intra-cardiac puncture. The platelet concentration in PRP increased 3 fold compared to the blood sample platelet count (Table 1). We obtained a PRP average of 5ml from blood sampling. In the PRP, the mean platelet concentration was 594,200 platelets/mm<sup>3</sup> (Table 1). After preparing a platelet lysate starting from PRP, the platelet concentration was 80,000 platelets/mm<sup>3</sup>. We considered the PRP treated with the 10 $\mu$ L calcium gluconate volume as presenting adequate coagulation. When we increased the volume there was a loss in the coagulation capacity of the PRP. We had a good result with the liquid thrombin prepared in the service unit. The thrombin concentration was 10.3

U/mL. The coagulum formation using this thrombin took 60 seconds. We standardized the same concentration of thrombin in relation to the PRP. Photomicrographs of PLG without chondrocytes after gel formation (Fig. 1a) demonstrate the network of fibrin and discoid form.

Table 1. PRP preparation and platelet cell counts in total blood and PRP

Rabbit		Blood Samples		AC	Centrifugation		Hct	PRP	Platelet Cells Count/mm <sup>3</sup>	
F	M	S	ml	Type	1st	2nd	%	ml	Heart	PRP
	1	Heart	45	Citrate	1000rpm/10'	3000rpm/10'	36.3	4	224,000	857,000
	2	Heart	40	Citrate	1000rpm/10'	3000rpm/10'	36.2	3	154,000	465,000
	3	Heart	60	Citrate	1000rpm/10'	3000rpm/10'	13.6	8	147,000	475,000
	4	Heart	20	Citrate	1000rpm/10'	3000rpm/10'	37	1	118,000	521,000
	5	Heart	60	Citrate	1000rpm/10'	3000rpm/10'	27.2	9	218,000	653,000

Legend: F: Female; M: Male; Hct: Hematocrit; S: Source; AC: Anticoagulation;

#### Chondrocyte culture in platelet lysate gel (PLG)

Chondrocyte viability after cartilage digestion was above 90%. Photomicrographs of chondrocytes cultured in platelet lysate gel scaffold in 14 day cultures, are shown in Fig. 1b. After gel formation, in the cell-seeded scaffold, the addition of thrombin insignificantly decreased the amount of PLG without cell loss, while maintaining the cells in the interior of the gel. Daily assessment with the inverted microscope showed the cells homogeneously distributed throughout the scaffold (Fig. 1b). The presence of many cells was shown during the culture period.

Chondrocytes cultured in platelet gel scaffold maintained their round phenotype without any indication of cellular dedifferentiation, a process during which they become fibroblast-like. Viability testing after 1 week showed about 90% vital cells according to trypan blue stain.

The PG remained unbroken maintaining all cells in four weeks or culture.

### **Histological analysis of cell-seeded platelet gel scaffolds**

Histological examination of cell-seeded platelet gel scaffold through hematoxylin and eosin (HE) showed well-defined chondrocyte distribution in the scaffold and high cell density. (Fig 1c). Large clusters of chondrocytes were observed in central regions of the platelet gel scaffold. After 4 weeks of cultivation in platelet gel, there was fresh matrix formation with lacunae having formed around chondrocytes, as shown by HE staining, that had preserved their round shape (Fig. 1d). The chondrocytes were organized in rows.

A pericellular accumulation of proteoglycans was demonstrated with toluidine blue (tB) staining (Fig. 1e and f). Figure 1e shows most surface cells with polygonal-rounded morphology.

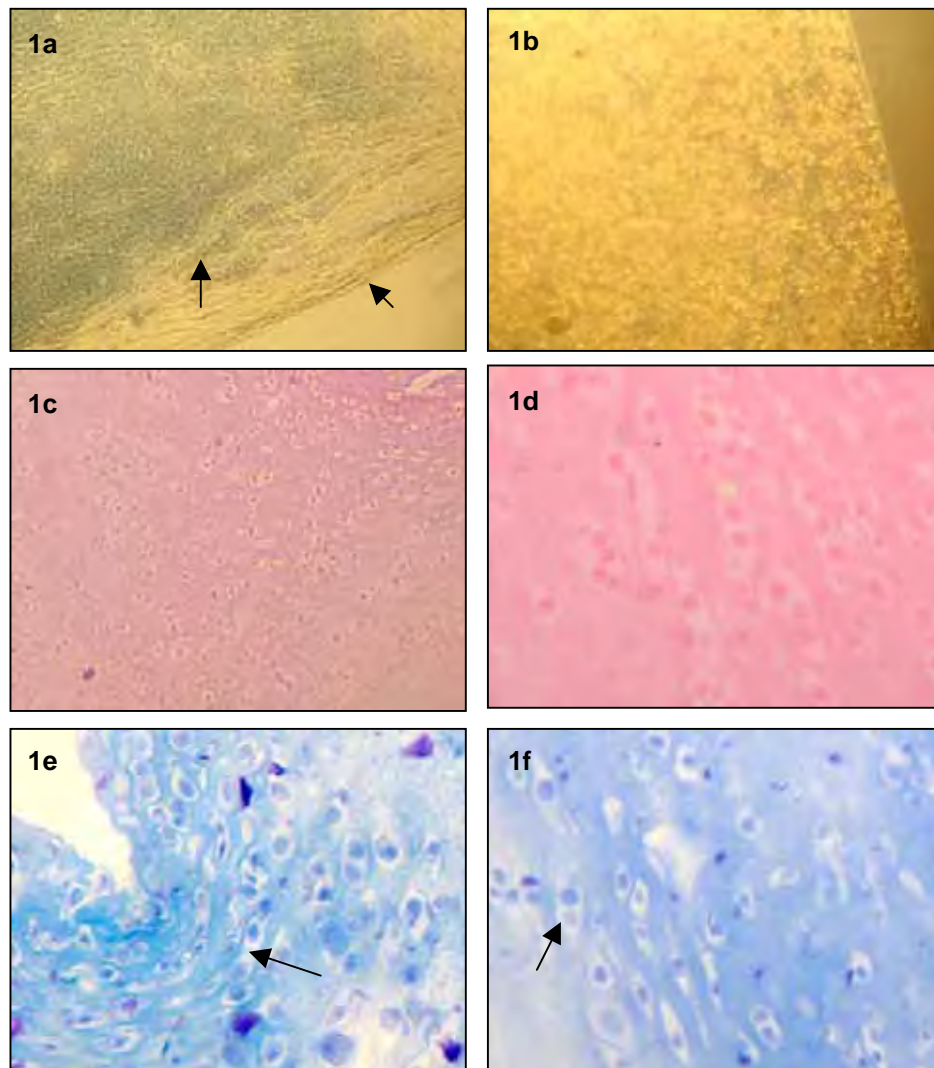


Figure 1. Photomicrographs of representative platelet lysate gel (PLG) without (1a) and with chondrocytes (1b). Figure 1a shows the fibrin network and discoid form of the gel (arrow) and 1b proliferation of chondrocytes in PLG at culture day 14 (magnification 100x and 50x). Histological sections from PLG with hematoxyline and eosin staining (fig. 1c and d). Figure 1c displays the well-defined chondrocyte distribution in the scaffold and high cell density and (1d) the phenotype retention by chondrocytes after 4 weeks (arrow) (magnification 100x and 200x). Toluidine blue staining (1e and f). Chondrocyte culture after 4 weeks (fig. 1e), presence of higher cell density, pericellular matrix around chondrocytes (arrow). (magnification 200x). Chondrocytes after 4 weeks (1f), rounded morphology and lacunar formation. (arrow). (magnification 200x).

## **Discussion**

Cartilage is a non-vascular tissue with limited numbers of chondrocytes and therefore has a limited capacity for self-repair (19).

The treatments that aim to regenerate articular cartilage injuries through tissue engineering are based on implantation of cells, scaffolds, or cell-seeded scaffolds into articular cartilage defects. Recently, many scaffolds have been tested to associate the use of specific growth factors for cartilage regeneration and cell proliferation with matrix deposition of the cartilage. The idea is to create one scaffold that can simultaneously provide support for chondrocyte culture and release growth factors, coincident with the objective of this study.

Growth factors such as transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and platelet-derived growth factor (PDGF), applied singly or in combination with cells, have been shown to stimulate cell proliferation and matrix formation of tissue-engineered cartilage (5). Platelet-rich plasma (PRP) is a plasma fraction that can be produced and separated by centrifugation of whole blood. Because PRP contains multiple growth factors concentrated at high levels (20,21) PRP from patients is used as an autologous source of growth factors for soft tissue and bone repair in several clinical procedures (22,23). A platelet contains the vast majority of biologically active molecules required for blood coagulation, such as adhesive proteins, coagulation factors and protease inhibitors, within cytoplasmic  $\alpha$ -granules. In addition to the factors that coagulate blood, growth factors such as TGF- $\beta$ , PDGF and FGF-2, are released from  $\alpha$ -granules (24,25) when platelets are activated (5, 13)

The platelets in PRP are activated by the addition of thrombin and excess calcium, a process that promotes both platelet activation and a coagulation cascade which finally results in the formation of a thrombus-like gelatinous substance (platelet gel), in which activated platelets are trapped in the fibrin network, where they continue to excrete their contents, and where the bioactive substances slowly diffuse into the surroundings (13).

We developed a method to make PRP in rabbits, successfully, for chondrocyte culture in platelet lysate gel (PLG) derived from PRP.

Blood coagulation problems are more frequently seen in female than male rabbits. This observation could influence rabbit PRP production (14, 26).



Nevertheless, these differences do not seem to be relevant in humans (27). In the present study we collected blood samples from male rabbits only to prevent this interference.

Several variables should be carefully monitored during PRP preparation. Special care is required in choosing blood extraction tools, blood centrifugation machines and  $\text{CaCl}_2$  solutions to prevent contamination of the compound. All processes must be done in sterile conditions and precisely executed to separate platelets from red blood cells. Unless platelet sequestration is done carefully and without causing any damage, platelets will no longer be able to actively secrete growth factors (14).

All procedures were carried out in a laminar flow cabinet, with the exception of blood collection. The  $\text{CaCl}_2$  utilized was sterile, which resulted in 0% contamination throughout the four weeks of cell culture. The concentration of red blood cells in the PRP was practically zero.

In the present study it was possible to formulate a platelet concentrate from rabbit blood samples, increasing by up to three fold the numbers of platelets in the PRP. The claim of some researchers that the best platelet concentration for producing PRP is 1 million/dl remains unproven (14).

After platelet lyses, through the process of freezing and thawing, there was a reduction in the number of platelets; however, this did not alter the quality of the coagulation. It is believed that most lysated platelets had released growth factors stimulating chondrocyte proliferation.

In the present study we evaluated the concentrations of thrombin and calcium to arrive finally at an ideal concentration without sacrificing gel consistency during the culture process. We maintained the gel for the four weeks of culture without losing the gel property or the cells themselves, which therefore remained trapped in the gel until the end of the culture process. As observed in an inverted microscope, the rounded shape of chondrocytes remained constant throughout the culture time, and no cells with fibroblast-like morphology were observed. The presence of extracellular matrix was demonstrated to be distributed throughout the gel.

It was not possible to quantify the growth factor concentrations in the PRP, that were responsible for these effects on chondrocytes culture. But given the high platelet concentration in PRP before lysis and the beneficial effect on chondrocyte culture, it was possible to see the importance of the platelet number in the gel and its

effect on cartilage production. There are a few studies on chondrocyte culture using platelet lysate from PRP. Choi et al., 1980 (18), who utilized lysate platelet to promote action on rabbit articular chondrocytes in monolayer culture, obtained good results. Recently, human platelet lysate has been used to replace fetal bovine serum for expansion of mesenchymal stromal cells (28, 29).

PRP utilization has several advantages over the use of recombinant growth factors of animal origin in relation to safety issues, including much less concern about immunological reactions or carcinogenesis, besides presenting costs considerably lower than those associated with the use of recombinant proteins (14).

Thus, this methodology can be readily applied to establish chondrocyte transplants for cartilage reconstruction in animals, which is the next step of this study, as well as for advancing *in vitro* investigations of chondrocyte differentiation.

For the application of PRP growth factors and PLG to human tissue-engineered cartilage, further studies assessing the effects of PRP on matrix metabolism by human primary and expanded chondrocytes should be performed.

### **Conclusion:**

- In the present study, the PLG was shown to be an efficacious scaffold for utilization in chondrocytes culture.
- This scaffold may be an apt application to repair articular cartilage defects using autologous plasma.

## **Reference**

- 1 – Fernandez RN, Ximenes AC, Rassi CM, Silva NA. 1997. Perspectivas terapêuticas para a osteartrose. *Rev Bras Reumatol* 37:97-102.
- 2 – Chang CH, Lin FH, Kuo TF, Liu HC. 2005. Cartilage tissue engineering. *Biomed Eng Appl Basis Comm* 17:1-11.
- 3- Lee GM, Loeser RF. 1998. Interactions of the chondrocyte with its pericellular matrix. *Cells and Mater* 8:135-149.
- 4- Mandelbaum BR, Browne JE, Fu F, et al. 1998. Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med* 26:853-861.
- 5- Akeda k, An hS, Osuma M, et al. 2006. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *OsteoArthritis Cartilage* 14:1272-1280.
- 6- Wei X, Messner K. 1999. Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res* 46:539-48.
- 7 – Lee CR, Spector M. 1998. Status of articular cartilage tissue engineering. *Curr Opin Orthop* 9:88-93.
- 8 – Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu H-P, Spector M. 2003. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seed type I collagen scaffold on healing of a chondral defect in canine model. *J Orthop Res* 21:272-281.
- 9- Perka C, Spitzer R-S, Lindenhayn K, et al. 2000. Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *J Biomed Mater Res* 49:305-311.
- 10- Risbud MV, Sitterling M. 2002. Tissue engineering: advances in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol* 20:351-356.
- 11 - Caron JP. 2003. Osteoarthritis. In: *Diagnosis and management of lameness in the horse*. Philadelphia: Saunders Co; p 572-591.
- 12 - Platt D. 1996. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition. In: McIlwraith CW, Trotter GW (editors). *Joint disease in the horse*. McIlwraith CW, Trotter GW (editors). Philadelphia: WB Saunders Company; p 29-40.
- 13 – Rozman P, Bolta Z. 2007. Use platelet growth factors in treating wounds and soft-tissues injuries. *Acta Dermatovenerol Aep Panonica Adriat* 16:156-165.

- 14 – Gimeno FL, Gatto S, Ferro j, Croxatto JO, Gallo JE. 2006. Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. *Thromb J* 4:18.
- 15 – Anitua E , Andí I, Sánchez M, et al. 2005. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 23:281-286.
- 16 – Everts P, knape JTA, Weibrich G, et al. 2006. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* 38:174-187.
- 17 – What is platelet gel? [article on the internet]. Melbourne: Heartpumper Inc; 2008 [cited 12 out 2008] Available from: [www.heartpumper.com/prp](http://www.heartpumper.com/prp).
- 18 - Choi YC, Morris GM, Sokoloff L. 1980. Effect of platelet lysate on growth and sulfated glycosaminoglycan synthesis in articular chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum* 23:220-224.
- 19 – Goessler UR, Hörmann K, Riedel F. 2004. Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (Review). *Int J Mol Med* 13: 505-513.
- 20 - Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. 2002. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 30:97-102.
- 21 - Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. 2002. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:615-619.
- 22 - Anitua E. 1999. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:529-535.
- 23 - Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, et al. 2004. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci* 30:145-151.
- 24 - Harrison P, Cramer EM. 1993. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 7:52-62.
- 25 -Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 258: 7155-7160.
- 26 - Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S: 2004. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg* 62:1403-1407.

27 - Weibrich G, Kleis WK, Kunz-Kostomanolakis M, et al. 2001. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16:693-699.

28 – Capelli C, Domenghini M, Borleri G, et al. 2007. Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from samples of bone marrow aspirates for marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant* 40: 785-791.

29 - Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, et al. 2007. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 47: 1436-1446.

**Tratamento de Lesões Osteocondrais do Joelho Através da Engenharia Tecidual: Transplante Alogênico de Condrócitos Embebidos em Gel de Plaquetas versus Hidrogel de Alginato**

[Artigo IV]

*Status: a ser submetido a Periódico Nacional Clinics*

**TRATAMENTO DE LESÕES OSTEOCONDRAIS DO JOELHO ATRAVÉS DA ENGENHARIA TECIDUAL: TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CONDROCITOS EMBEBIDOS EM GEL DE PLAQUETAS VERSUS HIDROGEL DE ALGINATO**

**TREATMENT OF OSTEOCHONDRAL DEFECTS OF THE KNEE USING TISSUE ENGINEERING: TRANSPLANTATION OF ALLOGENIC CHONDROCYTES EMBEDDED IN PLATELET GEL VERSUS ALGINATE HIDROGEL**

Renata Aparecida de Camargo Bittencourt<sup>1</sup> ; Hamilton Rosa Pereira<sup>2</sup> ; Sérgio Luís Felisbino<sup>3</sup> ; Andrei Moroz <sup>4</sup>; Aparecida Vitória Gonçalves de Souza<sup>4</sup> , Ricardo Violante Pereira<sup>5</sup>, Elenice Deffune<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda do Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>2</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Cirurgia e Ortopedia - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>3</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu./ <sup>4</sup>Alunos de Mestrado em Biotecnologia Médica - Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>5</sup>Médico Contratado, Departamento de Cirurgia e Ortopedia - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP / <sup>6</sup>Professora Assistente Doutora, Departamento de Urologia/ Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu, Laboratório de Cultura Celular, Hemocentro - UNESP – São Paulo - Brasil.

**Endereço para correspondência:** Renata Aparecida de Camargo Bittencourt, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Hemocentro, Rubião Júnior s/n, Telefone: (14) 38116041, Fax: (14) 38116041, E-mail: rentcourt2000@yahoo.com.br

**Agradecimentos:** Nós agradecemos à Fátima Regina Guimarães e Ednelson Henrique Bianchi pela excelente assistência técnica em todo desenvolvimento do trabalho. Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela realização das análises estatísticas do presente trabalho.

## RESUMO

**OBJETIVOS:** A proposta do presente trabalho foi tratar lesões osteocondrais da cartilagem articular do joelho implantando condrócitos embebidos em gel de plaquetas *versus* hidrogel de alginato utilizando como modelo experimental coelhos.

**MÉTODO:** Amostras de cartilagem articular foram cultivadas em hidrogel de alginato ou gel de plaquetas obtido a partir do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) de coelhos durante uma semana para posteriormente serem implantados. Defeitos osteocondrais de 2.0mm de diâmetro por 4.0mm de profundidade foram criados cirurgicamente em ambos côndilos femorais (n=36). Subdividiram-se os grupos de animais em grupo tratado que recebeu gel de plaquetas/condrócitos (GPC) e controle que recebeu somente o gel de plaquetas (GP) e grupo tratado que recebeu hidrogel de alginato/condrócitos (HAC) e controle que recebeu somente o hidrogel de alginato (HA). Compararam-se macroscopicamente e histologicamente todos os tipos de defeitos após 30, 60 e 90 dias de evolução.

**RESULTADOS:** A avaliação macroscópica dos defeitos preenchidos com GPC ou GP apresentou na maioria dos casos, uma superfície brilhante, lisa e em continuidade com a cartilagem adjacente, quando comparados aos defeitos preenchidos com HAC e HA. Histologicamente os defeitos preenchidos com GPC apresentaram (50%), GP (33%), HAC (33,3%) e HA (16,7%) de tecido cartilaginoso no momento de 30 dias de evolução; com GPC apresentou (66,7%), GP (66,7%), HAC (66,7%) e HA (16,7%) de tecido cartilaginoso no momento de 60 dias de evolução; e com GPC apresentaram (83,3%), GP (66,7%), HAC (50%) e HA (33,3%) de tecido cartilaginoso no momento de 90 dias de evolução.

**CONCLUSÃO:** O uso do GPC ou GP demonstrou ser mais eficiente no reparo de lesões osteocondrais quando comparado ao HAC e HA.

**Palavras chaves:** joelho; implante alogênico; cartilagem articular; lesão osteocondral; hidrogel de alginato; gel de plaqueta.



## Introdução:

A degeneração da cartilagem articular é multifatorial. A resultante da ação degenerativa desta cartilagem é a incapacidade física temporária ou permanente. Inúmeras doenças podem provocar tais acometimentos, desde microorganismos (tuberculose, sífilis, etc.) até lesões secundárias aos processos inflamatórios como doença reumática e artrite reumatóide além das causas degenerativas (osteoartrose), afecções traumáticas e doenças metabólicas (gota, ocrnose etc.) <sup>(1)</sup>.

Na osteoartrose (OA), quer primária ou secundária, a cartilagem é o tecido com maiores aberrações do normal. Entre as alterações morfológicas, a cartilagem articular perde sua natureza homogênea e é fragmentada, com fibrilação, fissuras e ulcerações resultando na maioria dos casos na exposição da superfície óssea e crescimento ósseo nas margens da articulação <sup>(2)</sup>.

Nos EUA existem mais de 50 milhões de pessoas que apresentam esta enfermidade. No Brasil, não existem dados precisos sobre esta prevalência <sup>(3)</sup>.

Alguns tratamentos para regenerar a cartilagem articular lesada devido a uma doença ou trauma, como por exemplo: perfuração ou microfratura do osso subcondral ou artroplastia de abrasão promovem a formação de uma cartilagem fibrosa com propriedades distintas do tecido hialino original. No entanto, este mecanismo de reparo tem duração limitada <sup>(4,5)</sup>.

Os tratamentos para osteoartrose severa incluem a substituição da superfície articular degenerada por uma prótese artificial ou substituição total do joelho. Entretanto, esses tratamentos são indicados geralmente a indivíduos com idade acima de 60 anos e menos indicado para indivíduos com idade inferior a 50 anos, devido ao limite de duração dessas próteses <sup>(6)</sup>.

Um dos maiores avanços no campo da engenharia de tecidos e dentro da medicina ortopédica, tem sido a produção de cartilagem articular “in vitro”, retirada do próprio paciente, para a realização de implante autólogo de condrócitos (IAC), com intuito de regenerar o tecido cartilaginoso lesado.

Esta possibilidade de isolar células do próprio paciente e posteriormente implantá-las, para o uso na terapia celular, pode resolver um dos maiores problemas: a rejeição imunológica de tecidos e órgãos <sup>(7)</sup>. No caso do implante de cartilagem articular autóloga a ação imediata é a de restaurar a função da articulação lesada e evitar possivelmente doenças como osteoartrose <sup>(4)</sup>.

Para a realização do IAC, a cartilagem das margens da articulação do joelho é colhida através de artroscopia. Posteriormente, os condrócitos são cultivados durante quatro semanas, e depois são transplantados na área lesada. As células são sustentadas por uma membrana de periósteo retirada da parte superior da tíbia. Esta membrana é suturada sobre o defeito da cartilagem, antes da injeção dos condrócitos isolados (4-6). Recentemente tem-se usado no lugar do periósteo a cola de fibrina (8). A mais popular e disponível comercialmente terapia baseada na cultura de condrócitos para uso em implantes autólogos de condrócitos é Carticel® (Genzyme Biocirurgia, EUA e Europa). Avaliações clínicas dos pacientes tratados com Carticel após 24 a 36 meses, 85% dos pacientes tiveram uma melhora no defeito do côndilo femoral após 36 meses de evolução. Os procedimentos de IAC utilizando Carticel variam de \$17.000 a \$38.000 dólares, com uma média de \$26.000 por procedimento (9).

ROBERTS e colaboradores (10), registraram análises histológicas da cartilagem articular após três anos de transplante autólogo: 22% do tecido da biópsia foi de cartilagem hialina, 38% fibrocartilagem e em 48% foram encontradas tanto cartilagem hialina como fibrocartilagem.

BRITTBERG e colaboradores (6), tiveram resultados satisfatórios no transplante autólogo de condrócitos em pacientes com lesões no côndilo femoral. No entanto o procedimento não foi considerado eficiente para o tratamento de condromalácia patelar.

Outros tratamentos têm sido usados na tentativa de regenerar o tecido cartilaginoso: técnicas que envolvem o enxerto autólogo osteocondral e transplante alogênico osteocondral (8).

A engenharia de tecidos juntamente com IAC tem colaborado em grande parte na regeneração de lesões na cartilagem articular, principalmente no que diz respeito à produção de suportes ou “scaffolds” tri-dimensionais para a cultura de condrócitos pré-implante.

Recentemente, uma variedade de suportes ou *scaffolds* como hidrogel e polímeros sintéticos, têm sido investigadas para a expansão dos condrócitos “in vitro” para o reparo da cartilagem lesada, pois condrócitos quando cultivados em monocamada, passam a sintetizar componentes da matriz da cartilagem fibrosa. Tais suportes incluem polímeros naturais: gel de colágeno tipo I e II, esponjas de

colágeno tipo II, gel de fibrina, hidrogel de alginato e polímeros sintéticos como ácido polilático e ácido poliglicólico (<sup>11,12</sup>).

A cultura de condrócitos em hidrogel de alginato constitui o método mais indicado para o isolamento e cultura destas células (<sup>13</sup>). O alginato é um polissacarídeo linear (n - ácido gulurônico – ácido manurônico), aniônico, capaz de gelatinizar-se de maneira reversível, na presença de cálcio ou outros cátions divalentes (<sup>14-15</sup>). Os condrócitos suspensos em alginato não aderem à matriz, facilitando a sua recuperação depois de cultivados, permitindo o estudo da expressão protéica e genética. Através deste método, consegue-se manter a expressão do fenótipo diferenciado, restaurar condrócitos não diferenciados e formar uma matriz extracelular similar à encontrada na cartilagem articular (<sup>13</sup>).

Fragonas e colaboradores (<sup>16</sup>), realizaram implantes em lesões osteocondrais no joelho de coelhos utilizando suspensões de condrócitos alogênicos embebidos em hidrogel de alginato. As análises histológicas realizadas após 4 a 6 meses pós-implante demonstraram a formação de tecido cartilaginoso hialino no local onde a lesão foi preenchida com hidrogel de alginato/condrócitos e tecido fibroso no local onde foi preenchida somente com hidrogel de alginato.

Recentemente tem-se procurado associar o uso de *scaffolds* mais fatores de crescimento (FC) específicos (Fator de Crescimento Transformante Beta -TGF $\beta$ , Fator de Crescimento de Fibroblastos do tipo 2 - FGF-2, Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas - PDGF) para a regeneração da cartilagem aumentando a proliferação dos condrócitos e produção dos componentes específicos da matriz cartilaginosa (<sup>17</sup>). O ideal é acoplar um *scaffold* que possa gerar ao mesmo tempo uma superfície de apoio para a cultura dos condrócitos e simultaneamente a liberação de FC.

Na linha de desenvolvimento de *scaffolds* que liberem FC, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem surgido como uma boa proposta. Trata-se de uma fração do plasma com alta concentração de plaquetas, rico em vários fatores de crescimento, de fácil obtenção, de origem autóloga, tendo sido amplamente utilizado no reparo de fraturas ósseas e inúmeros procedimentos ortopédicos (<sup>17,18</sup>). Sua biocompatibilidade e biodegradabilidade previnem a ocorrência de reações adversas (<sup>19</sup>).

Wu W e colaboradores (<sup>20</sup>), realizaram experimentos injetando PRP com ou sem condrócitos no dorso de coelhos, obtendo resultados de relevância na fonte de PRP contendo condrócitos, onde houve a formação de tecido cartilaginoso *in vivo*.

Mais recentemente tem sido descrito que nos procedimentos cirúrgicos ou tratamentos de lesões de pele, úlceras crônicas multifatoriais como diabetes, uma fração ainda mais concentrada obtida a partir do PRP tem apresentado resultados satisfatórios: gel de plaqueta (GP). Para formação do GP é necessária a adição de trombina e cloreto de cálcio ao PRP, antagonizando o efeito anticoagulante do citrato de sódio e resultando na ativação do concentrado de plaquetas formando um gel em camadas. (<sup>18,21</sup>). O GP poderá ser aplicado no local da lesão com a seringa ou como uma massa gelatinosa na fratura óssea, osso sintético, reparo de lesões na cartilagem articular ou ainda aplicado de forma laminar.

A proposta do presente trabalho foi tratar lesões osteocondrais da cartilagem articular do joelho implantando condrócitos embebidos em gel de plaquetas *versus* hidrogel de alginato utilizando como modelo experimental coelhos.

## **Material e Métodos**

### **Materiais:**

Os meios de cultura utilizados foram: DMEM:Ham's F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (1:1), meio Ham's F12, soro bovino fetal (SBF), antibióticos: 10U/ml de penicilina G, 10µg/ml de estreptomicina e 25µg/ml de anfotericina B, tripsina 0,25%/EDTA, colagenase tipo I, todos obtidos da GIBCO<sup>®</sup> Invitrogen Corporation. Ácido Algínico Sal Sódio de Baixa Viscosidade obtido de Macrocisti sp, hialuronidase, ácido ascórbico todos Sigma<sup>®</sup>. Cloreto de cálcio dihidratado (Fluka<sup>®</sup>) e cloreto de sódio (LABSYNTH<sup>®</sup>), gluconato de cálcio (Hypofarma<sup>®</sup>, 100mg/mL) e trombina humana (Divisão Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP). Os anestésicos utilizados foram pentobarbital sódico Sigma<sup>®</sup>, Zoletil<sup>®</sup> 50 (virbac) e Anasedan<sup>®</sup>. Como antiinflamatório utilizou-se Maxicam<sup>®</sup> 0,2% contendo meloxicam e antibiótico Baytril<sup>®</sup> injetável 5% (BAYER) contendo Enrofloxacino (5g).

## **Coleta de Cartilagem Articular e de Sangue por Punção Intracardíaca:**

### **Animais**

Coletaram-se condrócitos e amostras de sangue alogênico para minimizar intervenções cirúrgicas nos animais experimentais. Foram utilizados neste estudo 5 coelhos da raça Botucatu com 3 a 6 meses de idade, pesando entre 2 a 3Kg. Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/ Kg) administrado nas veias central ou marginal da orelha. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu segundo o protocolo n° 345.

Primeiramente, fez-se a coleta de sangue para obtenção do PRP por punção intracardíaca e posteriormente a eutanásia, administrando uma dose anestésica excessiva de pentobarbital sódico e coleta da cartilagem articular de ambos joelhos.

### **Preparo do Plasma Rico em Plaquetas**

Coletou-se de cada animal uma média de 50mL de sangue por punção intracardíaca em 3.8% de citrato de sódio, aspirando o sangue por meio de um angiocath BD™ com agulha de 18G x 3,5mm. As amostras foram centrifugadas (FANEM®) a 1000rpm por 10 minutos para separar o PRP. A centrifugação resultou na separação de três camadas no tubo de ensaio: camada inferior composta de hemácias, camada intermediária composta de glóbulos brancos e camada superior composta pelo plasma. Um total de 20mL de plasma obtido da camada superior foi centrifugado por 10 minutos a 3000rpm para obtenção de duas partes do plasma: plasma pobre em plaquetas – PPP (parte superior – 16mL) e plasma rico em plaquetas (parte inferior – 4mL). Após remoção do PPP aspirou-se o PRP transferindo-o para tubo estéril. Fez-se a contagem das plaquetas no PRP através do contador automático Horiba ABX Diagnostics Micros 60, obtendo uma concentração 465.000/mm<sup>3</sup> de plaquetas. Posteriormente seguiu-se o mesmo procedimento de lise das plaquetas conforme descrito por Bittencourt e colaboradores.

## **Isolamento dos Condrócitos**

A cartilagem articular foi removida do côndilo femoral, fragmentada em pedaços de  $\pm 1$ mm e submetida à digestão da matriz extracelular com as seguintes enzimas: tripsina (0,25%), hialuronidase (2mg/mL) por 45 minutos cada enzima e colagenase tipo I (0,45%) a 37°C por 16 horas.

## **Cultura dos Condrócitos em Hidrogel de Alginato Pré-Implante**

Após a digestão enzimática a suspensão de células foi filtrada em filtro de nylon de 70  $\mu$ m, centrifugada, e as células foram ressuspensas a uma densidade de  $1 \times 10^6$  céls/mL em uma solução de alginato de sódio a 1,5% (w/v). A suspensão de células em alginato não polimerizado (joelho tratado) foi pipetada (50 $\mu$ L -  $0,5 \times 10^5$  células) dentro da solução de gelatinização (2mL de CaCl<sub>2</sub> - 102 mM) na placa de Petri, permitindo a polimerização do alginato durante 10 minutos até formar os "hidrogéis". A solução de gelatinização foi desprezada, e os "hidrogéis" foram lavados 3 vezes em 5 vol. de NaCl a 0,15 M. Os hidrogéis foram cultivados em meio DMEM-F12 contendo 10U/ml de penicilina G, 10 $\mu$ g/ml de estreptomicina e 25 $\mu$ g/ml de anfotericina B, suplementado com ácido ascórbico (50  $\mu$ g/mL) e 10% de SBF. A cultura foi mantida em estufa de 37° C em uma atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar durante uma semana. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Para a realização dos hidrogéis controle (joelho controle), seguiu-se o mesmo protocolo. No entanto, os hidrogéis sem células foram confeccionados no dia dos implantes sem cultura prévia.

## **Cultura dos Condrócitos em Gel de Plaquetas Pré-Implante**

Para a formação do gel de plaquetas contendo condrócitos embebidos neste arcabouço (joelho tratado) e construção dos moldes para implantes, utilizou-se uma mistura de 10 $\mu$ L da suspensão celular contendo uma média de  $0,5 \times 10^5$  células, 10 $\mu$ L de trombina humana e 10 $\mu$ L de gluconato de cálcio para confecção do gel. Os géis de plaquetas/condrócitos foram cultivados em meio DMEM-F12 contendo 10U/ml de penicilina G, 10 $\mu$ g/ml de estreptomicina e 25 $\mu$ g/ml de anfotericina B,

suplementado com ácido ascórbico (50 µg/mL) e 10% de SBF. A cultura foi mantida em estufa de 37° C em uma atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar durante uma semana. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

Para confecção do gel de plaquetas sem condrócitos (joelho controle), fez-se o mesmo procedimento, no entanto os géis foram confeccionados no ato do implante sem cultura prévia.

### **Contagem e Viabilidade Celular Pré-Implante**

A contagem de células e determinação da viabilidade celular foi realizada utilizando a câmara de Neubauer. O número de células vitais foi determinado pela técnica de exclusão de células não vitais coradas por solução de azul de tripano, seguindo as recomendações de Freshney, 2001 <sup>(12)</sup>. As viabilidades celulares em ambas culturas atingiram uma média de 90% de condrócitos viáveis pré-implante.

### **Implante de Condrócitos Embebidos em Gel de Plaquetas versus Gel de Alginato**

#### **Animais de Experimentação**

O coelho foi escolhido, neste estudo, por ser um animal amplamente utilizado em modelos para reparação da superfície articular.

Para o estudo proposto foram utilizados 36 coelhos machos, albinos, adultos da raça Botucatu pesando entre 3,5kg e 4,0kg, provenientes do Laboratório Experimental de Cirurgia e Ortopedia – UNESP – Botucatu. Os animais foram alojados em sala apropriada e confinados em gaiolas metálicas, alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

#### **Grupos de Animais de Estudo**

Para realização das lesões osteocondrais nos côndilos femorais e preenchimento das mesmas, respectivamente, padronizou-se o joelho esquerdo como grupo tratado preenchido com gel de plaquetas/condrócitos ou hidrogel de alginato/condrócitos e direito como grupo controle preenchido com gel de plaquetas ou hidrogel de alginato.

Os grupos de animais foram subdivididos da seguinte forma: grupo tratado que recebeu gel de plaquetas/condrócitos e grupo controle que recebeu somente o gel de plaquetas sendo submetidos ao sacrifício nos períodos de 30 dias (n=6), 60 dias (n=6) e 90 dias (n=6), totalizando 18 animais.

O grupo tratado que recebeu hidrogel de alginato/condrócitos e grupo controle que recebeu somente o hidrogel de alginato foram sacrificados nos períodos de 30 dias (n=6), 60 dias (n=6) e 90 dias (n=6), totalizando 18 animais.

### **Técnica Cirúrgica**

Os animais foram anestesiados por via intra-muscular com Zoletil na dose de 15,0 – 30,0mg/kg de peso associado ao cloridrato de xilazina (Anasedan®) a 2% na dose de 4mg/kg de peso. Procedeu-se a tricotomia da área cirúrgica e posterior incisão parapatelar medial seguida de luxação da patela. Com o joelho fletido expôs-se o côndilo femoral (Figura 1A) e com uma broca trefina fez-se uma lesão de 2.0mm de diâmetro por 4.0mm profundidade em área de carga de ambos os joelhos (Figura 1B). As lesões estenderam-se da cartilagem articular até o osso subcondral. O defeito foi lavado com solução salina estéril (NaCl 0.9%) e preenchido com os moldes já citados (Figura 2).

Procedeu-se a sutura das feridas operatórias e os animais receberam 0,1ml/kg de peso de antibiótico via subcutânea por cinco dias e 0,2mg/Kg de antiinflamatório via subcutânea por dois dias.

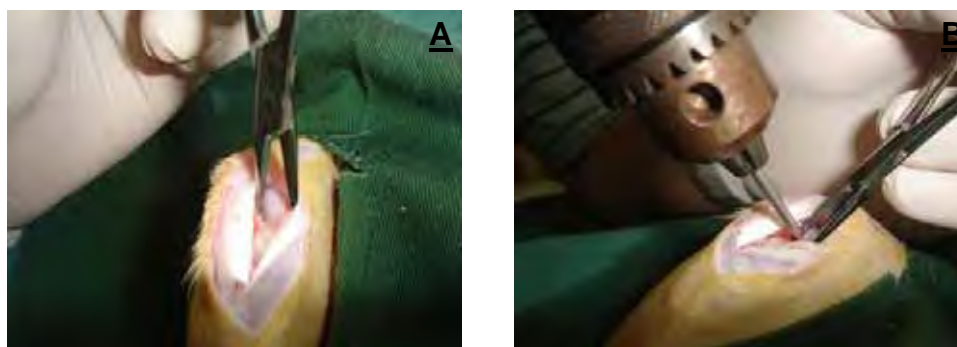


Figura 1 – Fotografias demonstrando os passos do procedimento cirúrgico. Em A exposição do côndilo femoral e B produção da lesão com a broca trefina.



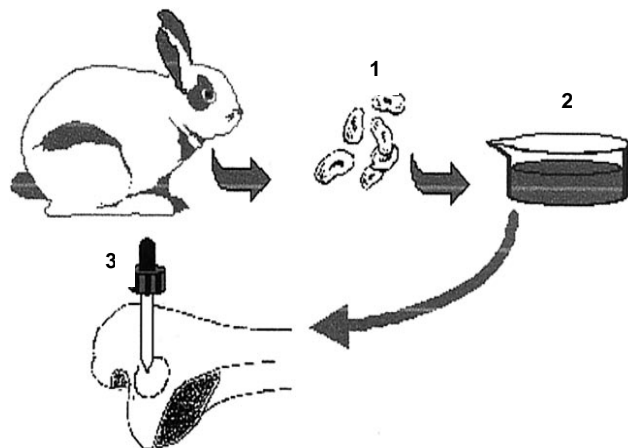


Figura 2 - Esquema do procedimento de coleta da cartilagem e liberação dos condrócitos (1), cultura dos condrócitos (2) nos suportes já mencionados e posterior implante na lesão osteocondral (3). Fonte: Fragonas e colaboradores (16) - modificado por Bittencourt 2008.

### **Análises macroscópicas e microscópicas da articulação do joelho após implante alogênico de condrócitos**

Para efetuar as análises macro e microscópicas dos reparos obtidos na articulação do joelho houve a necessidade da realização da eutanásia para remoção completa de ambos os joelhos. A eutanásia dos animais foi realizada nos períodos 30, 60 e 90 dias de evolução, administrando uma dose anestésica excessiva de pentobarbital sódico. Após as análises macroscópicas o material foi enviado para estudo histológico no Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP.

### **Crítérios de Avaliação**

Considerou-se especificamente para o estudo proposto a análise de dois critérios de avaliação: macroscópica (aparência do tecido de reparação) e microscópica (histológica).

## **Avaliação Microscópica**

Após a eutanásia a porção distal do fêmur foi removida, fixada em formalina 10%, descalcificada em solução de ácido acético 20% para posterior realização do emblocamento em resina metacrilato (Historesin<sup>®</sup> - Leica) e efetuação das secções histológicas (7µm de espessura). As secções histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina.

A análise histológica foi realizada pelo pesquisador através dos seguintes parâmetros, relacionados à natureza do tecido de reparação: presença de tecido fibroso; tecido mesenquimal e de tecido cartilaginoso hialino.

O critério de classificação da presença de tecido fibroso baseou-se na existência de células alongadas com ausência de lacunas e matriz fibrosa. Para o tecido mesenquimal, células com morfologia alongada ou estrelada e ausência de matriz fibrosa. A presença de tecido cartilaginoso hialino foi determinada mediante a ocorrência de células com morfologia arredondada organizadas em lacunas bem definidas e ausência de aspecto fibroso na matriz extracelular. A quantificação foi subjetiva.

Para registrar as avaliações microscópicas utilizou-se o analisador de imagens Leica Qwin Colour<sup>®</sup> (RGB) acoplado ao microscópio Leica<sup>®</sup> DM 2500.

## **Metodologia Estatística**

As observações macroscópicas basearam-se em: 1- preenchimento total plano, 2 - quase total, 3 – parcial (depressão), 4 – parcial aspecto avermelhado e 5 – erosão (osso subcondral).

Técnica da análise de variância não-paramétrica para o modelo com três fatores complementada com o teste de comparações múltiplas entre pares de níveis de um dos fatores fixados os outros (<sup>27</sup>).

Todas as comparações foram realizadas no nível de 5% de significância.

As observações microscópicas quantitativas basearam-se em: presença ou ausência em cada animal de tecido fibroso, tecido mesenquimal e tecido cartilaginoso.

## Resultados

### Aspectos macroscópicos

Tabela 1. Mediana e valores mínimo e máximo do preenchimento da lesão (“score total de preenchimento”) segundo grupo, tipo de gel e momento de avaliação

Grupo	Gel	Momento de Avaliação		
		30	60	90
T	Alginato	2,5 (2,0 - 4,0) <b>a</b> A $\alpha$	2,0 (1,0 - 5,0) <b>a</b> A $\alpha$	2,0 (1,0 - 5,0) <b>a</b> A $\alpha$
	Plaqueta	2,5 (2,0 - 4,0) <b>a</b> A $\alpha$	3,0 (1,0 - 4,0) <b>a</b> A $\alpha$	1,0 (1,0 - 3,0) <b>a</b> A $\alpha$
C	Alginato	3,5 (2,0 - 4,0) <b>b</b> A $\beta$	4,0 (2,0 - 5,0) <b>a</b> A $\alpha$	1,0 (1,0 - 5,0) <b>a</b> A $\alpha$
	Plaqueta	2,0 (1,0 - 3,0) <b>a</b> A $\alpha$	3,5 (1,0 - 4,0) <b>a</b> A $\alpha$	2,0 (1,0 - 5,0) <b>a</b> A $\alpha$

<sup>(1)</sup> duas medianas seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre si ( $P>0,05$ ) quanto aos tipos de gel fixados o grupo e o momento de avaliação

<sup>(2)</sup> duas medianas seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem entre si ( $P>0,05$ ) quanto aos grupos de estudo fixados o tipo de gel e o momento de avaliação

<sup>(3)</sup> duas medianas seguidas de uma mesma letra grega não diferem entre si ( $P>0,05$ ) quanto aos momentos de avaliação fixados o grupo de estudo e o tipo de gel

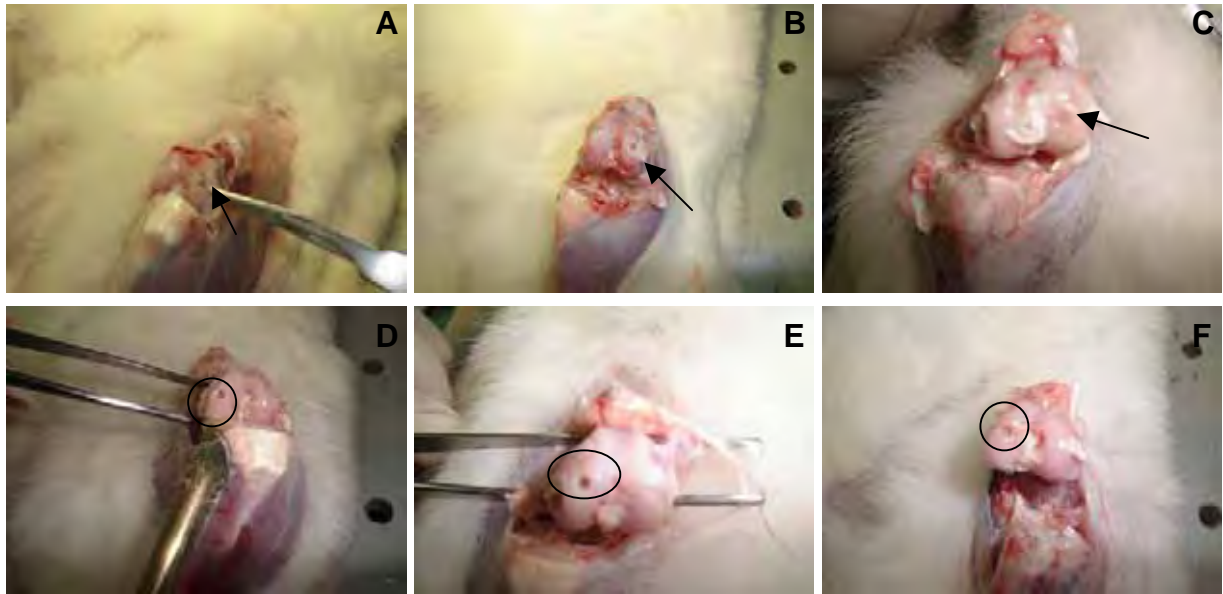


Figura 3 – Aspectos macroscópicos dos joelhos após eutanásia dos animais nos períodos de 30 (A e D), 60 (B e E) e 90 (C e F) dias. Grupo A, B e C tratado com hidrogel de alginato/condrócitos e D, E e F grupo controle contendo hidrogel de alginato sem condrócitos. A e B defeitos não preenchidos (setas) e C defeito totalmente preenchido (seta). D, E e F defeitos não preenchidos (círculos).

O típico aspecto macroscópico encontrado nos defeitos preenchidos com hidrogel de alginato/condrócitos e somente hidrogel de alginato pode ser visto na Figura 3. Como observado, os grupos tratados com hidrogel de alginato (3A e 3B) nos períodos de 30 e 60 dias apresentaram casos de lesão em evidência com aspecto avermelhado, e no momento de 90 dias, casos com um preenchimento total da lesão com alterações mínimas na superfície (Figura 3C). No entanto não apresentou aspecto hialino semelhante a cartilagem articular nativa. Conforme demonstrado na figura 3, no grupo controle (3D, 3E) houve casos de não preenchimento da lesão e casos de preenchimento parcial (3F).

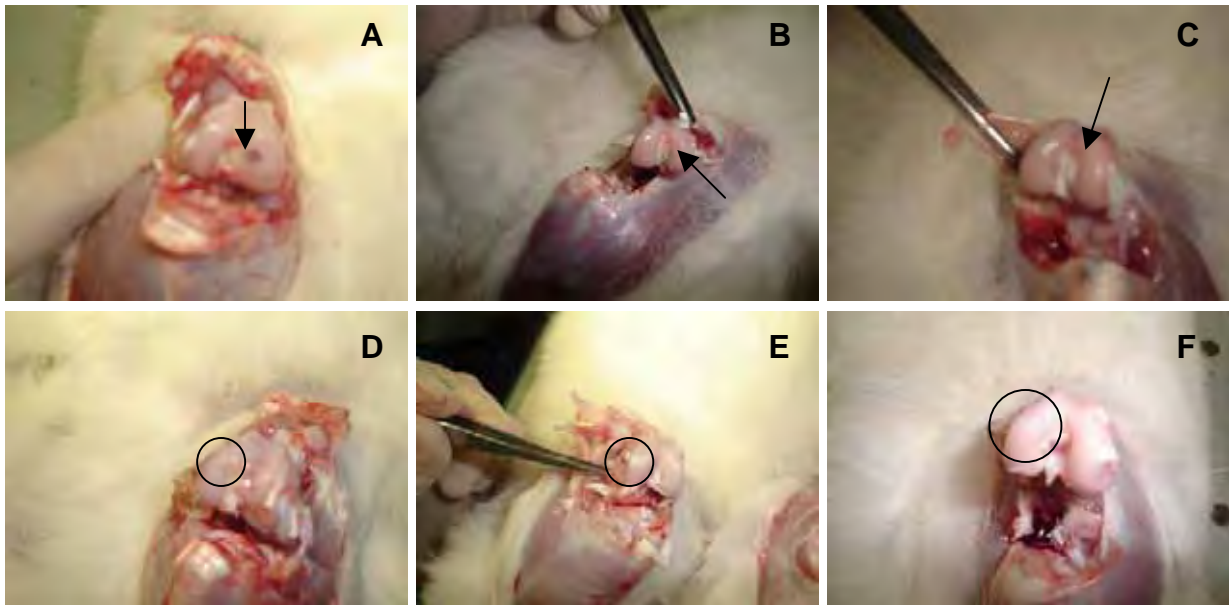


Figura 4 – Aspectos macroscópicos dos joelhos após eutanásia dos animais nos períodos de 30 (A e D), 60 (B e E) e 90 (C e F) dias. Grupo A, B e C tratado com gel de plaquetas/condrócitos e D, E e F grupo controle contendo gel de plaquetas sem condrócitos. Figura A defeito não preenchido com aspecto avermelhado, B defeito quase totalmente preenchido e C defeito totalmente preenchido com superfície lisa (setas). Na figura D defeito não preenchido, E defeito parcialmente preenchido e F defeito preenchido com alterações mínimas na superfície (círculos).

Na figura 4 estão representados os aspectos macroscópicos dos joelhos preenchidos com gel de plaquetas/condrócitos e gel de plaquetas sem condrócitos. Notou-se que o processo de reparação na área da lesão no grupo tratado com gel de plaquetas/condrócitos no período de 30 dias apresentou o defeito ainda em evidência com aspecto avermelhado (4A), em 60 dias um preenchimento quase total (4B) e 90 dias preenchimento total da lesão (4C), contendo um tecido com aspecto hialino, liso, brilhante, firme, em continuidade com a cartilagem adjacente. No grupo controle houve uma resposta macroscópica semelhante, onde no período de 30 dias não houve preenchimento da lesão, mas no período de 60 dias notou-se o preenchimento parcial do defeito e 90 dias defeito preenchido com alterações mínimas na superfície.



## Aspectos Microscópicos

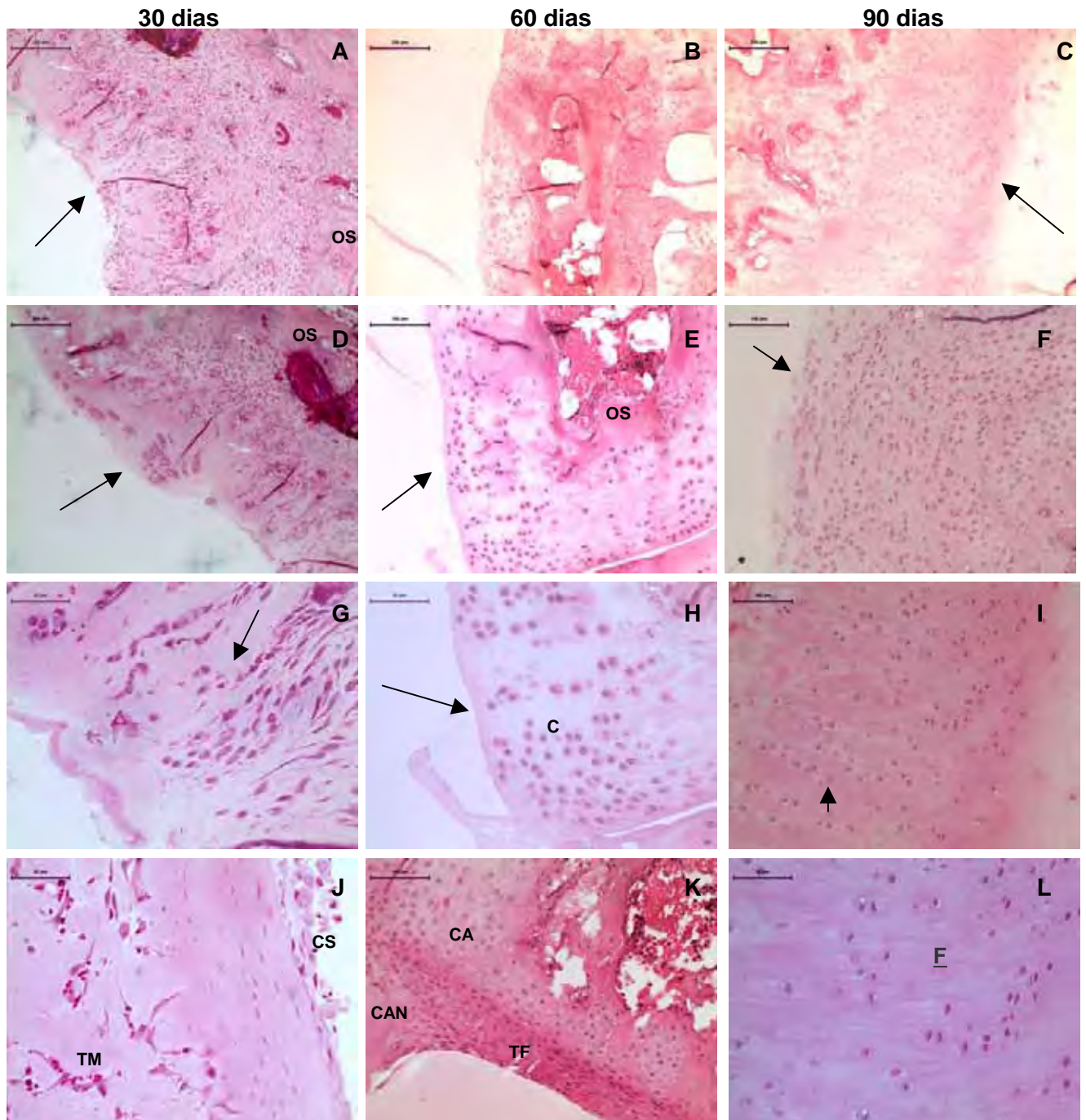


Figura 5 – Secções histológicas demonstrando o centro do tecido de reparação dos defeitos osteocondrais preenchidos com gel de plaquetas/condrócitos nos três períodos após eutanásia. Todas secções foram coradas com hematoxilina e eosina, A, B e C aumento de 100x, D, E, F, I, e K (aumento 200x), G, H e J (aumento 500x). As figuras A e D demonstram a área de lesão e o processo de formação de cartilagem após 30 dias de implante na superfície articular e formação do osso subcondral (OS), G condrócitos se organizando em fileiras (setas), em J tecido mesenquimal (TM) e cartilagem em formação na superfície articular (seta) e células provenientes da sinóvia (CS). Nas figuras B, E e H (60 dias) observou-se a formação de cartilagem hialina na superfície articular (setas) e condrócitos (C) se organizando em fileiras similarmente a cartilagem articular nativa com formação do osso subcondral (OS). Na figura K, nota-se o não preenchimento da lesão (seta), formação de tecido fibroso na superfície articular (TF) e cartilagem (CA) situada abaixo do tecido fibroso. Na lateral da lesão nota-se a presença de cartilagem articular nativa (CAN). No grupo de 90 dias observou-se a reparação da superfície articular contendo tecido cartilaginoso similar à cartilagem nativa (C e F - setas), condrócitos organizados em fileiras (setas) e fibras de colágenos (FC) perpendiculares à superfície semelhante à cartilagem nativa (I e L).

No grupo de animais tratados com gel de plaquetas/condrócitos observou-se que no período de 30 dias havia inflamação, em determinadas áreas, intensa vascularização e gel de plaquetas em processo de reabsorção. A figura 5 demonstra as secções histológicas dos defeitos preenchidos com gel de plaquetas/condrócitos nos períodos 30, 60 e 90 dias. Notou-se a formação de cartilagem no local da lesão em alguns animais no período de 30 dias e formação do osso subcondral (Figuras 5A e 5D), padrão de produção de cartilagem contendo condrócitos organizando-se em fileiras (5G), tecido mesenquimal em provável diferenciação e cartilagem superficial com condrócitos organizados paralelamente a superfície articular. Notou-se também, em algumas situações, que as células da membrana sinovial agregaram-se à superfície articular durante o processo de reparação (5J). No grupo de 60 dias torna-se evidente a formação de tecido cartilaginoso na superfície articular e indução da formação do osso subcondral (5B e 5E), cartilagem com superfície lisa, condrócitos arredondados e organizados similarmente a cartilagem nativa (5H). Na figura 5K, notou-se o não preenchimento da lesão, presença de tecido fibroso e cartilagem situada abaixo deste. Histologicamente o grupo de 90 dias demonstrou um padrão típico de produção de cartilagem articular, contendo tecido cartilaginoso similar à cartilagem nativa (5C e 5F), condrócitos organizados em fileiras e fibras de colágenos perpendiculares à superfície semelhante à cartilagem nativa (5I e 5L).

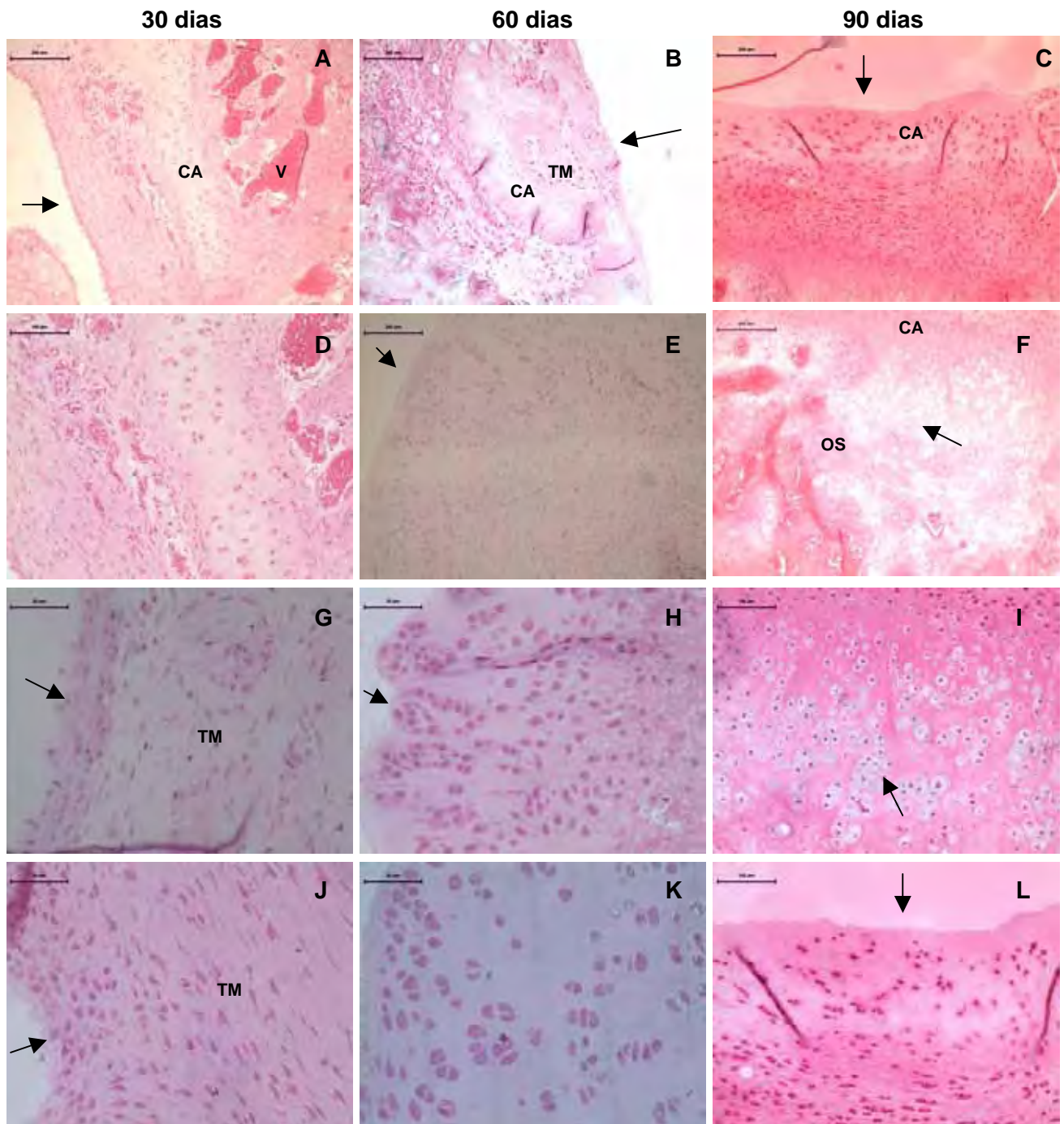


Figura 5 – Secções histológicas demonstrando o centro do tecido de reparação dos defeitos osteocondrais preenchidos com gel de plaquetas nos três períodos após eutanásia. Todas secções foram coradas com hematoxilina e eosina, A, B, C, F e aumento de 100x, 5 e I (aumento 200x), G, H e J (aumento 500x). No momento de 30 dias, em A e D notou-se a presença de cartilagem no centro (CA) e cartilagem em formação na superfície articular (seta). Intensa vascularização na região subcondral (V). Em G e J presença de tecido mesenquimal (TM) e células da membrana sinovial na superfície articular (setas). Em B (60 dias) observou-se uma mistura de tecido mesenquimal (TM) na superfície e cartilagem (CA) no local da lesão, em E, tecido cartilaginoso semelhante à cartilagem articular nativa (seta) em K um detalhe melhor da organização do condrócitos no tecido neoformado (seta). Em H, condrócitos em organização (seta). No grupo de 90 dias, nota-se o completo reparo da superfície articular contendo cartilagem similar à nativa (setas) (C e L). Em F e I, detalhe da região inferior a cartilagem articular, contendo intensa quantidade de condrócitos (setas), entre o osso subcondral (OS) e cartilagem articular (CA).



Os implantes realizados somente com gel de plaquetas sem condrócitos, demonstraram em alguns animais no período de 30 dias fenômenos de inflamação. A figura 5 representa as várias fases de reparação dos defeitos osteocondrais nos períodos de 30, 60 e 90 dias. Após 30 dias de implante observou-se a presença de cartilagem no centro e em formação na superfície articular além da intensa vascularização na região subcondral (5A e 5D). Notou-se a presença de tecido mesenquimal e novamente células da membrana sinovial na superfície articular (5G e 5J). No grupo de 60 dias observou-se uma mistura de tecido mesenquimal na superfície e tecido cartilaginoso, no local da lesão (5B), tecido cartilaginoso semelhante a cartilagem articular nativa e uma visualização mais ampla da organização do condrócitos no tecido neoformado (5E e 5K). Em 5H, condrócitos em organização. No grupo de 90 dias, observou-se o completo reparo da superfície articular contendo cartilagem similar à nativa (5C e 5L). Em 5F e 5I, detalhe da região abaixo da cartilagem articular, contendo intensa quantidade de condrócitos, entre o osso subcondral e cartilagem articular. Provavelmente tais células passaram pelo processo de ossificação endocondral. As secções com presença de tecido fibroso não foram demonstradas, no entanto é conveniente mencionar a presença de tal tecido em algumas amostras.

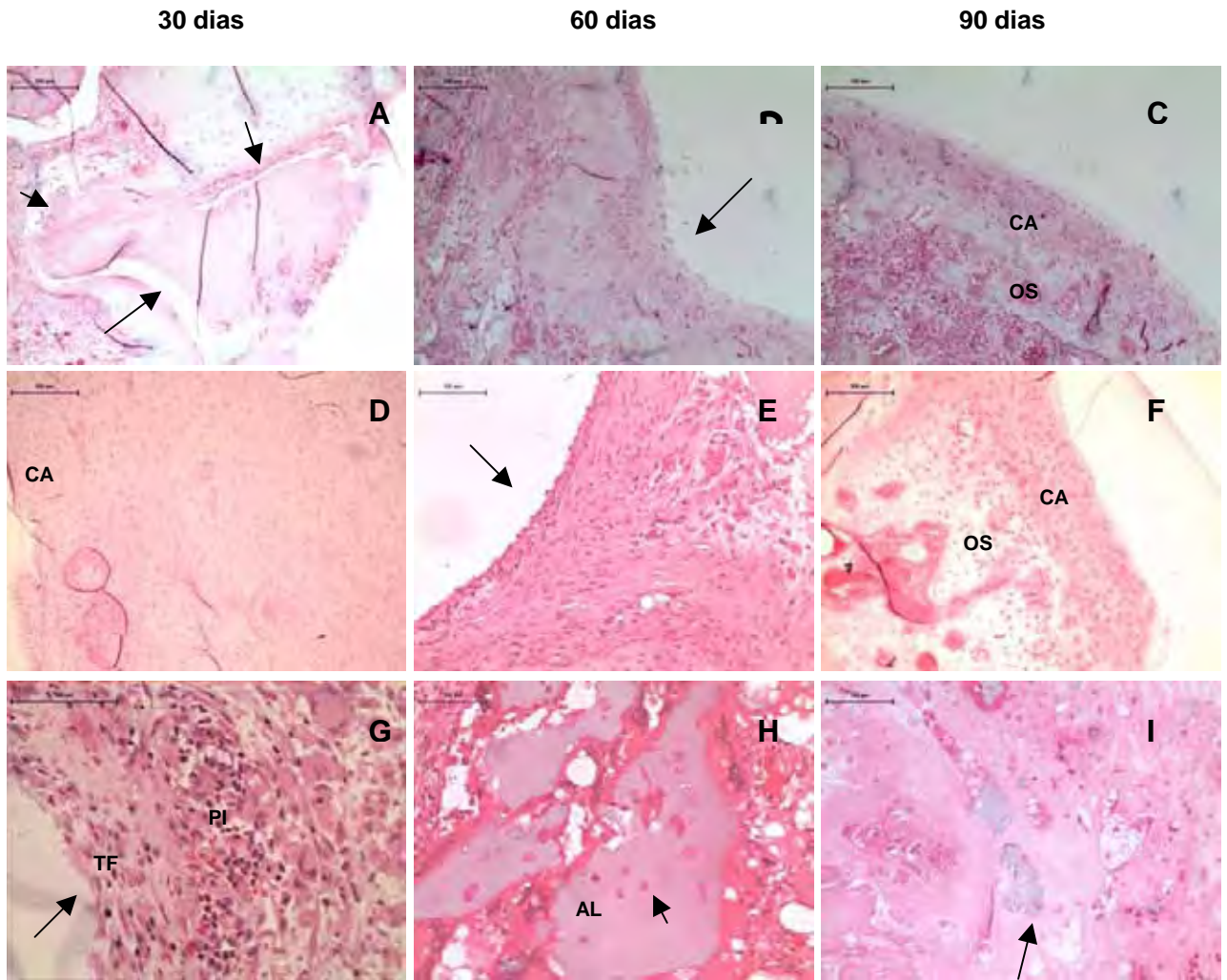


Figura 6 – Secções histológicas demonstrando o centro do tecido de reparação dos defeitos osteocondrais preenchidos com hidrogel de alginato/condrócitos nos três períodos após eutanásia. Todas secções foram coradas com hematoxilina e eosina, A, B, D e E aumento de 100x, C, E, G, H e I aumento 200x. Em A observamos uma visão total da área da lesão com cartilagem em processo de formação (setas), D formação de cartilagem na superfície (CA) e G tecido com característica fibroso (TF) na superfície (seta) e processo inflamatório (PI) evidente. Em B, tecido cartilaginoso em formação (seta), E tecido fibroso (seta) e em H demonstração da região interna do osso subcondral visualizando o alginato em processo de reabsorção (AL) e condrócitos encapsulados no hidrogel (seta). Em C e F, observa-se o tecido cartilaginoso (CA) neoformado, de superfície lisa, ocupando totalmente a área da lesão e osso subcondral praticamente formado (OS). Em I detalhe da região subcondral, visualização do processo de reabsorção do hidrogel de alginato (seta).

A figura 6 representa os momentos de avaliações histológicas em 30, 60 e 90 dias pós-implante com hidrogel de alginato/condrócitos. Em 30 dias pós-implante apresenta-se uma visão total da área da lesão com cartilagem em processo de formação da região basal ao ápice da lesão, demonstrando a integração parcial do tecido com a cartilagem superficial (6A). Em 6D há a formação de cartilagem na superfície, nota-se que ainda não há formação do osso subcondral e 6G tecido com característica fibroso localizado na superfície e evidência de processo inflamatório. No período de 60 dias pós-implante nota-se a presença de tecido cartilaginoso em formação, praticamente ocupando toda área da lesão (6B) e tecido fibroso (6E). A figura 6H representa a região interna do osso subcondral visualizando o alginato em processo de reabsorção e condrócitos ainda encapsulados no hidrogel. Em 90 dias, observou-se o tecido cartilaginoso neoformado de superfície lisa, ocupando totalmente a área da lesão e osso subondral praticamente regenerado (6C e 6F). A figura 6I demonstra o detalhe da região subcondral, delimitando especificamente a área de reabsorção do hidrogel de alginato, indicando que em 90 dias o hidrogel ainda não foi totalmente reabsorvido pelo organismo.

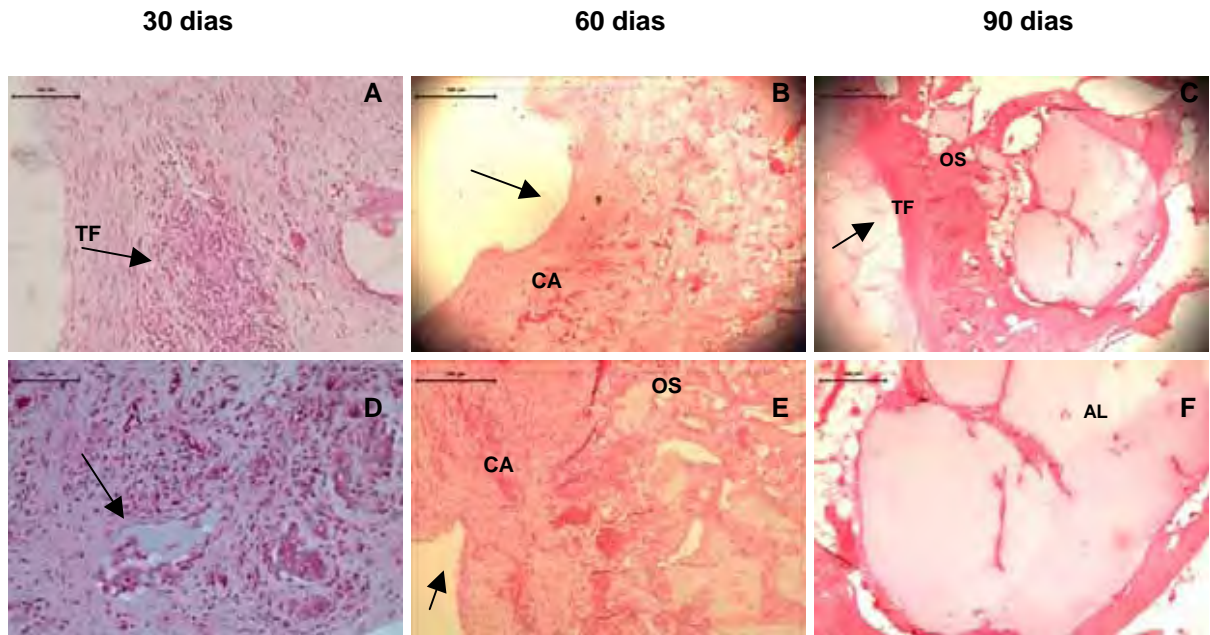
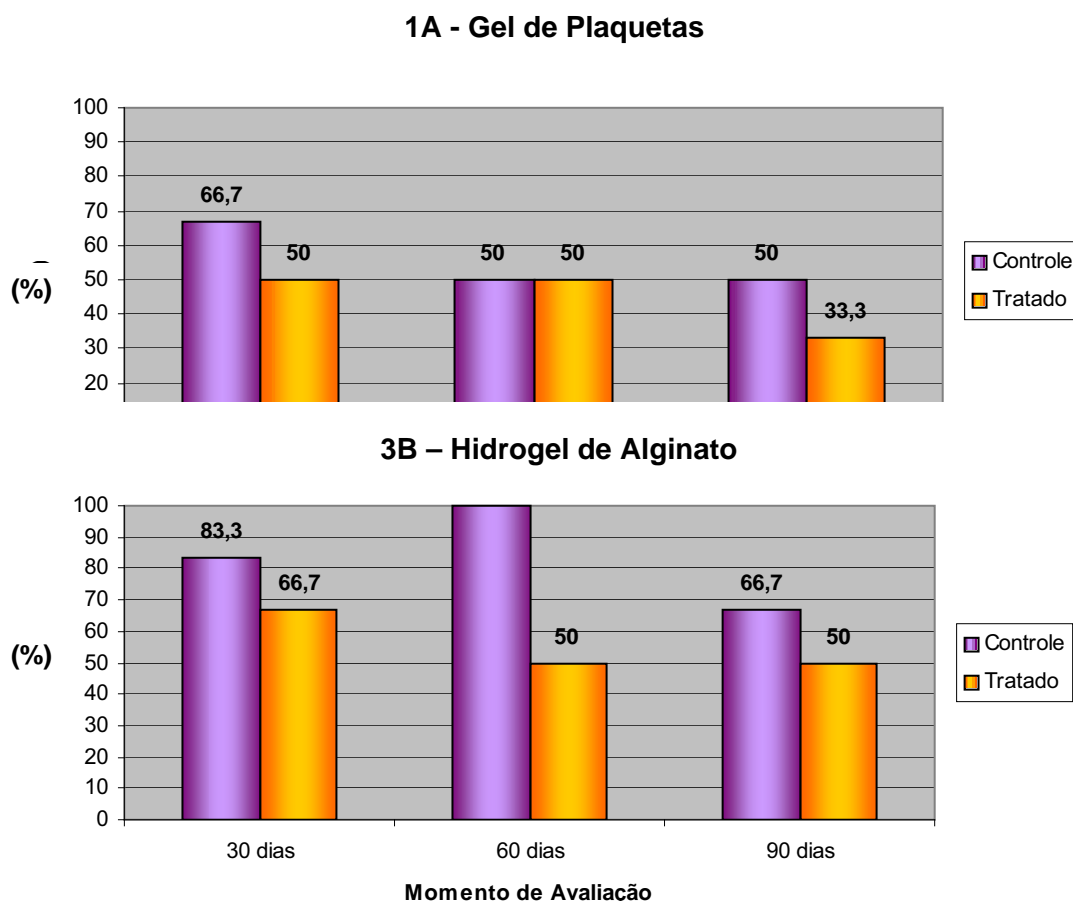


Figura 7 – Secções histológicas demonstrando o centro do tecido de reparação dos defeitos osteocondrais preenchidos com hidrogel de alginato sem células nos três períodos após eutanásia. Todas secções foram coradas com hematoxilina e eosina, B e C aumento de 50x, E e F aumento de 100x, A e D aumento 200x. Em A (30 dias) demonstração do processo inflamatório (seta) e presença de tecido fibroso (TF) na superfície articular. Em D, hidrogel de alginato em processo de reabsorção. Em B (60dias) demonstra a área da lesão parcialmente preenchida na superfície articular (seta), cartilagem (CA) adjacente à lesão e formação do osso subcondral (OS). Em E área da superfície articular contendo tecido fibroso (seta). Em C (90 dias) apresenta a área de reparo da lesão (seta) contendo tecido fibroso (TF), formação do osso subcondral (OS) e hidrogel de alginato não reabsorvido (AL). Em F, detalhe do hidrogel de alginato localizado abaixo do tecido de reparo, não reabsorvido (AL).

A figura 7 demonstra as várias fases de reparo nos períodos de 30, 60 e 90 dias de implante realizado somente com hidrogel de alginato. Em 30 dias pós-implante como demonstrado na figura 7A, observou-se a formação de tecido fibroso, processo inflamatório acentuado e hidrogel de alginato ainda em processo de reabsorção (7D). Em 60 dias a área da lesão apresentou-se parcialmente preenchida com tecido fibroso e há formação do osso subcondral (7D e 7E). No grupo de 90 dias a área de reparação da lesão apresentou especificamente tecido fibroso, havia formação do osso subcondral e em evidência o hidrogel de alginato localizado abaixo do tecido de reparo, não reabsorvido (7C e 7F).

**Porcentagem da produção de tecido fibroso, tecido mesenquimal e tecido cartilaginoso de acordo com os momentos de avaliação 30, 60 e 90 dias pós-eutanásia.**

Gráfico 1 - Distribuição da produção de tecido fibroso segundo grupo, tipo de gel e momento de avaliação



O gráfico 1A representa a porcentagem de tecido fibroso nas lesões osteocondrais preenchidas com gel de plaquetas onde no grupo tratado foi utilizado (gel de plaquetas/condrócitos) e grupo controle (somente gel de plaquetas). Tanto no grupo tratado e controle, observou-se não haver diferença quanto a produção de tecido fibroso nos períodos de 30 e 60 dias (50%) sendo que no grupo tratado a produção de tecido fibroso declinou para 33,3% e no grupo controle permaneceu a mesma porcentagem (50%) no período de 90 dias pós-implante.

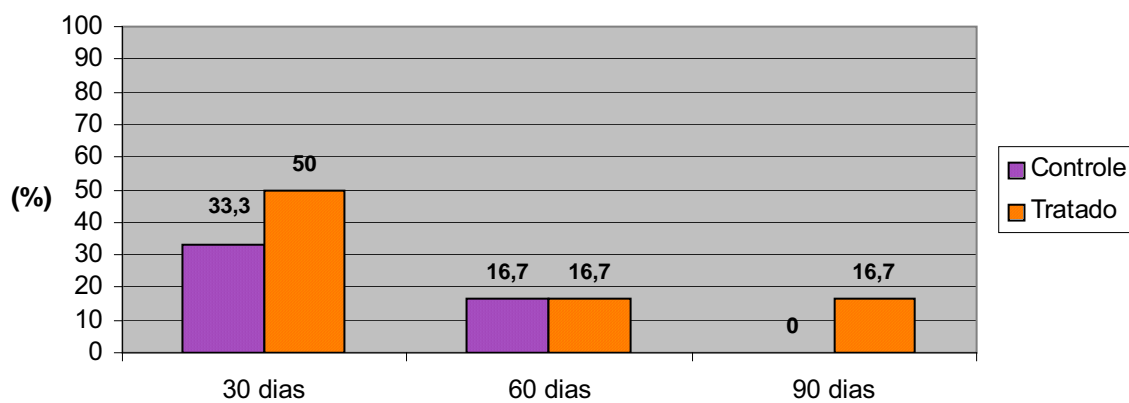
O gráfico 1B ilustra a porcentagem de tecido fibroso nas lesões osteocondrais preenchidas com hidrogel de alginato onde no grupo tratado foi utilizado (hidrogel de alginato/condrócitos) e grupo controle (somente hidrogel de alginato). O grupo

controle apresentou maior índice de produção de tecido fibroso em todos momentos de avaliação (30 dias= 83,3%; 60 dias= 100%; e 90 dias= 66,7%) quando comparado com o grupo controle (30 dias= 66,7%; 60 dias= 50% e 90 dias= 50%). Não houve diferença no grupo tratado quanto à produção de fibrose nos grupos de 60 e 90 dias.

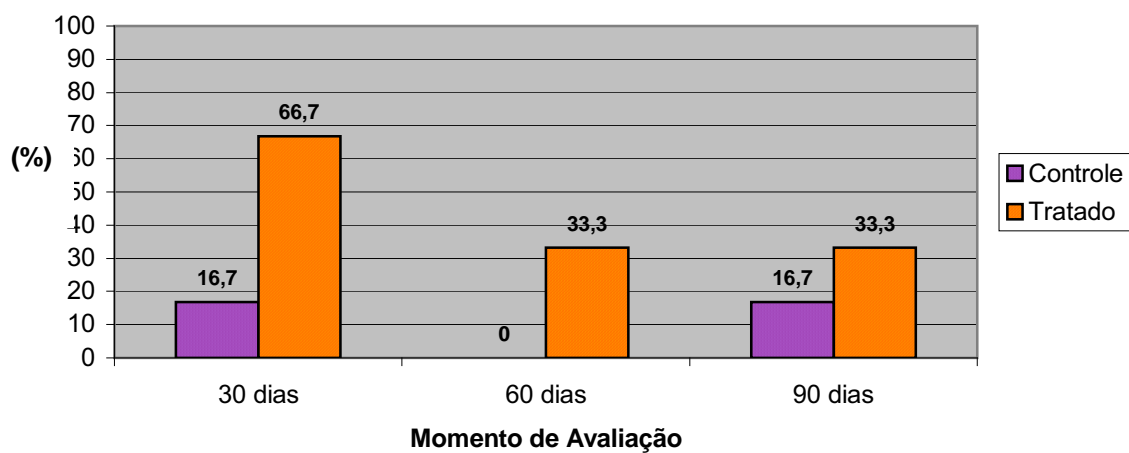
Quando comparado os defeitos osteocondrais preenchidos com gel de plaquetas/condrócitos e hidrogel de alginato/condrócitos, a produção de tecido fibroso foi inferior no grupo tratado com gel de plaquetas/condrócitos (33,3%) versus 50% do grupo tratado com hidrogel de alginato/condrócitos no momento de 90 dias. O mesmo aconteceu com os grupos controles de ambos géis, (50%) gel de plaquetas e 66,7 (hidrogel de alginato) no período de 90 dias.

Gráfico 2 - Distribuição da produção de tecido mesenquimal segundo grupo, tipo de gel e momento de avaliação

### 2A - Gel de Plaquetas



### 2B - Hidrogel de Alginato



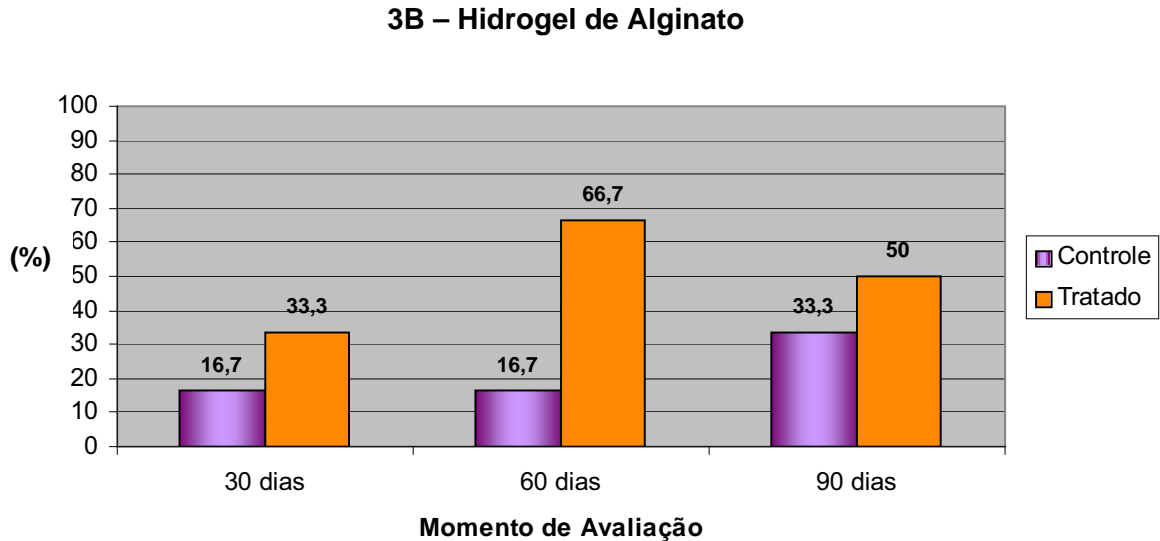
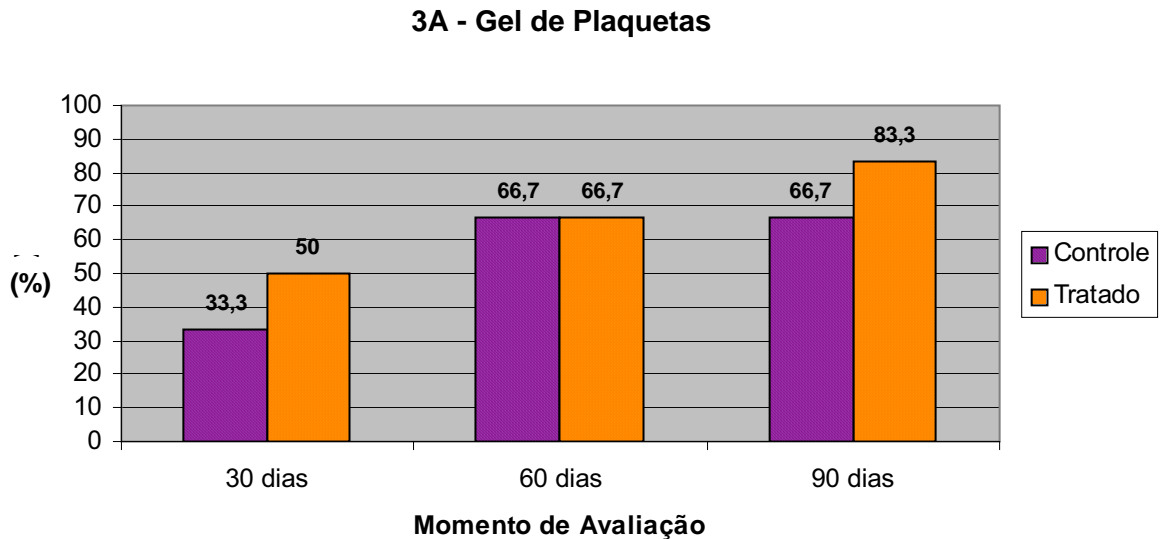
O gráfico 2A ilustra a porcentagem de tecido mesenquimal presente nas lesões osteocondrais preenchidas com gel de plaquetas onde no grupo tratado foi utilizado (gel de plaquetas/condrócitos) e grupo controle (somente gel de plaquetas). Notou-se que no grupo tratado apresentou uma maior porcentagem de produção de tecido mesenquimal no momento de 30 dias, com uma porcentagem de 50% (fig. 5J) não havendo mudança nos períodos de 60 e 90 dias (16,7%). No grupo controle houve uma diminuição gradativa da porcentagem nos períodos de 30 (33,3%), 60% (16,7) e 90 dias (zero).

Nas lesões osteocondrais preenchidas com hidrogel de alginato onde no grupo tratado foi utilizado (hidrogel de alginato/condrócitos) e grupo controle (somente hidrogel de alginato), a porcentagem de produção de tecido mesenquimal representada no gráfico 2B, demonstrou que o grupo tratado apresentou maior produção de tecido mesenquimal no período de 30 dias (66,7%) e os valores mantiveram-se similares nos momentos de 60 e 90 dias (33,3%). Quanto ao grupo controle, houve produção em 30 e 90 dias pós-implante (16,7%) não havendo no período de 60 dias.

Quando comparado os defeitos osteocondrais preenchidos com gel de plaquetas/condrócitos e hidrogel de alginato/condrócitos, a produção de tecido mesenquimal foi inferior no grupo tratado com gel de plaquetas/condrócitos (16,7%) versus 33,3% do grupo tratado com hidrogel de alginato/condrócitos, no período de 90 dias. No grupo controle onde utilizou-se gel de plaquetas houve a produção de de tecido mesenquimal em 16,7% dos casos versus 33,3% do grupo tratado com hidrogel de alginato/condrócitos após 90 dias de implante. Isto sugere que a diminuição de tecido mesenquimal no período de 90 dias no grupo de gel de plaquetas pode ser resultante da quase completa diferenciação deste em cartilagem e no grupo tratado com hidrogel de alginato/condrócitos o tecido mesenquimal ainda se encontrava em processo de diferenciação.



Gráfico 3 - Distribuição da produção de tecido cartilaginoso segundo grupo, tipo de gel e momento de avaliação



O gráfico 3A ilustra a porcentagem de tecido cartilaginoso presente nas lesões osteocondrais preenchidas com gel de plaquetas onde no grupo tratado foi utilizado (gel de plaquetas/condrócitos) e grupo controle (somente gel de plaquetas). Observou-se no grupo tratado uma tendência no aumento da produção de tecido cartilaginoso na superfície articular nos momentos de avaliação 30 dias (50%), 60

dias (66,7%) e 90 dias (83,3%). Em 90 dias pós-implante notou-se que na maior parte dos casos havia a cartilagem neoformada, regenerando toda a área da lesão e em alguns casos cartilagem ainda em formação. No grupo controle, observou-se um aumento da produção de cartilagem nos momentos entre 30 (50%) e 60 (66,7%) dias permanecendo constante no período entre 60 e 90 dias (66,7%).

O gráfico 3B ilustra a porcentagem de tecido cartilaginoso nas lesões osteocondrais preenchidas com hidrogel de alginato onde no grupo tratado foi utilizado (hidrogel de alginato/condrócitos) e grupo controle (somente hidrogel de alginato). No grupo tratado houve a produção de tecido cartilaginoso no momento de 30 dias foi de 33,3%, 60 dias 66,7% e 90 dias 50%, apresentando uma taxa maior de produção em 60 dias em relação ao momento de 90 dias. Nos últimos períodos, 60 e 90 dias, havia cartilagem neoformada e em alguns casos cartilagem ainda em formação. No período de 30 dias a maior parte dos casos era de cartilagem em formação. No grupo controle houve a presença de cartilagem em formação nos períodos de 30 e 60 dias (16,7%) e 90 dias um aumento inespecífico (33,3%), onde a maioria todos os casos apresentaram cartilagem em formação.

Ao comparar os grupos tratados gel de plaquetas/condrócitos e hidrogel de alginato/condrócitos quanto à produção de tecido cartilaginoso, o primeiro demonstrou-se principalmente no momento de 90 dias ser mais eficiente na produção de cartilagem (83,3%) em relação ao hidrogel de alginato/condrócitos (50%).

## **Discussão**

A limitação da regeneração da cartilagem articular permitiu o avanço em pesquisas dentro da engenharia tecidual e possivelmente a aplicação de diferentes procedimentos visando a recuperação do tecido cartilaginoso lesado. A nova era da engenharia tecidual dentro da ortopedia tem contribuído muito nos últimos anos na tentativa de recuperar danos de diversas origens causados nas articulações (doenças, fraturas que acometem a superfície articular etc...). Como já mencionado, existem inúmeros suportes, “scaffolds”, que podem ser utilizados para produção de cartilagem *in vitro* e sua aplicação *in vivo*. Neste trabalho escolhemos o uso do hidrogel de alginato por ser um gel que *in vitro* apresentou resultados satisfatórios que implicaram em proliferação, produção de matriz e manutenção da

morfologia dos condrócitos; e gel de plaquetas que além de excelentes resultados *in vitro*, constitui uma fonte de fácil obtenção e rica em fatores de crescimento específicos a induzir a formação de cartilagem (TGF $\beta$ , FGF-2 e PDGF).

Nós realizamos implantes alogênicos, devido à dificuldade de obtenção de condrócitos coletados da articulação e de sangue dos mesmos animais. No entanto, em todas as análises microscópicas, observamos poucos casos que apresentaram fenômenos de provável rejeição. Os focos de infecção foram nulos. Os animais após dois dias do procedimento cirúrgico andavam normalmente independente do tipo de gel implantado.

Macroscopicamente obtivemos resultados mais satisfatórios, ou seja, biologicamente aceitáveis quando utilizamos gel de plaquetas/condrócitos e gel de plaquetas sem células quando comparados ao hidrogel de alginato/condrócitos e hidrogel de alginato sem células. Segundo o trabalho de Ribeiro e colaboradores (<sup>22</sup>) o termo biologicamente aceitável, é utilizado para definir reparos, que à observação macroscópica, se apresentam como tecido neoformado semelhante à cartilagem original lisa, brilhante, firme em continuidade com a cartilagem adjacente. Trata-se de um critério macroscópico de avaliação, não se podendo estabelecer uma correlação exata com as características histológicas, bioquímicas ou biomecânicas do reparo. No entanto a maioria dos casos na qual se utilizou gel de plaquetas/condrócitos e gel de plaquetas sem células apresentou características macroscópicas e histológicas comparáveis ao biologicamente aceitável, quanto ao hidrogel de alginato/condrócitos alguns defeitos não estavam preenchidos totalmente, mas histologicamente apresentavam cartilagem em formação e no hidrogel de alginato sem células, poucos foram os casos que apresentaram cartilagem, havendo mais tecido fibroso.

A presença dos condrócitos no gel de plaquetas permitiu um aumento no índice de produção de tecido cartilaginoso, como observado no grupo de 90 dias. No entanto, gel de plaquetas sem células também influenciou o processo de produção de cartilagem, como observado nos vários momentos de avaliação pós-implante, os quais foram utilizados tal gel. Provavelmente isso se deva a alta taxa de FCs que estimulam a proliferação do condrócitos e indução da produção da matriz cartilaginosa (<sup>17</sup>). Notou-se também que o hidrogel de alginato/condrócitos também foi capaz de estimular a produção de cartilagem nos três momentos de avaliação e

hidrogel sem células não apresentou o mesmo perfil, fato esse comparável aos estudos de Breinan e colaboradores (25).

Quanto à presença de tecido fibroso, foi possível detectá-lo em vários casos, sendo mais freqüentes no grupo tratado com gel de plaquetas/condrócitos em 30 e 60 dias e diminuindo no período de 90 dias de evolução. Nos defeitos preenchidos com gel de plaquetas sem células, observou-se uma alta taxa de produção de tecido fibroso no período de 30 dias, diminuindo e mantendo-se semelhante em 60 e 90 dias de evolução. No grupo tratado com hidrogel de alginato/condrócitos a presença de fibrose foi maior no período de 30 dias, permanecendo constante em 60 e 90 dias de evolução. No grupo controle contendo hidrogel de alginato sem células, o pico maior de fibrose foi no período de 60 dias, onde na maioria dos defeitos foi detectado tecido fibroso.

No estudo de Lee e colaboradores (24), que realizaram implantes condrais na articulação de cães utilizando condrócitos cultivados em suporte de colágeno, após 15 semanas de implante, os pesquisadores obtiveram nos defeitos tratados com condrócitos cultivados em suporte de colágeno, 42% de cartilagem hialina, 52% de fibrocartilagem e 5% de tecido fibroso. Em vários casos havia a mistura de tecido cartilaginoso, fibrocartilagem e fibrose.

Dorotka e colaboradores (23) realizaram implantes na região condral da articulação de ovelhas usando células-tronco da medula óssea ou condrócitos autólogos cultivados em matriz de colágeno, demonstrando que após 16 semanas do implante, os defeitos preenchidos com a matriz de colágeno que continha condrócitos autólogos foi mais eficiente na produção de tecido semelhante à cartilagem hialina do que a matriz contendo células-tronco da medula óssea. Trabalhos prévios utilizando o mesmo suporte demonstraram uma degeneração da cartilagem neoformada após 12 meses de implante.

Fragonas e colaboradores (16) realizaram implantes osteocondrais usando condrócitos alogênicos cultivados em hidrogel de alginato ou somente hidrogel de alginato, avaliando-os até seis meses pós-implante. Os melhores resultados foram obtidos com 4 a 6 meses pós-implante, onde os animais que receberam hidrogel de alginato/condrócitos alogênicos apresentaram produção de tecido cartilaginoso e os defeitos preenchidos somente com hidrogel de alginato, houve a produção de tecido fibroso.

Pode-se dizer que a produção de tecido fibroso é considerada inconveniente, pois é caracterizado por um tecido vascularizado com matriz fibrosa, diferindo completamente da histologia da cartilagem articular, avascular, onde os condrócitos vivem em baixas tensões de oxigênio. Dificilmente o tecido fibroso irá metaplasiar em cartilagem hialina.

Quanto à presença de tecido mesenquimal, no grupo tratado com gel de plaquetas/condrócitos, houve maior produção de tecido mesenquimal no período de 30 dias, mantendo-se constante nos períodos 60 e 90 dias. No grupo controle tratado com gel plaquetas, percebeu-se uma diminuição gradativa do tecido mesenquimal, estando ausente no período de 90 dias de evolução. Provavelmente, o tecido mesenquimal presente no grupo tratado estaria diferenciando-se em cartilagem. No grupo tratado com hidrogel de alginato/ condrócitos, percebeu-se que a porcentagem de tecido mesenquimal foi maior ainda no período de 90 dias, quando comparado com o grupo tratado com gel de plaquetas.

É reconhecido que quando a lesão se estende até o osso subcondral muito bem vascularizado, todas as fases do processo de reparação: necrose, inflamação e reparação ocorrem naturalmente quando comparado a um defeito condral, por ser avascular, não apresenta a fase de inflamação, o que provavelmente inviabiliza o processo de reparação da cartilagem. Ainda nos defeitos osteocondrais, células indiferenciadas da medula óssea e endotélio vascular são transformadas em fibroblastos primitivos que com o aporte de capilares sangüíneos e coágulos de fibrina se transformam em tecido fibroblástico vascularizado de reparação <sup>(22)</sup>.

Nas lesões contendo gel de plaquetas o estímulo da produção de todo processo de reparação pode ter sido amplificada por mimetizar ainda mais a regeneração da cartilagem articular. Para a obtenção do gel de plaquetas utilizou-se uma concentração de 465.000/mm<sup>3</sup> plaquetas, sugerindo na presença de taxas elevadas de vários FCs <sup>(18)</sup>.

Quanto à absorção do gel de plaquetas, observou-se a presença deste no período de 30 dias e posteriormente não foi possível visualizar, onde provavelmente tal gel possa ter sido reabsorvido com maior facilidade que o hidrogel de alginato onde detectamos a sua presença nos momentos de 30, 60 e 90 dias. Paige e colaboradores <sup>(26)</sup> detectaram a persistência do hidrogel de alginato após 12 semanas de implante.

Fato interessante a escrever, na aplicação tanto do gel de plaquetas/condrócitos e somente gel de plaquetas ocorria à diminuição ou o cessamento do sangramento no momento do implante, fato que não ocorria quando se aplicava o hidrogel de alginato.

A quantificação dos fatores de crescimento será necessária para a adequação da utilização do gel de plaquetas em novos procedimentos experimentais.

Avaliações da ação do gel de plaquetas em implantes em lesões osteocondrais e condrais em um maior período de acompanhamento serão de suma importância para possivelmente validar o seu uso no tratamento clínico de lesões articulares humanas.

### **Conclusão**

Nas condições deste trabalho: o uso do gel de plaquetas com ou sem condrócitos demonstrou ser mais eficiente no reparo de lesões osteocondrais quando comparado ao hidrogel de alginato.

## Referências:

1. Lemos C, Filho JSA, AYMORÉ IL, BARBOSA CSP. Sistema ósteo-articular. In: Brasileiro Filho G, Bogliolo L. Bogliolo: patologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 873-927.
2. Felisbino SL, Carvalho HF, Condrócito. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB, Células: uma abordagem multidisciplinar. Barueri: Manole; 2005. p. 11-21.
3. Coimbra IB, Pastor EH, Greve JMA, Puccinelli MLC, Fuller R, Cavalcanti FS, et al. Consenso brasileiro para o tratamento da osteoartrite (artrose). Rev Bras Reumatol. 2002; 6: 371-74.
4. Bentley G, Minas T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. Br Med J. [serial on the internet]. 2001; [cited 2003 oct 28]. Available from: <http://www.bmj-pt.com>.
5. Wroble RR. Articular cartilage injury and autologous chondrocyte implantation. Phys Sports Med. [serial on the internet] 2000; 28. [cited 2003 jun]. Available from: <http://physsportsmed.com.issues>.
6. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl Med, 1994; 331: 889-95.
7. Carvalho ACC. Células-tronco: a medicina do futuro. Ciênc Hoje. 2001; 29: 27-31.
8. Shah MR, Kaplan KM, Meislin RJ, Bosco JA. Articular cartilage restoration of the knee. Bull NYU Hosp Joint Dis. 2007; 65: 51-60.
9. Carticel: autologous cultured chondrocytes. Genzyme Biosurgery. [homepage in the internet] [cited may 18]. Available from: <http://carticel.com/medprof/aboutcarticel/about-carticel.aspx>.
10. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, et al. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. Arthritis Res Ther. 2003; 5:60-72.
11. Kisiday J, Jin M, Kurtz B, Hung H, Semino C, Zhang S, et al. Self-assembling hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99: 9996-10001.
- 12 - Chang CH, Lin FH, Kuo TF, Liu HC. Cartilage tissue engineering. Biomed Eng Appl Basis Commun. 2005; 17:1-11.
- 13 - Freshney RI. Specialized cells. In: Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4 ed. New York: Wiley-Liss; 2000; v: 22, p. 367-70.

14. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci.* 1994; 107: 17-27.
15. Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Shastri P. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2004; 25: 887-94.
16. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials.* 2000; 21: 795-801.
17. Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJMA, et al. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *OsteoArthritis Cartil.* 2006; 14:1272-80.
18. Everts P, Knappe JTA, Weibrich G, Schönberger JPAM, Hoffman J, Overdijk EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006; 38:174-87.
19. Gimeno FL, Gatto S, Ferro J, Croxatto JO, Gallo JE. Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. *Thromb J.* 2006; 4:18.
20. Wu W, Chen F, Liu Y, Ma Q, Mao T. Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: experimental study in rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65:1951-57.
21. Araújo ICF, Deffune E. Tratamento de feridas crônicas de membros inferiores com biocurativo [Dissertação] Botucatu: Divisão Hemocentro, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2007.
22. Ribeiro JL, Camanho GL, Takita LC. Estudo Macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. *Acta Orthop Bras.* 2004; 12:16-21.
23. Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials.* 2005; 26: 3617-29.
24. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu H.-P, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type I collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res.* 2003; 21: 272-81.



25. Breinan HA, Minas T, Hsu H-P, Nehrer S, Shortkroff S, Spector M. Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res.* 2001;19:482-92.
26. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Vacanti JP, Vacanti CA. Injectable cartilage. *Plast Reconstr Surg.* 1995;96:1390-400.
- 27 – Zar JH. *Bioestatistical analysis*, 4<sup>th</sup> ed, Prentice-Hall, New Jersey, 66:3.

**Isolamento de Células-Tronco Mesenquimais da Medula Óssea**

[Artigo V]

*Status: Publicado em Periódico Nacional Acta Ortopédica Brasileira*

# ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA

## ISOLATION OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS

RENATA APARECIDA DE CAMARGO BITTENCOURT<sup>1</sup>, HAMILTON ROSA PEREIRA<sup>2</sup>, SÉRGIO LUÍS FELISBINO<sup>3</sup>, PRISCILA MURADOR<sup>4</sup>, ANA PALLA EHRHARDT DE OLIVEIRA<sup>4</sup>, ELENICE DEFFUNE<sup>5</sup>

### RESUMO

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) têm alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Este trabalho teve como objetivo isolar as CTMs da medula óssea de camundongos utilizando dois diferentes meios de cultura e caracterizá-las através de imuno-marcação com anti-vimentina. Foram utilizados 6 camundongos BALB/c com 15 dias de idade. A medula óssea foi coletada do canal medular das tíbias e fêmures dos camundongos e ressuspenso em uma concentração final  $6 \times 10^5$ , em meio Knockout-DMEM e DMEM alta concentração de glicose, suplementados com 10% SBF, mantidas em estufa a 37° C em uma atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar por 72 horas, quando as células não aderentes foram removidas durante a troca do meio. O número e densidade de células com morfologia fibroblástica foram maior no meio Knockout-DMEM em cinco dias de cultura versus 10-20 dias para conseguir a mesma concentração celular com o DMEM alta concentração de glicose. As células de ambos os grupos apresentaram intensa marcação com anticorpo anti-vimentina, caracterizando-as como CTMs. A obtenção mais rápida das CTMs é fundamental para o campo da terapia celular, principalmente quando se deseja utilizar estas células no reparo de tecidos de origem mesenquimal.

**Descritores:** Células-Tronco; Cultura de Células; Camundongos; Medula óssea; Vimentina.

### SUMMARY

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have a high ability to renew and differentiate themselves into various lineages of connective tissues. This study aimed to isolate the MSCs from murine bone marrow by using two different growth media and to characterize them with immunostaining with antivimentin antibody. We used six 2-week old BALB/c mice. Bone marrow was collected from mice's tibial and femoral channels and re-suspended in a final strength of  $6 \times 10^5$  in Knockout-DMEM and high-glucose-DMEM media, supplemented by 10% FBS, and kept in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37° C for 72 h, when non-adherent cells were removed during the change of medium. The number and density of adherent fibroblast-like colonies was greater with the Knockout-DMEM medium (within 5 days of culture) versus 10-20 days in DMEM-high glucose to get the same cellular concentration. The cells in both groups were highly positive for antivimentin antibody, characterizing them as MSCs. Obtaining MSCs as quickly as possible is essential for cell therapy field, especially when those cells are intended to be used for the repair of tissues from mesenchymal sources.

**Keywords:** Stem Cells; Cell Culture; Mice; Bone Marrow; Vimentin.

### INTRODUÇÃO

As células do estroma medular, também conhecidas como células-tronco mesenquimais ou unidades formadoras de colônias fibroblásticas, são células tronco não-hematopoiéticas multipotentes que aderem a placas de cultura<sup>(1,2)</sup>.

As Células-Tronco Mesenquimais (CTM) da medula óssea têm a capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular<sup>(3,4)</sup>. Estas células foram descritas primeiramente por Friedenstein et al.<sup>(5)</sup>, que descobriu que as CTMs aderem a placas de cultura, assemelham a fibroblastos "in vitro", e formam colônias<sup>(1,2)</sup>. Recentemente, as CTMs têm atraído a atenção de vários pesquisadores, pois são de

grande interesse para serem usadas no tratamento de diversas doenças humanas.

Muitos estudos têm isolado as CTMs e tem controlado, *in vitro*, a sua diferenciação em tecido cartilaginoso e osso utilizando fatores de crescimento específico, com o objetivo de usar esta nova tecnologia no reparo de tecidos de origem mesenquimal lesados<sup>(7-9)</sup>.

A proposta deste estudo foi padronizar o melhor meio de cultura que deve ser empregado para isolar mais rapidamente as CTMs e caracterizá-las com a imunomarcação com anticorpo anti-vimentina, pois temos interesse em diferenciá-las "in vitro" em tecido cartilaginoso, para que este futuramente possa ser usado no reparo da cartilagem articular lesada.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu, Laboratório de Cultura Celular, Hemocentro - UNESP - São Paulo - Brasil.

Endereço para correspondência: Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP Hemocentro, Rubião Júnior s/n - E-mail: [aragab@focemil.com.br](mailto:aragab@focemil.com.br)

- 1 - Doutoranda do Departamento de Cirurgia e Ortopedia.
- 2 - Professor Assistente Doutor, Departamento de Cirurgia e Ortopedia.
- 3 - Professor Assistente Doutor, Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências
- 4 - Pesquisadora - Hemocentro.
- 5 - Professora Assistente Doutora, Departamento de Urologia/ Hemocentro.

Trabalho recebido em: 07/04/06 aprovado em 27/05/06

## OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi padronizar o meio de cultura que deve ser empregado para isolar mais rapidamente as CTMs e caracterizá-las com a imunomarcação com anticorpo anti-vimentina.

## MATERIAL E MÉTODOS

As CTMs foram coletadas da medula óssea de seis camundongos BALB/c com duas semanas de vida, procedentes do Laboratório Experimental de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Os animais foram sacrificados como uma dose letal de pentobarbital sódico. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta universidade segundo o protocolo n° 345.

O meio de cultura testado foi o Knockout DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM; Catálogo n° 10829-018, Lote: 1209477) e DMEM-alta concentração de glicose (DMEM; Catálogo n° 12100-046, Lote: 1181947), suplementado com 10% de soro bovino fetal ([FBS] Catálogo n° 10270-106, Lote: 40Q3534K) e 10U/ml de penicilina G, 10ug/ml de estreptomicina e 25µg/ml de anfotericina B (Catálogo n° 15240-096, Lote: 1185890) todos obtidos da GIBCO® Invitrogen Corporation.

As CTMs foram coletadas da medula óssea dos fêmures e tíbias de três camundongos pela inserção de uma seringa de 26-gauge na cavidade do osso, lavando-a com 10 ml de Knock-out DMEM e DMEM-alta concentração de glicose nos outros três camundongos.

Após centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos, as células da medula óssea foram ressuspensas em 1mL nos respectivos meios de cultura para contagem de células e determinação da viabilidade celular utilizando-se a câmara de Neubauer. O número de células vitais foi determinado pela técnica de exclusão de células não vitais coradas por solução de azul de trypan (GIBCO® Invitrogen Corporation), seguindo as recomendações de Freshney<sup>(11)</sup>. Para

a contagem, foi utilizado 0,1mL da suspensão celular que, por sua vez, foi utilizado 0,1 mL de azul de trypan e 0,8 mL de meio de cultura. Esta suspensão celular foi transferida para a câmara de Neubauer com auxílio de pipeta de Pasteur e as células foram contadas, excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas de azul (células não viáveis). Para o cálculo do número de células foi utilizada a seguinte equação matemática:  $NC \times D \times 10^4 / \#Q$ , onde NC= número de células vitais contadas; D= diluição da amostra (10) e #Q= número de quadrados da câmara de Neubauer usados para contagem das células. A viabilidade foi sempre maior que 95%, e o número de células plaqueadas foi  $6 \times 10^4$ /placa.

Colocou-se uma laminula dentro da placa de cultura para permitir que as células crescessem sobre ela para posteriormente analisá-las com anticorpo anti-vimentina. As culturas foram mantidas em

estufa a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub> por 72h. Após 72h de cultura o meio foi trocado, e isto possibilitou a remoção das células não-aderentes da cultura. O meio de cultura foi trocado a cada três a quatro dias. Quando as células atingiram 80% de confluência, apresentando várias colônias fibroblásticas na placa, as laminulas foram removidas da cultura e as células foram fixadas com 70% de etanol e lavadas duas vezes em 2mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7.4.

As laminulas cultivadas foram tratadas com 3% de peróxido de hidrogênio em metanol para bloquear as peroxidases endógenas. Depois foram incubadas sequencialmente com 3% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), em PBS, e o anticorpo primário de camundongo anti-vimentina (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA). Posteriormente, as laminulas foram incubadas com anticorpo IgG de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA). A reação de imunoperoxidase foi revelada com diaminobenzidina.

A média da área ocupada pelas células mesenquimais nas placas foi determinada pela medida de 10 campos ao acaso no aumento de 5X, de uma lâmina de cada camundongo doador. As medidas foram realizadas utilizando imagens digitalizadas, usando um analisador de imagens Leica Q-win software Version 3 for Windows™.

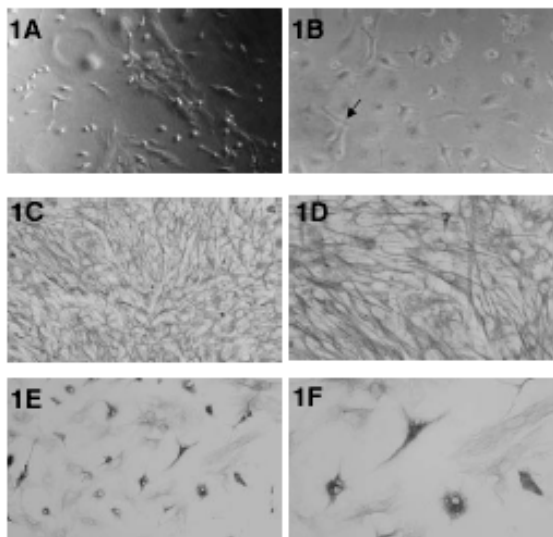
Os valores obtidos foram expressos como média ± desvio-padrão. Utilizou-se o test *t* de Student's não pareado, considerando significativo os resultados com índice de significância ( $p \leq 0,05$ ). O teste estatístico foi realizado no Instat (versão 3.0, GraphPad, Inc., San Diego, CA).

## RESULTADOS

As colônias de células com morfologia fibroblástica começaram a aparecer nas placas de cultura em 72 horas com o meio

Knockout DMEM e 5 dias com o DMEM alta concentração de glicose. As células não-aderentes foram removidas da cultura durante a troca do meio. Após cinco dias de cultura, o número e densidade de colônias de células com morfologia fibroblástica com o meio Knockout DMEM (Figura 1a) foram maior que com o DMEM alta concentração de glicose, que levou praticamente 10 dias para atingir a mesma concentração celular do primeiro meio (Figura 1b).

As células mantidas em cultura em ambos os protocolos foram positivas para anti-vimentina, caracterizando-as como CTMs. Após 10 dias, a placa de cultura que continha o meio Knockout DMEM ficou totalmente recoberta com as CTMs, como confirmada pela reação de anticorpo anti-vimentina (Figura 1c e 1d). Entretanto, a placa no qual foi usado o meio DMEM alta concentração de glicose não apresentou a mesma concentração celular (Figura 1e e 1f).



**Figura 1** - Microfotografia de contraste de fase das células mesenquimais em cultura (A-F). Presença de colônias de células com morfologia fibroblástica em 5 dias de cultura com o meio Knockout DMEM (A) e no meio DMEM alta concentração de glicose, as células formaram colônias em 10 dias (B). Aumento: x400 respectivamente. Microfotografia de células tronco mesenquimais marcadas com anticorpo anti-vimentina (C-F). Observe a grande densidade celular com morfologia alongada cultivada no meio Knockout DMEM (C, D). A concentração celular foi menor com o meio DMEM alta concentração de glicose (E, F). Aumento: (C, E) x200 (D, F) x400.

A área média ocupada pelas células mesenquimais conforme analisada pela morfometria (Figura 2) foi aproximadamente 61,89%, com desvio-padrão de 18,64, para o Knockout DMEM versus 42,88%, com desvio-padrão de 8,81, para o DMEM-alta concentração de glicose, com um  $p < 0.01$ , apresentando um resultado estatisticamente significativo.

## DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que é possível obter as CTMs em um curto espaço de tempo usando o meio de cultura Knockout DMEM. Isto foi possível devido a sua propriedade de ser utilizado especificamente em células tronco embrionárias. Em outros trabalhos foi realizada a cultura de CTMs com DMEM baixa concentração de glicose, e os autores obtiveram somente de depois de 5 dias as primeiras colônias aderentes de células com morfologia fibroblástica<sup>4,10</sup>. Neste presente estudo, observamos uma diferença significativa entre os dois meios de cultura, e essas diferenças foram mais



**Figura 2** - Comparação dos efeitos entre os dois meios de cultura na área ocupada pelas células mesenquimais. Os valores representam a média  $\pm$  desvio-padrão. As células cultivadas no meio Knockout DMEM ocuparam uma área na placa que foi aproximadamente 50% maior que as cultivadas no meio DMEM alta concentração de glicose, com diferença estatisticamente significante,  $p < 0.01$ .

evidentes quando as células foram marcadas com o anticorpo anti-ventina.

## CONCLUSÕES

1. O uso dos dois meios permitiu demonstrar a superioridade do Knockout DMEM que produziu um grande número de células quando comparado aos valores obtidos quando se usou o DMEM alta concentração de glicose.
2. O uso do meio Knockout DMEM poderá ser uma outra alternativa para o isolamento mais rápido das CTMs em cultura, principalmente quando se deseja diferenciá-las em outros tecidos de linhagem mesenquimal, como a cartilagem.

## Agradecimentos:

Agradecemos à técnica Sra. Fátima Regina Guimarães do Laboratório de Cultura Celular, Hemocentro – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela excelente assistência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Javason EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stroma cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; 19:219-25.
2. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002; 20:249-58.
3. Campagnoli C, Roberts AG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98:2396-402.
4. Romanov YA, Svintskaya VA, Srimov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like Cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21:105-10.
5. Friedenstein AJ, Derigazova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakova SF, Luria EA, Rudakow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2:83-92.
6. Johnstone B. Mesenchymal stem cells and chondrogenesis. *Eur Cells Mater* 2002; 4 (Suppl 1):1473-2262.
7. Martin I, Padena RF, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stroma cells into cartilaginous and bone-like tissues. *J Orthop Res* 1998; 16:181-9.
8. Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Hematol* 2003; 123:702-11.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal PK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
10. Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH, Jang CC. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells* 2003; 21:190-9.
11. Freshney RJ. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: Wiley-Liss, 2001.

**Avaliação de Morte Programada de Células: Comparação do Índice Apoptótico Progressivo em Cultura de Condrócitos**

[Artigo VI]

*Status: submetido e aprovado para publicação no Periódico Nacional Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento (in press)*

# **AVALIAÇÃO DE MORTE PROGRAMADA DE CÉLULAS**

## **Comparação do Índice Apoptótico Progressivo em cultura de Condrócitos**

### **Apoio: CNPQ**

**Gabrielle Reinoldes Bizarria GUILHERME**  
Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Médica –  
[gabrielle\\_rbg@yahoo.com.br](mailto:gabrielle_rbg@yahoo.com.br)

**Aparecida Vitória de Gonçalves SOUZA**  
Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Médica – FMB-UNESP  
[vitoriagsouza@yahoo.com.br](mailto:vitoriagsouza@yahoo.com.br)

**Andrei MOROZ**  
Mestrando do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Médica - FMB-UNESP  
[andreimoroz@terra.com.br](mailto:andreimoroz@terra.com.br)

**PRISCILA MURADOR - MS**  
Pesquisadora do Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina – UNESP  
[pmurador@fmb.unesp.br](mailto:pmurador@fmb.unesp.br)

**RENATA APARECIDA DE CAMARGO BITTENCOURT - MS**  
Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ortopedia – FMB –UNESP  
[Rentcourt2000@yahoo.com.br](mailto:Rentcourt2000@yahoo.com.br)

**Marjorie de Assis GOLIM – Dra**  
Pesquisadora do Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina – UNESP  
[citometria@fmb.unesp.br](mailto:citometria@fmb.unesp.br)

**Rosana ROSSI-FERREIRA – Profa. Dra.**  
Docente do Departamento de Ciências Biológicas – FC-UNESP – Bauru  
[rossi@fc.unesp.br](mailto:rossi@fc.unesp.br)

**Elenice DEFFUNE – Profa. Dra.**  
Docente do Departamento de Urologia –FMB-UNESP – Botucatu  
[ed12@fmb.unesp.br](mailto:ed12@fmb.unesp.br)



## INTRODUÇÃO

Em todo mundo são gastos milhares de dólares todos os anos em tratamentos para reduzir sintomas de doenças sem cura efetiva. Os problemas ortopédicos que atingem em sua maioria idosos, são de grande importância econômica para a sociedade, pois requerem muitas intervenções cirúrgicas. Essas intervenções muitas vezes não obtêm os resultados bons esperados em longo prazo. Uma das formas para reduzir os gastos e melhorar a qualidade de vida do paciente, quanto a possíveis rejeições e incômodos com próteses, são os auto-transplantes, que se caracterizam pela retirada de material autólogo e, após a realização de cultura celular em laboratório, o re-implante<sup>1</sup>.

Estas considerações se aplicam, entre outras, a transplantes de cartilagem em pacientes que apresentam doenças como a osteoartrite e a artrite reumatóide. Estas são doenças degenerativas, sem cura efetiva, apenas com tratamento sintomático e paliativo.

Os tratamentos que vêm sendo desenvolvidos, mais recentemente, envolvem a terapia celular. Esta terapia consiste em produzir a cartilagem articular “in vitro” para realização de transplantes autólogos, com a finalidade de regenerar o tecido lesado. A produção de tecido “in vitro” se faz a partir de células do próprio paciente e, como não há incompatibilidade imunológica, as chances de rejeição são extremamente reduzidas<sup>2</sup>.

Uma das formas de se realizar um transplante autólogo é utilizar condrócitos retirados da cartilagem do paciente. Os condrócitos devem ser cultivados em matriz tridimensional (scaffolds) para não perderem seu fenótipo, durante três a quatro semanas, e depois, transplantado para a área lesada<sup>3</sup>.

Estudos anteriores demonstraram que o fenótipo dessa cartilagem teve alta variação, obtendo-se cartilagem do tipo hialina, fibrocartilagem e os dois tipos juntos<sup>4</sup>. Embora se verifique uma variação de fenótipo, a maioria dos transplantes feita em outras demonstrações aponta sucesso em cerca de 80%<sup>5</sup>. Esta taxa poderia ser melhorada se estudos induzissem não só a produção de matriz extracelular para formação do tecido, mas também a proliferação celular dos condrócitos, até porque, essas células estão sendo cultivadas em ambiente estranho, e podem apresentar morte celular precoce. Ainda assim, este tipo de



transplante é contra-indicado em paciente com lesões provocadas por osteonecrose, condrocalcinose, osteoartrite, artrite reumatóide e meniscectomia total<sup>6</sup>.

Nos últimos três anos, com o avanço na tecnologia de células-tronco, um segundo tipo de cultivo celular vem sendo testado. Ele consiste em cultivar células-tronco mesenquimais e diferenciá-las em condrócitos. Essas células mesenquimais (ou células do estroma medular – CTMs) estão presentes na medula óssea em baixíssima quantidade (0,01% a 0,001% do total de mononucleares) e são capazes de serem diferenciadas (dependendo do ambiente local e estímulos tróficos) em condrócitos, osteoblastos, adipócitos e miócitos<sup>7</sup>.

A dificuldade existente nesta técnica é expandir as CTMs em laboratório para obtenção de cultura homogênea e facilitar a sua diferenciação em outros tipos celulares. Infelizmente, na literatura, é difícil de achar trabalhos básicos sobre isolamento, expansão e caracterização das CTMs, e a base do conhecimento sobre essas células que possuem propriedades muito intrigantes, é deixada de lado. A maioria trata sobre as possíveis diferenciações e transplantes.

O estudo da apoptose (morte celular programada) é importante pois, esse fenômeno pode ser desencadeado por estímulos diversos, presentes ou ausentes na cultura celular, como: hormônios ou fatores tróficos, toxinas, competição negativa entre as células, etc. Assim, ao analisarmos a extensão da progressão da apoptose, podemos corrigir a cultura com o que estiver faltando ou sobrando para as células.

Para o cultivo de condrócitos, neste trabalho, foi utilizada a matriz tridimensional de alginato de sódio. Essas células foram cultivadas em laboratório sem estímulo de proliferação como é descrito na literatura. Assim, observando a viabilidade celular em cultura tridimensional e a progressão de morte celular por apoptose podemos avaliar se essas células tem condições de serem re-implantadas em lesões de tecido cartilaginoso para regenerá-lo. E, também, contribuimos com dados básicos, que faltam na literatura.

Para o cultivo de CTMs em monocamada, avaliamos dados básicos que, também, faltam na literatura como viabilidade celular ao longo da cultura, progressão do crescimento das CTMs durante a cultura de células mononucleadas do sangue de medula óssea, e a progressão da morte celular por apoptose.

Além de avaliar os índices de apoptose nas culturas celulares, ainda foi possível, ainda, comparar, duas técnicas de viabilidade celular (1) a técnica mais

amplamente utilizada para observação de viabilidade celular que consiste em usar o corante de viabilidade celular azul de Tripán junto com a Câmara de Neubauer; (2) e a técnica por marcação com anexina V (conjugada com FITC - isotocianato) e iodeto de propídeo com posterior análise por Citometria de Fluxo.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e os animais utilizados estavam sob cuidados no Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

***Coleta da cartilagem e processamento:*** foram coletadas raspas de tecido cartilaginoso de coelhos machos. As amostras passaram por processamento em laboratório para destruição da matriz extracelular e liberação dos condrócitos. A digestão do tecido foi feita com incubação a 37°C por 45 minutos com tripsina a 0,25%, após a retirada da tripsina, foi feita nova incubação com hialuronidase na mesma condição anterior e por último, após a remoção da hialuronidase, o tecido foi incubado com colagenase tipo I em estufa a 37°C por 18 horas.

***Inclusão dos condrócitos em pérola de alginato:*** fez-se necessário o uso de matriz tridimensional para o cultivo de condrócitos, para esses não perderem seu fenótipo. Optou-se pelo hidrogel de alginato de sódio para realização de matriz tridimensional pois é um material reabsorvível, podendo ser re-implantado diretamente nos organismos. Para isto foi preparado uma solução de alginato de sódio 1,2% (Fluka®) em cloreto de cálcio a 155mM. O pellet celular de condrócitos foi ressuspenso na solução de alginato de sódio e colocado em uma seringa de 1mL. Foi feito o gotejamento da solução da seringa em cloreto de sódio a 55mM para a formação das pérolas de alginato. Essas foram cultivadas em meio DMEM Dulbecco's Modified Eagle Media Meio - GIBCO® suplementado com F-12 Nutrient Mixture (Ham) - GIBCO®, com troca a cada dois dias.

***Dissolução da pérola de alginato para liberação de condrócitos:*** as pérolas de alginato foram incubadas a temperatura ambiente com citrato de sódio a 165mM por

uma hora. Após centrifugação, o pellet celular formado foi ressuspenso em meio de cultura.

**Coleta de medula óssea e processamento:** foi retirado 5 mL de medula óssea da crista ilíaca de coelhos machos (com heparina para não coagular). O sangue foi processado em laboratório tendo suas células mononucleadas separadas por Ficoll-hypaque<sup>®</sup> densidade 1.077g/mL como descrito no protocolo de ZAGO e COVAS, 2006. As células mononucleadas foram cultivadas em fracos de 25cm<sup>2</sup> com meio Knockout-DMEM - GIBCO<sup>®</sup>.

**Tripsinização das culturas:** para “soltar” as CTMs que aderiram a placa, foi feito digestão enzimática com tripsina a 0,25% durante 2 minutos.

**Viabilidade celular por azul de tripan:** foram coletadas amostras de células e misturado (v:v) com azul de tripan 0,2%. A mistura foi colocada na Câmara de Neubauer para contagem celular.

**Viabilidade celular por marcação com anexina-V e iodeto de propídeo:** foi utilizado o KIT “ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT I” - BD Pharmingen<sup>™</sup> e a marcação das células foi feita de acordo com as especificações do fabricante. A leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCALIBUR BD<sup>®</sup> e a análise em software PAINT-A-GATE da BD<sup>®</sup>.

**Marcação das CTM com anti-vimentina:** A vimentina é um componente intracelular de caracterização das CTM, portanto sua marcação é de extrema significância. A permeabilização celular foi feita com saponina a 1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção da saponina por centrifugação, foi colocado o anticorpo monoclonal anti-vimentina e depois um anticorpo secundário conjugado com FITC. A leitura foi feita por citometria de fluxo FACSCALIBUR BD<sup>®</sup> e a análise em software PAINT-A-GATE da BD<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

**Cultivo de condrócitos em pérolas de alginato:** Na cultura em pérola de alginato de sódio (ilustração 01), os condrócitos não perderam seu fenótipo, continuando como células ovaladas que formam grupos isógenos (ilustração 02).



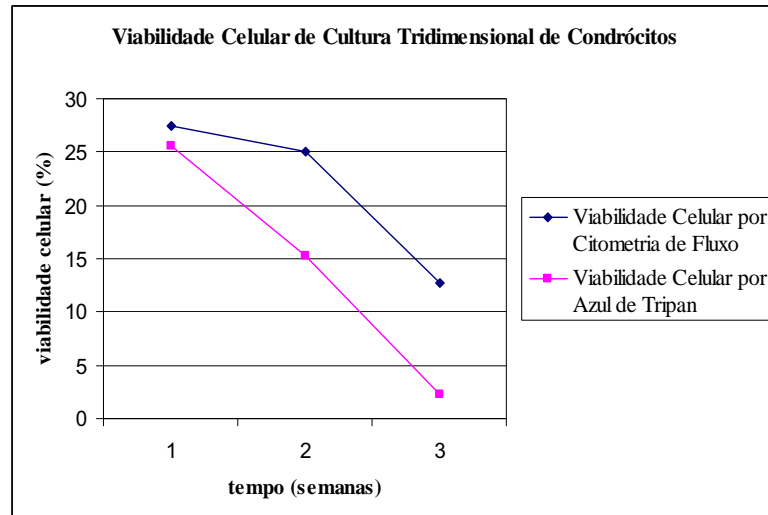
**Ilustração 01:** Pérola de alginato de sódio com células (aumento 20X)



**Ilustração 02:** Formação de grupos isógenos pelos condrócitos cultivados dentro da pérola de alginato de sódio.

**Viabilidade Celular e Progressão da Apoptose em Cultura Tridimensional de Condrócitos:** A viabilidade celular foi analisada por dois métodos (1) por marcação com anexina V e iodeto de propídeo analisadas por Citometria de Fluxo; e (2) usando-se o corante de viabilidade celular azul de Tripán com análise pela Câmara de Neubauer.

Em ambas as análises, podemos perceber diminuição da taxa de viabilidade celular (gráfico 01).



**Gráfico 01:** Média das viabilidades celulares de cultura de condrócitos em pérola de alginato (tridimensional) durante 3 semanas de cultivo. Linha azul: viabilidade celular feita por citometria de fluxo e marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Linha rosa: viabilidade celular feita por corante de viabilidade (azul de tripan) e Câmara de Neubauer.

Para confrontar as duas metodologias de avaliação da viabilidade celular utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Não houve diferença significativa dos testes para  $p < 0,05$ .

A progressão da apoptose foi analisada através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo, com análise por citometria de fluxo. Foi observado que os níveis de marcação com anexina V caíram conforme o tempo de cultivo, enquanto os níveis de iodeto de propídeo aumentaram. A coexpressão de ambos também sofreu leve aumento (tabela 01) Isso indica diminuição da quantidade de células morrendo por apoptose e aumento de células em apoptose tardia ou necrose.

**Tabela 01:** Análise das médias de expressão de anexina V e iodeto de propídeo nas culturas durante 3 semanas de cultivo.

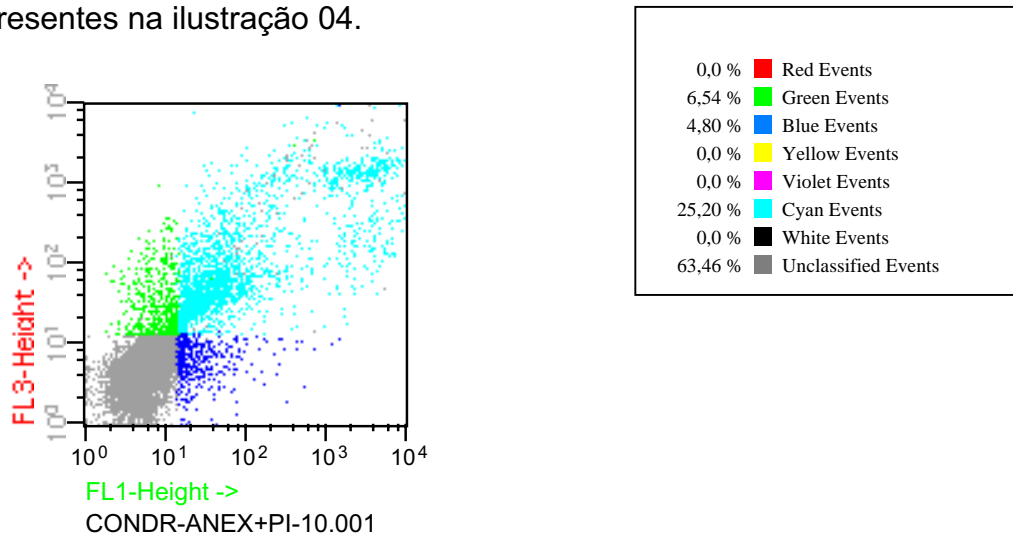
Momento	Anexina V	Iodeto de Propídeo	Anexina V + PI
1ª semana	65,33%	36,56%	31,48%
2ª semana	64,76%	43,74%	37,77%
3ª semana	61,09%	73,58%	37,83%

A ilustração 03 mostra o padrão da análise feita por corante de viabilidade celular Azul de Tripán. As células não viáveis, isto é com membrana plasmática não íntegra, absorvem o corante tornando-se azuis. Nas viáveis, ocorre o contrário.



**Ilustração 03:** Viabilidade celular por azul de tripan em Câmara de Neubauer. Células não viáveis estão coradas em azul.

No controle do padrão da análise por citometria de fluxo com marcação positiva para anexina V (FL1) e iodeto de propídeo (FL3) e a coexpressão de ambos estão presentes na ilustração 04.



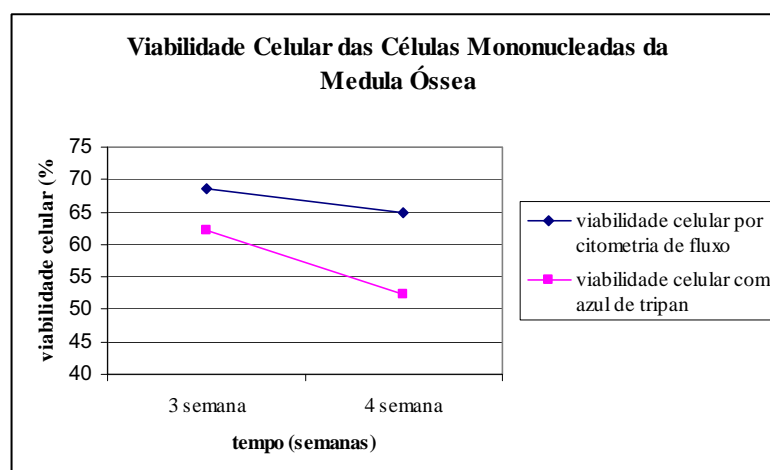
**Ilustração 04:** Condrócitos marcados com anexina V (FL1) e iodeto de propídeo (FL3). Em azul e ciano temos expressão de anexina V; em verde e ciano temos expressão de iodeto de propídeo, e somente o ciano representa a coexpressão de anexina V e iodeto de propídeo. A maior parte da cultura em cinza são as células que não expressaram os marcadores, sendo consideradas células viáveis. Ao lado, temos a legenda que mostra a porcentagem de cada cor (isto é cada expressão).

**Cultivo de células mononucleadas:** Depois de processadas em laboratório, as culturas de células mononucleadas da medula óssea foram mantidas em cultura por 4 semanas. Devido a baixa concentração inicial (máximo de  $20,2 \times 10^3$  cels/ml), na primeira e segunda semana de cultivo, é impossível realizar qualquer tipo de teste a respeito de viabilidade celular, progressão de apoptose ou quantidade de CTM presente na amostra. Mesmo assim, conseguimos observar a progressão da cultura por microscopia de luz contrastada (ilustração 05: três semanas de cultura).



**Ilustração 05:** Aumento 20X. Três semanas de cultivo (após segunda passagem) das células mononucleadas da medula óssea. Na microscopia de luz contrastadada observa-se o aumento da formação de colônias celulares (nos círculos).

A viabilidade celular das células mononucleadas também foi analisada pelos dois métodos descritos. Em ambas as análises, pode-se perceber diminuição da taxa de viabilidade celular (gráfico 02).



**Gráfico 02:** Média das viabilidades celulares de cultura de células mononucleadas da medula óssea durante 4 semanas de cultivo. Linha azul: viabilidade celular feita por citometria de fluxo e marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Linha rosa: viabilidade celular feita por corante de viabilidade (azul de tripan) e Câmara de Neubauer.

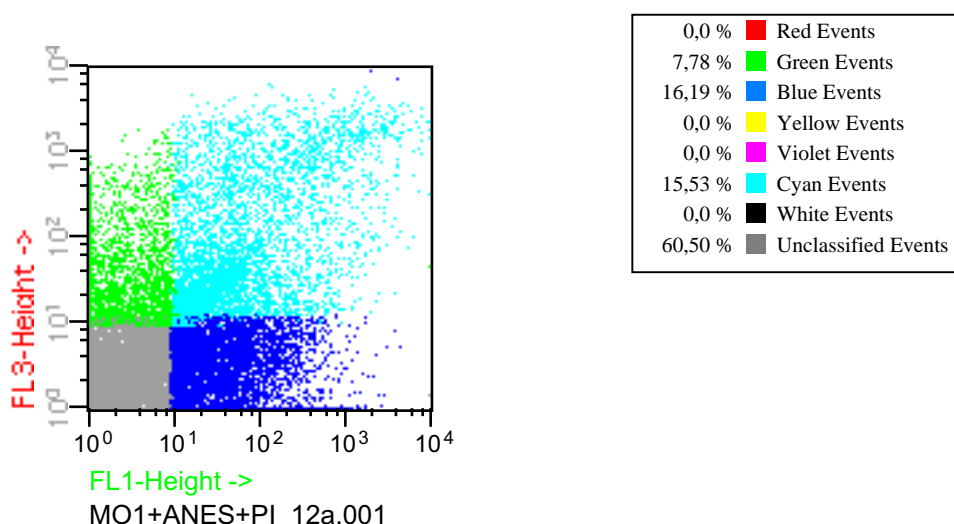
Para confrontar as duas metodologias de avaliação da viabilidade celular utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Não houve diferença significativa dos testes para  $p < 0,05$ .

A progressão da apoptose foi analisada através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo, sendo que , os níveis de marcação com anexina V aumentaram conforme o tempo de cultivo, enquanto os níveis de iodeto de propídeo diminuíram. A coexpressão de ambos também sofreu leve aumento (tabela 02) Isso indica diminuição da quantidade de células morrendo por apoptose e aumento de células em apoptose tardia ou necrose

**Tabela 02:** Análise das médias de expressão de anexina V e iodeto de propídeo nas culturas durante 2 semanas de cultivo.

Momento	Anexina V	Iodeto de Propídeo	Anexina V + PI
3ª semana	22,10%	22,48%	9,58%
4ª semana	25,75%	20,49%	14,89%

O controle do padrão da análise por citometria de fluxo com marcação com anexina V (FL1), iodeto de propídeo (FL3) e a coexpressão de ambos estão presentes na ilustração 06.



**Ilustração 06** Células mononucleadas marcados com anexina V (FL1) e iodeto de propídeo (FL3). Em azul e ciano temos expressão de anexina V; em verde e ciano temos expressão de iodeto de propídeo, e somente o ciano representa a coexpressão de anexina V e iodeto de propídeo. A maior parte da cultura em cinza são as células que não expressaram os marcadores, sendo consideradas células viáveis. Ao lado, temos a legenda que mostra a porcentagem de cada cor (isto é cada expressão).

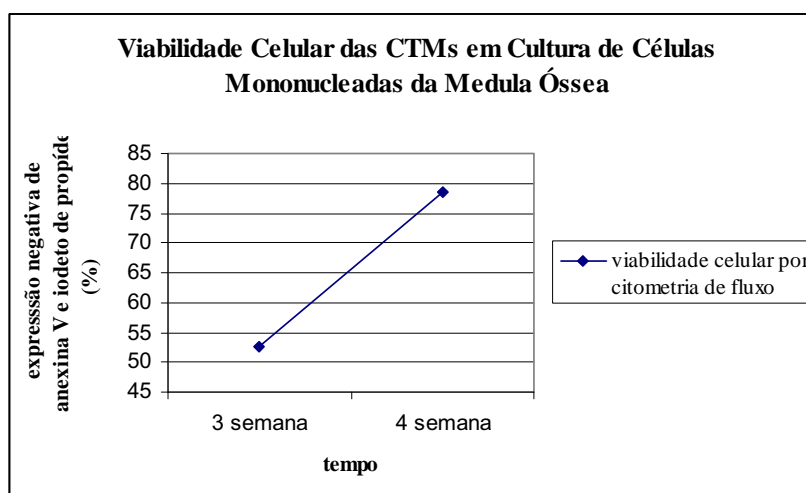
A quantidade de CTM na cultura de células mononucleadas da medula óssea foi analisada por marcação da vimentina com o anticorpo anti-vimentina. Parte-se do princípio, utilizando a literatura, que existe na medula óssea 0.01% de CTM (tabela 03). Nesta análise, observa-se um grande crescimento até a terceira semana e na semana seguinte uma redução do número de CTM nas culturas.



**Tabela 03:** Análise das médias de expressão positiva de anti-vimentina nas culturas durante 2 semanas de cultivo:

Momento	Quantidade de CTM nas culturas
Coleta	0,01%
3ª semana	22,80%
4ª semana	20,87%

Podemos observar um aumento na viabilidade celular das CTM nas duas últimas semanas de cultura (ilustração 07).



**Ilustração 07:** Média da viabilidade celular de cultura de CTM duas últimas semanas de cultivo. Linha azul: viabilidade celular feita por citometria de fluxo e marcação com anexina V e iodeto de propídeo.

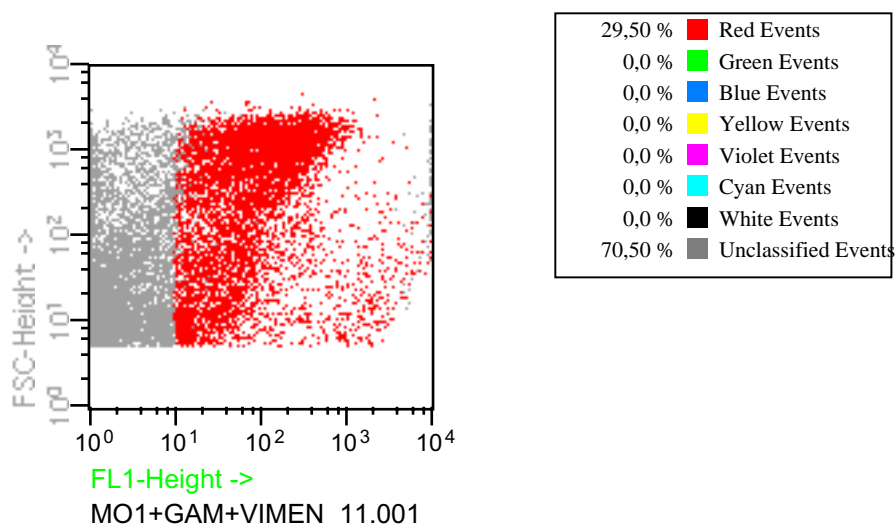
A progressão da apoptose foi analisada através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo com análise por citometria de fluxo (tabela 04).

**Tabela 04:** Análise das médias de expressão de anexina V e iodeto de propídeo nas culturas durante 2 semanas de cultivo.

Momento	Anexina V	Iodeto de Propídeo	Anexina V + PI
3ª semana	26,10%	14,29%	12,71%
4ª semana	15,38%	6,90%	9,58%

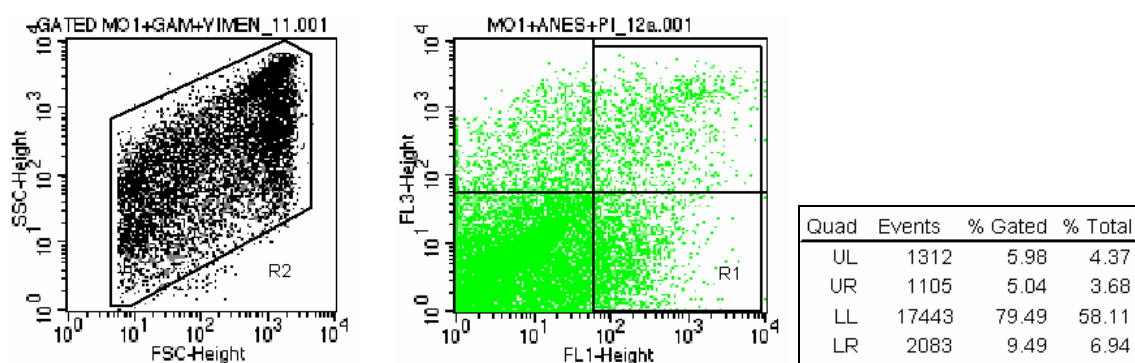
Observou-se que os níveis de marcação com anexina V, iodeto de propídeo e a coexpressão de ambos diminuiu (embora considerados não significantes para  $p < 0,05$ ). Isso indica diminuição da quantidade de células morrendo por apoptose e diminuição de células em apoptose tardia ou necrose.

O controle do padrão da análise por citometria de fluxo com marcação por anti-vimentina está na ilustração 08.



**Ilustração 08:** Cultura de células mononucleadas da medula óssea, e as CTMs estão marcadas com anti-vimentina (FL1). Ao lado, temos a legenda que mostra a porcentagem da expressão de anti-vimentina (29,50%).

A marcação positiva com anexina V (FL1), iodeto de propídeo (FL3) e a coexpressão de ambos estão presentes na ilustração 09.



**Ilustração 09** CTMs marcadas com anexina V (FL1) e iodeto de propídeo (FL3). Na esquerda temos somente as CTMs que foram marcadas com anti-vimentina, neste quadro distribuídas por tamanho x granulosidade. Ao meio encontra-se a marcação das CTMs do “gate” R2 com anexina V e iodeto de propídeo. Do lado esquerdo temos a legenda do quadrante do meio (UL = up left, UR = up right, LL = low left, LR = low right) onde se lê que 58,11% das células estão viáveis, 6,94% expressão somente anexina V, 4,37% expressão somente iodeto de propídeo e 3,68% coexpressa anexina V e iodeto de propídeo.

## DISCUSSÃO

A cultura em gel de alginato de sódio, embora não tenha proporcionado a proliferação celular, possibilitou a formação de matriz pericelular com colágeno tipo II (resultado não mostrado). Por não ser o ambiente próprio dos condrócitos, essas células apresentaram ao longo da cultura diminuição de suas viabilidades celulares, tanto pelo método de marcação com anexina V e iodeto de propídeo quando analisados tanto por citometria de fluxo, quanto com o corante de viabilidade (azul de Tripan) na Câmara de Neubauer. A diminuição da viabilidade coincidiu com a alta incidência de morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose, pois no final da cultura observamos mais de 60% de apoptose precoce, 73% de necrose e 35% de apoptose tardia ou necrose secundária. Quanto a progressão da apoptose, embora tenha diminuído pouco durante o cultivo, ainda se apresentou alta ao final deste, nos fazendo considerar o meio (hidrogel) ao qual essas células estão sendo expostas. Os mais prováveis fatores de interferência são: dificuldade do meio de cultura e nutrientes em chegar as células dentro do alginato de sódio, dificuldade das toxinas celulares liberadas saírem do gel, falta de estímulo de crescimento, como o TGF $\beta$  ou problemas de manipulação durante a coleta e processamento da cartilagem. Para essa cultura, o índice apoptótico comprova que as células, se re-implantadas com a finalidade de corrigir defeitos no tecido cartilaginoso, não atingiriam seus objetivos, uma vez que com a viabilidade baixa e grau de morte celular alto elas seriam incapazes de regenerar lesões. A avaliação dos parâmetros analisados neste trabalho deve ser refeita durante a realização de novo cultivo celular em outros materiais hidrogéis, ou num alginato de sódio de menor concentração, assim como colocar junto ao meio, fatores de crescimento extras.

O método pelo azul de tripan, embora neste estudo tenha se mostrado tão eficaz quanto os marcadores de morte celular por citometria de fluxo, não permite identificar aquelas células que estão entrando em processo apoptótico.

Pelos resultados aqui apresentados, sugerimos que os testes de viabilidade celular devem ser feitos sempre durante o cultivo de condrócitos em matriz tridimensional. E sempre que a viabilidade celular diminuir, sugere-se fazer a curva de morte celular, principalmente por apoptose, para tentar corrigir os erros do cultivo.

Já a cultura em monocamada de células mononucleadas da medula óssea proporcionou a proliferação celular, e o aumento das CTMs no cultivo.

A diminuição da viabilidade total das células em cultura, e o aumento da apoptose (confirmada pelo aumento da marcação com anexina V) se mostram compatíveis. A partir do momento em que o meio de cultura usado serve para estimular o crescimento das CTM, é compreensível que vejamos diminuição da competição negativa proporcionada pelas células mononucleadas através da diminuição da viabilidade total das células. Ao mesmo tempo, a progressão do aumento da apoptose confirma tal resultado.

A proliferação máxima das CTM ocorreu durante a terceira semana de cultivo, após terceira passagem. Essa proliferação celular está de acordo com a diminuição da morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose, observadas através da diminuição progressiva da marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Na quarta semana observou-se uma menor expressão de vimentina pelas células em cultura. Essa expressão diminuída pode estar relacionada com perda de fenótipo pelas células (o que ocorre devido ao número de passagens) e não com a morte das células, pois não há indício de aumento dos marcadores de morte celular na quarta semana. A partir da observação do grau de apoptose celular dessa cultura, sugere-se que a diferenciação celular ocorra na terceira semana, ponto em que as CTMs são em sua maioria homogêneas e o índice de apoptose/morte celular está diminuindo consideravelmente.

Tal perda de fenótipo das CTMs vem sendo amplamente estudada e discutida na literatura como nos relatos de Javazon, E. (2004). Por um lado as passagens (repiques) com tripsina estimulam o crescimento, e por outro, ao estimular a taxa de proliferação, estimula também mutações no DNA celular o que pode levar a perda do fenótipo pela célula e diminuição da atividade das telomerasas – enzimas responsáveis por manter os telômeros celulares com tamanho suficiente para a célula não entrar em senescência.

A pesquisa de CTMs elevou-se, somente, nos últimos quatro anos, e ainda é difícil achar trabalhos coerentes, principalmente, em relação a caracterização e expansão dessas células. Por falta de informação base (o que está começando a ser produzido e divulgado por necessidade de entenderem as CTMs antes de diferenciá-las) é difícil correlacionar os resultados deste trabalho com a literatura. Os principais trabalhos com CTM na literatura indicam que fizeram a

contagem celular (pelos mais variados métodos) mas raramente expõe os resultados em seus artigos, e muitos deles não diferenciam as CTMs das outras células mononucleadas durante a contagem celular, levando em consideração somente a confluência de células na placa de cultura vistas por microscopia de luz – Bonab, M.M. *et al.* (2006), Shahdadfar, A. (2006).

Pelos resultados aqui apresentados, sugerimos que os testes de viabilidade celular devem ser feitos sempre durante o cultivo de CTMs para verificar o auge da homogeneidade do cultivo e a baixa morte celular.

### BIBLIOGRAFIA

01. CARVALHO, A.C.C. Células-Tronco: a medicina do futuro. **Ciênc. Hoje**. São Paulo, v.29, p. 27-31, 2001
02. GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Imunologia**. Quarta ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora REVINTER Ltda., 2002. p 517-526.
03. BENTLEY, G.; MINAS, T. Revisão clínica:tratar a lesão articular em jovens. **Br. Med. J.**, London, v.10, 2001. Disponível em <http://www.bmj-pt.com>
04. ROBERTS, S.; McCALL, I.W.; DARBY, A.J.; MENAGE, J.; EVANS, H.; HARRISON, P. E.; RICHARDSON, J.B. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. **Arthritis Res. Ther.** v. 5, p. 60-72, 2003
05. WROBE, R. R. Articular cartilage injury and autologous chondrocyte implantation. **Phys. Sportsmed.**, Minneapolis, v. 28, 2000. Disponível em: <http://www.physsportsmed.com.issues>
06. KLINIKUM LEVERKUSEN TRAUMATOLOGY & ORTHOPEDIC SURGERY. **Autologous chondrocyte implantation**. Levekusen, 2000. Disponível em: <[http://www.Unflchirurgie.com/english/autologous\\_condrocyte\\_implant.htm](http://www.Unflchirurgie.com/english/autologous_condrocyte_implant.htm)>. Acesso em: 28 abr. 2003

07. MARTIN, I.; PADERA, R. F.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FREED, L.E. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stroma cells into cartilaginous and bone-like tissues. **J. Bone Joint Surg.**, Boston, v. 16, p. 181-189, 1998
08. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A nova fronteira da medicina.** Primeira ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p.35-48
09. JAVAZON, E.; BEGGS, K.; FLAKE, A. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging *Experimental Hematology* v.32, p. 414–425, 2004
10. BONAB, M. *et al.* Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biology**, v.7:14 doi:10.1186/1471-2121-7-14, 2006
11. SHAHDADFAR, A. *et al.* In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability **Stem Cells** v. 23, p.1357–1366, 2005.

**Gel de Plaquetas: Nova Tecnologia em Arcabouços 3D para Cultivo  
de Cartilagem - Engenharia de Tecidos**

[Artigo VII]

*Status: submetido a Periódico Nacional Acta Ortopédica Brasileira*

## **GEL DE PLAQUETAS: NOVA TECNOLOGIA EM ARCABOUÇOS 3D PARA CULTIVO DE CARTILAGEM - ENGENHARIA DE TECIDOS**

PLATELET GEL: NEW TECHNOLOGY CARTILAGE CULTURE IN SCAFFOLD 3D-TISSUE ENGINEERING

Andrei Moroz<sup>1</sup>, Renata A.C. Bittencourt<sup>2</sup>, Sérgio Luis Felisbino<sup>3</sup>, Rosana Rossi-Ferreira<sup>4</sup>, Elenice Deffune<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Aluno de Mestrado em Biotecnologia Médica - Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>2</sup>Doutoranda do Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>3</sup>Professor Assistente Doutor, Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu./ <sup>4</sup>Professora Assistente Doutora, Divisão Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP/ <sup>5</sup>Professora Assistente Doutora, Departamento de Urologia/ Hemocentro - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

### **ABSTRACT**

Tissue/organ repair has been the ultimate goal of surgery from ancient times to the present, and has traditionally taken two forms: tissue grafting and synthetic material replacement. Recently, tissue engineering emerged to replace these limited techniques. Cell culture requires a mechanical scaffold that supports cell growth and provides nutrient diffusion for the cells. The possibility of using platelet-rich plasma (PRP) as a 3D scaffold in gel form to provide cell sustentation possesses various advantages. It is a biological material, that presents easy absorption after the transplantation stage, being rich in growth factors, in particular, PDGF and TGF that stimulate extracellular matrix synthesis. The objective was to develop a platelet gel scaffold in the terms of its form, reagent concentration and lifetime. The PRP was obtained from the centrifugation of rabbit(n=5) blood. Two forms were idealized for the scaffold: Sphere and Carpet. Different concentrations of thrombin were used. All the platelet gel were made with 2,3mL of PRP. The entire process was performed in sterile conditions. The platelet gel remained in Petri plates, at 37°C inside a 5% CO<sub>2</sub> incubator with 4mL DMEM High Glucose 10% fetal bovine serum, changed one time per week. Pictures were taken at days 1, 2, 3 and 20, and the plates were observed at a inverted microscope daily. Both forms were succesfull because produced a 3D environment that supports cell growth and had positive and negative features. The Sphere form didn't attached to the plate, being easier to change the medium and



remove the gel from the plate. A small retraction of the gel was observed and the investigation at the microscope was very difficult, because of the dark areas in the optical camp. In the other hand, the Carpet form didn't retract, did not produce dark areas, being very easy to see at the microscope. The thrombin concentrations used did not interfere with the final production of the gel. Time was the only factor that changed with the variation (more concentrated, faster production of the gel). The 20 day lifetime observed was considered a good result, more than sufficient to conduct a cell culture experiment. This work represents an innovation in the 3D scaffold technology, in the fact that it is completely new to use platelet at the mechanical structure of the scaffold. The advantages of platelets in this field are obvious in comparison to other scaffolds used today. The production of a platelet-rich plasma 3D scaffold was a success, and this is a path that needs to be investigated in order to consolidate in an efficient and reliable route in tissue engineering technology.

**KEY WORDS:** Cell Culture, 3D Scaffold, Platelet Gel, Tissue Engineering.

## Introdução

O reparo de tecidos e órgãos foi o objetivo final da cirurgia das épocas antigas até a presente, e foi tradicionalmente realizado de duas formas: enxerto de tecidos ou substituição por material sintético. O ouro foi utilizado em defeitos cranianos datando de 2000 AC, e o enxerto de tecidos foi usado desde pelo menos 1660 DC. Ambos os métodos, entretanto, têm limitações. O enxerto de tecidos requer mais cirurgias, associadas à morbidade, e é restringido por quantidade limitada de material. Os materiais sintéticos integram-se mal com o tecido e podem falhar com o tempo devido ao desgaste e fadiga, ou resposta adversa do corpo. A engenharia de tecidos (EngTec) emergiu em 1990 para corrigir as limitações do enxerto de tecidos e uso de materiais sintéticos. O conceito da EngTec é transplantar um biofator (células, genes ou proteínas) dentro de um material degradável poroso (*scaffold*). Os biofatores incluem *stem cell* e a gene-terapia, que estimulam o reparo do tecido (HOLLISTER, 2005).

O objetivo da engenharia de tecidos é restaurar e preservar as funções perdidas por órgãos doentes ou danificados. Como *in vivo*, os tecidos projetados *in vitro* devem fornecer transporte de nutrientes, estabilidade mecânica, coordenação de processos

multicelulares e um microambiente celular que preserve a estabilidade fenotípica das células. Para conseguir este objetivo, muitos tecidos projetados requerem características arquiteturais da escala macro (cm) e micro (aproximadamente 100 micra) e as técnicas de cultura celular foram adaptadas para criar *scaffolds* com as arquiteturas tridimensionais (3D) definidas em escalas relevantes ao sucesso fisiológico do tecido (TSANG & BHATIA, 2007). Caso contrário, se cultivados em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características morfológicas e passam a produzir componentes de matriz de outro tipo celular (BENYA & SHAFFER, 1982). Assim, perde-se a funcionalidade do tecido.

Longe de serem componentes passivos, o material escolhido e o *design* poroso da arquitetura do *scaffold* são fatores cruciais no sucesso da regeneração do tecido. Um *scaffold* bem sucedido deve prover sustentação mecânica ao mesmo passo que promove o transporte em massa, e ainda, degradar-se de maneira que o tecido regenerado assume suas funções (HOLLISTER, 2005).

Vários sistemas de cultura já foram usados: cultura em monocamadas, cultura em gel de agarose (HAÜSELMANN *et al*, 1994), hidrogel e polímeros sintéticos como: arcabouços à base de colágeno (gel de colágeno tipo I e II), esponjas de colágeno tipo II, ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídeos e alginato (KISIDAY *et al*, 2002), e mais recentemente, celulose bacteriana (SVENSSON *et al*, 2005).

Investigando o papel da plaqueta idealizou-se a sua utilização, sob a forma de gel, como arcabouço 3D para cultura celular baseando-se na secreção de uma série de hormônios interfaceados com a adesão, cicatrização e neovascularização dos seus grânulos. A possibilidade de uso do plasma rico em plaquetas (PRP) como um arcabouço 3D em forma de gel para sustentação das células possui diversas vantagens. Entre elas, lista-se ser um material biológico, que apresenta fácil reabsorção após a fase de transplantação, pode ser produzido com concentrado de plaquetas do próprio paciente que receberá o transplante, trata-se de um material barato, além de serem ricos em fatores de crescimento, em particular, PDGF e TGF que estimulam a síntese de matriz extracelular (BHANOT & ALEX, 2002), são importantes para diferenciação em muitas linhagens celulares, além de serem extremamente caros de se adquirir.

# Objetivos

O desafio do presente trabalho foi definir o uso do PRP como arcabouço 3D para cultura celular quanto à sua forma, concentrações de reagentes e determinação do número máximo de dias que o gel se mantém firme na presença do meio de cultura.

## Materiais e Métodos

Utilizou-se no presente trabalho 5 coelhos Nova Zelândia, e o mesmo está aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição segundo o protocolo 626. Todos os procedimentos foram conduzidos em condições estéreis. O PRP foi obtido através de centrifugação de sangue total (obtido por punção cardíaca) a 1000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o PRP foi aliquoteado em tubos cônicos de 15mL e uma amostra (200µL) foi levada para determinação do número de plaquetas em contador automático Micros60 HoribaABX<sup>®</sup>. Uma vez separado em volumes de 2,3mL foram preparados os géis, utilizando-se concentração fixa de gluconato de cálcio e concentrações variadas de trombina em placas de Petri. Foram testados os géis a partir de PRP fresco e PRP descongelado.

São propostas duas formas para os géis: um mais volumoso, e um tapete mais uniforme e com menos volume (mas ainda em 3D). Estas formas foram obtidas da seguinte maneira: após adicionar o gluconato de cálcio (GC) e a trombina ao PRP no tubo cônico de 15mL, podia-se esperar a solidificação para depois colocar o gel na placa de petri, obtendo-se desta forma o gel *Sphere*; ou então logo após adicionar GC e trombina ao PRP no tubo vertia-se o conteúdo na placa, de modo que este cobrisse toda a extensão da mesma e solidificasse como um tapete, denominado gel *Carpet*.

O meio de cultura utilizado foi DMEM High Glicose (Gibco<sup>®</sup>) 10% soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup>) suplementado com L-glutamina (Gibco<sup>®</sup>) e antibiótico/antimicótico (Gibco<sup>®</sup>), o qual foi trocado uma vez por semana. As placas estiveram em estufa de CO<sub>2</sub> 5% (Thermo<sup>®</sup>) por toda a duração do experimento. Efetuou-se registro fotográfico (Canon PowerShotA620<sup>®</sup>) durante os três primeiros dias, e no último dia. A observação das placas, a olho nu e ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert<sup>®</sup>) foi feita diariamente. Além disso, registrou-se as imagens das placas ao microscópio para verificação da microestrutura dos géis formados.

## Resultados

A contagem de plaquetas obtidas variou entre  $442 \times 10^3/\text{mm}^3$  e  $513 \times 10^3/\text{mm}^3$ . O tempo de formação do gel variou entre 5 segundos (com concentração de trombina 6X) até 40-45 segundos (com as menores concentrações, de 1X e 2X). Os géis tiveram vida útil de 20 dias. Os géis *Sphere* (Figura 1) apresentaram áreas escuras ao microscópio invertido (Figura 2), enquanto os géis *Carpet* (Figuras 3 e 4) não as apresentaram (Figura 5). O gel feito com plaquetas descongeladas (Figura 6) apresentou visualização facilitada ao microscópio em relação ao com plaquetas frescas.



Figura 1: Géis *Sphere* 1X, 2X e 3X Trombina, respectivamente. Volume=2,3mL.



Figura 2: Fotomicroscopia do gel *Sphere* X Trombina. Notar as áreas de visualização prejudicada. Volume =2,3mL.



Figura 3: Géis *Carpet* 1X e 2X Trombina. Volume=2,3mL.

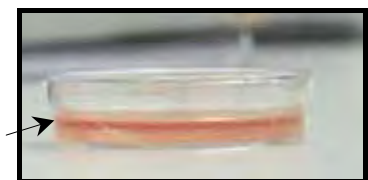


Figura 4: Gel *Carpet* 1X Trombina. Seta: interface gel/meio de cultura. Volume 4,6mL.



Figura 5: Fotomicroscopia do Gel *Carpet* 1X. Notar a ausência de áreas de visualização prejudicada.



Figura 6: Fotomicroscopia do Gel *Carpet* com plaquetas descongeladas. Notar área de fácil visualização.

## Discussão

Todos os géis produzidos solidificaram pela ação do gluconato de cálcio e da trombina. As duas propostas para os géis (*Sphere* e *Carpet*) apresentaram estrutura

3D tendo assim o primeiro requisito para um bom *scaffold* alcançado. Os dois modelos evidenciam pontos positivos e negativos: o gel *Sphere* não aderiu à placa de cultura, assim foi mais fácil trocar o meio sem danificar o gel e para fazer uma análise histológica bastaria retirá-lo da placa de cultura. Entretanto, a visualização ao microscópio é mais difícil, devido ao maior volume que produziu as áreas escuras obtidas nas fotomicroscopias (Figura 2), onde seria impossível de visualizar quaisquer células que ali estivessem. Foi observada uma retração no tamanho do gel no segundo dia. Em um projeto piloto a ser realizado, o PRP será diluído antes da formação do gel *Sphere*, para investigar se é possível obter um gel translúcido. O gel *Carpet* se mostrou mais homogêneo, íntegro, não houve retração ou áreas escuras ao microscópio (Figura 5). Em um processo de cultura celular isso significa grandes vantagens, já que uma das principais ferramentas é a análise diária das placas por microscopia. Como pontos negativos, cita-se a aderência à placa, o que dificulta a troca do meio de cultura (particularmente com bomba a vácuo); além disso, cita-se também a dificuldade em retirar o gel da placa quando se quer analisá-lo histologicamente.

Quanto às concentrações de trombina utilizadas, observou-se que todas eram suficientes para ativar a agregação plaquetária e formar o gel. O único fator que variou mediante as diferentes concentrações foi o tempo de formação do gel, que diminuiu quando se aumentou a dose de trombina. Isso explica a utilização de apenas duas concentrações testadas nos géis *Carpet* (1X e 2X).

O gel *Carpet* produzido com o dobro do volume de PRP (4,6mL) se mostrou mais firme e fácil de manejar - em relação aos géis *Carpet* com 2,6mL de PRP - nas trocas de meio de cultura por ser mais evidente a interface gel/meio, sem ter prejudicado o processo de investigação diária por microscopia. O gel feito com plaquetas descongeladas apresenta a vantagem de fornecer melhores condições de visualização microscópica, devido à ruptura das plaquetas durante o descongelamento, assim como a liberação dos fatores de crescimento dos grânulos- $\alpha$ .

Todos os géis se mantiveram firmes por pelo menos 20 dias em estufa, quando foram descartados. O vigésimo dia foi considerado como o último neste trabalho, já que três semanas são suficientes para conduzir um experimento em cultura celular, mas é provável que os géis tenham uma vida útil de aproximadamente 30 dias.

## Conclusão

Este trabalho representa uma inovação na tecnologia de produção de *scaffolds* 3D para cultura celular, pois é pioneiro ao utilizar as plaquetas diretamente no suporte mecânico às células. São evidentes as vantagens das plaquetas neste campo da ciência, em relação a muitos outros *scaffolds* 3D atualmente utilizados, muitos dos quais já estão consagrados, como as pérolas de alginato. Aos autores, esta primeira experiência com as plaquetas se mostrou muito promissora, pois se conseguiu criar com êxito dois modelos de utilização do gel de plaquetas como *scaffolds* 3D para cultura celular: *Sphere* e *Carpet*. Ambos se mostraram eficientes em criar ambientes 3D, aparentemente porosos, sendo necessários alguns ajustes para melhorar o microambiente para as células, em ambos os modelos. Os autores acreditam que o modelo *Sphere* pode ser melhorado apenas com a utilização de menores volumes de PRP (com a conseguinte formação de pérolas de plaquetas) ou então com uma diluição, o que em ambos os casos levará a uma diminuição no número de plaquetas utilizados e melhora exponencial na visualização das células por microscopia invertida. Entretanto somente novos experimentos, com a utilização de células, podem responder a essa questão. O gel *Carpet* também pode ser melhorado no sentido de buscar um volume ótimo de plaquetas, que forneça boas condições de investigação microscópica e microambiente favorável às células, sendo também necessários novos experimentos, com células, para alcançar este objetivo. Como considerações finais, o presente trabalho abre um novo caminho na ciência de produção de arcabouços 3D, o qual necessita ser trilhado para se consolidar em uma nova e eficiente rota da tecnologia de produção de arcabouços 3D para a medicina reparadora de órgão e tecidos. O uso do PRP no *scaffold* surge como promissor aliado na cultura celular, em especial de cartilagem, por dois motivos fundamentais: 1) possibilidade de utilizar material autólogo, onde o *scaffold* é preparado com material oriundo do próprio paciente, facilitando a etapa de integração do futuro implante; 2) de ser a plaqueta e o PRP ricos em fatores de crescimento celular que atuam endogenamente, não criando riscos outros para o paciente.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao apoio da equipe do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da FMB, bem como ao Laboratório Experimental de Cirurgia e Ortopedia, em especial ao Sr. Ednélson Henrique Bianchi, pelo excelente auxílio técnico.

## **Referências**

- 1- Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 1982. Volume 30, 215-224.
- 2- Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plastic Surgery*, 2002. Volume 18, 27-33.
- 3- Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schimid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJMA. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell Sci*, 1994. Volume 107, 17-27.
- 4- Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 2005. Volume 4, 518-524.
- 5- Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. Volume 99, 9996-10001.
- 6- Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 2005. Volume 26, 419-431.
- 7- Tsang VL, Bhatia SN. Fabrication of three-dimensional tissues. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2007. Volume 103:189-205.