

Andrei Moroz

Avaliação de novas propostas em arcabouços tridimensionais  
(3D) para cultura de células-tronco mesenquimais e  
condrogênese.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, curso de Mestrado Profissional do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Médica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elenice Deffune

Botucatu  
2009



*Dedico este trabalho aos principais responsáveis, as pessoas que com seu esforço e dedicação integral e de uma vida inteira, fizeram com que ele fosse nada mais do que sua merecida recompensa, demarcando de forma incontestável seu triunfo e vitória como pais e formadores de caráter! Aos meus pais, com muito orgulho, dedico este trabalho.*

## *Agradecimentos*

*Aos meus pais Alexandre e Mara, pelo exemplo de comprometimento e dedicação, apoio e confiança dedicados. Por serem minha bússola, que orienta meu caminho e trajetória, e fonte de carinho e amor inesgotável!*

*A minha mãe, Mara, a melhor mãe que eu poderia ter desejado, pessoa cujo amor e carinho são imensuráveis, muitas vezes tendo se prejudicado para poder tornar a vida do próximo menos sofrida. Minha mãe, tenha em mente que você é uma mulher especial, extraordinária, que tem o poder de colocar as coisas em equilíbrio e somente com um olhar e uma palavra consegue acalmar o mais aflito dos corações. Pessoas assim são raras.*

*Ao meu pai, Alexandre, que é um exemplo de pessoa comprometida e honesta, cuja educação impecável sempre me inspirou a melhoria como profissional e, mais recentemente, como pai de família. Obrigado pelo apoio e carinho! Ser seu filho é motivo de orgulho!*

*Ao meu irmão, Ivan, que mesmo a um Oceano Atlântico de distância sempre se interessou e se preocupou pela minha vida acadêmica e pessoal!*

*A minha esposa, Denise, meu amor! A própria personificação da garra humana, que eleva as pessoas a patamares incríveis. Ter tido você como companheira foi essencial para que eu pudesse realizar tudo que consegui, e pelo seu apoio incondicional sou eternamente*

*grato! É meu desejo que consiga todas as glórias e conquistas que merece, e ressalto que terá todo o meu apoio, assim como tive o seu.*

*A minha filha, Maria Giulia “Juju” que, mesmo sem entender, foi fonte de todo o meu esforço, e incontáveis vezes me renovou o espírito, apenas com um lindo sorriso, um beijinho e um abraço.*

*Ao Ademir Alonso e Terezinha Alonso, pela confiança, amizade e apoio durante toda a minha carreira.*

*A querida professora Elenice Deffune, por ter-me proporcionado autonomia para a realização deste trabalho, me incentivando a buscar as respostas e soluções às questões e problemas encontrados, lapidando-me de forma elegante, em um pesquisador.*

*Por ter sido conselheira, amiga, mãe, irmã, e todos os outros papéis desempenhados, sempre com a maior sabedoria. Por compartilhar seus conhecimentos infinitos e preciosos. Mas, sobretudo, agradeço a enorme confiança depositada, ao apoio, e ao amor e ternura que uma grande mãe tem, e mesmo com 17 filhos, ainda compartilha com seus alunos.*

*Ao professor Sérgio Felisbino, pela parceria produtiva e prazerosa, tendo-me apresentado os mistérios da histologia, e ao ceder espaço em seu laboratório me ajudou a enxergar, junto com minha orientadora, os próximos passos a serem dados em minha vida. Obrigado pela amizade e confiança, e torno compromisso que nossa parceria continue sendo como sempre foi!*

*A professora Rosana Rossi, pela amizade, apoio e momentos de presteza no laboratório.*

*Ao professor Sidnei, por ceder a celulose bacteriana em seu estado úmido.*

*A Renata Bittencourt, por ter me orientado e desde 2004 compartilhado seus conhecimentos, sem dúvida contribuindo em muito para a execução deste trabalho.*

*A Márjorie Golim, pelo bom humor ao me receber inúmeras vezes pedindo análises “para ontem”, tendo sempre me ajudado com as mesmas, pela amizade e orientações que me ajudaram a prosseguir. Você é “dez”!*

*Ao Luis Justulin pelo apoio e auxílio durante todas as vezes que eu fui ao Departamento de Morfologia.*

*Ao Ednelson Bianchi, pelo grande apoio técnico prestado nas coletas de medula óssea, e por sempre ter me tratado como um amigo próximo, por ter me ajudado a dar os primeiros passos neste trabalho. Continue sendo um homem de grande fé.*

*À Fátima “Tata” Guimarães, pelo apoio durante a produção do anticorpo monoclonal, exemplo de pessoa que ama seu trabalho, e o faz sempre com muito prazer. Pessoa que eu nunca vi, em 7 anos de convívio, de mau humor ou irritada! Valeu Tata!*

*À Valéria “Leia” Alves, pelo apoio e amizade!*

*A auxiliar acadêmica Sueli, ao técnico Ricardo e ao aluno de graduação Alexandre, do departamento de Morfologia, pelo apoio nas confecções das primeiras e últimas lâminas histológicas.*

*Às colegas do mestrado, Gabrielle e Vitória pela amizade e apoio durante os dois anos de árduo trabalho! Valeu “xuxus”!*

*À colega Josy Vicentini, pela amizade e presteza nos testes de ELISA.*

*À colega Marina, aluna egressa do Mestrado Profissional, pela amizade e apoio durante as padronizações dos tratamentos enzimáticos, e por compartilhar seus conhecimentos.*

*Ao Alexandre Fagner por sempre ter me ajudado com palavras de apoio e pela presteza em esterilizar, sempre de forma impecável, os materiais utilizados. Exemplo de trabalhador honesto e dedicado, grande amigo.*

*Ao Renan “Patrick” Padrón, Armando Carvalho e Daniel Jesuíno pela amizade e momentos de descontração, muito importantes durante um serviço sério para que os resultados sempre se tornem mais proveitosos.*

*À colega Priscila Murador pela amizade.*

*A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica, pelos inestimáveis conhecimentos adquiridos, obrigado.*

*A todo o corpo docente do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos, onde dei meus primeiros passos para tornar-me um biólogo.*

*A todos os funcionários do Hemocentro de Botucatu, em especial ao Valdir Cruz.*

*Aos 25 coelhos e 5 camundongos sacrificados para a realização deste trabalho.*

*“São onze os supliciados. A queima já vai adiantada, os rostos mal se distinguem. Naquele extremo arde um homem a quem falta a mão esquerda. Talvez por ter a barba enegrecida, prodígio cosmético da fuligem, parece mais novo. E uma nuvem fechada está no centro do seu corpo. Então Blimunda disse, Vem. Desprendeu-se a vontade de Baltasar Sete-Sóis, mas não subiu para as estrelas, se à terra pertencia e a Blimunda.”*

*Memorial do Convento, José Saramago*

*Lista de Abreviações*

<i>3D</i> : tridimensional	<i>IgG</i> : imunoglobulina G
<i>AcMm</i> : anticorpo monoclonal murino	<i>IgM</i> : imunoglobulina M
<i>BACTCELL3D</i> : arcabouço de celulose	<i>ITS</i> : insulina, transferrina, ácido selênio
<i>BIOGEL3D</i> : arcabouço a base de PRP	<i>LMN</i> : linfomononuclear
<i>BMP-2</i> : <i>bone morphogenetic protein</i>	<i>MC</i> : meio de cultura
<i>CaCl<sub>2</sub></i> : cloreto de cálcio	<i>MEC</i> : matriz extracelular
<i>CDs</i> : <i>clusters of differentiation</i>	<i>MIAMI</i> : <i>marrow-isolated adult multilineage inducible cells</i>
<i>CPDA</i> : citrato fosfato destrose adenina	<i>MMM</i> : mieloma múltiplo murino
<i>CTMs</i> : células-tronco mesenquimais	<i>MO</i> : medula óssea
<i>DMEM</i> : <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>	<i>mp</i> : membrana plasmática
<i>DMSO</i> : dimetilsulfóxido	<i>MSC</i> : <i>mesenchymal stem cell</i>
<i>EDTA</i> : ácido etilenodiamino tetra-acético	<i>N<sub>2</sub></i> : nitrogênio líquido
<i>ELISA</i> : <i>enzyme-linked immunoabsorbant assay</i>	<i>PBS</i> : <i>phosphate buffered saline</i>
<i>FGF</i> : fator de crescimento fibroblastóide	<i>PDGF</i> : fator de crescimento derivado da plaqueta
<i>FITC</i> : isotiocianato de fluoresceína	<i>ph1</i> : contraste de fase 1
<i>FMB</i> : Faculdade de Medicina de Botucatu	<i>ph2</i> : contraste de fase 2
<i>GC</i> : gluconato de cálcio	<i>PRP</i> : plasma rico em plaquetas
<i>HEPES</i> : Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico	<i>RPMI</i> : meio de cultura <i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
<i>H&amp;E</i> : hematoxilina e eosina	<i>SFB</i> : soro fetal bovino
<i>HGPRT</i> : Hipoxantina-Ribosina-Fosforibosil-transferase	<i>SNC</i> : sobrenadante de cultura
<i>IBB</i> : Instituto de Biociências de Botucatu	<i>TGF</i> : fator de crescimento transformador
<i>IGF</i> : fator de crescimento da insulina	



*Lista de Figuras*

- Figura 1:** Aderência inicial das CTMs. Objetiva de 5x em contraste de fase ph1.....51
- Figura 2:** Colônia resultante da multiplicação celular. Objetiva de 5x em contraste de fase ph1.....51
- Figura 3:** CTMs em confluência 80%. Objetiva de 10x em contraste de fase ph2.....51
- Figura 4:** Morfologia tipicamente fibroblastóide das CTMs. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1. ....51
- Figura 5:** CTM com seu núcleo e nucléolos (Seta). Objetiva de 40x em contraste de fase ph2.....51
- Figura 6:** Morfologia prismática e volume celular aumentado, após 1ª passagem em trip sina. Objetiva de 40x em contraste de fase ph2.....51
- Figura 7:** CTMs do animal 1 de G5. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1.....55
- Figura 8:** CTMs do animal 2 de G5. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1.....55
- Figura 9:** CTMs do animal 3 de G5. Objetiva de 20x em contraste de fase ph1.....55
- Figura 10:** CTMs do animal 4 de G5. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1.....55

<b>Figura 11:</b> CTMs do animal 5 de G5. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1.....	56
<b>Figura 12:</b> Géis Pérola 1X, 2X e 3X Trombina, (A,B,C) respectivamente.....	58
<b>Figura 13:</b> Microestrutura do gel Pérola (1X) Trombina. Notar as áreas opacas (A). Objetiva de 10x.....	58
<b>Figura 14:</b> Géis Tapete 1X (A) e 2X Trombina (B).....	58
<b>Figura 15:</b> Gel Tapete 1X Trombina.....	58
<b>Figura 16:</b> Microestrutura do Gel Tapete 1X. Notar as áreas translúcidas (A). Objetiva de 10x.....	58
<b>Figura 17:</b> Microestrutura do Gel Tapete com plaquetas descongeladas. Objetiva de 10x.....	58
<b>Figura 18:</b> Pérola de alginato e distribuição celular uniforme. Objetiva de 5x e ph2..	61
<b>Figura 19:</b> Pérola de BIOGEL3D e distribuição celular uniforme.....	61
Objetiva de 10x e ph1.....	61
<b>Figura 20:</b> Pérola de celulose e distribuição celular concentrada no ponto de aplicação único. Objetiva de 5x e ph2.....	61
<b>Figura 21:</b> Pérola de celulose após múltiplas injeções. Mesmo padrão de distribuição da figura anterior. Objetiva de 10x e ph1.....	61
<b>Figura 22:</b> Célula e sua lacuna produzida em pérola de alginato. Objetiva de 20x e ph2.....	62
<b>Figura 23:</b> Célula e sua lacuna produzida em pérola de BIOGEL3D. Objetiva de 20x e ph2.....	62

<b>Figura 24:</b> Grupo de 3 células em divisão mitótica. Notar a semelhança aos grupos isógenos. Pérola de alginato. Objetiva de 20x.....	62
<b>Figura 25:</b> Grupo de 3 células em divisão mitótica. Mesmo padrão da figura anterior. Pérola de BIOGEL3D. Objetiva de 20x.....	62
<b>Figura 26:</b> Pérola de alginato e células com morfologia arredondada. Objetiva de 5x e ph1.....	62
<b>Figura 27:</b> Pérola de BIOGEL3D e células morfologicamente arredondadas. Objetiva de 10x e ph1.....	62
<b>Figura 28:</b> Pérola de celulose e células com morfologia arredondada. Objetiva de 40x e ph1.....	63
<b>Figura 29:</b> Morfologia fibroblastóide em área da pérola de BIOGEL3D. Objetiva de 10x e ph1.....	63
<b>Figura 30:</b> Secção histológica de arcabouço de BIOGEL3D. Seta: célula com mp enrugada. Objetiva de 40x e ph2. H&E.....	65
<b>Figura 31:</b> Célula e sua mp fragmentada devido ao processo falho de fixação. Objetiva de 40x e ph2. H&E.....	65
<b>Figura 32:</b> Célula e seu núcleo picnótico. Objetiva de 20x e ph1. H&E.....	66
<b>Figura 33:</b> Secção histológica do BIOGEL 3D mostrando pouca celularidade. Objetiva de 40x e ph2. H&E.....	66
<b>Figura 34:</b> Duas células (seta) inseridas em lacuna lembrando os grupos isógenos da cartilagem nativa. Objetiva de 20x e ph1. H&E.....	66

<b>Figura 35:</b> Quatro células (seta) inseridas em lacuna relembrando os grupos isógenos da cartilagem nativa. Objetiva de 40x e ph2. H&E.....	66
<b>Figura 36:</b> Célula em lacuna (seta) formada no BIOGEL3D. Objetiva de 40x e ph2. H&E.....	66
<b>Figura 37:</b> Célula inserida no BIOGEL3D. Núcleo (seta) e gotículas de lipídio (cabeça de seta). Objetiva de 100x. H&E.....	66
<b>Figura 38:</b> Linfócitos e mieloma ao microscópio invertido. Objetiva de 10x e ph1.....	67
<b>Figura 39:</b> Linfócitos e mieloma ao microscópio invertido. Objetiva de 40x e ph2.....	67
<b>Figura 40:</b> Aspecto morfológico de um híbrido obtido e testado. Objetiva de 40x e ph2.....	69
<b>Figura 41:</b> Método de microencapsulação das CTMs em scaffold de alginato de sódio.....	77
<b>Figura 42:</b> Produção dos receptáculos para o scaffold de BIOGEL3D.....	77
<b>Figura 43:</b> Produz-se a pérola de BIOGEL depositando-se o PRP/CTMs/trombina nos receptáculos.....	77
<b>Figura 44:</b> Pérolas de BIOGEL aguardando a gelificação.....	77
<b>Figura 45:</b> Após a completa gelificação retira-se o scaffold com uma pinça estéril....	77
<b>Figura 46:</b> Aspecto das pérolas de BIOGEL produzidas antes da adição do meio de cultura.....	77
<b>Figura 47:</b> Pérola de celulose pura.....	78

<b>Figura 48:</b> Preparo da placa para a transferência das CTMs.....	78
<b>Figura 49:</b> Aspiração das CTMs da gota de MC.....	78
<b>Figura 50:</b> Injeção das CTMs na pérola de celulose.....	78
<b>Figura 51:</b> CTMs já microencapsuladas na pérola de celulose. Observe a mudança da cor.....	78

*Lista de Gráficos e Quadros*

**Gráfico 1:** Viabilidade média nas diferentes e principais etapas de cultura das CTMs.....52

**Gráfico 2:** Relação entre grupo experimental e média do total de células obtidas.....53

**Gráfico 3:** Tempo de cultura até confluência 80% e 1ª passagem em tripsina (Animais 1 a 5= G1; Animais 6 a 10= G2; Animais 11 a 15= G3; Animais 16 a 20=G4).....54

**Gráfico 4:** Relação entre volume aspirado e tempo médio para 1ª passagem.....54

**Quadro 1:** Diferentes grupos de estudo e o respectivo volume de medula óssea coletado.....38

**Quadro 2:** Determinação da quantidade de plaquetas nas amostras de sangue coletadas e após a separação do PRP.....57

**Quadro 3:** Híbridos obtidos, testados, cobertura de screening e retidos finais.....70

**Quadro 4:** Híbridos obtidos, positividade no primeiro e último teste do screening e classe de imunoglobulina mais expressiva.....71

## *Resumo*

*Avaliação de novas propostas em arcabouços tridimensionais (3D) para cultura de células-tronco mesenquimais e condrogênese.*

**Introdução:** Levando-se em consideração avanços tecnológicos na área médica e o impacto dos programas de saúde que determinaram curvas de longevidade cada vez maiores e taxas de natalidade cada vez menores, o novo desafio do gestor público são as conseqüências: o envelhecimento e a vida como uma “doença crônica”. Entre os principais desafios está a abordagem das doenças crônico-degenerativas que determinam o aumento de lesões cartilagosas articulares. A débil capacidade de regeneração e as limitações das alternativas de tratamento fazem as técnicas derivadas da biotecnologia, como o transplante autólogo de condrócitos (TAC) e o uso de células-tronco, o foco das investigações. O TAC requer coleta de material cartilaginoso de área sadia, podendo causar nova lesão; no entanto, pode-se evitar este perigo com o uso de células-tronco. As células-tronco mesenquimais, adultas, podem se diferenciar em condrócitos mediante o uso de meio de cultura específico em consonância a um arcabouço 3D, mas muitos problemas como evitar a calcificação e estimular a condrogênese em meio favorável constituem o desafio para os pesquisadores na atualidade. **Objetivos:** 1) produzir anticorpo monoclonal específico a CTMs de coelho para monitorá-las, 2) determinar o volume ideal de coleta de medula óssea para microencapsulação e condrogênese, 3) realizar a microencapsulação das CTMs em novos arcabouços: BIOGEL3D e BACTCELL3D, comparando seu desempenho com o modelo clássico em alginato. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 25 coelhos Nova Zelândia sendo divididos em diferentes grupos em função do volume de MO coletado: G1 = 6mL, G2 = 9mL, G3 = 12mL, G4 = 15mL e G5 = volume ideal de coleta determinado pelos indicadores dos outros grupos. O material coletado foi diluído 1:2 em RPMI 1640 com 3.000U de heparina sódica. Após a contagem celular, as amostras foram submetidas a

separação em gradiente de densidade para a obtenção da camada linfomononuclear (LMN). As LMNs foram plaqueadas para se obter a expansão das CTMs, em DMEM Knockout™ (Invitrogen®) suplementado por: 5mL de antibiótico/antimicótico (Invitrogen®), 5mL de L-glutamina (Invitrogen®), 5mL de aminoácidos essenciais (Invitrogen®), 2,5mL de aminoácidos não-essenciais (Invitrogen®) e 50mL de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen®). As células permaneceram em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Class 100®). Além da viabilidade avaliada por azul de tripano, outros indicadores de qualidade foram considerados para seleção do melhor volume de coleta para cada grupo: o número médio obtido de células da fração LMN; morfologia celular e o tempo médio para primeira passagem em tripsina. As CTMs cultivadas foram criopreservadas e utilizadas para a etapa de produção de AcMm. As CTMs foram então microencapsuladas em pérolas de BIOGEL3D, BACTCELL3D e alginato, e induzidas à condrogênese mediante uso de meio de cultura específico. **Resultados e Discussão:** Na etapa de produção de AcMm anti-CTM foram realizados 2592 híbridos, testados 587 e destes, selecionados como híbridos de interesse 6 células. Destas, 1 é da classe IgG, outra IgM e 4 outras deverão ser clonadas e na condição de híbridos expressam tanto IgG como IgM. Quanto à microencapsulação das CTMs, para todos os modelos a quantidade encapsulada foi de  $1 \times 10^5$  células. O arcabouço BIOGEL3D induziu as células à condrogênese e permitiu a multiplicação celular, enquanto BACTCELL3D não teve a mesma performance. O volume ideal de coleta foi 12mL de aspirado de medula óssea. **CONCLUSÕES:** BIOGEL3D é uma alternativa eficaz, enquanto BACTCELL3D precisa de modificações para tanto. Os híbridos obtidos, após clonagem e caracterização, tornar-se-ão importantes ferramentas de caracterização das CTMs.

*Palavras-chave:* arcabouços 3D, células-tronco mesenquimais, condrogênese.



## *Abstract*

*Evaluation of two novel proposals of three dimensional (3D) scaffolds for mesenchymal stem cell culture and chondrogenesis.*

**Introduction:** Technological advances in the medical area combined with the impact of health programs that enhance longevity, together with lower natality rates created new challenges to the public manager such as aging and life as a “chronic disease”. Among the major problems are the chronic degenerative diseases that increase articular lesions. The limited regeneration capabilities and the limitations of actual treatment alternatives made biotechnology derived techniques the focus of investigations. The autologous chondrocyte transplantation (ACT) requires a small biopsy of health cartilage, which can lead to a new lesion. However, the use of stem cells can avoid this possibility. Mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into chondrocytes by using a specific culture medium together with a 3D scaffold, but some questions such as the risks of calcification remain as key factors to researchers. **Objectives:** 1) to produce a monoclonal antibody that recognizes MSCs in order to characterize them, 2) to determine the optimal bone marrow collection volume for cell microencapsulation and chondrogenesis and 3) to microencapsulate MSCs in two novel scaffolds: BIOGEL3D and BACTCELL3D, comparing them with sodium alginate. **Materials and Methods:** 25 New Zealand rabbits were divided into 5 groups related to bone marrow collection volume: G1 = 6mL, G2 = 9mL, G3 = 12mL, G4 = 15mL and G5 = optimal volume determined by the study. The collected material was diluted in RPMI1640 medium 1:2, with 3000U sodium heparin. After cell count and viability assessment the samples were submitted to density gradient centrifugation in order to isolate the lymphomononuclear (LMN) fraction. These cells were seeded to obtain and expand the MSCs in DMEM Knockout<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) supplemented with antibiotic/antimycotic, L-glutamine, essential aminoacids, non essential aminoacids and fetal bovine serum (all from

Invitrogen™). The cells were cultivated in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in an incubator (Thermo Class 100®). Along with viability other indicators were studied to determine the optimal volume of collection: the average number of LMN cells obtained, cell morphology and the average time required to first passage in trypsin. The MSCs cultivated were cryopreserved and used to produce the monoclonal antibody. The MSCs obtained from G5 were microencapsulated into the scaffolds: BIOGEL3D, BACTCELL3D and sodium alginate and induced to chondrogenesis using a defined culture medium. **Results and Discussion:** During the production of the monoclonal antibody, 2592 hybridomas were obtained, 587 were tested leading to 6 final hybridomas retained. Among these cells, 1 expressed IgM, 1 expressed IgG and 4 expressed IgM and IgG. Regarding MSCs microencapsulation, all scaffolds received 1x10<sup>5</sup> cells. BIOGEL3D induced MSCs toward chondrogenesis and allowed cell proliferation. BACTCELL3D did not show the same performance. The best bone marrow collection volume was 12mL. **Conclusions:** BIOGEL3D is an effective proposal, while BACTCELL3D needs adjustments to achieve the same status. The hybridomas obtained shall be important tools to study MSCs after cloning and further characterization.

*Key words:* scaffolds 3D, mesenchymal stem cells, chondrogenesis.

*Sumário*

**Dedicatória**

**Agradecimentos**

**Epígrafe**

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de Figuras**

**Lista de Gráficos e Quadros**

**Lista de Abreviações**

**I) Introdução**

O tecido cartilaginoso.....	21
Lesões articulares e terapêutica.....	22
Células-tronco mesenquimais.....	25
Células-tronco e condrogênese.....	29
Arcabouços 3D.....	30
Inovações em modelos de arcabouços 3D.....	31
O novo modelo em arcabouços 3D: BIOGEL3D.....	31
Gel de plaquetas.....	32
Celulose bacteriana úmida.....	33

<b>II) Objetivos.....</b>	<b>34</b>
<b>III) Materiais e Métodos</b>	
Instalações.....	35
Animais.....	36
Etapa 1 - Análise de novos arcabouços 3D	
1.1) Coleta de medula óssea.....	37
1.2) Determinação do volume ideal para coleta de medula óssea.....	38
1.3) Expansão in vitro de células-tronco mesenquimais.....	39
1.4) Obtenção de PRP para confecção do arcabouço 3D.....	39
1.5) Determinação quantitativa dos níveis de PDGF-ββ dos PRPs.....	40
1.6) Determinação inicial da forma do arcabouço BIOGEL3D.....	40
1.7) Microencapsulação das células-tronco mesenquimais e diferenciação condrogênica.....	41
1.8) Análise histológica.....	43
Etapa 2 - Produção de anticorpo monoclonal anti-CTM	
2.1) Protocolo de imunização.....	45
2.2) Fusão celular.....	46
2.3) Identificação dos híbridos obtidos.....	46
2.4) Screening dos híbridos obtidos.....	47
2.5) Análise dos resultados do screening.....	47
2.6) Reteste dos híbridos secretores.....	48
<b>IV) Resultados e Discussão</b>	
Etapa 1 - Análise de novos arcabouços 3D	
1.1) Coleta de medula óssea e isolamento das células-tronco mesenquimais.....	49

1.2) Expansão <i>in vitro</i> de células-tronco mesenquimais.....	49
1.3) Determinação do volume ideal de coleta de MO.....	52
1.4) Morfologia das CTMs para microencapsulação dos arcabouços 3D (G5) .....	55
1.5) Obtenção de plasma rico em plaquetas.....	56
1.6) Determinação quantitativa dos níveis de PDGF-ββ dos PRPs.....	57
1.7) Determinação inicial da forma do arcabouço BIOGEL3D.....	57
1.8) Microencapsulação das CTM e diferenciação condrogênica.....	59
1.9) Análise histológica.....	63
Etapa 2 - Produção de anticorpo monoclonal anti-CTM.....	67
<b>V) Conclusões.....</b>	<b>71</b>
<b>VI) Referências Bibliográficas.....</b>	<b>72</b>
<b>VII) Anexos.....</b>	<b>77</b>

## **Introdução**

### *O tecido cartilaginoso*

O tecido cartilaginoso corresponde a uma das especializações do tecido conjuntivo, apresentando consistência rígida. Entre suas funções estão suporte de tecidos moles, revestimento de superfícies articulares, absorção de choques mecânicos nestas articulações, amenização de desgaste dos ossos além de desempenhar papel importante no crescimento dos ossos longos. Suas células características são os condrócitos, células estas especializadas, responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular. Classicamente citam-se três tipos de cartilagem: hialina, elástica e a fibrocartilagem (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). No entanto, o tipo celular é o mesmo, com variabilidade identificada com relação ao número de células e aos aspectos biossintéticos associados à formação de diferentes arranjos da matriz extracelular. A estrutura relativamente simples esconde uma célula altamente diferenciada, construtora solitária de um tecido único, o qual precisa ser firme e maleável ao mesmo tempo (FELISBINO & CARVALHO, 2005). Os condrócitos têm forma esférica ou ovóide, com núcleo central e nucléolo bem desenvolvido nas cartilagens em crescimento ativo. Não há junções intercelulares, pelo fato de serem circundados por abundante matriz extracelular. De modo geral, a matriz do tecido cartilaginoso é formada pela substância fundamental amorfa – glicosaminoglicanas combinadas de proteínas formando os agregados de proteoglicanas – e fibrilas de colágeno (FELISBINO & CARVALHO, 2005).

Cada proteoglicana consiste de um eixo central protéico e de uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanas ligadas covalentemente ao eixo. As principais glicosaminoglicanas encontradas são: hialuronam, condroitim sulfato, queratan sulfato, dermatam sulfato e

heparam sulfato, este último em menor quantidade. As diferentes concentrações destas substâncias são, entre outros fatores, o que diferenciam os três tipos de cartilagem (FELISBINO & CARVALHO, 2005).

Existem dois tipos de proteoglicanas de maior relevância, a grande proteoglicana agrecom, e as pequenas proteoglicanas decorim, biglicam, fibromodulim, lumicam, epificam, perlecam (típico de membranas basais) e das proteoglicanas de superfície celular sindecam e glipicam (FELISBINO & CARVALHO, 2005).

Outro componente da matriz extracelular são as fibrilas de colágeno. O colágeno mais abundante na cartilagem hialina é o tipo II, principal componente das fibrilas, que serve como marcador da diferenciação dos condrócitos. O colágeno tipo IX e o colágeno tipo XI estão associados às fibrilas de colágeno. O colágeno tipo VI forma as microfibrilas presentes na cartilagem e está concentrado na matriz pericelular. Sua função aparente é ancorar as células à matriz e organizar grupos de fibrilas de colágeno tipo II (FELISBINO & CARVALHO, 2005).

### *Lesões articulares e terapêutica*

A cartilagem articular possui pobre capacidade de regeneração (LAFEBER *et al.*, 1992; REDMAN *et al.*, 2005; TUAN, 2007). Nas lesões articulares existem dois grandes problemas a serem resolvidos. O primeiro é o preenchimento da área lesada por um tecido com propriedades mecânicas e fisiológicas semelhantes à cartilagem nativa. O segundo é a integração eficaz entre a área regenerada e o tecido sadio (REDMAN *et al.*, 2005). Mesmo uma pequena lesão pode levar à degeneração, causando um quadro de osteoartrite (REDMAN *et al.*, 2005). As lesões articulares são classificadas como defeitos de

profundidade parcial ou de profundidade total (REDMAN *et al.*, 2005). Quando a lesão é parcial, não atinge o osso subcondral, e se assemelha às fissuras iniciais do quadro de osteoartrite (REDMAN *et al.*, 2005). A lesão de profundidade parcial não se regenera de forma eficaz, o que se deve ao fato de não atingir o osso subcondral, não havendo acesso ao compartimento de células progenitoras da medula óssea (REDMAN *et al.*, 2005). Foi observado que ocorre uma resposta à lesão, na tentativa de reparar o defeito: as células adjacentes à borda da lesão entram em morte celular, e após 24 horas há um aumento da replicação celular e formação de *clusters* condrocíticos, além de aumento na síntese de matriz extracelular. Ocorre que esta resposta tem tempo de ação limitado e passageiro, acarretando falha do processo regenerativo (REDMAN *et al.*, 2005). O outro tipo de lesão articular, de profundidade total, ultrapassa a zona de cartilagem calcificada e atinge o osso subcondral. Quando ocorre resposta à lesão, forma-se um tecido semelhante à fibrocartilagem, mas que é um pobre substituto da cartilagem hialina. Por fim, ocorre degeneração do tecido regenerado e do tecido sadio circundante (REDMAN *et al.*, 2005).

As estratégias de reparo clássicas à disposição do ortopedista são: desbridamento, lavagem artroscópica, artroplastia por abrasão, perfuração de Pridie e microfatura. Desbridamento e lavagem artroscópica são usualmente utilizadas para aliviar a dor, sendo o desbridamento a retirada cirúrgica do tecido morto, e a lavagem artroscópica, a irrigação do local, o que permite aliviar a dor por um período prolongado (REDMAN *et al.*, 2005). Estas técnicas, todavia, não promovem a regeneração tecidual (REDMAN *et al.*, 2005), sendo indicadas para os estádios tardios da osteoartrite (JACKSON & DIETERICH, 2003). As outras três técnicas - artroplastia por abrasão, perfuração de Pridie e microfatura - são baseadas na capacidade das lesões de profundidade total possuírem regeneração parcial, por atingirem o osso subcondral e terem acesso ao compartimento de células-tronco da medula óssea;



assim, busca-se perfurar o osso para que ocorra extravasamento do conteúdo da medula óssea para a área da lesão (REDMAN *et al.*, 2005). Entretanto, a resposta obtida é semelhante à resposta natural daquelas lesões, ou seja, formação de tecido fibroso.

Como técnicas de vanguarda, listam-se o enxerto de tecidos moles, a transferência osteocondral e o transplante autólogo de condrócitos. Na primeira, é comum realizar-se enxerto de perióstio ou de pericôndrio em lesões de profundidade total. Relata-se que o efeito desses dois enxertos é similar e que há formação de tecido do tipo hialino (REDMAN *et al.*, 2005). A propriedade condrogênica do perióstio se deve à presença de células precursoras condrocíticas. Na segunda técnica, o material pode ser retirado de cadáveres, entretanto, materiais frescos são mais eficazes do que os congelados em relação a viabilidade celular e estabilidade mecânica (REDMAN *et al.*, 2005). Pode-se utilizar material autólogo, retirado de uma zona sem ação de carga, e transplantada para a zona do defeito articular. Este método é mais conhecido como MosaicPlasty<sup>TM</sup> e OATS<sup>TM</sup> e os resultados indicam alívio da dor e melhora da função articular (REDMAN *et al.*, 2005). Os questionamentos acerca desta técnica incluem a dúvida sobre a viabilidade celular seguida da extração e a capacidade do tecido transplantado em suportar carga, já que, originalmente, se encontrava em área livre de carga.

O transplante autólogo de condrócitos é, atualmente, a técnica que envolve mais tecnologia. Uma pequena amostra de tecido cartilaginoso sadio é coletada do paciente, geralmente por artroscopia, e enviada a um serviço de engenharia celular. A amostra passa por um processo de digestão enzimática da matriz extracelular, a fim de se isolarem as células. Estas células, uma vez isoladas, são expandidas *in vitro*, e inseridas em um arcabouço tridimensional (3D), sendo este posteriormente transplantado para a lesão articular. De modo geral, os

resultados mostram melhora da função articular, alívio da dor e formação de tecido cartilaginoso do tipo hialino (REDMAN *et al.*, 2005).

Em estudo de transplante autólogo de condrócitos foram comparados o hidrogel de alginato e o plasma rico em plaquetas como arcabouços carreadores dos condrócitos. Mostrou-se a eficácia da técnica em experimento com 30 coelhos (BITTENCOURT, 2008).

Não se sabe ao certo como os condrócitos implantados atuam no processo de regeneração (REDMAN *et al.*, 2005); além disso, há a possibilidade de se criar uma nova lesão ao se extrair a amostra inicial. Dessa forma, o ideal seria obter as células cartilaginosas para o implante de modo a evitar realização da coleta em área sadia. Obtendo-se células-tronco, expandindo-as em cultura e diferenciando-as em condrócitos, é possível realizar o implante e evitar os perigos inerentes à obtenção da amostra inicial. Neste caso particular, pode-se utilizar células-tronco adultas, pois existe uma população comprovadamente passível de diferenciação em células cartilaginosas (GUILLOT *et al.*, 2007). Trata-se das células-tronco mesenquimais, que podem ser facilmente isoladas da medula-óssea e do tecido adiposo e expandidas em cultura, conseguindo-se grande quantidade de células.

### *Células-tronco mesenquimais*

Além das células-tronco hematopoiéticas adultas, que originam progenitores linfóides e mielóides, a medula óssea possui células-tronco precursoras de tecidos não-hematopoiéticos, as células-tronco não-hematopoiéticas adultas (PROCKOP, 1997; RATAJCZAK *et al.*, 2007). Já foram relatadas pelo menos cinco populações de células-tronco não-hematopoiéticas adultas na medula óssea: células progenitoras endoteliais, células-tronco mesenquimais, células progenitoras adultas multipotentes, células MIAMI e,

mais recentemente, células-tronco muito pequenas semelhantes às embrionárias (RATAJCZAK *et al.*, 2007). Estas últimas possuem muitos marcadores de células-tronco embrionárias e podem se diferenciar em células das três camadas germinativas, o que define sua pluripotência.

Sabe-se que células-tronco hematopoiéticas e não-hematopoiéticas têm diferenças relevantes quanto ao fenótipo, com diferentes antígenos de superfície de membrana, os *clusters of differentiation* (CDs). As células-tronco mesenquimais possuem os marcadores CD29, CD44, CD73, CD 90, CD105, CD106 e CD166, e não possuem os marcadores hematopoiéticos CD11, CD14, CD34 e CD45 (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). Células-tronco mesenquimais presentes no estroma da medula óssea, dependendo do meio ambiente local, podem diferenciar-se em condrócitos, osteoblastos, adipócitos e miócitos (MARTIN *et al.*, 1998; HERZOG *et al.*, 2003; GUILLOT *et al.*, 2007).

A Sociedade Internacional para Terapia Celular estabeleceu critérios para que uma célula possa ser definida como célula-tronco mesenquimal: deve ser aderente ao frasco de cultura durante várias passagens, deve ser capaz de se diferenciar em cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo, deve expressar CD73, CD90 e CD105, não deve expressar c-kit, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  e os antígenos leucocitários humanos (HLA-DR) (SCHAFFLER & BUCHLER, 2007).

Já foi constatado, em estudos experimentais com camundongos, que células derivadas da medula óssea regeneraram o músculo esquelético quando injetadas no local da lesão ou mesmo mediante transplante de medula óssea. Pesquisadores demonstraram que as células-tronco da medula óssea podem ajudar na regeneração de tecidos e órgãos.

Este fenômeno foi inicialmente explicado pela possível plasticidade das células-tronco hematopoiéticas adultas, as quais poderiam se transdiferenciar em células-tronco comprometidas com vários tecidos não-hematopoiéticos. Para tanto, existem duas possibilidades: (1) uma mudança paralela de comprometimento do compartimento de células-tronco hematopoiéticas monopotentes; (2) uma regressão no processo de diferenciação das células-tronco hematopoiéticas monopotentes, em que elas desdiferenciariam-se em células-tronco multipotentes (uma camada germinativa apenas) ou mesmo pluripotentes (todas as três camadas germinativas). Isto gerou uma expectativa de que as células-tronco hematopoiéticas de medula óssea, sangue periférico mobilizado e de cordão poderiam ser fontes para reparo de órgãos e tecidos. Relatos de uso de células-tronco hematopoiéticas mostrando melhora em modelos de lesões cardíacas agudas aumentaram tais expectativas. Entretanto, quando populações purificadas de células-tronco hematopoiéticas foram obtidas, os resultados não foram satisfatórios. As tentativas para explicar para tais resultados não evidenciaram o fato de que a medula óssea poderia conter populações de células-tronco não-hematopoiéticas. A presença de células-tronco heterogêneas na medula óssea poderia explicar tanto os primeiros resultados positivos em modelos de regeneração de tecidos, quanto os negativos, pois durante a purificação as populações heterogêneas não-hematopoiéticas foram excluídas. Assim, o processo de transdiferenciação das células-tronco hematopoiéticas e sua contribuição nos casos de lesões de órgãos e tecidos continuam questionáveis, ao passo que a presença de populações de células-tronco não-hematopoiéticas na medula óssea é irrefutável (RATAJCZAK *et al.*, 2007).

Recentemente, tem-se explorado cada vez mais o uso das células do estroma medular, principalmente no reparo de tecidos cartilaginoso e ósseo. As vantagens de se utilizar essas

células progenitoras incluem: para cultivá-las é necessário, inicialmente, pouca quantidade de células; as amostras são coletadas por aspiração da medula óssea (5 a 10 ml) com anestesia local; é possível reproduzi-las em laboratório durante várias semanas, obtendo-se quantidade considerável para aplicação em medicina regenerativa.

Constatou-se em experimentos com coelhos que a injeção local das células-tronco mesenquimais na cartilagem articular lesada promove o reparo do tecido danificado (PROCKOP, 1997). Em outro estudo, foram utilizadas células-tronco mesenquimais de ratos transgênicos que expressam a proteína verde fluorescente no citoplasma e núcleo de suas células. Estas células foram injetadas em lesões condrais de ratos não-transgênicos. Os pesquisadores puderam rastrear as células injetadas durante a regeneração, e obtiveram tecido regenerado do tipo hialino, com expressão da proteína verde fluorescente, indicando que as células obtidas do tecido regenerado se originaram das células-tronco mesenquimais (OSHIMA *et al.*, 2005).

Além da medula óssea, outro tecido que contém células-tronco mesenquimais é o tecido adiposo. A fração do estroma vascular tornou-se foco das investigações após comprovar-se capaz de fornecer células-tronco mesenquimais multipotentes (SCHAFFLER & BÜCHLER, 2007). O procedimento cirúrgico simples, aliado à confirmação do sucesso destas células em comparação com as de medula óssea, quanto à capacidade de diferenciação, frequência de colônias obtidas e morfologia, conferem as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo plena capacidade de serem utilizadas em medicina regenerativa (SCHAFFLER & BÜCHLER, 2007).

### *Células-tronco e condrogênese*

Células-tronco mesenquimais podem se diferenciar em condrócitos utilizando-se meio de cultura definido, em conjunto com um arcabouço 3D. Na literatura relata-se que os condrócitos necessitam de um arcabouço 3D para crescerem e preservarem a morfologia e a produção de componentes de matriz próprios de condrócitos, quando em cultura celular. Todavia, se cultivadas em monocamadas, essas células tendem a se aderir ao fundo do recipiente, sofrem processo de desdiferenciação, adquirem características morfológicas e passam a produzir componentes de matriz de fibroblastos, como colágeno tipo I (BENYA & SHAFFER, 1982). Dessa forma, perde-se a funcionalidade do tecido. Outro fator que pode estimular a condrogênese é a alta concentração de células no momento da microencapsulação (TAKAGI *et al.*, 2007).

Vários sistemas de cultura são empregados na expansão dos condrócitos: cultura em gel de agarose (HAÜSELMANN *et al.*, 1994) e cultura de condrócitos em um arcabouço 3D. Recentemente, 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 tipos I e II e esponjas de colágeno tipo II - ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídios e alginato (KISIDAY *et al.*, 2002). Seguindo estes modelos de cultura de condrócitos, demonstrou-se a necessidade de se utilizar o arcabouço 3D para ativar a condrogênese das células-tronco mesenquimais.

O meio de cultura utilizado deve ser livre de soro fetal bovino, e ter alta concentração de glicose, acrescido das seguintes substâncias condroindutoras: dexametasona, insulina, transferrina, ácido selênico (ITS), ácido ascórbico e TGF- $\beta$ 1 (LEE *et al.*, 2004; PENICK *et*

*al.*, 2005; FUCHS *et al.*, 2005). O TGF- $\beta$ 1, juntamente com a BMP-2, parece estimular a síntese de colágeno II (LEE *et al.*, 2004). Em outro estudo, adicionou-se o IGF-1 como agente condrogênico (XIANG *et al.*, 2007). O uso de soro fetal, durante a etapa de expansão das CTMs em monocamada, estimula a atividade do gene codificador do componente de matriz agrecam, presente na matriz extracelular de condrócitos (YOKOYAMA *et al.*, 2008).

### *Arcabouços 3D*

São estruturas porosas que conferem sustentação mecânica, proteção, sustentabilidade (JANČÁŘ *et al.*, 2007) e condições para que as células, ao produzirem matriz extracelular, construam um ambiente tridimensional, com interatividade célula-matriz. Deste modo, o arcabouço deve ser poroso, biocompatível, bioabsorbível, facilitador do transporte em massa e permitir migração celular (HOLLISTER, 2005).

Um arcabouço mais poroso tende a fornecer melhores condições de transporte em massa, melhorando a nutrição das células, enquanto um mais denso oferece melhores propriedades mecânicas (HOLLISTER, 2005). Além desta propriedade, o arcabouço poroso também pode proporcionar migração celular e superfície para adesão celular (HOLLISTER, 2005). A biocompatibilidade é essencial, pois o arcabouço será introduzido no tecido lesado, devendo ser aceito pelo tecido justaposto sem respostas imunológicas e inflamatórias danosas. A bioabsorção deve ser compatível à capacidade das células em produzir matriz, de modo que, aos poucos, esta se acumule nos espaços intersticiais, substituindo o material do arcabouço que está sendo reabsorvido pelo tecido circundante, assumindo, então, o papel que o arcabouço temporariamente executava (HOLLISTER, 2005). O transporte em

massa (permeabilidade e difusão) permite que nutrientes do meio de cultura alcancem as células inseridas nos poros, mantendo a viabilidade celular e promovendo a homeostase mediante o bom funcionamento de todas as funções fisiológicas celulares.

### *Inovações em modelos de arcabouços 3D*

Já está em uso uma série de arcabouços na área de engenharia celular. Em uma proposta inovadora, busca-se um modelo que não apenas proporcione suporte e sustentação mecânica, mas que também seja biologicamente ativo. Pode-se recorrer a estratégias tecnologicamente avançadas, como a introdução de hormônios e fatores de crescimento nas microestruturas destes arcabouços, ou mesmo técnicas para que estes ajam com características de *drug delivery*, desse modo, espera-se que o arcabouço libere as substâncias previamente incorporadas de forma gradativa, controlada e pré-programada. Em geral, tais artifícios encarecem exageradamente o processo, pois os fatores de crescimento e hormônios purificados são extremamente dispendiosos, bem como as técnicas de micromanipulação envolvidas.

### *O novo modelo em arcabouços 3D: BIOGEL3D*

Na busca de uma alternativa inovadora e um arcabouço bioativo que atendessem os requisitos necessários para sua função, com baixo custo de produção e simples confecção, pensou-se no plasma rico em plaquetas (PRP) ao se investigar o papel da plaqueta (fragmentos citoplasmáticos derivados do megacariócito ricos em grânulos- $\alpha$  e densos) idealizando-se a sua utilização na forma de gel para cultura celular, com base na secreção de uma série



hormônios interfaceados com a adesão, cicatrização, neovascularização e síntese de matriz extracelular.

O uso de gel de plaquetas como um arcabouço de sustentação para as CTMs possui diversas vantagens, como o fato de ser um material biológico, ter fácil reabsorção após a fase de transplantação, ser produzido com concentrado de plaquetas do próprio paciente que receberá o transplante (autogel), ser um material disponível, pois é produzido a partir de concentrados de plaquetas que podem constituir-se estoque excedente nos serviços de transfusão de sangue, portanto testados sorologicamente com o rigor da legislação brasileira para Hemoterapia (RDC n. 153/2004). Estes hemocomponentes são ricos nos fatores de crescimento PDGF- $\beta\beta$  e TGF- $\beta$ , entre outros, armazenados nos grânulos  $\alpha$  e densos das plaquetas constituindo-se potentes indutores da diferenciação em cartilagem.

### *Gel de plaquetas*

O Gel de Plaquetas é obtido a partir do PRP podendo ser autólogo ou alogênico. A formação do gel propriamente dita é obtida através da combinação de lisado de concentrado de plaquetas com trombina e cálcio formando rapidamente um coágulo viscoso (gel). A liberação dos fatores de crescimento estimulam funções celulares como migração, proliferação, diferenciação e angiogênese, facilitando a cicatrização e regeneração de tecidos. Entre suas funções, o gel de plaquetas é um agente hemostático efetivo e bioativo, interagindo com células e tecidos circunvizinhos. Em particular dois fatores de crescimento, contidos nos grânulos plaquetários, PDGF- $\beta\beta$  e TGF- $\beta$ , sendo o primeiro correspondente a um potente quimioatrativo e o segundo um forte estimulador da síntese de matriz extracelular (BHANOT & ALEX, 2002). O gel de plaquetas possui diversas

aplicações, entre elas o tratamento de feridas crônicas de origem multifatorial onde auxiliam a regeneração tecidual (ARAÚJO, 2007).

### *Celulose bacteriana úmida*

A celulose consiste de um composto produzido pela bactéria *Acetobacter xylinum*. É 100% pura, ou seja, não se acompanha de outras substâncias orgânicas como a lignina, hemicelulose e outros componentes da celulose vegetal. Este composto já foi utilizado para oclusão de vasos sanguíneos durante tratamento de malformações arteriovenosas, tendo sido seguro e eficaz (TOKUNAGA *et al.*, 2000). Foi também bem sucedido para substituir a dura-máter em pacientes com traumas ou câncer. Portanto, trata-se de um composto inerte que não ocasiona reação imune ao paciente que recebe o implante, o que torna vantajosa a tentativa de utilizá-lo como suporte ao crescimento de CTMs *ex vivo*. É uma substância altamente porosa, característica considerada importante para agir como carreador (THOMSOM *et al.*, 1995) e é freqüentemente usada como substitutivo temporário de pele (neste caso no estado seco) em casos de queimaduras ou feridas.

Considerou-se o uso deste composto como arcabouço 3D, pois apresenta características específicas compatíveis a sua função, tais como alta capacidade de reter água, alta cristalinidade (fator muito importante para o acompanhamento da cultura por microscopia de luz), moldabilidade *in situ* apropriada e alta força tensiva (SVENSSON *et al.*, 2005). Na bioengenharia, a celulose bacteriana já foi usada, em sua forma não-processada (úmida), como suporte em três dimensões para cultivo de condrócitos (SVENSSON *et al.*, 2005), apresenta biocompatibilidade (HELENIUS *et al.*, 2005) e já foi testada como suporte ao crescimento de vasos sanguíneos *in vitro* (BÄCKDAHL *et al.*, 2006).

## **Objetivos**

### Objetivos Gerais

1. Avaliar novos modelos tridimensionais de arcabouços para diferenciação de CTMs em condrócitos: gel de plaquetas e celulose bacteriana.
2. Desenvolver anticorpo monoclonal que reconheça a CTM por citometria de fluxo.
3. Determinar qual o volume máximo necessário de coleta de medula óssea para melhor rendimento da cultura de CTMs.

### Objetivos Específicos

1. Estabelecer protocolos de cultura de CTMs em:
  - Arcabouço 3D semi-sólido constituído por gel de plaquetas
  - Arcabouço 3D semi-sólido constituído por celulose bacteriana não processada (úmida)
2. Produzir e caracterizar anticorpo monoclonal que reconheça a CTM para utilizá-lo no trabalho e posteriormente no serviço, devido ao baixo número de similares no mercado, para uso com células de coelho.
3. Determinar o volume ideal de coleta de MO, com relação a: reagentes gastos, número inicial de células mononucleares obtidas, tempo para 1<sup>a</sup> passagem em tripsina e morfologia da CTM em cultura.

## **Materiais e Métodos**

Este trabalho constou das seguintes etapas:

1. Produção de anticorpos monoclonais murinos (AcMm) dirigidos contra antígenos expressos por CTMs de coelho.
2. Diferenciação de CTMs em condrócitos
3. Microencapsulação das células em arcabouços 3D

Estas etapas assim dispostas foram necessárias em razão da inexistência de marcador de CTM de coelho disponível no mercado (anticorpo). A primeira etapa do trabalho foi dirigida a se construir esta ferramenta de monitoramento das células obtidas, enquanto que as etapas 2 e 3 estão intrinsecamente ligadas com o objetivo desta pesquisa .

### *Instalações*

Este trabalho foi desenvolvido em diversos setores e departamentos, de duas instituições: Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), ambos pertencentes a UNESP, o que reforça que o campo da engenharia celular seja multidisciplinar.

Estiveram envolvidos:

- Laboratório de Engenharia Celular, pertencente ao Hemocentro de Botucatu da FMB - UNESP.
- Laboratório Experimental de Cirurgia, pertencente ao Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FMB - UNESP.
- Laboratório de Imunohistoquímica, pertencente ao Departamento de Morfologia do IBB - UNESP.

Resumidamente, em cada Setor foram realizadas:

- No Laboratório Experimental de Cirurgia, todos os procedimentos de coleta de material.
- No Laboratório de Engenharia Celular, a cultura celular e a manipulação dos arcabouços.
- No Laboratório de Imunohistoquímica, a confecção de lâminas histológicas.

### *Animais*

Foram utilizados 25 coelhos da raça Nova Zelândia, linhagem Botucatu para obter-se a medula óssea e o sangue total, e cinco camundongos BALB\C para a produção do anticorpo monoclonal.

## *Etapa 1 - Análise de novos arcabouços 3D*

### *1.1) Coleta de medula óssea*

Os coelhos foram inicialmente anestesiados e posteriormente sacrificados com dose extra de pentobarbital sódico. Coletou-se a medula óssea dos coelhos (n=25) por punção da crista ilíaca em condições de rigorosa antissepsia, utilizando-se uma seringa de 20mL, contendo heparina (3000U), acoplada a uma agulha intraóssea. Após processamento em laboratório, o material medular foi diluído em meio RPMI HEPES (Invitrogen<sup>®</sup>) estéril (1:2). Em seguida procedeu-se à técnica de separação das células linfomononucleares (LMN) pela técnica de gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (Sigma<sup>®</sup>). O anel de LMN obtido foi ressuspensão em meio DMEM Knockout<sup>®</sup>, determinando-se a viabilidade e o número de células mediante contagem em câmara de Neubauer, por métodos clássicos. Este procedimento justificou-se no sentido de:

- Adquirir experiência na coleta de medula óssea.
- Obter amostras de medula óssea para os protocolos de obtenção dos AcMm dirigidos contra antígenos expressos em CTMs de coelhos.
- Expansão das CTMs para posterior diferenciação.
- Determinação do volume ideal de coleta de medula óssea.

### 1.2) Determinação do volume ideal para coleta de medula óssea

Foram formados cinco grupos de coelhos, e cada grupo foi constituído por cinco coelhos. O último grupo, G5, foi o grupo utilizado na parte final do experimento, e o volume de sangue coletado deste grupo foi determinado pelo desempenho dos demais, levando-se em consideração diferentes indicadores como contagem celular e viabilidade.

**Quadro 1:** *Diferentes grupos de estudo e o respectivo volume de medula óssea coletado.*

GRUPO	VOLUME COLETADO DE MEDULA ÓSSEA
G1	6mL
G2	9mL
G3	12mL
G4	15mL
G5	Gerado pelo melhor resultado dos grupos anteriores

Os indicadores de qualidade utilizados, por grupo, descritos no quadro foram:

1. número médio obtido de células da fração mononuclear;
2. morfologia celular, em que se deseja que esta seja alongada, com prolongamentos, fibroblastóide;
3. tempo médio de confluência 80% e primeira passagem em tripsina.

### *1.3) Expansão in vitro das células-tronco mesenquimais*

Após a determinação da viabilidade celular e número de células, o plaqueamento inicial foi realizado em três frascos de 25cm<sup>2</sup> de área de cultura (Nunc<sup>®</sup>), para dar seguimento à cultura.

As CTMs da medula óssea foram selecionadas com base em sua habilidade em aderir à placa de cultura, enquanto as células hematopoiéticas não aderentes foram removidas da cultura durante as trocas do meio.

O meio de cultura utilizado foi o DMEM Knockout<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>), suplementado por: 5mL de antibiótico/antimicótico (Invitrogen<sup>™</sup>), 5mL de L-glutamina (Invitrogen<sup>™</sup>), 5mL de aminoácidos essenciais (Invitrogen<sup>™</sup>), 2,5mL de aminoácidos não essenciais (Invitrogen<sup>™</sup>) e 50mL de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen<sup>™</sup>). As células permaneceram em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Class 100<sup>®</sup>).

Ao se identificar, no monitoramento por microscopia invertida (microscópio Axiovert 200<sup>®</sup>, Zeiss<sup>™</sup>), que os poços atingiram confluência de 80% da placa, as células foram destacadas com 0,25% de tripsina/1mM de EDTA (Invitrogen<sup>™</sup>), contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em frascos de 75cm<sup>2</sup> (Nunc<sup>™</sup>). Após a segunda passagem em tripsina, as células foram criopreservadas em DMSO (LGC Biotecnologia<sup>™</sup>) 10% SFB, em nitrogênio líquido na temperatura de -196°C.

### *1.4) Obtenção de PRP para confecção do arcabouço 3D*

Para a obtenção do PRP, tanto para padronização quanto para o uso final nos arcabouços, foram utilizados os coelhos descritos anteriormente, não havendo necessidade de sacrifício de animais extras. Após a anestesia dos animais, foram coletados 40mL de sangue total por



punção cardíaca, com seringa de 50mL (BD Biosciences™) previamente preenchida com 5,5mL de solução anticoagulante CPDA1. Retirou-se alíquota de sangue para a determinação da concentração inicial de plaquetas do animal em contador semi-automático (ABX Horiba™ Micros60®). O conteúdo foi transferido para tubos de 15mL e submetido a centrifugação de 1000rpm durante dez minutos para a obtenção do PRP, tendo sido procedida nova recontagem hematimétrica nas mesmas condições e equipamentos descritos. O material foi congelado a -80°C e extemporaneamente foi descongelado e filtrado em membrana 0,22µM, e uma determinação dos níveis de PDGF-ββ foi realizada.

#### *1.5) Determinação quantitativa dos níveis de PDGF-ββ dos PRPs*

Considerando-se a relevância da identificação dos níveis de um dos principais hormônios contidos nos grânulos plaquetários lisado pela técnica de congelamento/descongelamento, optou-se pela determinação pelo método ELISA. Foi utilizado kit para dosagem de PDGF-ββ humano pela similaridade de 85% entre espécies, disponibilizada pelo fabricante, e por não haver kit específico para coelho.

#### *1.6) Determinação inicial da forma do arcabouço BIOGEL3D*

O PRP foi descongelado (ou produzido extemporaneamente), dividido em tubos cônicos de 15mL e uma amostra (200µL) foi separada para a determinação do número de plaquetas em contador automático Micros60 HoribaABX®. Uma vez determinada alta concentração de plaquetas, o PRP foi separado em volumes iguais de 2,3mL. Utilizou-se concentração fixa de gluconato de cálcio e concentrações variadas de trombina. Foram testados géis a partir de PRP fresco e PRP descongelado.

Idealizaram-se duas formas para os géis: uma mais volumosa e esférica, denominada *Pérola*, e um tapete plano e com menor volume, denominado *Tapete*. Estas formas foram obtidas da seguinte maneira: após adicionar-se o gluconato de cálcio (GC) e a trombina ao PRP no tubo cônico de 15mL, aguardava-se a solidificação e, posteriormente, colocava-se o gel na placa de Petri, obtendo-se, dessa forma, o gel *Pérola*. Para a confecção do *Tapete* o conteúdo na placa era transferido para a superfície plana de cultura após adicionarem-se GC e trombina ao PRP, ocorrendo a solidificação como um tapete de aproximadamente 5mm de altura.

O meio de cultura utilizado foi o DMEM High Glucose<sup>TM</sup> (Gibco<sup>®</sup>) 10% SFB (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 permaneceram em estufa de CO<sub>2</sub> 5% (Thermo<sup>®</sup>) durante todo o experimento. Efetuou-se registro fotográfico (Canon PowerShotA620<sup>®</sup>) nos três primeiros dias e no último dia. A observação das placas, macroscópica e ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert<sup>®</sup>), foi feita diariamente.

### *1.7) Microencapsulação das células-tronco mesenquimais e diferenciação condrogênica*

Para se realizar esta etapa do trabalho avaliou-se o desempenho de dois diferentes arcabouços 3D na diferenciação condrogênica: PRP e celulose bacteriana úmida. Estes dois modelos foram comparados com o mais frequentemente utilizado, o hidrogel de alginato, sendo empregado o alginato sódico (Sigma<sup>®</sup>). As células utilizadas para a microencapsulação foram obtidas dos animais do G5.

As pérolas de alginato encapsuladas com CTMs ( $60\mu\text{L}$  de volume,  $1 \times 10^5$  células/pérola) foram obtidas por meio de homogeneização de um *pellet* celular de  $1,66 \times 10^6$  células e gotejamento da solução em uma placa de Petri contendo  $10\text{mL}$  de cloreto de cálcio com uma micropipeta ajustada para  $60\mu\text{L}$ . Após o gotejamento, as pérolas permaneceram em repouso à temperatura ambiente, para que ocorresse a gelificação total. Em seguida, foram transferidas para uma placa de cultura de seis poços contendo meio de diferenciação condrogênico (Anexo I).

O PRP utilizado foi coletado no dia antecedente ao da microencapsulação e preparado extemporaneamente. As pérolas de PRP foram obtidas de forma similar ao processo descrito para o alginato: ao volume de  $60\mu\text{L}$  de PRP foram adicionadas  $1 \times 10^5$  CTMs para gerar uma pérola. Isto foi obtido homogeneizando-se um *pellet* celular de  $1,66 \times 10^6$  células, após adição de  $10\mu\text{L}$  de GC e  $40\mu\text{L}$  de trombina, depositando-se  $60\mu\text{L}$  em cada orifício de um suporte de ponteiros P1000, previamente recoberto com Parafilm® estéril, de modo a formar uma depressão discóide em cada orifício do suporte (Anexo I). O tempo de gelificação padronizado foi de cinco minutos, com posterior transferência para uma placa de cultura de seis poços contendo meio de diferenciação condrogênico (Anexo I).

A celulose bacteriana úmida foi cedida pelo professor Sidney José Lima Ribeiro, do Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Esta celulose é um composto já na forma semissólida, e para seu uso foi necessária uma adaptação para a microencapsulação das células, uma vez que não era possível empregar o mesmo procedimento técnico realizado tanto com o alginato como com o PRP. Para isso, a celulose foi cortada em tiras e novamente seccionada de modo a produzirem-se pequenas pérolas de celulose, com o volume mais próximo possível do adotado para as pérolas dos dois outros arcabouços (Anexo I). Essas pérolas foram esterilizadas por autoclavagem

(121°C, 15 minutos) em uma solução de PBS pH7,4. As CTMs foram ressuspensas em meio de cultura e depositadas em pequenas gotas de 10µL em uma placa de Petri (1x10<sup>5</sup> células/gota), juntamente com as pérolas de celulose (Anexo I). Cada gota foi injetada em uma pérola, mediante várias aplicações, visando-se a microencapsulação homogênea de 1x10<sup>5</sup> células por pérola (Anexo I).

O meio de diferenciação condrogênico definido foi: DMEM-F12, livre de SFB, suplementado de dexametasona, ácido ascórbico, piruvato de sódio e insulina-transferrina-ácido selênico-ácido linoleico (ITS<sup>+</sup>Premix BD Biosciences).

Todas as pérolas (PRP, alginato e celulose) permaneceram em cultura por 21 dias, tendo o meio sido trocado a cada dois dias, e os suplementos adicionados ao meio no início de cada semana. Foi realizada visualização diária das placas ao microscópio invertido (Zeiss Axiovert<sup>®</sup>) e registro fotográfico nos dias 1, 7 e 21. Ao final de 21 dias as pérolas foram retiradas das placas e encaminhadas para análise histológica e imuno-histoquímica.

### *1.8) Análise histológica*

Os procedimentos de preparo e fixação foram os mesmos para todos os arcabouços, sendo os procedimentos padrão do Laboratório de Imunohistoquímica do IBB. Todas as pérolas foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado, ou solução de Karnovsky para posterior inclusão em historesina. Após a confecção dos blocos e ajuste do micrótomo para realizar cortes histológicos de 5µM de espessura, a microtomia foi realizada. Os cortes de cada amostra foram corados utilizando-se os seguintes corantes: hematoxilina-eosina (H&E), azul de toluidina e azul de Alcian. A coloração H&E teve a seguinte seqüência: imersão das lâminas em hematoxilina de Harris, por 30 minutos; a lavagem em água corrente por dez

minutos; imersão em solução diferencial por 1 minuto; imersão em eosina por 5 minutos; lavagem rápida por 10 segundos em água corrente e montagem da lâmina em *permout* e lamínula. A coloração em azul de toluidina teve a seguinte seqüência: imersão das lâminas neste corante por 5 minutos; lavagem em água corrente por 10 segundos e montagem da lâmina em *permout* e lamínula. A coloração em azul de alcian foi realizada fazendo-se: imersão das lâminas no corante por duas horas; lavagem em água corrente por 1 minuto e montagem da lâmina em *permout* e lamínula.

## *Etapa 2 - Produção de anticorpo monoclonal anti-CTM*

### *2.1) Protocolo de imunização*

A obtenção de anticorpos monoclonais murinos segue rigorosa agenda incluindo: imunização, fusão celular, *screening*, clonagem, novo *screening*, amplificação dos clones, determinação de classe e subclasse de imunoglobulina e confirmação da monoclonalidade.

Para o protocolo de imunização foram utilizados três camundongos isogênicos da linhagem BALB\C, cedidos pelo biotério do Laboratório Experimental de Doenças Tropicais e Infectologia da FMB-UNESP. Nesta etapa utilizaram-se seringas de 1mL (BD Biosciences™) e agulhas de insulina (BD Biosciences™).

Os antígenos foram apresentados em sua forma integral, proteínas de membrana, utilizando-se CTMs previamente isoladas de medula óssea de coelhos, expandidas *in vitro*, cultivadas por duas passagens em tripsina e criopreservadas. Foi adotada a imunização intraperitoneal, em que cada animal recebia  $5 \times 10^4$  células diluídas em 100µL de PBS por injeção, exceto no *booster*. Como se almejava a obtenção de anticorpos da classe IgG, para utilização em citometria de fluxo, adotou-se protocolo longo de imunização, respeitando-se o seguinte cronograma:

- dia zero: 1.<sup>a</sup> dose de imunização
- dia +7: 2.<sup>a</sup> dose de imunização 1.<sup>o</sup> Reforço
- dia +14: 3.<sup>a</sup> dose de imunização 2.<sup>o</sup> Reforço
- dia +21: 4.<sup>a</sup> dose de imunização 3.<sup>o</sup> Reforço
- dia +41: imunização de reforço ou *Booster* (Intravenosa)
- dia +45: fusão celular

## 2.2) Fusão celular

No protocolo de fusão celular é necessário extrair os linfócitos B dos animais imunizados e fundi-los às células de mieloma múltiplo murino (MMM). Estas células são descongeladas do banco de nitrogênio líquido do Serviço e cultivadas por duas semanas antes do dia de fusão, em meio completo (MC) 20%SFB composto de meio de cultura RPMI (Invitrogen<sup>®</sup>), antibiótico/antimicótico (Invitrogen<sup>®</sup>), L-glutamina (Invitrogen<sup>®</sup>), aminoácidos essenciais (Invitrogen<sup>®</sup>), aminoácidos não essenciais (Invitrogen<sup>®</sup>), glicose 30%, ácido oxaloacético e insulina bovina. O protocolo de fusão foi executado conforme Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Engenharia Celular.

As fusões celulares realizadas pelo método químico em presença de polietileglicol receberam a seguinte nomenclatura: MSC1, MSC2 e MSC3 respeitando as padronizações dos *Workshops* de Anticorpos Monoclonais.

## 2.3) Identificação dos híbridos obtidos

Após a fusão celular, as placas foram visualizadas diariamente em microscópio invertido (Zeiss Axiovert<sup>®</sup>) em contraste de fase, com o intuito de identificar os poços em que havia híbridos e determinar os dias ideais para o *screening*, para identificação dos híbridos secretores de imunoglobulinas. A cada híbrido obtido foi dada a nomenclatura MSCx-y, na

qual x corresponde ao número da fusão (1, 2 ou 3) e y corresponde à posição na placa, na ordem que os híbridos foram encontrados.

#### *2.4) Screening dos híbridos obtidos*

Para o *screening* foi adotada a técnica de citometria de fluxo. Foram utilizadas as CTMs isoladas de MO, expandidas *in vitro* e criopreservadas, provenientes dos animais dos G1, G2, G3 e G4. O *screening* foi realizado com o sobrenadante de cultura (SNC) coletado dos poços onde os híbridos recobriam 80% da área de cultura. Este sobrenadante foi coletado em tubo para citômetro (BD Biosciences™). A cada tubo, devidamente identificado com a nomenclatura do híbrido, foram adicionadas  $5 \times 10^4$  CTMs, descongeladas em banho Maria a 37°C. Procedeu-se à incubação do provável anticorpo primário (SNC) com as células durante uma hora a 25°C, em agitador mecânico. A reação foi revelada com anticorpo secundário, goat anti-mouse IgG-FITC (Invitrogen™), na diluição 1:200 em PBS. Foram testados 587 híbridos obtidos, em diferentes dias, sendo que para cada dia de teste os controles negativos eram refeitos.

#### *2.5) Análise dos resultados do screening*

O citômetro de fluxo é um aparelho que possui um feixe de *laser*. Este aparelho é capaz de criar um fluxo contínuo e controlado de células, de modo que as mesmas passem pelo *laser* uma depois da outra, registrando-se tamanho e granulosidade (complexidade intracelular). Caso estejam acoplados a estas células anticorpos marcados com fluorosceínas, ou então um complexo anticorpo-anticorpo secundário marcado com fluorosceína, o laser também registra a intensidade de fluorescência. Por meio desse procedimento constatou-se que as



amostras em que foi detectada fluorescência eram as que continham no SNC, anticorpos específicos à CTM, portanto, positivas.

Durante a leitura do tubo, define-se o *gate*, que é a área da população a ser analisada. Esta determinação é regida pelo tamanho e granulosidade médio da população, procurando-se estabelecer uma população homogênea nestas características, eliminando-se células muito grandes ou pequenas, assim como as muito ou pouco complexas. A determinação do *gate* é de extrema importância, pois o citômetro vai considerar a fluorescência apenas das células que estejam dentro destes parâmetros, do fluxo que passou pelo laser.

#### 2.6) Reteste dos híbridos secretores

Os híbridos “positivos” foram retidos e retestados três vezes, seguindo-se o mesmo protocolo no primeiro teste de *screening*. Somente os que mantiveram o perfil de positividade em todos os retestes foram retidos. Estes híbridos foram expandidos *in vitro* e de cada um deles foram congeladas cinco ampolas em SFB 10% DMSO e estocadas no banco de células em nitrogênio líquido. Foram produzidos também 30mL de SNC de cada híbrido. Destaca-se que no terceiro reteste as amostras foram avaliadas em duplicatas, em que cada amostra recebeu um tipo de anticorpo: goat anti-mouse IgG-FITC (Invitrogen™); ou goat anti-mouse IgM-FITC (Invitrogen™)

## Resultados e Discussão

### *Etapa 1 - Análise de novos arcabouços 3D*

#### *1.1) Coleta de medula óssea e isolamento das células-tronco mesenquimais*

Os procedimentos de coleta foram realizados sem intercorrências. A separação da fração linfomononuclear por centrifugação em gradiente de densidade utilizando-se o *ficoll* foi inicialmente realizado com tubos cônicos de 50mL, não tendo havido formação do *buffy-coat* (n=5). Adotou-se então tubos de 15mL obtendo-se os *buffy-coats* desejados.

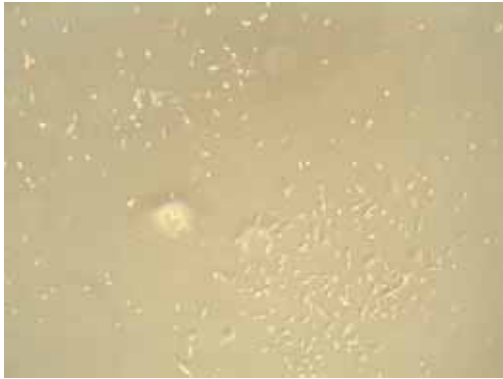
#### *1.2) Expansão in vitro de células-tronco mesenquimais*

Após a adesão das células iniciais em baixa densidade (Figura 1), estas formavam colônias dispersas no frasco de cultura (Figura 2) assim como descrito na literatura (JAVAZON *et al.*, 2004), e replicavam até que as colônias se encontrassem, formando confluência 80% (Figura 3).

Morfológicamente, as células cultivadas *in vitro* mantiveram características de CTMs até a primeira passagem em tripsina. A população celular obtida era heterogênea, morfológicamente, mas a maioria destas células apresentava-se alongada, justaposta e provida de prolongamentos, tipicamente fibroblastóides (Figura 4) com dois nucléolos na região nuclear (Figura 5), corroborando achados da literatura (JAVAZON *et al.*, 2004; CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

Após a primeira passagem em tripsina as células sofreram alterações morfológicas, com perda de seus prolongamentos, ganho de volume citoplasmático e nuclear, evidenciação de nucléolos, tendo, assim, sua morfologia modificada de fibroblastóide para prismática ou poligonal (Figura 6). Esta morfologia, embora incomum em CTMs, é caracterizada como uma das possíveis formas da célula-tronco mesenquimal, segundo afirmado por Javazon *et al.*, 2004. Percebeu-se que o tempo de cultura requerido para uma segunda passagem em tripsina dobrou. Verificou-se que com confluência 80% o número de células por cm<sup>2</sup> claramente diminuiu, e mesmo o aumento total da área disponível para crescimento não foi suficiente para a expansão quantitativa das células. As possíveis causas para esta mudança morfológica incluem: exposição contínua ao SFB, indutor de alterações morfológicas compatíveis às observadas, e um possível estímulo à produção de agregam e diferenciação condrogênica, com decréscimo na porcentagem de células positivas ao CD90 (YOKOYAMA *et al.*, 2008). Os tratamentos em tripsina resultam em alterações epigenéticas ou genéticas, como transformações e fusões cromossômicas ou transferência gênica (JAVAZON *et al.*, 2004).

A viabilidade média no momento do plaqueamento, após a coleta de MO, foi de 88,1%. A viabilidade média após a 1ª passagem em tripsina foi de 89,6% e após a 2ª passagem foi de 86,9%. Esses resultados de viabilidade referem-se ao total de animais e estão sumarizados no gráfico 1.



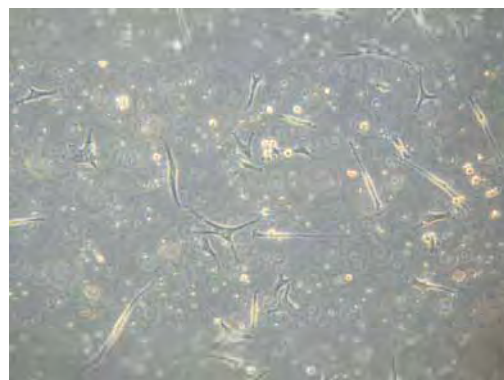
**Figura 1:** Aderência inicial das CTMs. Objetiva de 5X em contraste de fase ph1.



**Figura 2:** Colônia resultante da multiplicação celular. Objetiva de 5X em contraste de fase ph1.



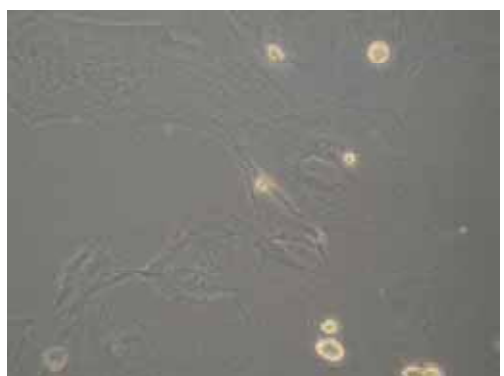
**Figura 3:** CTMs em confluência 80%. Objetiva de 10X em contraste de fase ph2.



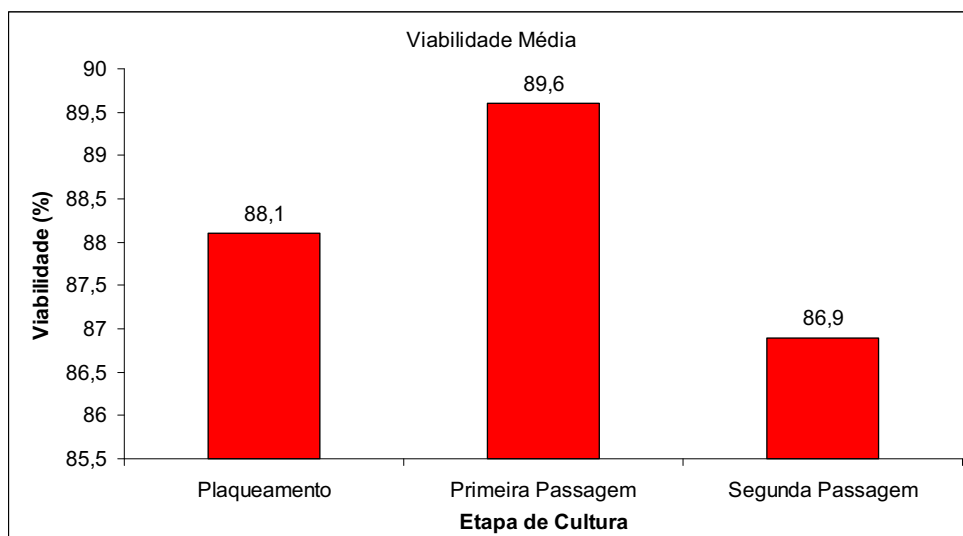
**Figura 4:** Morfologia tipicamente fibroblastóide das CTMs. Objetiva de 10X em contraste de fase ph1.



**Figura 5:** CTM com seu núcleo e nucléolos (Seta). Objetiva de 40X em contraste de fase ph2.



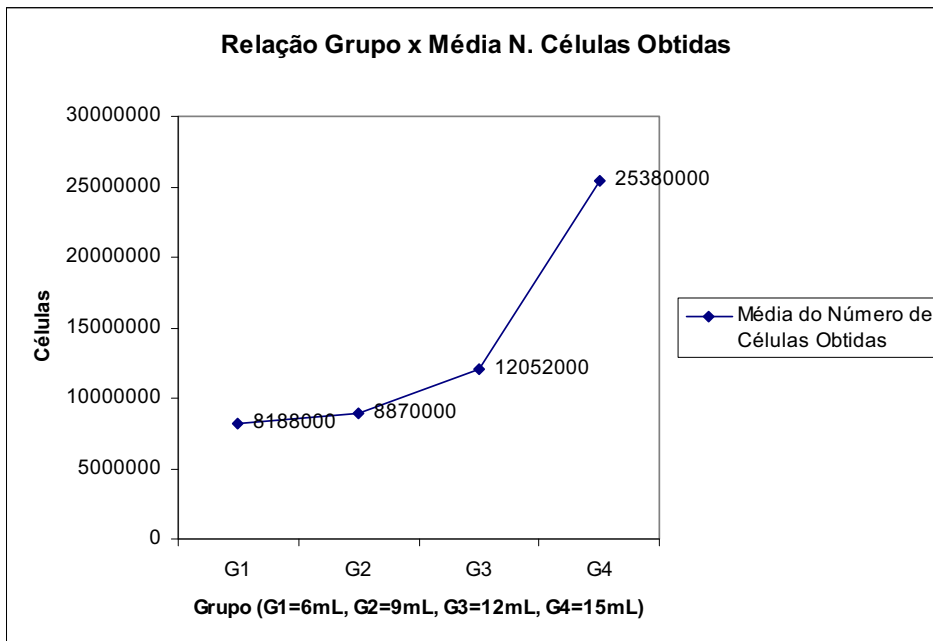
**Figura 6:** Morfologia prismática e volume celular aumentado, após 1ª passagem em tripsina. Objetiva de 40X em contraste de fase ph2.



**Gráfico 1-** Viabilidade média nas diferentes e principais etapas de cultura das CTMs.

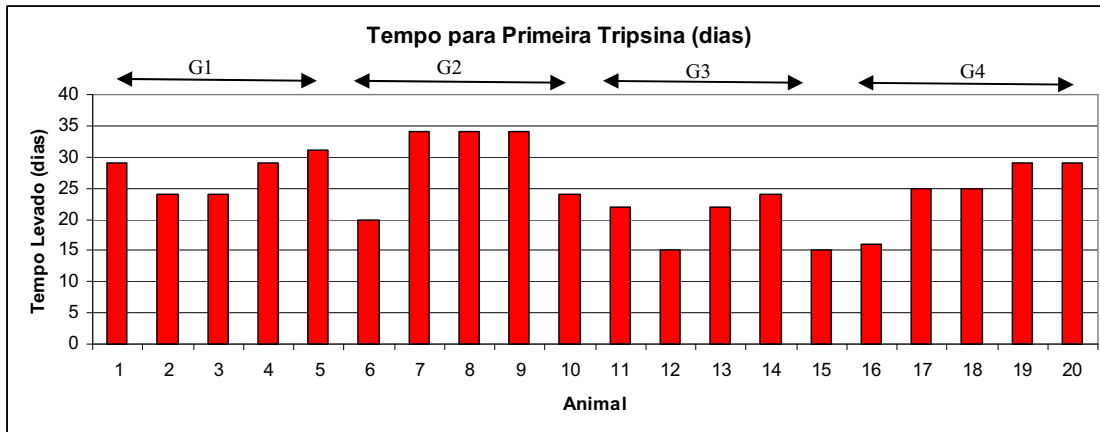
### *1.3) Determinação do volume ideal de coleta de MO*

Em relação ao primeiro parâmetro analisado, os resultados obtidos demonstraram que, com o aumento do volume de coleta de aspirado de MO, houve aumento da quantidade de células da fração mononuclear obtidas (Gráfico 2):

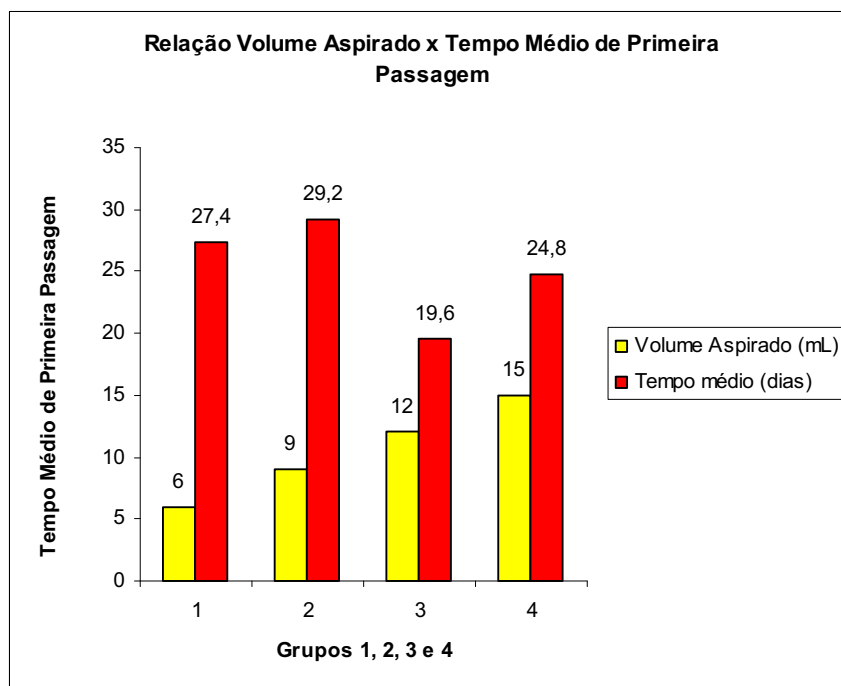


**Gráfico 2** - Relação entre grupo experimental e média do total de células obtidas.

As células-tronco mesenquimais perfazem de 0,001% a 0,01% da população de LMN da medula óssea (COVAS, 2006). Diante desta afirmação e dos resultados acima, analisando-se o segundo parâmetro, esperava-se que o tempo para primeira tripsina fosse reduzindo à medida que o número inicial de plaqueamento aumentasse. Esta teoria baseia-se no fato de que, com o aumento do volume coletado e do número de LMN, haveria também aumento na quantidade de CTMs inicialmente plaqueadas. Entretanto, isto foi demonstrado apenas parcialmente, como se observa nos gráficos gráficos 3 e 4.



**Gráfico 3:** Tempo de cultura até confluência 80% e 1ª passagem em tripsina (animais 1 a 5: G1; animais 6 a 10: G2; animais 11 a 15: G3; animais 16 a 20:G4).



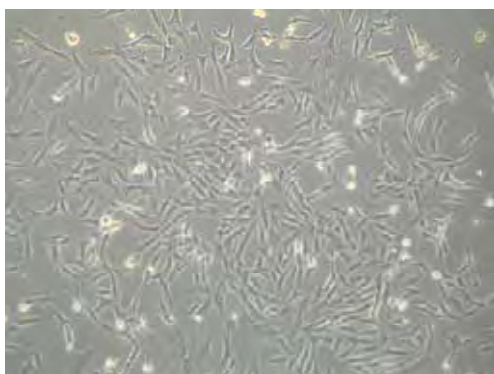
**Gráfico 4:** Relação entre volume de MO aspirado e tempo médio para 1ª passagem.

No terceiro parâmetro analisado, morfologia celular, verificou-se homogeneidade entre todos os animais, células aderentes fibroblastóides com prolongamentos (inclusive as mesmas mudanças morfológicas já relatadas), não tendo havido qualquer influência do volume de coleta.

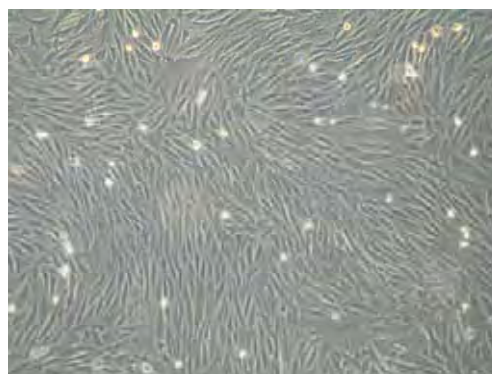
Foi adotado o volume de coleta de 12mL de aspirado de MO para a confecção do último grupo experimental, G5, que providenciaria as células para o uso nos arcabouços 3D.

#### *1.4) Morfologia das CTMs para microencapsulação dos arcabouços 3D (G5)*

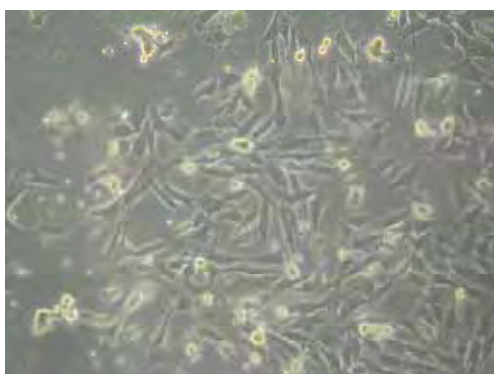
Morfologicamente, as células mantiveram características fibroblastóides até a 1ª passagem em tripsina (Figuras 7 a 11) e adquiriram morfologia prismática e volume celular aumentado entre a 1ª passagem e a 2ª passagem, assim como as células cultivadas de G1 a G4.



**Figura 7:** CTMs do animal 1 de G5. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1.



**Figura 8:** CTMs do animal 2 de G5. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1.

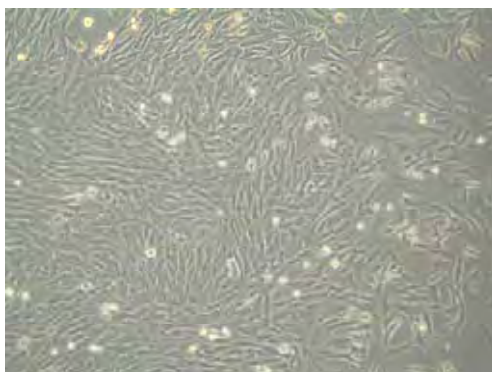


**Figura 9:** CTMs do animal 3 de G5. Objetiva de 20x em contraste de fase ph1.



**Figura 10:** CTMs do animal 4 de G5. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1.





**Figura 11:** CTMs do animal 5 de G5. Objetiva de 10x em contraste de fase ph1.

### 1.5) Obtenção de plasma rico em plaquetas

Após a coleta do sangue, uma amostra foi encaminhada para se determinar a quantidade de plaquetas inicial. Todas as cinco amostras apresentaram valores abaixo do padrão em hemograma de coelho ( $428 \pm 178 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) (JAIN, 1993). Após a centrifugação e coleta do plasma rico em plaquetas, nova amostra foi encaminhada para se determinar a quantidade de plaquetas, e os valores estavam aumentados (Quadro 2)

**Quadro 2:** Determinação da quantidade de plaquetas nas amostras de sangue coletadas e após a separação do PRP.

Amostra	Plaquetas (sangue)	Plaquetas (PRP)	Aumento (x)
Coelho 1	$248 \times 10^3/\text{mm}^3$	$541 \times 10^3/\text{mm}^3$	2,18
Coelho 2	$223 \times 10^3/\text{mm}^3$	$623 \times 10^3/\text{mm}^3$	2,79
Coelho 3	$201 \times 10^3/\text{mm}^3$	$661 \times 10^3/\text{mm}^3$	3,28
Coelho 4	$146 \times 10^3/\text{mm}^3$	$337 \times 10^3/\text{mm}^3$	2,30
Coelho 5	$231 \times 10^3/\text{mm}^3$	$529 \times 10^3/\text{mm}^3$	2,29

Percebeu-se que houve concentração plaquetária no volume de plasma, variando de 2,18 até 3,28 como valor máximo. Durante as etapas de padronização da produção do PRP, chegou-se a obter valores da ordem de  $1100 \times 10^3/\text{mm}^3$  plaquetas. Teoricamente, quanto maior a concentração plaquetária, maiores serão os níveis de fatores de crescimento disponibilizados para as células.

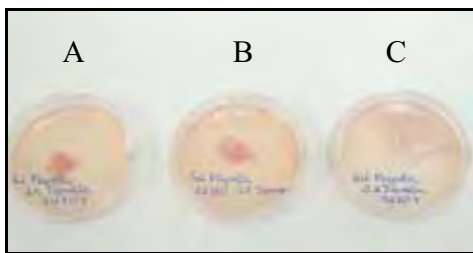
#### *1.6) Determinação quantitativa dos níveis de PDGF- $\beta\beta$ dos PRPs*

Não foi possível obter resultados conclusivos. Os determinantes para o insucesso desta etapa do projeto foram: 1) inexistência de reagentes próprios para a espécie em estudo; 2) o kit disponível dispõe apenas de PDGF- $\beta\beta$  humano liofilizado utilizado para produzir a curva de referência; 3) os valores obtidos da curva de referência mantiveram-se muito próximos, quando deveriam ter uma diferença considerável; 4) os valores das densidades óticas dos PRPs utilizados nos experimentos foram muito baixos, semelhantes ao controle negativo (PBS). Portanto, os resultados não podem ser considerados como válidos.

#### *1.7) Determinação inicial da forma do arcabouço BIOGEL3D*

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 de 5 segundos (com concentração de trombina 6x) até 40-45 segundos (com as menores concentrações, de 1x e 2x). A via útil dos géis foi de 20 dias, sendo que todos os arcabouços permaneceram semi-sólidos durante este período. Os géis *Pérola* (Figura 12) apresentaram áreas opacas ao microscópio invertido (Figura 13), enquanto os géis *Tapete* (Figuras 14 e 15) não as apresentaram (Figura 16). O gel feito com

plaquetas descongeladas/lisadas (Figura 17) se apresentou mais translúcido ao microscópio em relação ao com plaquetas frescas.

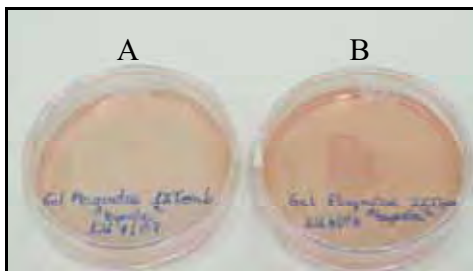


**Figura 12:** Géis Pérola 1x, 2x e 3x trombina, respectivamente.

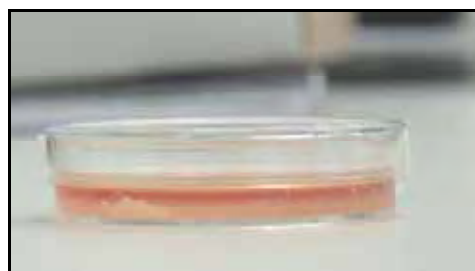


**Figura 13:** Microestrutura do gel Pérola (A,B,C) (1x) trombina. Notar as áreas opacas (A).

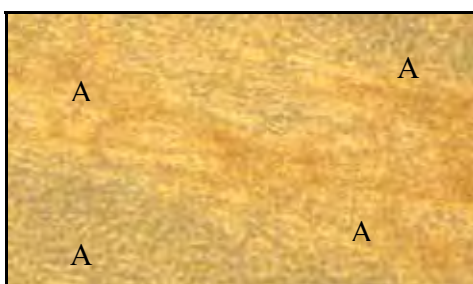
Objetiva de 10x.



**Figura 14:** Géis Tapete 1x (A) e 2x trombina (B)



**Figura 15:** Gel Tapete 1x trombina.



**Figura 16:** Microestrutura do Gel Tapete 1x. Notar as áreas translúcidas (A). Objetiva de 10x.



**Figura 17:** Microestrutura do Gel Tapete com plaquetas descongeladas. Objetiva de 10x.

Embora estes resultados, sobretudo a presença das áreas opacas no arcabouço *Pérola*, possam induzir à escolha do *Tapete* como forma a ser adotada, uma questão deve ser aprofundada: o arcabouço *Tapete* possui desvantagens que são impossíveis de serem solucionadas, como o fato da aderência à placa de cultura. Para se realizar uma análise histológica seria necessário que uma amostra do gel fosse mecanicamente destacada, com o uso de um bisturi. Isto danificaria a estrutura geral do gel, podendo provocar mudanças na estrutura do restante do gel da placa. A presença de áreas opacas no arcabouço *Pérola*, no entanto, é facilmente solucionada adotando-se um menor volume de PRP. Assim, adotou-se como forma final de apresentação do arcabouço, a *Pérola*, modificada pelo uso de 60µL de volume de plasma.

#### *1.8) Microencapsulação das CTMs e diferenciação condrogênica*

As pérolas de alginato foram práticas de se produzir, pois a matéria prima do arcabouço apresentava-se na forma líquida. Portanto, bastava diluir o botão celular em alginato de sódio e gotejar em uma solução polimerizadora de CaCl<sub>2</sub>. A distribuição celular obtida era homogênea, com células ocupando todas as áreas do arcabouço, em mesma concentração (Figura 18).

As pérolas do BIOGEL3D compartilhavam a mesma característica da apresentação em forma líquida (PRP), mas necessitavam de um método mais refinado. Com isso, era necessária maior quantia de material estéril, e a produção das pérolas era bem mais demorada, comparativamente ao alginato. Para tanto, foi necessário conceber um método inovador, já que não havia referências na literatura. Obtiveram-se pérolas de volume e

tamanho semelhantes, graças à boa padronização do processo. A distribuição celular também era homogênea (Figura 19).

As pérolas de celulose foram mais complicadas de produzir. Devido à apresentação do arcabouço ser em forma semissólida, era necessário um método de microencapsulação diferente, e a injeção celular foi a única escolha possível. Durante a padronização adotou-se aplicação de injeção única, contendo todas as 100.000 células diluídas em meio de cultura. Observou-se distribuição celular concentrada apenas no ponto de injeção e ausência de células nas outras áreas do arcabouço (Figura 20).

Este padrão não é interessante, pois haveria deposição de matriz extracelular apenas na área da injeção. Como já referido, a matriz recém sintetizada fará, no futuro, o papel do arcabouço. Com produção centralizada no ponto de aplicação, não haverá interação célula-matriz eficiente.

Diante disso, múltiplas injeções em diferentes pontos da pérola de celulose, visando-se a distribuição mais homogênea, foram realizadas nas etapas finais da produção do arcabouço. As células foram diluídas de modo a manter a quantidade de 100.000 por arcabouço, mas as aplicações foram fracionadas (25.000 x 4 injeções). Mesmo assim, não se obteve resultados satisfatórios, mantendo-se o padrão de concentração no ponto de aplicação (Figura 21).

Com relação a mitoses, observou-se alta proliferação celular nas pérolas de alginato e BIOGEL3D. Já na celulose bacteriana este padrão não foi observado, não corroborando a literatura (SVENSSON *et al.*, 2005), provavelmente devido a diferenças na rede porosa dos arcabouços utilizados.

Observou-se, no alginato e BIOGEL3D, a formação de complexos semelhantes a lacunas, com células inseridas e um material depositado (Figuras 22 e 23), bem como grupos de

duas a três células em divisão, lembrando a formação dos grupos isógenos cartilagosos (Figuras 24 e 25), em concordância com a literatura (BITTENCOURT, 2008).

Todos os arcabouços mantiveram a morfologia celular arredondada (Figuras 26, 27 e 28), em concordância com a literatura (MOUW *et al.*, 2005; SVENSSON *et al.*, 2005; BITTENCOURT, 2008). Em algumas áreas o arcabouço BIOGEL3D apresentou células com morfologia fibroblastóide (Figura 29), indicando diferenciação em fibroblastos, provavelmente decorrente da liberação do fator de crescimento fibroblastóide (FGF) pelos grânulos plaquetários.



**Figura 18:** Pérola de alginato e distribuição celular uniforme. Objetiva de 5x e ph2.



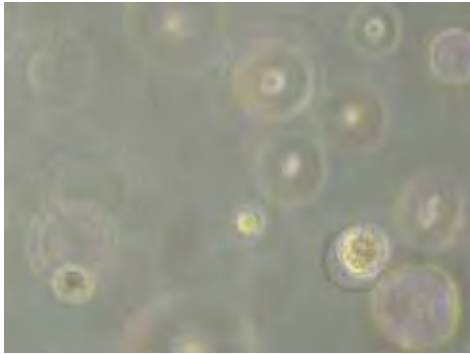
**Figura 19:** Pérola de BIOGEL3D e distribuição celular uniforme. Objetiva de 10x e ph1.



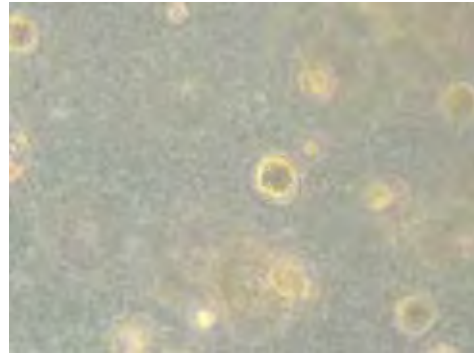
**Figura 20:** Pérola de celulose e distribuição celular concentrada no ponto de aplicação único. Objetiva de 5x e ph2.



**Figura 21:** Pérola de celulose após múltiplas injeções. Mesmo padrão de distribuição da figura anterior. Objetiva de 10x e ph1.



**Figura 22:** Célula e sua lacuna produzida em pérola de alginato. Objetiva de 20x e ph2.



**Figura 23:** Célula e sua lacuna produzida em pérola de BIOGEL3D. Objetiva de 20x e ph2.



**Figura 24:** Grupo de 3 células em divisão mitótica. Notar a semelhança aos grupos isógenos. Pérola de alginato. Objetiva de 20x.



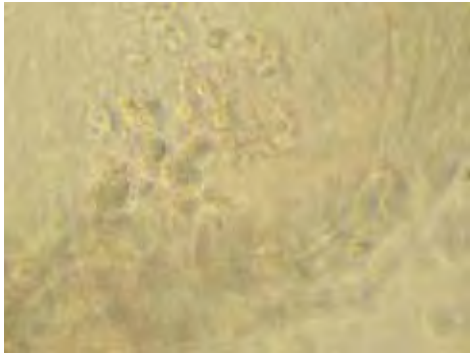
**Figura 25:** Grupo de 3 células em divisão mitótica. Mesmo padrão da figura anterior. Pérola de BIOGEL3D. Objetiva de 20x.



**Figura 26:** Pérola de alginato e células com morfologia arredondada. Objetiva de 5x e ph1



**Figura 27:** Pérola de BIOGEL3D e células morfológicamente arredondadas. Objetiva de 10x e ph1.



**Figura 28:** Pérola de celulose e células com morfologia arredondada. Objetiva de 40x e *ph1*.



**Figura 29:** Morfologia fibroblastóide em área da pérola de BIOGEL3D. Objetiva de 10x e *ph1*.

### *1.9) Análise histológica*

Durante o procedimento de fixação das pérolas de alginato ocorreu dissociação do arcabouço, tendo-se perdido as amostras. A hipótese levantada para tanto está relacionada ao fixador. O Karnovsky interagiu com o alginato de sódio determinando a sua dissolução. As outras pérolas, BIOGEL3D e BACTCELL3D, mantiveram-se íntegras e foram processadas.

O processo de inclusão em parafina envolveu sucessivas passagens em álcool, seguidas de passagens em xilol, com a finalidade de retirar a água do material e substituí-la por material miscível à parafina. As pérolas de alginato e BIOGEL3D, quando submetidas ao xilol, sofreram encolhimento, diminuição do volume para 1/10 do original. Com isso perderam-se as amostras e todo o processo teve de ser refeito, da coleta de MO, expansão das CTMs, microencapsulação nos arcabouços e nova análise histológica.

Adotou-se, então, a historesina como material de inclusão, pois esta dispensa os banhos iniciais de álcool e xilol. Trata-se de uma técnica mais ágil e mais segura para a obtenção



de amostras. Pérolas de alginato e BIOGEL3D foram congeladas em N<sub>2</sub>, em presença de DMSO, para a realização da análise imuno-histoquímica, já que a historesina não a permite. Apesar das secções terem revelado a ineficácia do processo de fixação identificou-se: células com aspectos morfológicos indicativos de morte celular e não-conservação das estruturas celulares intactas, como membrana plasmática, que se encontrava enrugada (Figura 30), fragmentada (Figura 31) e o núcleo piquinótico (Figura 32) em consonância aos achados já publicados por Guilherme *et al.*, 2008 de que ao longo das semanas de cultura ocorre uma diminuição da apoptose, mas o processo de cultivo induz ao aparecimento da apoptose tardia, resultados estes obtidos pela técnica de citometria de fluxo utilizando marcadores como anexina V e iodeto de propídeo. Em função dos problemas técnicos nas análises histológicas, foi encontrada pouca quantidade de células por secção (Figura 33), mas pôde-se confirmar as estruturas observadas durante a cultura celular, grupos isógenos de duas a três células (Figuras 34 e 35), e células inseridas em lacunas (Figura 36). O material da lacuna, entretanto, não se corou com azul de alcian tampouco azul de toluidina, o que pode ser outro reflexo do processo de fixação ineficaz. Em uma secção do BIOGEL3D foi identificado núcleo mais conservado, além de gotículas de lipídeos no interior citoplasmático, sugestivo de condrogênese (Figura 37).

As pérolas de celulose, quando submetidas a microtomia, revelaram secções com ausência total de células, o que já era esperado, devido ao efeito de concentração celular no ponto da injeção. Estas pérolas foram refeitas e continuaram a gerar secções desprovidas de células. Após adotar-se a estratégia da microencapsulação fracionada em múltiplas injeções, as pérolas foram novamente seccionadas, em diferentes profundidades, mas continuaram a não apresentar células. Este resultado mostra claramente o sério problema do processo de microencapsulação e, também, a falta de porosidade capaz de permitir a multiplicação e

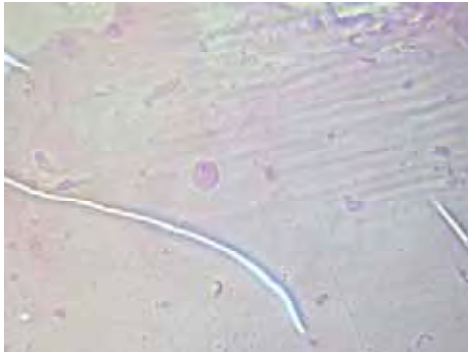
migração celular. Isto significa que na forma apresentada desta celulose os poros são pequenos e não proporcionam ambiente favorável às células, caracterizando-se a ineficácia do BACTCELL3D como um arcabouço. Estes resultados são concordes com a literatura (SVENSSON *et al.*, 2005), mas são explicados pelas diferenças nos métodos e características das celulosas utilizadas. No presente trabalho utilizou-se uma celulose não modificada e já polimerizada, enquanto no trabalho da literatura fez-se uso de sulfatações e fosforilações da superfície de crescimento, na tentativa de mimetizar as cargas conferidas pelas glicosaminoglicanas da MEC. Além disso, eles produziram a celulose, tendo controle sobre os parâmetros determinantes da rede porosa do arcabouço.



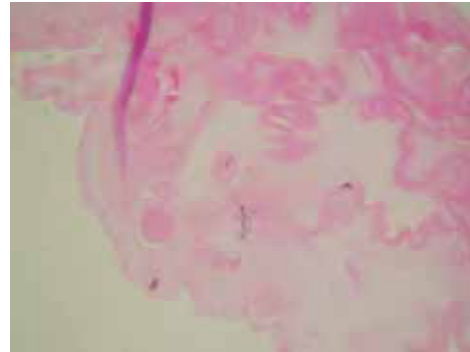
**Figura 30:** Secção histológica de arcabouço de BIOGEL3D. Seta: célula com mp enrrugada. Objetiva de 40x e ph2. H&E.



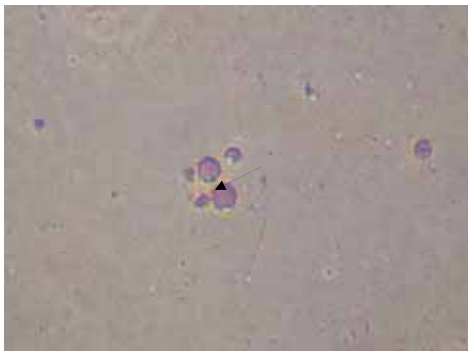
**Figura 31:** Célula e sua mp fragmentada devido ao processo falho de fixação. Objetiva de 40x e ph2. H&E.



**Figura 32:** Célula e seu núcleo picnótico. Objetiva de 20x e ph1. H&E.



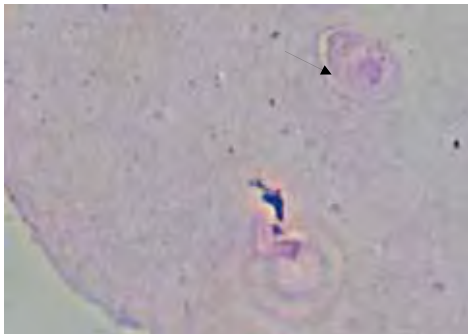
**Figura 33:** Secção histológica do BIOGEL 3D mostrando pouca celularidade. Objetiva de 40x e ph2. H&E.



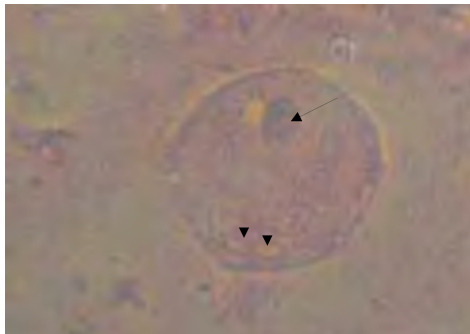
**Figura 34:** Duas células (seta) inseridas em lacuna lembrando os grupos isógenos da cartilagem nativa. Objetiva de 20x e ph1. H&E.



**Figura 35:** Quatro células (seta) inseridas em lacuna lembrando os grupos isógenos da cartilagem nativa. Objetiva de 40x e ph2. H&E.



**Figura 36:** Célula em lacuna (seta) formada no BIOGEL3D. Objetiva de 40x e ph2. H&E.



**Figura 37:** Célula inserida no BIOGEL3D. Núcleo (seta) e gotículas de lipídio (cabeça de seta). Objetiva de 100x. H&E.

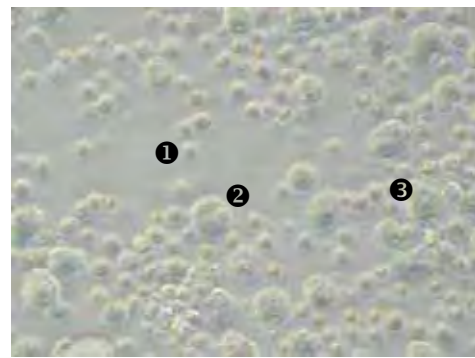
## *Etapa 2 - Produção de anticorpo monoclonal anti-CTM*

Esta etapa do projeto foi feita simultaneamente à determinação do volume de coleta de medula óssea. Ela foi necessária por inexistir no mercado insumo que pudesse caracterizar as CTMs de coelho: anti-CD90, por exemplo. Com os protocolos executados foi possível obter anticorpos que reconhecem CTMs, sendo 1 da classe IgG, 1 IgM e 4 outros expressando IgG e IgM, que após a clonagem serão separados. Este regente pode se tornar um insumo de pesquisa e mesmo de mercado com valor agregado importante e retorno institucional.

Foram realizadas três fusões celulares pelo método químico de polietilenoglicol. Durante a fusão celular observou-se linfócitos (menores) e células do mieloma (maiores), na placa de cultura (Figuras 38 e 39). Destaca-se que este é o aspecto clássico da fase inicial da fusão celular.



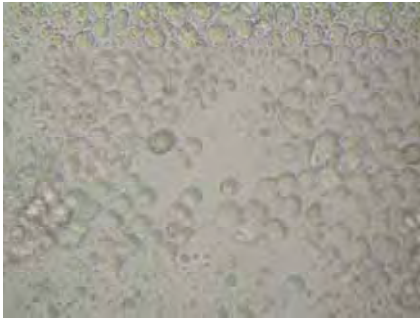
**Figura 38:** Linfócitos e mieloma ao microscópio invertido. Objetiva de 10x e ph1.



**Figura 39:** Linfócitos e mieloma ao microscópio invertido. ① linfócito murino normal não fusionado; ② mieloma múltiplo NS1 e ③ híbrido em rearranjo cromossômico. Objetiva de 40x e ph2.

Foram obtidas 10 placas de fusão no protocolo MSC1, 8 placas no protocolo MSC2 e 9 placas no protocolo MSC3, um material total equivalente a 2592 híbridos construídos. Na etapa de investigação ao microscópio, na procura por híbridos, foram selecionados 587

híbridos para serem analisados no *screening* em função destes poços possuírem colônias em plena expansão, com células morfológicamente arredondadas, translúcidas e não-aderentes (Figura 40). Destes últimos, os híbridos MSC1-1 a MSC1-282, MSC2-1 a MSC2-200 e MSC3-1 a MSC3-105 foram selecionados como tendo provável atividade anti-CTM de coelho. A diferença entre os híbridos obtidos (2592) e os testados (587) corresponde aos poços cujos híbridos não foram viáveis por provável exclusão enzimática que envolve a técnica de hibridomas. Sabidamente, o mieloma múltiplo não secretor NS1 utilizado possui um gene hipermetilado que lhe confere a característica de ser Hipoxantina-Ribosina-Fosforibosil-transferase (HGPRT) negativo e que o impede de usar a via alternativa para a síntese de nucleotídeos enquanto que linfócitos B de camundongos imunizados possuem gene normal, com a característica de ser HGPRT positivo. O híbrido ideal é aquele que no momento da fusão guarda suas características HGPRT+ e usam a via alternativa. No dia seguinte da fusão, adicionaram-se ao meio de cultura hipoxantina-aminopterina e timidina que obrigam as células a usarem a via alternativa. As células com gene hipermetilado são incapazes e morrem. Outra justificativa além da seleção enzimática genética para esta diferença entre híbridos construídos e testados fica por conta da habilidade técnica. Quanto mais agressiva for a obtenção das células esplênicas, maior a prevalência de fibroblastos na cultura. Os fibroblastos tornam o híbrido e futuro clone inviável economicamente e mesmo em termos de pesquisa. Os híbridos não podem ter a característica de aderência em plástico para facilitar os processos de ampliação em *batch* de cultura, biorreatores ou pelo método de produção de líquido ascítico.



**Figura 40:** Aspecto morfológico de um híbrido obtido e testado. Objetiva de 40X e ph2.

O resultado do *screening* inicial e dos três retestes daqueles identificados como “positivos”, significa que o sobrenadante de cultura contém uma imunoglobulina que se fixou na superfície das CTM de coelho. Após 3 retestes, 6 híbridos foram selecionados como de interesse para serem melhor estudados e amplificados.

**Quadro 3:** Híbridos obtidos, testados, cobertura de *screening* e retidos finais.

Protocolo	Híbridos Obtidos	Híbridos Testados	Cobertura de <i>screening</i>	Híbridos Retidos Finais
MSC1	480	282	58,75%	3
MSC2	480	200	41,66%	2
MSC3	384	105	27,34%	1

O quadro acima revela que o protocolo MSC1 conseguiu ter a melhor cobertura de *screening*, conseqüentemente, o maior número de híbridos retidos. Estes resultados estão entre os mais favoráveis descritos na literatura, onde um laboratório de produção de monoclonais, na sua melhor fase, consegue obter um anticorpo a cada 1.000 híbridos construídos. Na fase de consolidação da técnica, os resultados são mais efetivos atingindo

um anticorpo a cada 500 híbridos construídos. A maturidade da tecnologia instalada se verifica quando os projetos conseguem obter a relação de um anticorpo a cada 100-200 híbridos construídos (HARLOW & LANE, 1988). Os resultados dos últimos três anos no laboratório corroboram o diagnóstico de que a tecnologia dos monoclonais está bem consolidada no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.

A análise dos resultados obtidos na citometria de fluxo estão resumidos abaixo, no quadro 4:

**Quadro 4:** Híbridos obtidos, positividade no primeiro e último teste do screening e classe de imunoglobulina mais expressiva.

Híbrido Obtido	1.º Teste	3.º Re-teste	Classe mais expressiva
MSC1-132	31,67%	51,24%	IgM
MSC1-160	44,24%	67,26%	IgG
MSC1-193	80,42%	81,21%	IgM
MSC2-13	94,15%	82,78%	IgM
MSC2-91	71,09%	71,51%	IgM + IgG
MSC3-5	31,15%	79,16%	IgM

Esta ferramenta construída (AcMm anti-CTM de coelho) deveria ter sido utilizada para a caracterização das CTM a serem microencapsuladas e processadas em cultura para o estímulo da condrogênese nos diferentes arcabouços estudados, no entanto, dificuldades técnicas de reagentes e de agenda de laboratório dificultaram esta aplicação. Estes híbridos serão caracterizados imuniquimicamente e validados com o reagente disponível somente agora, pela tecnologia de citometria de fluxo e imuno-histoquímica.

## Conclusões

- Foram avaliados dois novos modelos de arcabouços 3D para diferenciação de CTMs em condrócitos: gel de plaquetas e celulose bacteriana.
- ❖ O modelo bioativo proposto, BIOGEL3D, demonstrou-se um arcabouço eficiente, ao verificar-se que manteve a morfologia celular arredondada, permitiu proliferação celular, e induziu a formação de estruturas e formações típicas de tecido cartilaginoso, como formação de grupos isógenos e células inseridas em lacunas. Novos modelos e estudos são necessários para a maximização de sua eficiência, como métodos para se depletarem os níveis dos fatores de crescimento indesejáveis à condrogênese, como o fator de crescimento fibroblastóide.
- ❖ O segundo modelo proposto, BACTCELL3D, não agiu eficientemente como arcabouço, uma vez que não permitiu a multiplicação celular e migração celular, além de não induzir a formação das citadas estruturas. Entretanto, caso seja utilizada uma versão com porosidade alterada, este arcabouço pode vir a ser vantajoso.
- Foram obtidos seis híbridos cujo sobrenadante de cultura reconheceu CTMs de coelho. As etapas de clonagem, caracterização e validação deverão ser objeto de estudo posterior.
- O volume ideal de coleta de MO para separação de LMN observado foi de 12mL, em relação aos indicadores estudados.



## Referências Bibliográficas

- ARAUJO, I.C.F. Tratamento de feridas crônicas de membros inferiores com biocurativos. 2007. 210 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2007.
- BENYA, P.; SHAFFER, J. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. **Cell.**, v.30, p.215-24, 1982.
- BHANOT, S.; ALEX, J.C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. **Facial Plast. Surg.**, v.18, p.27-33, 2002.
- BITTENCOURT, R.A.C. Cultura de Condrócitos para Uso Terapêutico: Reconstituição de Cartilagem. 2008. 129 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. 2008.
- CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells.**, v.25, p.2739-49, 2007.
- COVAS, D.T. Células-Tronco Mesenquimais. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células-tronco: A nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu, p. 35-48, 2006.
- FELISBINO, S.L.; CARVALHO, H.F. Condrócito. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. Células: Uma abordagem multidisciplinar. Barueri: Manole. p.11-21, 2005.
- FUCHS, J.R.; HANNOUCHE, D.; TERADA, S. et al. Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells. **Stem Cells.**, v.23, p.958-64, 2005.

- GUILHERME, G.B.R.; SOUZA, A.V.G.; MOROZ, A. *et al.* Comparação do Índice Apoptótico Progressivo em cultura de Condrócitos. **Biotecnologia cienc. desenvolv.**, v.37, p.70-5, 2008.
- GUILLOT, P.V.; CUI, W.; FISK, N.M. *et al.* Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. **J. Cell. Mol. Med.**, v.11, p.935-44, 2007.
- HARLOW E, LANE D. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
- HÄUSELMANN, H.J.; FERNANDES, R.J.; MOK, S.S. *et al.* Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. **J. Cell Sci.**, v.107, p.17-27, 1994.
- HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A. *et al.* In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v.76, p.431-8, 2006.
- HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood.**, v.102, p.3483-93, 2003.
- HOLLISTER, S.J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nat. Mater.**, v.4, p.518-24, 2005.
- JACKSON, R.W.; DIETERICHS, C. The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up. **Arthroscopy.**, v.19, p.13-20, 2003.
- JAIN, N.C. Comparative hematologic features of some avian and mammalian species. In: JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology.* Philadelphia: Lea & Febiger, p. 56-6, 1993.

- JANČÁŘ, J.; SLOVÍKOVÁ, A.; AMLER, E. *et al.* Mechanical response of porous scaffolds for cartilage engineering. **Physiol. Res.**, v.56, p.17-25, 2007.
- JAVAZON, E.H.; BEGGS, K.J.; FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Exp. Hematol.**, v.32, p.414-25, 2004.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido cartilaginoso. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 104-10, 1999.
- KISIDAY, J.; JIN, M.; KURZ, B. *et al.* Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.99, p.9996-10001, 2002.
- LAFEBER, F.P.; VAN ROY, H.; WILBRINK, B. *et al.* Human osteoarthritic cartilage is synthetically more active but in culture less vital than normal cartilage. **J Rheumatol.**, v.19, p.123-9, 1992.
- LEE, J.W.; KIM, Y.H.; KIM, S.H. *et al.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. **Yonsei Med. J.**, v.30, p.41-7, 2004.
- MARTIN, I.; PADERA, R.F.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. *et al.* In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stroma cells into cartilaginous and bone-like tissues. **J. Bone Joint. Surg.**, v.16, p.181-89, 1998.
- MOUW, J.K.; CASE, N.D.; GULDBERG, R.E. *et al.* Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. **Osteoarthr. Cartil.**, v.13, p.828-36, 2005.
- OSHIMA, Y.; WATANABE, N.; MATSUDA, K. *et al.* Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. **J. Histochem. Cytochem.**, v.53, p.207-16, 2005.

- PENICK, K.J.; SOLCHAGA, L.A.; WELTER, J.F. High-throughput aggregate culture system to assess the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells. **Biotechniques.**, v.39, p.687-91, 2005.
- PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science.**, v.276, p.71-4, 1997.
- RATAJCZAK, M.Z.; ZUBA-SURMA, E.K.; MACHALINSKI, B. et al. Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? **J. Appl. Genet.**, v.48, p.307-19, 2007.
- REDMAN, S.N.; OLDFIELD, S.F.; ARCHER, C.W. Current strategies for articular cartilage repair. **Eur. Cell Mater.**, v.9, p.23-32, 2005.
- SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells.**, v.25, p.818-27, 2007.
- SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T. *et al.* Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials.**, v.26, p.419-31, 2005.
- TAKAGI, M.; UMETSU, Y.; FUJIWARA, M. et al. High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells. **J. Biosci. Bioeng.**, v.103, p.98-100, 2007.
- THOMSOM, R.C.; WAKE, M.C.; YASZEMSKI, M.J. et al. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. **Adv. Polym. Sci.**, v.122, p.245-74, 1995.
- TOKUNAGA, K.; KINUGASA, K.; MEGURO, T. *et al.* Curative treatment of cerebral arteriovenous malformations by embolisation using cellulose acetate polymer followed by surgical resection. **J. Clin. Neurosci.**, v.7, p.1-5, 2000.

- TUAN, R.S. A second-generation autologous chondrocyte implantation approach to the treatment of focal articular cartilage defects. **Arthritis Res. Ther.**, v.9, p.109-13, 2000.
- XIANG, Y.; ZHENG, Q.; JIA, B.B. *et al.* Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. **J Zhejiang Univ. Sci. B.**, v.8, p.136-46, 2007.
- YOKOYAMA, M.; MIWA, H.; MAEDA, S. *et al.* Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. **J. Biosci. Bioeng.**, v.106, p.46-50, 2008.

## Anexos

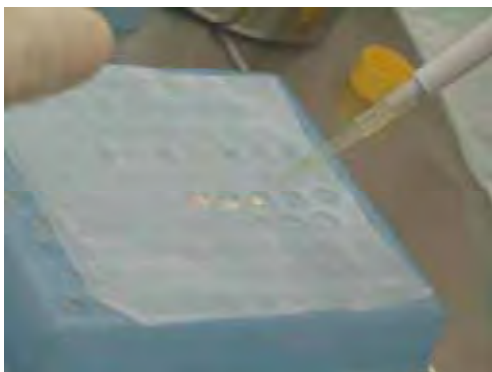
Anexo I: Métodos de microencapsulação das CTMs nos diferentes arcabouços utilizados.



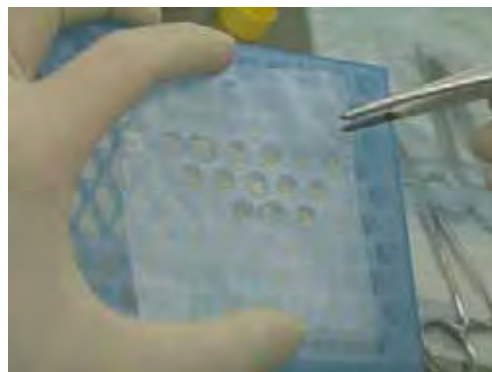
**Figura 41:** Método de microencapsulação das CTMs em scaffold de alginato de sódio.



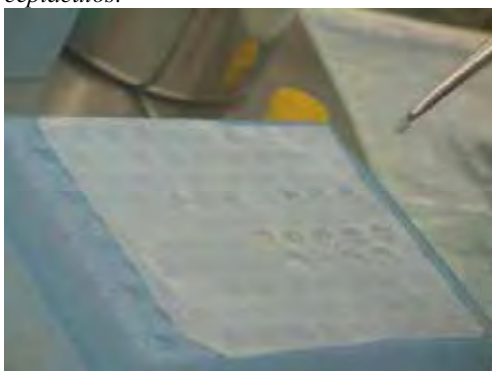
**Figura 42:** Produção dos receptáculos para o scaffold de BIOGEL3D



**Figura 43:** Produz-se a pérola de BIOGEL depositando-se o PRP/CTMs/trombina nos receptáculos.



**Figura 44:** Pérolas de BIOGEL aguardando a gelificação.



**Figura 45:** Após a completa gelificação retira-se o scaffold com uma pinça estéril.



**Figura 46:** Aspecto das pérolas de BIOGEL produzidas antes da adição do meio de cultura.



**Figura 47:** Pérola de celulose pura.



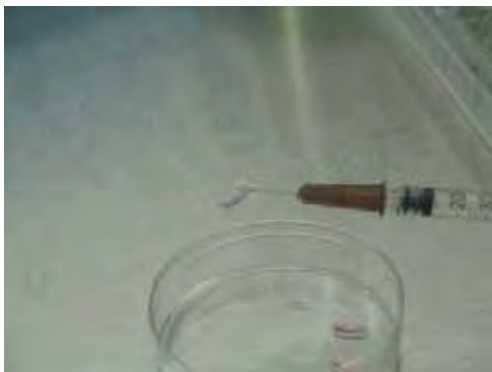
**Figura 48:** Preparo da placa para a transferência das CTMs.



**Figura 49:** Aspiração das CTMs da gota de MC.



**Figura 50:** Injeção das CTMs na pérola de celulose..



**Figura 51:** CTMs já microencapsuladas na pérola de celulose. Observe a mudança da cor.