

Camila Schiavinatto Godoy

**PRODUÇÃO DE CARTILAGEM ARTICULAR PORCINA E
CULTURA DE CONDRÓCITOS HUMANOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Luismar Marques Porto, *Ph. D.*

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Godoy, Camila Schiavinatto

Produção de cartilagem articular porcina e cultura de
condrócitos humanos / Camila Schiavinatto Godoy ;
orientador, Luismar Marques Porto - Florianópolis, SC, 2014.
93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Engenharia Genômica e
Biomédica. 3. Engenharia de Tecidos. 4. Engenharia de
Biosistemas. 5. Processos Químicos e Biotecnológicos. I.
Porto, Luismar Marques. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
III. Título.

Camila Schiavinatto Godoy

**PRODUÇÃO DE CARTILAGEM ARTICULAR PORCINA E
CULTURA DE CONDRÓCITOS HUMANOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Florianópolis, 30 de junho de 2014.

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr.^a Andréa de Lima Pimenta,
Membro participante - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti,
Membro externo - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira,
Membro interno - Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Instituto de Bioprocessos e Engenharia de Biosistemas da Universidade Técnica de Hamburg Harburg – Hamburg, Alemanha.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Técnica de Hamburg-Harburg - TUHH e ao Instituto de Bioprocessos e Engenharia de Biosistemas pela oportunidade de estágio de pesquisa em nível de mestrado oferecida.

Ao meu supervisor dos trabalhos desenvolvidos na Universidade Técnica de Hamburg, Professor Dr. Rolf Janßen, Engenheiro Sênior do Instituto de Cerâmicas Avançadas, que conduziu as atividades de estágio com enorme profissionalismo e que sempre encontrou tempo para compartilhar suas experiências, ensinar e apontar os prazeres, as dificuldades e desafios de ser um engenheiro de pesquisa e desenvolvimento.

Ao meu co-supervisor dos trabalhos desenvolvidos na TUHH, Professor Dr. Ralf Pörtner, Engenheiro-Pesquisador Sênior do Instituto de Bioprocessos e Engenharia de Biosistemas, que, quando a rotina lhe permitiu, partilhou suas experiências profissionais e transmitiu seus ricos conhecimentos sobre os processos de engenharia de tecidos.

À minha co-surpevisora dos trabalhos desenvolvidos na TUHH, Dra. Christiane Goepfert, Pesquisadora Associada do Instituto de Bioprocessos e Engenharia de Biosistemas, que com grande simpatia acompanhou todo o meu trabalho, dando suporte e me ensinando as técnicas laboratoriais que foram essenciais para a realização deste projeto e que sempre atendeu aos meus chamados de socorro durante os momentos de dificuldade.

Ao Professor Dr. Dachamir Hotza, professor associado da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo convite e pela oportunidade em realizar este estágio na Universidade Técnica de Hamburg, que me possibilitou essa experiência internacional, a qual foi de grande valia para o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento dos meus estudos realizados na Alemanha através do programa Ciência sem Fronteiras e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos meus estudos realizados no Brasil.

Agradeço ao meu orientador, Professor Luismar Marques Porto, *Ph. D.*, pela paciência e atenção em sua orientação durante este importante período da minha formação.

Agradeço aos membros da banca Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira, Dr.^a Andréa de Lima Pimenta e ao Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti, por aceitarem avaliar este trabalho, contribuindo com suas sugestões.

Agradeço imensamente aos meus pais, Vagner Godoy e Cecília Carmem Schiavinatto, que nunca mediram esforços para me educar e me ensinar tudo o que foi necessário para a minha formação pessoal, acarretando na minha formação acadêmica atual. Como um singelo agradecimento, dedico com todo amor e carinho este trabalho a eles.

RESUMO

Cartilagem articular danificada ou doente frequentemente leva à degeneração progressiva que resulta em uma diminuição acentuada na qualidade de vida. Engenharia de tecidos, um campo em expansão dentro das modernas ciências biomédicas, promete a criação de substitutos viáveis para falência total ou parcial de órgãos ou tecidos. Atuais abordagens da engenharia de tecidos baseiam-se, essencialmente, na restauração da estrutura de tecidos patologicamente alterados com base no transplante de células em combinação com matrizes de suporte e biomoléculas. A capacidade de manipular a estrutura do tecido e reconstituir a função *in vitro* tem tremendas implicações clínicas e é provável que tenha um papel chave em terapias celulares e genéticas nos próximos anos. O presente estudo é focado na geração de implantes condrais para a reparação de cartilagem articular, que consistem em substitutos da cartilagem *in vivo* pela cartilagem produzida *in vitro*. Culturas de condrócitos humanos foram realizadas com o intuito de avaliar a eficácia dos soros fetais bovinos, bem como dos fatores de crescimento. A combinação mais eficaz para a cultura tridimensional de condrócitos humanos foi atingida pela suplementação com soro FBS Superior e pelo enriquecimento com IGF-1. Re-diferenciação de células porcinas foi realizada, expandidas em gel de alginato, seguida de formação de cartilagem tridimensional em culturas de alta densidade celular. Neste trabalho, diferentes fatores de crescimento para a estimulação da re-diferenciação e formação de cartilagem foram utilizados para melhorar a qualidade dos implantes condrais. Foi demonstrado que a suplementação do meio com fatores de crescimento tem efeitos significativos sobre as propriedades da matriz. Nas amostras porcinas cultivadas com a adição dos fatores de crescimento IGF-1 e TGF- β 1 durante a cultura de alginato, os cortes histológicos mostraram a formação de tecido homogêneo e coloração intensa de colágeno tipo II.

Palavras-chave: Engenharia de Tecidos. Condrócitos. Cartilagem. Produção *in vitro*. Fatores de crescimento. bFGF. IGF-1. TGF- β 1. ASAP.

ABSTRACT

Damaged or diseased articular cartilage often leads to progressive debilitation which results in a marked decrease in quality of life. Tissue Engineering, a growing field within the modern biomedical sciences, promises the creation of viable substitutes for total or partial failure of organs or tissues. This represents the fusion of a fast developing of cellular and molecular biology, supported, on the one hand, by the chemical materials, and the other by the biomechanical engineering. Current approaches to tissue engineering are based mainly in the restoration of pathologically altered tissue structure based on cell transplantation in combination with support matrices and biomolecules. The ability to manipulate the tissue structure and reconstitute the function in vitro has tremendous clinical implications and is likely to have a key role in gene and cell therapies in the coming years. The present study focuses on the generation of chondral implants for articular cartilage repair, which consist of cartilage substitutes in vivo, by the in vitro cartilage produced. Cultured human chondrocytes were performed in order to evaluate the effectiveness of fetal bovine serum and growth factors. The most effective combination for the three-dimensional culture of human chondrocytes was achieved by supplementation with whey Superior FBS and the enrichment with IGF-1. Re-differentiation of porcine cells was performed, expanded in alginate gel, then the formation of three-dimensional cartilage cultures at high cell density. In this work, different growth factors for the stimulation the re-differentiation and cartilage formation were used to improve the quality of chondral implants. Was shown that supplementation of the medium with growth factors has significant effects on the properties of the matrix. In the samples cultured with the addition of growth factors IGF-1 and TGF- β 1 during the culture alginate, histological sections showed the formation of homogeneous tissue and intense staining of type II collagen.

Keywords: Tissue Engineering. Chondrocytes. Cartilage. Production in vitro. Growth factors. bFGF. IGF-1. TGF- β 1. ASAP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Cartilagens tridimensionais produzidas a partir de 5×10^6 condrócitos articulares porcinos semeados e expandidos em monocamada com 25 mL de meio DMEM enriquecido com FBS e em cultura de gel de alginato. Condições de cultivo: temperatura de 37 °C e atmosfera controlada a 5% de O₂ e 5% de CO₂. Fotos realizadas com o microscópio Stemi 2000-C Zeiss e câmera Canon DS126191; (barra de escala = 1 mm)..... 69
- Figura 2 – Parâmetros bioquímicos da concentração de GAG em relação à concentração de DNA dos condrócitos recuperados a partir da cultura em alginato, com IGF-1, TGF-β1 e ASAP, e das amostras de cartilagem do tecido suíno sem fatores de crescimento (n=18, p < 0,05)..... 71
- Figura 3 – Coloração imuno-histológica das amostras de cartilagem: Evidência da presença de colágeno tipo I, utilizando anticorpo primário anti-hCL I (MediCorp). Núcleos das células corados em azul por DAPI e MEC coradas em verde por FITC. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR; (barra de escala = 100 μm)..... 72
- Figura 4 – Coloração imuno-histológica das amostras de cartilagem: Evidência da presença de colágeno tipo II, utilizando anticorpo primário anti-hCL II (MediCorp). Núcleos das células corados em azul por DAPI e MEC coradas em verde por FITC. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR; (barra de escala = 100 μm)..... 73

- Figura 5 – Coloração imuno-histológica das amostras de cartilagem: Evidência da presença de colágeno tipo VI, utilizando anticorpo secundário de cabra anti-rato biotinado; (Southern Biotechnology Associates Inc.). Núcleos das células corados em azul por DAPI e MEC coradas em verde por FITC. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR; (barra de escala = 100 μm)..... 74
- Figura 6 – Coloração histológica das amostras de cartilagem: Análise da produção de glicosaminoglicanos por Safranina O. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR; (barra de escala = 100 μm)..... 75
- Figura 7 – Coloração imunohistológica: (1a) colágeno tipo I, (1b) colágeno tipo II (1c) colágeno do tipo VI. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR; (barra de escala = 100 μm)..... 76
- Figura 8 – Expansão dos condrócitos articulares humanos em monocamada com meio de cultura DMEM suplementado com os soros FBS, FBS Superior e FBS Gold analisada a cada passagem (P0, P1, P2 e P3) das células (n = 3, p < 0,05)..... 77
- Figura 9 – Contagem dos condrócitos articulares humanos ao final da expansão em monocamada e após a recuperação das células a partir da cultura em gel de alginato, com meio de cultura DMEM e a suplementação com FBS, FBS Superior e FBS Gold (n = 6, p < 0,05).....78

- Figura 10 – Expansão dos condrócitos articulares humanos em monocamada com o meio de cultura DMEM suplementado com soro FBS Superior e enriquecido com os fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1 analisada a cada passagem (P0, P1, P2 e P3) das células (n = 3, p < 0,05)..... 80
- Figura 11 – Contagem dos condrócitos articulares humanos ao final da expansão em monocamada e após a recuperação a partir da cultura em gel de alginato com meio de cultura DMEM suplementado com soro FBS Superior e enriquecido com os fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1 (n = 6, p < 0,05)..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Desenvolvimento de procedimentos de engenharia utilizados com base na engenharia de tecidos de cartilagem.....	28
Tabela 2 –Preparação da solução de PBS.....	38
Tabela 3 –Preparo da solução tampão de lavagem 1.....	38
Tabela 4 –Preparo da solução tampão de lavagem 2.....	38
Tabela 5 –Preparo da solução tampão de cálcio.....	38
Tabela 6 –Preparo da solução tampão de citrato.....	38
Tabela 7 –Preparo da solução de tripsina - Volumes com base no tamanho do frasco de cultura de células	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Complexo Adivina-Biotina
ASAP	Ácido Ascórbico 2-Fosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino
DAPI	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FBS	Soro Fetal Bovino
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
<i>g</i>	Força Gravitacional
GAG	Glicosaminoglicano
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]- etanosulfónico
IGF-1	Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1
MEC	Matriz Extracelular
$m \cdot m^{-1}$	Massa por massa
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
OA	Osteoartrite
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PP	Polipropileno
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPM	Rotações por minuto
SBA	Aglutinina de Soja
TGF- β 1	Fator Transformador de Crescimento Beta 1
U	Unidades de penicilina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	23
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivo geral.....	24
1.1.2 Objetivos específicos.....	24
1.2 JUSTIFICATIVA.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS	27
2.2 GERAÇÃO DE CARTILAGEM <i>IN VITRO</i>	29
2.3 EXPANSÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS EM MONOCAMADA.....	30
2.4 FORMAÇÃO DE CARTILAGEM PORCINA TRIDIMENSIONAL SOB TENSÃO DE OXIGÊNIO REDUZIDA.....	31
2.5 MATRIZ EXTRACELULAR E COLÁGENOS TIPO I, II e VI.....	32
2.6 SOROS FETAIS BOVINOS	33
2.7 COMBINAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO.....	35
2.8 TESTE IMUNO-HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA A PRODUÇÃO DA CARTILAGEM	37
3.2 ISOLAMENTO DOS CONDRÓCITOS.....	40
3.3 FUNDAMENTOS DOS PROCESSOS PARA A EXPANSÃO DOS CONDRÓCITOS EM MONOCAMADA E CONSTRUÇÃO DA CARTILAGEM EM CULTURA TRIDIMENSIONAL	43
3.3.1 Tripsinização	43
3.3.2 Contagem das células	44
3.3.3 Revestimento de placas de 12 poços com agarose ...	44
3.3.4 Troca do meio de cultura	45
3.4 PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS	45
3.5 CONGELAMENTO DAS CÉLULAS.....	46
3.6 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS	47
3.7 PRODUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE CARTILAGEM	47
3.7.1 Proliferação dos condrócitos isolados	47

3.7.2 Cultura em alginato e cultura primária.....	48
3.7.3 Preparação da cultura de cartilagem tridimensional ..	51
3.7.4. Avaliação das construções de cartilagem tridimensionais.....	53
3.8 DETERMINAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAG) NAS CARTILAGENS	54
3.9 DETERMINAÇÃO DO DNA NAS CARTILAGENS	56
3.10 INCORPORAÇÃO DAS CARTILAGENS TRIDIMENSIONAIS EM PARAFINA	58
3.11 COLORAÇÃO DAS SECÇÕES DE CARTILAGEM COM SAFRANINA-O E VERDE RÁPIDO.....	59
3.12 IMUNOHISTOQUÍMICA DAS AMOSTRAS DE CARTILAGEM DAS SECÇÕES PARAFINADAS.....	61
3.13 COLORAÇÃO DE ANTICORPOS DAS CÉLULAS POR FLUORESCÊNCIA.....	65
3.14 PROLIFERAÇÃO DE CONDRÓCITOS HUMANOS IMORTALIZADOS	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 CONDRÓCITOS PORCINOS.....	69
4.1.1 Parâmetros bioquímicos da concentração de GAG em relação à concentração de DNA.....	70
4.1.2 Presença de colágeno tipo I, colágeno tipo II e colágeno tipo VI.....	71
4.2 CONDRÓCITOS HUMANOS.....	76
4.2.1 Avaliação da eficiência dos soros FBS, FBS Superior e FBS Gold.....	76
4.2.2 Avaliação da eficiência dos fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1	79
5 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A engenharia de tecidos representa a convergência de um conjunto complexo de linhas de trabalho pré-existentes de três domínios muito diferentes: a medicina clínica, a engenharia e a ciência. Seus precursores mais óbvios são encontrados no domínio clínico, e são melhor compreendidos como exemplos específicos de estratégias de resolução de problemas gerais empregadas pelos médicos. No entanto, a engenharia de tecidos também é notável pela amplitude de sua aplicação à pesquisa biomédica, em áreas como a biologia celular e do desenvolvimento, nas ciências básicas médica e veterinária, em transplantes, na área de biomateriais, biofísica, biomecânica e na engenharia biomédica. Os principais desenvolvimentos da engenharia de tecidos foram realizados nas diversas áreas clínicas, incluindo enxertos vasculares, enxertos de pele, terapias de pâncreas, rim e insuficiência hepática, reparação de osso e de cartilagem [1].

A engenharia de tecidos engloba uma grande variedade de abordagens experimentais e disciplinas científicas. A engenharia de tecidos *in vitro* envolve a manipulação de células *in vitro*, antes da implantação no ambiente *in vivo*, enquanto a engenharia de tecidos *in vivo* baseia-se na capacidade natural do organismo de regenerar sobre biomateriais sem semeadura de células. Células, biomateriais, e condições de incubação controladas desempenham papéis importantes na construção e utilização dos modernos sistemas *in vitro* para a engenharia de tecidos [2].

A cartilagem humana adulta mostra fraca capacidade de reparação e regeneração. As explicações para isto incluem a sua capacidade limitada para a proliferação das células da cartilagem, denominadas condrócitos ou condroblastos; a capacidade dos condrócitos de se tornarem catabólicos em resposta aos mediadores patológicos e a natureza do tecido avascular, que impede a migração de células regenerativas, a menos que a lesão forneça acesso à medula [3].

O potencial impacto da engenharia de tecidos, tanto na área terapêutica, como do ponto de vista econômico, é enorme. O custo total com cuidados de saúde nos EUA, por exemplo, para pacientes que sofrem de perda de tecidos ou a falha de

órgãos, ultrapassa US\$ 400 bilhões anualmente. Aproximadamente 8 milhões de procedimentos cirúrgicos são realizados anualmente nos Estados Unidos para tratar estas desordens. Estimou-se que, já na década de 90, o mercado total de produtos para engenharia de tecidos movimentava, nos Estados Unidos, 80 bilhões de dólares anuais [4-5].

As lesões da cartilagem articular são geradas durante o curso de várias doenças das articulações, osteoartrite (OA), em conjunto com um grande número de condições genéticas ou metabólicas ou como resultado de um trauma, sendo a principal causa da perda de tecido cartilaginoso e apresentando efeitos diretos sobre a saúde do indivíduo. A dor durante a locomoção devido à OA no joelho é responsável pela maioria das cirurgias de prótese total do joelho. Em 2007, os custos nos EUA relacionados à OA foram superiores a US\$ 60 bilhões ao ano [6-7]. Portanto, este estudo teve como objetivo produzir cartilagem articular *in vitro*, determinando a eficiência dos soros fetais bovinos e dos fatores de crescimento utilizados e analisando bioquímica e histologicamente o tecido gerado, contribuindo assim, para que num futuro próximo seja possível aprimorá-la de forma a se tornar viável temporal e economicamente para a utilização em implantes de substituição total ou parcial de cartilagens articulares danificadas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como principal objetivo a produção de cartilagem articular porcina *in vitro* e a cultura de condrócitos articulares humanos imortalizados, ambas suplementadas com soros fetais bovinos e enriquecidas com fatores de crescimento.

1.1.2 Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Caracterizar condrócitos articulares porcinos, através de análises bioquímicas (GAG e DNA) e coloração imuno-histoquímica, produzindo-se construções de cartilagem tridimensionais cultivadas em alginato, a partir de células

expandidas em cultura de monocamada utilizando um meio de cultura padrão (DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham's F-12) com a adição de FBS (soro fetal bovino) e fatores de crescimento.

- Determinar a eficiência dos soros FBS, FBS Superior e FBS Gold, e dos fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1 durante todo o processo da proliferação em cultura de monocamada e do cultivo em gel de alginato de condrócitos articulares humanos imortalizados.

1.2 JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a osteoartrite, doença articular degenerativa, afeta principalmente a cartilagem articular e já é uma das dez doenças mais incapacitantes em países desenvolvidos. As estimativas são de que em todo o mundo 9,6% dos homens e 18,0% das mulheres com idade superior a 60 anos têm osteoartrite, sendo que 80% das pessoas com a doença têm limitações no movimento, e 25% não podem executar suas principais atividades da vida diária. A cartilagem danificada acarreta deformidades articulares graves representadas por distúrbios complexos no alinhamento de ligamentos e do aparelho muscular subjacente, causando dores articulares e debilitando parcial ou completamente a locomoção [8]. Tendo em vista que há limitações das respostas espontâneas da regeneração da cartilagem, e dada a multiplicidade de possíveis origens, as tentativas de curar lesões da cartilagem articular têm envolvido medidas sintomáticas que são úteis apenas para o paciente obter alívio e prevenir a progressão da destruição articular [9]. Ainda não foi desenvolvida uma técnica de produção de cartilagem articular xenogênica e/ou alogênica *in vitro*, que possa ser produzida em escala compatível à demanda dos pacientes com articulações lesionadas e que seja acessível aos sistemas de saúde. Portanto, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento desta técnica, de forma que a substituição da cartilagem possa ser parcial ou total dependendo da necessidade do paciente, pois assim, não serão mais necessários os atuais implantes protéticos que limitam o paciente

em muitas atividades físicas e nos movimentos de flexão e extensão, além de sofrerem desgaste das superfícies de rolamento da prótese e o afrouxamento dos componentes ao longo do tempo, tendo que ser substituídos [10], possibilitando ao paciente voltar às suas atividades normais de locomoção com mais conforto e menos limitações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

Transplante de um indivíduo para outro, ainda que muito bem sucedido, tem grave restrições. O grande problema é o acesso a tecidos e órgãos suficientes para todos os pacientes que deles necessitam. Em 2012, 115.940 pessoas estiveram em listas de espera de transplantes nos Estados Unidos, e muitos morreram enquanto esperavam por órgãos disponíveis. Além disso, problemas com o sistema imunológico produzem rejeição crônica e destruição ao longo do tempo. Criando um desequilíbrio ao sistema imune, a partir da imunossupressão, pode causar a formação de novos tumores. Essas restrições produziram uma necessidade de novas soluções para fornecer tecido suficiente. É dentro deste contexto que o campo da engenharia de tecidos surgiu. Novas fontes de células, incluindo muitos tipos de células-tronco, têm sido identificadas nos últimos anos, iniciando um novo interesse no campo. De fato, a emergência da biologia de células-tronco conduziu a um novo termo: medicina regenerativa. Os progressos neste domínio têm sido tão rápidos que o Prêmio Nobel de Medicina em 2012 foi atribuído aos Drs. Gurdon e Yamanaka por suas contribuições sobre a reprogramação de células e para a produção de células-tronco pluripotentes induzidas [11].

A abordagem de regeneração tecidual tem desenvolvido novas estratégias promissoras que têm o potencial de revolucionar o tratamento de pacientes que sofrem de uma perturbação das funções dos tecidos vitais. O conhecimento moderno adquirido nos campos da biologia celular e molecular, em combinação com novos biomateriais de pesquisa, tem proporcionado uma abordagem prática da regeneração. Procedimentos de engenharia de tecidos se concentram na distribuição ou na mobilização *in situ* de células capazes de restaurar a arquitetura patologicamente alterada e a função dos tecidos. Esta abordagem compreende a tríade interativa de células sensíveis, de uma matriz de suporte e de moléculas

bioativas que promovem a diferenciação e a regeneração tecidual (Tabela 1) [12].

Tabela 1 - Desenvolvimento de procedimentos de engenharia utilizados com base na engenharia de tecidos de cartilagem

	1ª Geração (atualmente)	2ª Geração (em desenvolvimento)	3ª Geração (futuro)
Principais abordagens	Transplantes de células autólogas	Retalhos de tecido pré-formados, construções em 3D e transplantes osteocondrais	Regeneração <i>in vivo</i> e reparação tecidual dirigida
Componente importante	Retalho de periosteal	Substâncias de distribuição e de suporte	Fatores de crescimento e biomateriais

Fonte: RISBUD M.V., SITTINGER M. Tissue engineering: advances in *in vitro* cartilage generation. Trends Biotechnol, v. 20, p. 351–356 (2002).

A engenharia de tecidos *in vivo* depende da capacidade natural do corpo para regenerar tecidos sobre os biomateriais sem células semeadas, porém esta abordagem pode requerer proteínas, DNA, ou aditivos de mRNA para uma regeneração melhorada. Esta tecnologia foi aplicada a pacientes durante décadas. Em contraste, a engenharia de tecidos *in vitro* envolve a manipulação de células *in vitro*, antes da implantação no ambiente *in vivo*. Embora esta técnica também dependa da capacidade do corpo para se regenerar, evidências adicionais são fornecidas com a presença de células ou de tecidos no momento do implante. Quando as células são utilizadas para a engenharia de tecidos, o tecido doador é dissociado em células individuais, que são implantados, quer diretamente para o hospedeiro ou expandidas em cultura, ligado a uma matriz de suporte, e reimplantadas após a expansão [1].

Um dos pontos críticos da engenharia de tecidos foi criar estruturas tridimensionais que permitiram um grande número de células a serem alojadas, necessárias para a criação de tecidos em três dimensões. Além disso, suportes de compostos de polímeros sintéticos foram introduzidos e proporcionaram

vantagens significativas na adaptação de propriedades tais como a resistência, as taxas de degradação e a incorporação de células [13].

A estratégia de engenharia de tecidos, geralmente implica os seguintes passos:

(i) Uma fonte de células adequada deve ser identificada, isolada, e estas devem ser produzidas em número suficiente.

(ii) Um material biocompatível apropriado que pode ser usado como um substrato de células (sistema aberto) ou um material de células-encapsuladas (sistema fechado) deve ser isolado ou sintetizado e fabricados com a forma e dimensões desejadas.

(iii) As células devem estar uniformemente semeadas no interior do material ou cultivadas num biorreator.

(iv) A estrutura projetada deve ser colocada em local adequado *in vivo*. Dependendo do local e da estrutura, vascularização pode ser necessária [14].

2.2 GERAÇÃO DE CARTILAGEM *IN VITRO*

A engenharia de tecidos de cartilagem tem um papel importante a desempenhar na geração de material de enxerto. Esta é uma abordagem para fabricar construções de cartilagem *in vitro*, que pode ser utilizada em cirurgias reconstrutivas. Os métodos, nos mais diferentes estudos de pesquisas com cartilagem, envolvem: a colheita da cartilagem suína ou humana, neste caso durante uma cirurgia; o isolamento de condrócitos através da digestão enzimática da cartilagem colhida; a expansão do número de células numa cultura em monocamada de duas dimensões, muitas vezes utilizando meios de cultura com soro e enriquecidos com fatores de crescimento; a semeadura das células sobre um suporte de crescimento e a formação da cartilagem tridimensional. Embora o progresso nesta área tenha sido lento, houve entusiasmo para o uso de células recém-isoladas ou expandidas, por causa da boa viabilidade de condrócitos transplantados [15].

Defeitos criados na cartilagem articular que foram preenchidos com condrócitos de cultura mostraram uma

reparação significativa no tecido com as características da cartilagem articular normal [16]. Em casos cuidadosamente selecionados, o primeiro uso clínico dos condrócitos autólogos expandidos mostrou o potencial com excelentes resultados, especialmente no cômulo femoral [17]. Assim, é evidente, a partir de estudos experimentais e clínicos, que condrócitos adultos podem ser expandidos *in vitro* e utilizados para a produção de cartilagem *in vivo*.

2.3 EXPANSÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS EM MONOCAMADA

Condrócitos isolados de indivíduos plenamente desenvolvidos têm uma capacidade limitada para a divisão celular, a menos que eles sejam cultivados em culturas em monocamada de soro enriquecido com suplementos de crescimento. O crescimento de condrócitos em cultura de monocamada com um número limitado de passagens serve para aumentar o número de divisões para procedimentos seguintes de transplante de condrócitos, mas a principal desvantagem desta abordagem é que os condrócitos sofrem desdiferenciação rapidamente durante a proliferação em monocamada [18]. Um metabolismo celular alterado é uma indicação de desdiferenciação dos condrócitos, que é acompanhado pela redução da síntese de cartilagem e por marcadores específicos, tais como o colágeno do tipo II e proteoglicanos específicos da cartilagem [19]. A desdiferenciação também altera a composição e a abundância de receptores e moléculas de sinalização importantes sobre a superfície da célula [20]. Por estas razões, em cultura de monocamada prolongada, condrócitos desdiferenciados continuam a se proliferar, mas parecem perder o seu potencial condrogênico irreversivelmente [21].

No entanto, estudos recentes em nossos laboratórios têm mostrado que culturas em monocamada de condrócitos articulares podem recuperar o seu potencial condrogênico se eles forem transferidos de uma passagem de monocamada para uma cultura de alta densidade. Culturas de alta densidade parecem promover a rediferenciação condrogênica, uma vez que, o ambiente tridimensional de suporte para as interações célula-célula imita as condições fisiológicas de cartilagem *in vivo*.

Baseada nas tecnologias para o tratamento de defeitos da cartilagem articular, a expansão celular de um pequeno número de condrócitos obtidos a partir de biópsias é uma parte integrante do processo de fabricação. O número inicial de células para a produção de implantes autólogos ou xenográficos é limitado pelo pequeno tamanho de uma biópsia, que é assumido ter entre $0,2 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^6$ células. Assim, os condrócitos devem ser expandidos por um fator de 100 a 1.000 até que o número de células desejado seja atingido: para a construção de cartilagem, um número inicial de 10^6 células é necessário. A fim de preencher um defeito de cerca de 6 cm^2 , é necessário subcultivar culturas em monocamada até a terceira passagem. A propagação em frascos-T compreende duas tripsinizações, levando a um fenótipo de desdiferenciação (redução da expressão de colágeno do tipo II e a produção de colágeno do tipo I) [22].

Cultura de condrócitos porcinos em monocamada é um método de interesse no transplante de condrócitos pela sua importância para a expansão e aumento da densidade celular.

2.4 FORMAÇÃO DE CARTILAGEM PORCINA TRIDIMENSIONAL SOB TENSÃO DE OXIGÊNIO REDUZIDA.

O tratamento de defeitos comuns por transplante de enxerto autólogo de condrócitos é um método bem estabelecido. No entanto, a aplicação desta técnica é limitada devido ao fato de que os implantes terem que ser obtidos a partir de regiões que não suportam o peso do corpo ou de parte deste. Assim, vários métodos têm sido desenvolvidos para a produção de implantes de cartilagem a partir de condrócitos xenogênicos. Uma vez que os condrócitos são colhidos a partir de uma pequena região do joelho suíno e expandidos em cultura de células, a cartilagem xenogênica cultivada *in vitro* permite a terapia de defeitos, evitando os inconvenientes acima mencionados de transplantes autólogos [23].

Pörtner *et al.* (2005) investigou o transporte de oxigênio em sistemas de cultura para a geração de *pellets* de cartilagem. Duas estratégias de cultura foram modeladas, um sistema de

cultura estática com o fornecimento de oxigênio através do meio, por difusão, e um sistema de cultura de perfusão com um meio enriquecido em oxigênio (para detalhes consulte [24]).

Para a cultura estática, a concentração de oxigênio na vizinhança do *pellet* diminui muito rapidamente para zero dentro de um curto espaço de tempo. Este efeito deve-se, sobretudo, ao transporte difusivo de uma concentração baixa de oxigênio através da camada limite entre o sedimento e o meio de cultura da cartilagem. Alternativamente, um sistema de perfusão foi modelado, em que o meio enriquecido com oxigênio flui sobre a cartilagem. Estes cálculos mostraram que a resistência à transferência de massa na camada limite, entre a cartilagem e o meio, pode ser significativamente reduzida, mas ainda assim a concentração de oxigênio no interior do *pellet* diminui muito rapidamente. A principal razão para essa limitação é a baixa taxa de transporte por difusão. A partir das observações dos dados experimentais, uma menor concentração de oxigênio na fase gasosa é recomendada. As simulações teóricas indicam que, mesmo sob condições ideais (sem limitação de transferência de massa na fase fluida) uma limitação grave de oxigênio dentro dos tecidos deve ser esperada. Se o fornecimento de oxigênio é o fator limitante durante a formação de cartilagem, um sistema de biorreatores (câmara de fluxo) com uma fonte de oxigênio deve levar a uma melhor qualidade de cartilagem “engenheirada”. Por outro lado, baixas concentrações de oxigênio na fase gasosa parecem melhorar algumas propriedades da matriz [22].

2.5 MATRIZ EXTRACELULAR E COLÁGENOS TIPO I, II e VI

Crescimento e diferenciação celular, em cultura celular bidimensional, bem como no espaço tridimensional do organismo em desenvolvimento, requer a presença de um ambiente estruturado, com o qual as células possam interagir. Esta estrutura necessária é a matriz extracelular (MEC), que é composta de redes poliméricas de vários tipos de macromoléculas, em que as moléculas menores, de íons e de água são ligadas. Os principais tipos de macromoléculas são proteínas de formação de polímeros, tais como colágeno, elastina, fibrilina, fibronectina e laminina; e heteropolissacarídeos hidrofílicos, tais como cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) em

ácido hialurônico e proteoglicanos. É a combinação de polímeros de proteínas e proteoglicanos hidratados que dão às matrizes extracelulares a sua resistência para suportar as forças mecânicas de tração e compressão [11].

Colágenos são os componentes principais de matriz extracelular e representam as principais proteínas (cerca de 25%) em tecidos de mamíferos [25]. Uma subfamília destas proteínas são os colágenos fibrilares, que contêm rígidas moléculas e são o principal tipo de colágeno que formam a estrutura da cartilagem articular [26].

Colágenos do tipo I, II e III são fibrilares. Colágeno do tipo I é o colágeno mais abundante do corpo humano, que forma as fibras grandes e eosinofílicas conhecidas como fibras de colágeno. Ele está presente no tecido cicatricial, o produto final da reparação do tecido, assim como tendões, ligamentos, o endomísio de miofibrilas, a parte orgânica do osso, a derme, a dentina e cápsulas de órgãos [27]. Já o colágeno do tipo II é a base para a cartilagem articular. Ele representa 50% de toda a proteína na cartilagem e 85-90% do colágeno da cartilagem articular. O colágeno tipo II possui forma de fibrilas, esta rede de colágeno fibrilar permite à cartilagem reter o agregado de proteoglicanos, assim como fornecer força de tração ao tecido [28]. Colágeno do tipo VI é um dos principais componentes da matriz pericelular na cartilagem articular e possui estreita associação com a superfície celular de condrócitos e a matriz da cartilagem [29]. Colágeno tipo VI está presente na maioria dos tecidos conjuntivos; possui propriedades de ligação para as células, proteoglicanos e colágeno tipo I, além de poder servir como uma ponte entre as células e a matriz [30].

2.6 SOROS FETAIS BOVINOS

Soro fetal bovino (FBS) ou soro fetal de vitelo é a fração do sangue remanescente após a coagulação natural do sangue, seguida por centrifugação para remover todos os resquícios de glóbulos vermelhos do sangue. O soro bovino fetal vem do sangue colhido a partir de feto de bovino através de um sistema fechado de coleta no matadouro. FBS possui baixo nível de

anticorpos e contém fatores de crescimento, permitindo versatilidade em muitas aplicações de cultura de células, sendo, assim, o suplemento mais amplamente utilizado para a cultura de células eucarióticas *in vitro*. A proteína globular, albumina de soro bovino (BSA), é um dos principais componentes de soro fetal bovino. A rica variedade de proteínas de soro fetal bovino mantém células cultivadas em um meio em que elas podem sobreviver, crescer e se dividir [31].

O soro FBS Gold difere-se do FBS tradicional por um conteúdo particular com baixo nível de anticorpos IgG (Imunoglobulina G) e nutrientes adicionais para fornecer mais fácil adaptação, crescimento celular superior e aumentar a produtividade de proteína durante a cultura celular. FBS Gold é completamente definido: o soro é cromatograficamente purificado e fracionado e então os constituintes individuais são recombinados em uma composição uniforme, proporcionando, assim, um soro sem variação entre lotes [32, 33].

A exigência de hormônios e fatores de crescimento na cultura de células é geralmente satisfeitas incluindo soro animal, geralmente 10% de soro fetal de vitelo. Esta é uma prática difundida, mas tem duas desvantagens significativas: O soro pode não ser completamente caracterizado e há diferenças entre lotes de soro, que pode ser crítico para os resultados experimentais [11]. A fim de uniformizar as variações habituais das características biológicas de lotes de FBS, foi desenvolvido o FBS Superior. Devido à adição de suplementos sintéticos selecionados, é garantido a qualidade constante do soro, eliminando, assim, a necessidade da realização de testes a cada lote e a adaptação das células entre um lote e outro. FBS Superior é livre de micoplasma, evitando, assim, a contaminação das células por estas bactérias [34-36]. Não existe atualmente uma unidade para remover o soro a partir de fetos de bovino para a preparação de células que se destinam a implantação em pacientes humanos, isso por causa da possibilidade de transmissão de doenças de animais para os pacientes [11].

2.7 COMBINAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO

O fator de crescimento de fibroblastos básico, também conhecido como bFGF, FGF2 ou FGF- β , está presente na membrana basal e na matriz extracelular subendotelial dos vasos sanguíneos do tecido. O bFGF é produzido por uma variedade de células do organismo e é secretado na matriz extracelular, acelerando a proliferação das células para a reconstituição do tecido, além de promover a diferenciação celular [37-41]. Em estudos realizados com diferentes células animais, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) mostrou acelerar a formação de tecido, o aumento da proliferação de células e de acumulação de colágeno [11].

Pesquisas realizadas para determinar as características e efeitos de fatores de crescimento em engenharia de tecidos de cartilagem provaram que especialmente o IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) e TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*) demonstram resultados positivos. Ambos os fatores de crescimento, IGF-1 e TGF- β 1, podem ser produzidos por condrócitos e são acumulados na matriz extracelular [42]. A partir de vários estudos, sabe-se que o IGF-1 e o TGF- β 1 influenciam a diferenciação de condrócitos e também a formação de cartilagem *in vitro* [43]. Os resultados variados sobre os efeitos desses fatores de crescimento são atribuídos às diferenças nas condições de cultura, à espécie e idade dos doadores, às concentrações dos fatores de crescimento, ao estado de diferenciação celular e à adição de soro [44].

O IGF-1 é um importante fator anabólico para os condrócitos e para a cartilagem *in vitro*. Ele pode estimular a proliferação de células e a biossíntese de matriz extracelular, em particular a produção de proteoglicanos. A adição de TGF- β 1 ao meio de cultura mostra efeitos diversos sobre a cultura de condrócitos. Ela pode estimular ou inibir o crescimento das células e o acúmulo de proteoglicanos e colágeno tipo II. Tsukazaki *et al.* (1994) observaram que o TGF- β 1 atua sinergicamente com o IGF-1, o que significa que uma combinação de ambos os fatores de crescimento pode influenciar o cultivo de uma maneira diferente do que cada fator de

crescimento por si só. Assim, os suplementos de fator de crescimento podem melhorar a qualidade da cartilagem de engenharia, mas eles têm que ser ajustados para cada aplicação de engenharia de tecidos [45].

2.8 TESTE IMUNO-HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM

O conceito fundamental da imuno-histologia é a localização de antígenos dentro das seções de tecido por meio de anticorpos específicos, em que é detectada a reação antígeno-anticorpo com uma reação de coloração histoquímica visível no microscópio de luz ou com fluorocromos por luz UV em microscópio de fluorescência. Métodos que utilizam anticorpos, como os testes imuno-histológico de cartilagem, são de especial importância devido à especificidade inerente da reação antígeno-anticorpo. Desde sua descoberta por E. BEHRING e S. KITASATO (1890) há mais de um século, os anticorpos são utilizados como proteínas de ligação com ligantes altamente seletivos e são largamente utilizados para a detecção e a separação de moléculas antigênicas [46].

Os anticorpos são feitos através da imunização de animais (rato, coelho, cabra, cavalo, etc.) com antígenos purificados. O animal responde produzindo anticorpos que reconhecem especificamente e se ligam aos antígenos. O anticorpo monoclonal é produzido principalmente em ratos [47].

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os procedimentos realizados no desenvolvimento da pesquisa, bem como todo o material necessário para a realização da mesma. Para o desenvolvimento deste trabalho foram conduzidos experimentos primeiramente com condrócitos articulares de joelhos suínos e, em seguida, como dados exploratórios, com condrócitos humanos.

Os protocolos experimentais, que serão apresentados a seguir, foram traduzidos e adaptados a partir dos seguintes trabalhos:

- *Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue* (MARTIN *et al.*, 1999).
- *Bioreactor cultivation of three-dimensional cartilage-carrier-constructs* (NAGEL-HEYER *et al.*, 2005).
- *Chondrocytes in agarose culture synthesis a mechanically functional extracellular matrix* (BUSCHMANN *et al.*, 1992).
- *Relationship between physical, biochemical and biomechanical properties of tissue-engineered cartilage-carrier-constructs* (NAGEL-HEYER *et al.*, 2005).
- *Redifferentiation capacity of human articular chondrocytes (HAC) expanded on microcarriers* (GOEPFERT *et al.*, 2006).

3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA A PRODUÇÃO DA CARTILAGEM

As soluções foram preparadas com água duplamente destilada. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N. Para a quantidade de água, deve-se encher inicialmente um pouco abaixo do volume total, em seguida, ajustar o valor do pH e, em seguida, completar o volume. As soluções foram

autoclavadas e, assim, podem ser mantidas na câmara fria por cerca de um mês.

- PBS:

Tabela 2 - Preparação da solução de PBS

Produtos Químicos	Composição [g·L⁻¹]
NaCl	8,00
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
NH ₂ PO ₄ ·1H ₂ O	0,75

- Solução tampão de lavagem 1:

Tabela 3 - Preparo da solução tampão de lavagem 1

Produtos Químicos	Concentração [mM]	Composição [g·L⁻¹]
NaCl	150	8,77
HEPES	25	5,96

- Solução tampão de lavagem 2:

Tabela 4 - Preparo da solução tampão de lavagem 2

Produtos Químicos	Concentração [mM]	Composição [g·L⁻¹]
NaCl	300	17,50
HEPES	50	11,90

- Tampão de cálcio:

Tabela 5 - Preparo da solução tampão de cálcio

Produtos Químicos	Concentração [mM]	Composição [g·L⁻¹]
CaCl ₂ ·2H ₂ O	100	14,70
HEPES	25	5,96

- Tampão de citrato:

Tabela 6 - Preparo da solução tampão de citrato

Produtos Químicos	Concentração [mM]	Composição [g·L⁻¹]
NaCl	150	8,77
Citrato trissódico di-hidratado	55	16,18
HEPES	25	5,96

- Alginato: Foram adicionados 2,4% (massa/volume) de alginato em água bidestilada (lentamente, por agitação durante a noite) e pasteurizou-se durante dez minutos a 100 °C em autoclave. O alginato pode ser utilizado apenas por duas semanas de armazenamento à temperatura ambiente. Caso haja um aquecimento excessivo ou armazenamentos longos, perde a viscosidade da solução e não pode mais ser utilizado. A solução deve ser de cor amarela pálida. Quando apresenta a cor castanha, significa que foi muito aquecida e, portanto, deve ser descartada.
- Agarose: A agarose foi dissolvida a 1% em PBS com aquecimento. Cada solução preparada foi utilizada apenas uma vez.
- Tripsina: Diluiu-se tripsina/EDTA (PAA, Alemanha) 1:10 em PBS estéril (Concentração utilizada: 0,5 mg·mL⁻¹ de tripsina, 0,22 mg·mL⁻¹ de EDTA).
- Meio de Cultura (DMEM enriquecido com glicose): Adicionou-se 10% de soro FBS (soro para a proliferação das células), 100 U·mL⁻¹ de penicilina, 100 µg·mL⁻¹ de estreptomicina (PAA) e HEPES a pH 7,4 (25 mM de concentração final) ao meio de cultura.
- Meio de Congelamento: Adicionou-se 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 20% de meio DMEM em FBS e esterilizou-se por filtração. O armazenamento foi feito a -20 °C.
- bFGF: Tampão: 5 mM de tris(hidroximetil)aminometano + BSA (Albumina de Soro Bovino) a 0,5% (pH 7,6), esterilizou-se por filtração, dissolveu-se 0,1 mg·mL⁻¹ em tampão, utilizou-se 100 µl de alíquotas preparadas e armazenou-se a -20 °C. O bFGF permanece estável durante 2 semanas a 4 °C.

- IGF-1: Tampão: ácido acético 10 mM + BSA a 0,5%, esterilizou-se por filtração, dissolveu-se 0,1 mg·mL⁻¹ em tampão, utilizou-se 100 µl de alíquotas preparadas e armazenou-se a -20 °C. O IGF-1 permanece estável durante 1 semana a 4 °C.
- TGF-β1: Tampão: 4 mM de HCl + 0,5% de BSA, esterilizou-se por filtração, dissolveu-se 0,01 mg·mL⁻¹ em tampão, utilizou-se 200 µL de alíquotas preparadas e armazenou-se a -20 °C. O TGF-β1 permanece estável durante 4 semanas a 4 °C.
- ASAP: Preparado com 0,28 mM de ácido-2-fosfato ascórbico + 0,1 mM de cisteína, em água bidestilada, esterilizado por filtração. As alíquotas foram preparadas e armazenadas a -20 °C.

3.2 ISOLAMENTO DOS CONDRÓCITOS

Todo o trabalho foi realizado sobre bancada limpa e esterilizada. Todas as soluções e materiais foram esterilizados e os princípios de funcionamento estéril foram seguidos.

Preparação das células:

As células foram isoladas a partir da cartilagem de suínos jovens de 4 meses de idade, mais especificamente dos joelhos, obtidos um dia antes no matadouro Ernst (Endereço: Cuxhavener Strasse, 391, 21149 Hamburg, Alemanha. Tel: +49 40 7018301).

Materiais para a coleta do tecido cartilaginoso suíno:

- Placas de Petri de vidro estéreis;
- Bisturis descartáveis estéreis;
- Filtro de seringa (0,22 µm);
- Seringas de 10 mL e agulhas longas de 30 × 0,7 mm com corte bisel trifacetado;
- 3 pinças estéreis;
- Folha de alumínio autoclavada 40 × 40 cm.

Soluções para a coleta da cartilagem e isolamento dos condrócitos:

- PBS estéril;
- DMEM com FBS;
- Penicilina / estreptomicina (Gibco, EUA);
- Tripsina estéril;
- Colagenase Tipo 1a (Sigma-Aldrich C 9891, Alemanha);
- Hialuronidase tipo III a partir de ovelhas (Sigma-Aldrich, Alemanha).

OBS: A umidade leva à inativação da colagenase e da hialuronidase; portanto, o descongelamento foi realizado com as alíquotas fechadas.

Implementação do protocolo de isolamento dos condrócitos:

O isolamento foi realizado no período vespertino do mesmo dia em que os joelhos suínos foram obtidos no matadouro Ernst.

1. Uma folha de alumínio foi aberta sobre a bancada da capela de fluxo laminar. Uma placa de Petri estéril foi preenchida com 25 mL de PBS.
2. Os joelhos foram enxaguados com o desinfetante cirúrgico Sterillium, tendo-se o cuidado para que o Sterillium não atingisse a cápsula do joelho. Uma placa de Petri grande serviu como suporte para a cápsula do joelho.
3. Joelhos suínos foram abertos com bisturi estéril e auxílio de pinças. Foi utilizada a cartilagem somente a partir do fêmur.
4. Foi realizada a dissecação do osso, a cartilagem subjacente foi removida com um bisturi convencional com lâmina nº. 15 e transferida para a placa de Petri com PBS.
5. A cartilagem foi lavada com PBS para remover o sangue residual.
6. A cartilagem foi cortada com o auxílio de 2 bisturis em pedaços de aproximadamente 2 x 2 mm.

7. O PBS foi removido da placa de petri e as secções de cartilagem foram lavadas 3 vezes com 25 mL de PBS fresco.
8. A solução de hialuronidase foi assim preparada: 12,5 mg de hialuronidase em pó (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram adicionadas a 10 mL de PBS; em seguida, essa solução foi extraída com seringa e filtrada para ser esterilizada.
9. Todo o PBS da placa de Petri com as secções de cartilagem foi removido e a solução de hialuronidase foi adicionada.
10. Adicionou-se 550 μ L de penicilina/estreptomicina às secções de cartilagem e colocou-se, durante 25 minutos, na incubadora a 37 $^{\circ}$ C sob agitação. Esta é a primeira parte da digestão, onde os glicanos são digeridos.
11. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, pois este não contém condrócitos.
12. Adicionou-se 50 mL de tripsina à placa de Petri, e esta foi colocada na incubadora, durante 45 minutos a 37 $^{\circ}$ C sob agitação.
13. Descartou-se a tripsina e adicionou-se 50 mL de meio contendo soro (10% de FBS) e a placa de Petri foi submetida a cinco minutos de incubação.
14. O meio de cultura foi descartado e 40 mL de meio fresco (com FBS) foram adicionados.
15. Preparou-se solução de colagenase: Foram dissolvidos 25 mg de colagenase em 10 mL de PBS. O meio de cultura da placa foi descartado e a solução de colagenase foi adicionada com filtro de seringa de 0,22 μ m para ser esterilizada. Adicionou-se 100 μ L de penicilina/estreptomicina. A placa com as secções de cartilagem foi tampada e permaneceu na incubadora durante a noite a 37 $^{\circ}$ C.
16. A digestão foi acompanhada através do microscópio. Como as peças ainda não estavam completamente digeridas, adicionou-se novamente colagenase e deixou-se reagir por mais duas horas na incubadora.
17. A solução com a cartilagem digerida foi transferida a partir da placa de Petri para um tubo e centrifugada a 1.500 RPM (RCF= 367,92 g) por oito minutos.

18. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspenso em 50 mL de solução tampão de lavagem. A contagem de células foi realizada com *trypan blue* e determinou-se o número de células de acordo com a seção 3.3.2.
19. As células foram semeadas após isolamento em frascos T175 (ver seção 3.4 ‘Proliferação das células’). Foram semeadas 5×10^6 células em cada frasco e adicionados 25 mL de meio DMEM com FBS e penicilina/estreptomicina ($100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de penicillina e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina, PAA).

3.3 FUNDAMENTOS DOS PROCESSOS PARA A EXPANSÃO DOS CONDROCITOS EM MONOCAMADA E CONSTRUÇÃO DA CARTILAGEM EM CULTURA TRIDIMENSIONAL

3.3.1 Tripsinização

Soluções utilizadas para a tripsinização:

- PBS estéril;
- Tripsina estéril;
- Meio de cultura contendo FBS.

Implementação do protocolo de tripsinização:

Tabela 7 - Preparo da solução de Tripsina – Volumes com base no tamanho do frasco de cultura de células.

Frasco	T175	T75	T25
PBS [mL]	8	5	3
Tripsina [mL]	5	3	1
Meio para parar a ação da tripsina [mL]	5	3	1

1. O meio de cultura foi removido do frasco de cultura e colocado em um frasco de descarte.
2. Lavou-se duas vezes com PBS, com o volume indicado na Tabela 7, cada frasco (não adicionado diretamente sobre a base do frasco). Com o frasco-T brevemente inclinado para que o PBS escorresse pelo base, retirou-se com uma pipeta novamente e descartou-se.

3. Adicionou-se tripsina, deitou-se a garrafa para espalhar uniformemente a tripsina, observou-se o processo de desprendimento batendo-se no lado da garrafa sob o microscópio.
4. Uma vez que as células perderam a adesão com a base do frasco, após cinco minutos, parou-se a reação adicionando meio contendo soro. Misturou-se três vezes com a pipeta e transferiu-se a suspensão para um pequeno tubo.

3.3.2 Contagem das células

Soluções e materiais para a contagem das células:

- *Trypan blue* (solução azul para diferenciar as células mortas das vivas);
- Montagem da câmara de contagem (câmara de Neubauer).

Implementação do protocolo de contagem das células:

1. As células foram suspensas e bem misturadas.
2. Foram colocados 100 μL de amostra em frasco Eppendorf.
3. Adicionou-se 50 μL de *trypan blue* e em seguida misturou-se bem.
4. As células foram contadas em câmara de Neubauer.
5. Foi utilizado o seguinte cálculo para obter a concentração de células:

$$\frac{\text{células contadas}}{\text{número de quadrantes}} \times 1,5 \times 10^4 = \text{células} \cdot \text{mL}^{-1}$$

3.3.3 Revestimento de placas de 12 poços com agarose

Soluções e materiais para o revestimento da placa:

- Agarose;
- Placas de 12 poços.

Implementação do protocolo de revestimento de placas de 12 poços:

1. A agarose foi autoclavada e foi retirada da autoclave a 80 °C.
2. Adicionou-se 2 mL de agarose por poço com uma pipeta estéril, mantendo a placa inclinada.
3. As placas foram tampadas e colocadas em incubadora a 37 °C, onde ficaram armazenadas durante 3 semanas.

3.3.4 Troca do meio de cultura

O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas durante a semana e a cada 72 horas nos fins de semana. Sendo assim, a troca do meio de cultura foi realizada sempre nas segundas, quartas e sextas-feiras.

3.4 PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS

Os valores apresentados aqui são dados para um frasco T175 (Carl Roth, Alemanha). De acordo com o número de células isoladas, vários frascos T175 são utilizados. As densidades das células não devem ser alteradas, de modo que, no início do experimento, o número de gerações continue sendo comparável com as células iniciais.

Materiais e soluções para a proliferação das células:

- Frasco-T175 (Carl Roth, Alemanha) para cultura de células;
- PBS estéril;
- Tripsina estéril (PAA, Alemanha);
- bFGF (Cell Concepts, Alemanha);
- DMEM com FBS (PAA, Alemanha).

Implementação do protocolo de proliferação das células:

1. As células utilizadas foram previamente submetidas ao isolamento por centrifugação a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g) por oito minutos.

2. Uma contagem de células na ordem de $1,5 \times 10^6$ células em 25 mL de meio foi definida.
3. 2,5 μL de bFGF foram adicionados aos 25 mL de meio de cultura.
4. Semeou-se a suspensão de células em um frasco T175. As condições de cultura utilizadas foram: 37 °C, 5% de O_2 e 5% de CO_2 .
5. O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas: Preparou-se 25 mL de meio com 2,5 μL de bFGF em um tubo, removeu-se o meio velho do frasco T e adicionou-se o meio fresco.
6. Pouco antes de se atingir a confluência celular no frasco, aproximadamente após 14 dias, as células foram tripsinizadas de acordo com o procedimento apresentado na seção 3.3.1.
7. A suspensão tripsinizada foi colocada em um tubo de ensaio e o número de células foi determinado de acordo com o procedimento de contagem descrito na seção 3.3.2.
8. As células foram congeladas (Ver seção 3.5).

3.5 CONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Material para o congelamento das células:

- Meio de congelamento de cultura de células;
- Frascos criogênicos (Sigma-Aldrich, EUA);
- Caixa criogênica.

Implementação do protocolo de congelamento das células:

1. A partir das células tripsinizadas da etapa 7 da seção 3.4, estas foram centrifugadas a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g) por oito minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em meio de congelamento, de modo que o número obtido de células foi de 5×10^6 células $\cdot \text{mL}^{-1}$.
2. Foi colocado 1 mL de suspensão celular em cada tubo Eppendorf, identificando-os com o tipo de linhagem celular utilizada, o número de passagens, a data de congelamento e o número de células.

3. Os tubos foram colocados na caixa de congelamento e permaneceram congelados durante 7 dias no congelador $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Material para o descongelamento das células:

- Frascos T25 para cultura celular;
- 8 mL de meio de cultura DMEM com 10% de FBS;
- 2,5 μL de bFGF.

Implementação do protocolo de descongelamento das células:

1. Foram colocados 10 mL de meio de cultura em um tubo de centrífuga.
2. Os frascos contendo as células foram retirados do tanque de nitrogênio e descongelados sob água corrente.
3. As células foram suspensas em meio de cultura e centrifugadas a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g) por oito minutos.
4. As células foram ressuspendidas em meio fresco e a contagem foi realizada (seção 3.3.2).
5. Como o número de células obtido estava acima do mínimo necessário (ver seção 2.3), bFGF foi adicionado e as células foram semeadas em frascos de cultura. Esta foi a primeira passagem das células, denominada P1.

3.7 PRODUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE CARTILAGEM

3.7.1 Proliferação dos condrócitos isolados

Material para a proliferação dos condrócitos:

- Frascos T75 para cultura celular;
- Frascos T175 para cultura celular
- Meio de cultura DMEM com 10% de FBS
- bFGF
- PBS estéril

- Tripsina estéril

Implementação do protocolo de proliferação dos condrócitos:

1. Depois de terem sido descongeladas as células (seção 3.6), semeou-se $1,5 \times 10^6$ células em um frasco T75, utilizando-se 25 mL de meio e 2,5 μ L de bFGF.
2. As células cresceram até um pouco antes de atingir a confluência, sendo que o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, (meio de cultura: 25 mL de meio DMEM com 10% de bFBS e 2,5 μ L de bFGF).
3. As células foram tripsinizadas novamente (ver seção 3.2.1), e foram semeadas em três frascos T175, sendo esta a segunda passagem, denominada P2.
4. As células foram cultivadas, no máximo, até um dia após ter atingido a confluência, sendo o meio de cultura renovado a cada 48 horas.
5. As células utilizadas para o início do experimento (alginato e cultura primária) foram tripsinizadas.
6. As células foram centrifugadas a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g) por oito minutos.
7. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 20 mL de solução tampão de lavagem 1 e determinou-se o número de células (seção 3.3.2), as células estavam agora na passagem P3.

3.7.2 Cultura em alginato e cultura primária

Material para a cultura em alginato:

- 6 tubos de centrifuga;
- 3 pinças estéreis (1 pinça cirúrgica);
- Um tripé
- Um dispositivo de gotejamento estéril formado por uma seringa conectada a uma mangueira de silicone (diâmetro interno de 2 mm e comprimento de 30 cm) e uma abraçadeira para regular o fluxo;
- Um frasco Erlenmeyer estéril;
- Uma placa de 12 poços revestida com agarose.

Soluções para a cultura em alginato e cultura primária:

- Solução tampão de lavagem 1 estéril;
- Solução tampão de lavagem 2 estéril;
- Alginato estéril;
- Solução tampão de cálcio estéril;
- Meio de cultura DMEM com 10% de FBS (meio de proliferação e rediferenciação);
- bFGF, IGF-1 e TGF- β 1 e ASAP.

Preparação do material para a cultura em alginato:

- A solução tampão foi verificada;
- Uma nova solução de alginato foi preparada;
- Os tubos da centrífuga foram numerados;
- O orifício na parte inferior do prato foi vedado com a fita de autoclave;
- O suporte permaneceu em solução de PBS durante a noite para, na manhã seguinte, determinar-se o peso úmido. O suporte foi colocado e a placa foi inserida firmemente na unidade de centrífuga (Hettich Rotanta 460);
- As placas de 12 poços foram revestidas com agarose, e em seguida foram armazenadas na incubadora.

Implementação do protocolo de cultura em alginato:

1. Iniciou-se com o alginato tamponado: Foram misturados 10 mL de alginato (2,4%) com 10 mL da solução tampão de lavagem 2.
2. Foram colocados 150 mL de solução tampão de cálcio no balão.
3. O tripé foi montado e nele anexado o dispositivo de gotejamento. Para controlar o fluxo da mangueira, uma braçadeira foi utilizada. A mangueira foi levada até o frasco Erlenmeyer, tomando-se o devido cuidado para que a agulha permanecesse estéril.
4. $1,5 \times 10^6$ células a partir da solução tampão de lavagem 1 da etapa 7 da seção 3.7.1 foram centrifugadas a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g) por oito minutos.

5. As células remanescentes da etapa 7 da seção 3.7.1 foram usadas para formar a camada primária: Utilizou-se o meio para o início de cultura (3 mL de DMEM com FBS e 0,3 μL de bFGF). Cada suporte tinha $0,2 \times 10^6$ células; portanto, $1,2 \times 10^6$ células foram transferidas para um novo tubo e centrifugou-se a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g) por oito minutos. As células foram ressuspensas em meio e incubadas a 37 °C para a cultura primária se r formada.
6. O sobrenadante da etapa 4 foi descartado e foram adicionados 15 mL de tampão de alginato (densidade celular 10^6 células·mL⁻¹) para ressuspender as células.
7. A suspensão de células em alginato foi colocada dentro da seringa do dispositivo de gotejamento, e o suporte foi alocado na parte superior do tripé.
8. A abraçadeira da mangueira foi aberta completamente. A suspensão de células em alginato foi gotejada sobre a solução de tampão de cálcio, movendo-se a ponta do conta-gotas em círculos e mantendo-se a boca da cânula longe o suficiente da superfície do líquido para que as gotas pudessem penetrar através da superfície de tampão de cálcio, formando miliesferas (*beads*). Esta etapa foi acompanhada de agitação suave em intervalos de tempo pequenos.
9. Deixou-se as miliesferas endurecerem durante 20 minutos.
10. Depois de fazer movimentos de rotação curtos, retirou-se a solução tampão de cálcio com o auxílio de uma pipeta de 5 mL, colocada diretamente no fundo do frasco, succionando lentamente o líquido e interrompendo a sucção a cada vez que uma miliesfera obstruía a entrada da pipeta.
11. As miliesferas foram lavados duas vezes com 15 mL de solução tampão de lavagem 1, seguidos de movimentos curtos de rotação. Na segunda lavagem, a solução tampão permaneceu dentro do frasco, enquanto o meio de cultura era preparado, para evitar o ressecamento das miliesferas.
12. Meio de cultura preparado: 30 mL de meio (o dobro do volume das miliesferas) com soro, 45 μL de IGF-1, 45 μL

de TGF- β 1, 450 μ L de ASAP (os fatores de crescimento foram calculados proporcionalmente para o volume de meio + alginato).

13. A solução tampão de lavagem 1 foi descartada e o meio de cultura preparado foi adicionado às miliesferas.
14. O cultivo foi realizado a 37 °C, 5% de O₂, 5% de CO₂, o meio de cultura foi renovado a cada 48 horas durante duas semanas.

Implementação do protocolo de cultura primária:

15. Foi preparada a partir das células da etapa 5 da seção 3.7.2.
16. Cada tubo com 2 mL de PBS estéril foi colocado na centrífuga (Hettich Rotanta 460).
17. Adicionou-se 0,5 mL da suspensão de células nos tubos, colocou-se as tampas e apertou-se ligeiramente. As condições de cultura utilizadas foram: 37 °C, 5% de O₂, 5% de CO₂.
18. Após 24 horas, foi realizada a mudança do meio com muito cuidado, para não tocar no substrato.
19. Após 24 horas, o meio e o PBS foram removidos.
20. Foi inserida uma pinça estéril dentro dos tubos, para coletar o aglomerado de células, e transferiu-se para uma placa de 12 poços.
21. Foram adicionados 1,8 μ L de bFGF em 18 mL de meio de cultura e, em seguida, foram colocados 3 mL de meio em cada poço.
22. Cultivou-se por 14 dias, trocando-se o meio a cada 48 horas.

3.7.3 Preparação da cultura de cartilagem tridimensional

Material para a cultura de cartilagem:

- 3 pinças estéreis;
- 6 tubos de centrífuga;
- Placa de Petri esterilizada;
- Placa de 12 poços revestida com agarose (0,5 mL por poço);

Soluções para a cultura de cartilagem:

- Solução tampão de lavagem 1 estéril;
- Tampão de citrato estéril;
- Meio de cultura DMEM com 10% de FBS;
- ASAP.

Implementação do processo de eluição das células a partir das esferas de alginato:

1. O meio de cultura das esferas de alginato foi retirado.
2. As esferas foram lavadas com 30 mL de solução tampão de lavagem 1 (duas vezes o volume do grânulo) com o auxílio de movimentos de rotação breve e, em seguida, a solução foi retirada.
3. Foram adicionados 75 mL de tampão de citrato (5 vezes o volume dos grânulos) e incubou-se a 37 °C durante 30 minutos, com o auxílio de movimentos de rotação breve, até que os grânulos estivessem completamente dissolvidos. Como a incubação não deve durar mais do que 30 minutos e os grânulos não estavam completamente dissolvidos, o procedimento foi finalizado com o auxílio de uma pipeta de 5 mL, com movimentos repetitivos de sucção até a completa dissolução dos grânulos.
4. As células foram suspensas em tubos de polipropileno.
5. A suspensão de células foi centrifugada a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g) por oito minutos.
6. O sobrenadante foi removido, o *pellet* de células do tubo de PP foi ressuspenso em 10 mL de solução tampão de lavagem 1, em seguida, transferiu-se a suspensão para os próximos tubos de PP, onde também foram ressuspenso.
7. As células foram novamente centrifugadas e ressuspenso em 10 mL de meio.
8. Foi realizada a contagem das células. Em 200 µL de suspensão de células, foram adicionados 200 µL de PBS e 4 mg de colagenase. As células foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C com agitação e, em seguida (em consideração à diluição do PBS), foram contadas novamente. As células foram separadas.

9. $1,8 \times 10^6$ células foram removidas, transferidas para um tubo separado e foram centrifugadas a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g) por oito minutos. As demais células foram armazenadas a 37 °C.
10. Meio de cultura foi preparado com 9 mL de meio DMEM e 90 µL ASAP.
11. As condições de cultura utilizadas foram: 5% de O₂, 5% de CO₂ a 37 °C.
12. A partir das células restantes da etapa 9, foram retiradas quatro amostras para a determinação de GAG e DNA. Foram removidas 10^6 células para cada tubo Eppendorf, foram centrifugadas a 2.000 RPM (RCF = 654,08 g) durante cinco minutos, o sobrenadante foi removido, o sedimento celular foi lavado com PBS, centrifugado novamente e congelado a -20 °C.
13. Depois de 24 horas, foi realizada uma mudança de meio: o meio foi retirado cuidadosamente, com a pipeta acompanhando a superfície do líquido para não tocar o substrato e garantir que nenhuma célula fosse perdida, e meio fresco (9 mL de meio e 90 µL ASAP) foi adicionado.
14. Após mais 24 horas, as células foram colocadas em uma placa de 12 poços revestida com agarose: Colocou-se 3 mL de meio fresco (18 mL de meio e 180 µL de ASAP) por poço.
15. As condições de cultura utilizadas foram: 5% de O₂, 5% de CO₂ a 37 °C.
16. Foi realizada a mudança de meio a cada 48 horas durante 19 dias.

3.7.4. Avaliação das construções de cartilagem tridimensionais

Soluções e materiais para a avaliação das cartilagens:

- PBS para medição;
- PBS com 4% de formol;
- Uma espátula dupla com micro colher em arame de aço inox;
- Uma pinça.

Implementação do processo de avaliação das cartilagens:

1. As construções de cartilagem foram retiradas da placa de 12 poços e colocadas em uma placa de Petri, mantidas em meio de cultura para não ressecarem.
2. As construções de cartilagem foram enxugadas e pesadas.
3. Fotografias das construções de cartilagem foram tiradas.
4. Foram preparadas construções para avaliar as cartilagens histologicamente: 1 mL de formol foi colocado em cada tubo Eppendorf, as cartilagens foram removidas a partir do suporte, transferidas para o formol e congeladas.
5. As construções restantes serviram para a medição das dimensões. As cartilagens foram removidas da placa, colocadas num suporte e suas dimensões foram medidas.
6. Em seguida, essas construções de cartilagem foram utilizadas para os testes de determinação de GAG e DNA.

3.8 DETERMINAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAG) NAS CARTILAGENS

O tecido gerado foi digerido enzimaticamente com uma solução de papaína (Roche, Alemanha) durante a noite. O conteúdo de GAG foi então medido fotometricamente por coloração com azul de 1,9-dimetilmetileno (Serva, Alemanha) com sulfato de condroitina (Sigma-Aldrich, EUA) como padrão.

Soluções para a determinação de GAG:

- Sulfato de condroitina a partir de cartilagem de tubarão (Sigma-Aldrich C-4384, Canadá).
- Solução estoque: $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em água bidestilada.
- Meio de cultura DMEM com 10% de FBS.
- Água bidestilada para a determinação de GAGs na digestão da cartilagem utilizando papaína.

Corantes para a determinação de GAG:

Solução A: 27,2 mg de azul de metileno (78 mM, Serva 20335) em 50 mL de solução de água bidestilada (com agitação, durante a noite).

Solução B:

- 5,168 g de glicina;
- 4,03 g de NaCl;
- Solução de 800 mL de água bidestilada;
- Adicionou-se 32,3 mL de HCl (1 M);
- Misturou-se as soluções A e B e completou-se até 1 L com água destilada;
- Solução corante sobre o controle espectrofotométrico:
 - Mediu-se a absorvância da solução de corante a 525 nm;
 - Branco: Diluente;
 - ΔE utilizado foi de 0,530. Caso contrário, deve ser ajustado com a solução corante para atingir o valor desejado.

Realizando a medida espectrofotométrica:

O ensaio foi efetuado nas amostras do meio em placas de microtitulação, como se segue:

1. Adicionou-se 100 μL de água bidestilada em todos os poços da placa;
2. Pipetou-se em cada poço da série A 100 μL de amostra, misturando-se com a pipeta (teste realizado em duplicata);
3. Adicionou-se 100 μL da série A na série B e misturou-se com a pipeta. Continuou-se esse processo até a série H e no final descartou-se 100 μL de cada coluna da série H;
4. Adicionou-se 150 μL de solução corante e deixou-se agindo por 30 segundos;
5. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 530 nm no espectrofotômetro Wallac 1420 VICTOR (PerkinElmer, Inc.).

Avaliação dos valores obtidos na medida espectrofotométrica:

- Analisou-se a média dos valores obtidos;
- Calculou-se a inclinação para a faixa linear (regressão linear);
- Os cálculos foram realizados com base nos valores de gradientes de concentração.

Implementação do protocolo de determinação de GAG na cartilagem:

A determinação do teor de GAG de cartilagem, utilizando-se digestão com papaína, foi realizada após a primeira noite. A amostra de cartilagem foi tratada em um tubo Eppendorf de 1,5 mL da seguinte forma:

1. Adicionou-se 500 μL de tampão de papaína (0,1 M NaH_2PO_4 , 5 μM de EDTA, pH 6);
2. Adicionou-se 5 μL de mercaptoetanol;
3. Adicionou-se 2,5 μL de suspensão de papaína (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$);
4. Agitou-se a amostra durante a noite a 60 $^\circ\text{C}$, a 1.000 RPM (RCF = 163,52 g);
5. As amostras tratadas foram armazenadas à temperatura ambiente.

Uma vez que nas amostras de cartilagem a concentração de GAGs geralmente é maior do que nas amostras de meio, uma quantidade menor de papaína foi usada para a determinação, adicionando-se 50 μL na linha A da placa de microtitulação. Em seguida, foi adicionada água bidestilada de modo que o volume total foi de 200 μL .

3.9 DETERMINAÇÃO DO DNA NAS CARTILAGENS

Após mensurar a quantidade de GAG, o conteúdo de DNA foi determinado utilizando o marcador de fluorescência H33258 (Hoechst, Alemanha) com o DNA de timo de vitelo como padrão. Para a determinação do conteúdo de DNA das amostras de cartilagem, inicialmente uma digestão do tecido com papaína foi realizada.

Digestão do tecido cartilaginoso com papaína:

- Solução estoque: 10 mg·mL⁻¹ de solução de papaína; Fabricante: Boehringer Mannheim No. 108014.
- Tampão de papaína: 100 mM de NaH₂PO₄ para cada 5 μM de EDTA a pH 6.
- Mistura de digestão: 500 μL de tampão de papaína;
5 μL de mercaptoetanol;
2,5 μL de solução de papaína.
- Durante a noite ocorreu a digestão a 60 °C sob agitação de 1.000 RPM (RCF = 163,52 g).

Soluções para a determinação do DNA da cartilagem:Tampão:

- Tampão de amostra:
 - 2,5 M NaCl;
 - 18,5 mM de citrato trissódico, pH 7,0.
- Tampão inicial:
 - 2 M NaCl;
 - 15 mM de citrato de sódio, pH 7,0.

DNA-Padrão:

- Solução estoque: 25 μg·mL⁻¹ (diluição 1:100 de 2,5 mg·mL⁻¹ de DNA de timo de vitelo).
- Solução utilizada: Solução estoque diluída 1:5 em tampão de amostra.

Amostras: Papaína de digestão diluída 1:5 em tampão de diluição.

Corante: Bisbenzimidida (Hoechst 33258).

- Solução estoque: 1 mg·mL⁻¹ de bisbenzimidida em água destilada.
- Solução utilizada: solução estoque de Bisbenzimidida diluída 1:500 em solução tampão (concentração final após diluição: 1 μg·mL⁻¹).

Como a solução corante é sensível à luz, esta foi armazenada em lugar escuro.

Implementação do protocolo de determinação do DNA da cartilagem:

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços da seguinte forma:

1. Colocou-se 100 μL de solução tampão em cada poço da placa.
2. Pipetou-se em cada poço da série A 100 μL da amostra, misturando-se com a pipeta (teste realizado em duplicata).
3. Adicionou-se 100 μL da série A na série B e misturou-se com a pipeta. Continuou-se esse processo até a série H e no final descartou-se 100 μL de cada coluna.
4. Adicionou-se 100 μL de solução corante e deixou-se agindo por 15 min no escuro.
5. No espectrofotômetro Wallac 1420 Victor foram utilizados os comprimentos de onda de 355 nm para excitação e de 450 nm para emissão.

Avaliação dos valores obtidos na medida espectrofotométrica:

- Analisou-se a média dos valores obtidos.
- Calculou-se a inclinação para a faixa linear (regressão linear).
- Os cálculos foram realizados com base nos valores de gradientes de concentração.

3.10 INCORPORAÇÃO DAS CARTILAGENS TRIDIMENSIONAIS EM PARAFINA

Implementação do protocolo de incorporação em parafina:

1. As amostras de cartilagem separadas para serem avaliadas histologicamente (a partir do item 4 da seção 3.7.4) permaneceram no formol durante uma noite à temperatura ambiente.
2. As cartilagens foram retiradas do formol, lavadas com PBS e colocadas em uma placa de Petri com PBS para não ressecarem.
3. Foram tiradas fotos no microscópio Stemi 2000-C Zeiss, câmera Canon DS126191.

4. As amostras de tecido foram lavadas com PBS e cortadas em pedaços menores, quando necessário, para uniformizar.
5. As amostras foram fixadas com solução tampão de formaldeído 4% a pH 7,4.
6. As amostras foram lavadas novamente com PBS e colocadas em histo-cassetes, os quais receberam inscrição para a identificação de cada amostra.
7. Realizou-se a desidratação das amostras com uma série ascendente de álcool para retirar o formol:
 - 1 vez em etanol 50% durante 30 minutos;
 - 1 vez em etanol 70% durante 30 minutos;
 - 3 vezes em etanol 90% durante 30 minutos;
 - 3 vezes em etanol 96% durante 30 minutos.
8. Os cassetes contendo as amostras de cartilagem foram retirados do álcool e colocados em uma solução de isopropanol/Paraplast (mistura de polímeros e parafina de alta pureza em *pellets*) 1:1 durante a noite.
9. No dia seguinte os cassetes foram colocados duas vezes em Paraplast 100% durante 12 horas para retirar o álcool.
10. As amostras foram retiradas dos histocassetes e foram incorporadas em Paraplast, formando assim blocos transparentes de parafina com a cartilagem no centro.
11. Os blocos de parafina com as amostras foram mantidos em lugar fresco até o seccionamento.

3.11 COLORAÇÃO DAS SECÇÕES DE CARTILAGEM COM SAFRANINA-O E VERDE RÁPIDO

Preparação das secções de cartilagem: Foram preparadas lâminas com cortes de 5 μm de espessura provenientes dos blocos de parafina para serem coradas com Safranina-O. As amostras foram submersas duas vezes em xileno durante 10 minutos para ocorrer a desparafinação.

As amostras foram reidratadas com série de soluções descendente de álcool, para isso as amostras permaneceram submersas:

- 2 vezes em etanol 100% durante 2 minutos;
- 1 vez em etanol 96% durante 2 minutos;
- 1 vez em etanol 90% durante 2 minutos;
- 1 vez em etanol 70% durante 2 minutos;
- 1 vez em etanol 50% durante 2 minutos;
- 1 vez em água desmineralizada durante 2 minutos.

Coloração das secções de cartilagem:

1. As lâminas de vidro com as amostras permaneceram sete minutos em hematoxilina para ocorrer a coloração dos núcleos das células.
2. Em seguida, as amostras permaneceram durante dois minutos em água desionizada.
3. As amostras foram mergulhadas três vezes em solução de 0,3% de HCL em etanol 96%.
4. As amostras foram lavadas em água corrente durante dez minutos até que toda a coloração azulada desaparecesse.
5. Em seguida, foram enxaguadas em água destilada.
6. As amostras foram submersas durante três minutos em solução de 200 mg de corante Verde Rápido (triarilmetano) em 1 L de água destilada;.
7. As amostras foram lavadas em solução de 1% de ácido acético durante 15 minutos.
8. As amostras foram tingidas durante cinco minutos em solução de 0,1% de safranina O com o intuito de proporcionar a coloração dos proteoglicanos.

Desidratação das secções de cartilagem: Após a coloração, as amostras foram submetidas à submersão:

- 1 vez em etanol 96% durante 10 minutos;
- 3 vezes em etanol 100% durante 10 minutos;
- 2 vezes em xileno durante 10 minutos.

Cobertura das secções de cartilagem: Cada amostra recebeu duas gotas de meio de montagem (Histokitt, Carl Roth, Alemanha) e foram cobertas com lamínulas de vidro.

3.12 IMUNOHISTOQUÍMICA DAS AMOSTRAS DE CARTILAGEM DAS SECÇÕES PARAFINADAS

Materiais e soluções para o teste imunohistoquímico

Para o corte das secções: lâminas de adesão (HistoBond, Marienfeld, Alemanha), gravada a identificação das respectivas amostra na face da extremidade fosca da lâmina;

Ligação do anticorpo:

- Soro suíno;
- Anticorpo primário contra o colágeno tipo I humano (anti-rato hCL (I), clone I-8H5);
- Anticorpo primário contra o colágeno tipo II humano (anti-rato hCL (II), clone II-4C11);
- Anticorpo biotilado secundário (anticorpos de cabra anti-rato IgG (H + L)-Biotina, SBA - aglutinina de soja);
- Kit ABC – Complexo Adivina-Biotina (Fosfatase Alcalina da série AK-5000), (Vectastain, USA).

Para o desenvolvimento do teste imunohistoquímico:

- Tris (hidroximetil)-aminometano (Carl Roth, Alemanha);
- NaCl (Baker, EUA), Nitrito de sódio (VWR, EUA);
- Corante Nova Fucsina em HCl 2 M;
- Naftol-AS-BI-fosfato (Sigma-Aldrich, EUA);
- Dimetilformamida (Sigma-Aldrich, EUA);
- Solução de hematoxilina.

Para cobrir as amostras de cartilagem:

- Meio de montagem Crystal Mount (Biomedica Corporation, EUA) para a preservação permanente de secções de tecidos coradas com imunoperoxidase e fosfatase alcalina;
- Meio de montagem Clarion (Sigma-Aldrich, EUA);
- Lamelas de vidro 24 x 60 mm.

Preparo das soluções para o teste imunohistoquímico:

1. Solução tampão PBS, 10x:
 - 45 g de NaCl;

- 13,8 g de NaH_2PO_4 monohidratado;
- Foi diluída 1:10 antes de ser usada e o pH foi ajustado para pH 7,4.

2. Solução corante para a fosfatase alcalina (enzima ligada ao anticorpo):

Solução I: Tris / NaCl-Tampão

- 12,1 g de Tris / HCl com pH ajustado para 8.24;
- 17 g de NaCl;
- Volume total final 2 L.

Solução II: 4% de nitrito de sódio

- 300 mg de nitrito de sódio;
- 7,5 mL de água destilada.

Solução III:

- 5 g de Nova fucsina ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{Cl}$);
- 100 mL de HCl 2 M.

Solução IV:

- 30 mg de naftol-AS-BI-fosfato;
- 750 μL de dimetilformamida.

Preparou-se a solução final, misturando-se na seguinte sequência:

- 1) 7,5 mL da solução II;
- 2) 0,3 mL da solução III;
- 3) 150 mL da solução I;
- 4) 750 μL da solução IV.

Desparafinação das secções de cartilagem:

A fim de promover a desparafinação, as amostras foram submersas em:

1. Xileno durante 10 minutos, duas vezes;
2. Etanol 100% durante 3 minutos;
3. Etanol 96% durante 5 minutos;
4. Etanol 90% durante 5 minutos;
5. Etanol 80% durante 5 minutos;
6. Etanol 50% durante 5 minutos;
7. Após a sequência decrescente de concentração de álcool, a amostra permaneceu mergulhada em água destilada durante dois minutos;

8. A amostra foi lavada duas vezes com 150 mL de PBS durante cinco minutos.

Desmascaramento do colágeno:

O desmascaramento foi realizado utilizando a enzima hialuronidase:

1. Preparou-se a solução de hialuronidase: $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em $0,1 \text{ M}$ de NaH_2PO_4 ($13,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) a pH 5,5;
2. Gotejou-se $50 \mu\text{L}$ da solução de hialuronidase em cada corte;
3. As lâminas de vidro contendo as amostras permaneceram durante quatro horas incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em câmara úmida;
4. As amostras foram lavadas duas vezes com 150 mL de PBS durante cinco minutos.

Bloqueio de ligação não específica:

1. Preparou-se a solução de bloqueio diluindo FBS 1:10 em PBS tratado;
2. Foram gotejados $50 \mu\text{L}$ da solução de bloqueio em cada uma das secções;
3. A incubação foi realizada durante 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida.

Incubação com o anticorpo primário:

1. A incubação com o anticorpo primário (anti-hCL I para colágeno do tipo I e anti-hCL II para colágeno do tipo II; MediCorp, Montreal, Quebec, Canadá) diluído 1:100 em diluente de anticorpo Dako com componente redutor da coloração de fundo N°. S3022 (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) foi realizada durante a noite (12 horas) em câmara úmida, no refrigerador a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram utilizados $50 \mu\text{L}$ da solução por secção;
2. As amostras para controle foram tratadas apenas com diluente de anticorpo;
3. No dia seguinte, as lâminas de vidro contendo as amostras foram retiradas do refrigerador e lavadas três vezes com PBS durante cinco minutos.

Incubação com o anticorpo secundário:

1. A incubação com o anticorpo secundário (anticorpo de cabra anti-rato biotinado; Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA) diluído 1:200 em diluente de anticorpo Dako foi realizada durante uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente.
2. Foram utilizados 50 µL da solução por secção;
3. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com PBS durante cinco minutos.

Coloração das secções cartilaginosas:

1. Ao reagente de fosfatase alcalina (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) foi misturado uma gota de solução tampão PBS e uma gota da solução corante, preparada anteriormente, em 2,5 mL de PBS. O reagente foi preparado 30 minutos antes de ser utilizado e foi misturado delicadamente por inversão evitando a formação de bolhas e espuma.
2. Foram aplicados 50 µL de reagente por secção e, em seguida, as amostras foram incubadas durante 30 minutos.
3. Após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS.
4. As amostras foram incubadas novamente durante 30 minutos no escuro com a solução corante preparada anteriormente.
5. As amostras foram lavadas durante cerca de dez minutos com água da torneira até que toda a precipitação colorida foi removida.
6. As amostras foram transferidas para água destilada.
7. Realizou-se a contracoloração dos núcleos com hematoxilina (diluído 1:1): As secções foram submersas durante 30 segundos na solução corante e, em seguida, dez minutos em água de torneira.
8. Por último, as amostras foram lavadas com água destilada.

Recobrimento das amostras de cartilagem:

1. As amostras úmidas foram cobertas com meio de montagem (Dako);

2. As lâminas de vidro com as amostras permaneceram à temperatura ambiente durante uma noite para secarem;
3. Após estarem secas, as amostras foram cobertas com o meio de montagem Roti®-Mount Aqua (Carl Roth, Alemanha), que é uma solução aquosa de resina de poliacrilato ideal para a montagem de secções de tecido imediatamente após a coloração. Por ser um meio de montagem hidrofílico, as cores e estruturas dos tecidos são preservados de forma otimizada.
4. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente para secarem novamente, e foram fotografadas no microscópio.

3.13 COLORAÇÃO DE ANTICORPOS DAS CÉLULAS POR FLUORESCÊNCIA

1. Posicionou-se as lâminas de vidro com as células na posição horizontal;
2. Para a fixação adicionou-se 100 μ L de acetona em cada lâmina de vidro e esperou-se até evaporar (cerca de dois minutos);
3. Preparou-se a solução de bloqueio: 10% de FBS em PBS. Adicionou-se 1 mL da solução de bloqueio em cada amostra e foram incubadas durante 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente;
4. Inclinou-se os slides para escorrer o excesso de solução, sem bater, e enxugou-se as bordas com lenços de papel;
5. Preparou-se a solução de anticorpo primário contra colágeno do tipo I, II e VI: 1:100 com diluente de anticorpo Dako (4 μ L de alíquota de cada anticorpo + 400 μ L de Dako);
6. Foram adicionados 70 μ L da solução de anticorpo em cada amostra. Foram utilizados cinco amostras por alíquota;
7. Nas amostras para controle utilizou-se somente diluente de anticorpo Dako;

8. Os slides com as amostras foram armazenados em câmara úmida, à temperatura de 4 °C, durante a noite;
9. No dia seguinte, lavou-se os slides com 100 µL PBS, três vezes durante cinco minutos cada vez; inclinou-se os slides para escorrer o excesso de solução e enxugou-se as bordas com papel toalha;
10. Preparou-se a solução de anticorpo secundário com Isotiocianato de fluoresceína (FITC - *Fluorescein isothiocyanate*) na concentração de 1:200 com diluente de anticorpo Dako. Foram adicionados 70 µL de solução em cada slide e assim foram armazenados no escuro durante 60 minutos à temperatura ambiente. O FITC utilizado aqui tem a finalidade de monitorar a presença das células mesenquimais que foram diferenciadas em tecidos cartilagosos marcados pela cor verde pelo anticorpo ligado ao FITC.
11. Os slides foram lavados três vezes com PBS;
12. A solução preparada com 0,2 mL de DAPI (Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole) foi preenchida com 10 mL de metanol. Foram adicionados 100 µL de solução em cada slide e foram armazenados durante 15 minutos a 37 °C. O DAPI utilizado aqui tem a finalidade de destacar em cor azul os núcleos das células vivas;
13. Os slides foram novamente lavados três vezes com PBS;
14. As amostras foram cobertas por Meio de Montagem Fluorescente Dako e em seguida foram colocadas lamelas de vidro 18 x 18 mm em cima das amostras;
15. Os slides foram armazenados em local fresco e úmido para evitar o ressecamento até serem realizadas as fotos microscópicas.

3.14 PROLIFERAÇÃO DE CONDRÓCITOS HUMANOS IMORTALIZADOS

Todos os procedimentos experimentais, do item 3.1 ao item 3.7.4, de 'Material e Métodos', foram reproduzidos com condrócitos humanos imortalizados (InSCREENeX GmbH, Braunschweig, Alemanha), utilizando três diferentes soros, FBS,

FBS Superior e FBS Gold, com o intuito de avaliar qual desses oferece às células humanas o melhor desempenho de expansão.

Implementação do protocolo de proliferação dos condrócitos:

1. Foram semeadas 5×10^6 células em cada frasco T175 (Carl Roth, Alemanha) e adicionados 25 mL de meio DMEM com os respectivos soros e adição de penicilina/estreptomicina ($100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de penicillina e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina, PAA). A proliferação foi realizada nas condições descritas na seção 3.4.
2. Conforme cada cultivo foi atingindo a confluência, realizou-se a tripsinização (seção 3.3.1), a contagem das células (seção 3.3.2) e a primeira passagem, denominada P1. Assim como na expansão dos condrócitos porcinos, este procedimento foi realizado até a terceira passagem, P3.
3. Realizou-se a cultura em alginato durante 14 dias nas condições descritas na seção 3.3.1.
4. As células da cultura em alginato foram recuperadas (seção 3.7.3) e novamente contadas.

Após a constatação da eficiência de cada soro na expansão dos condrócitos humanos, elegeu-se o melhor soro para repetir todo o procedimento de proliferação e cultura em alginato, novamente, dos condrócitos humanos, desta vez alternando o fator de crescimento utilizado em três diferentes culturas com o intuito de avaliar, desta forma, a eficiência de cada um dos fatores de crescimento (bFGF, IGF-1 e TGF- β 1).

Implementação do protocolo de proliferação dos condrócitos:

1. Para os cultivos, foram semeadas 5×10^6 células em cada frasco T175 (Carl Roth, Alemanha) e adicionados 25 mL de meio DMEM com o soro e penicilina/estreptomicina ($100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de penicillina e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina, PAA) e adição dos

respectivos fatores de crescimento. A proliferação foi realizada de acordo com a seção 3.4.

2. Conforme cada cultivo foi atingindo a confluência, realizou-se a tripsinização (seção 3.3.1), a contagem das células (seção 3.3.2) e a primeira passagem, denominada P1. Este procedimento foi realizado até a terceira passagem, P3.
3. Realizou-se a cultura em alginato durante 14 dias nas condições descritas na seção 3.3.1.
4. As células da cultura em alginato foram recuperadas (seção 3.7.3) e novamente contadas.

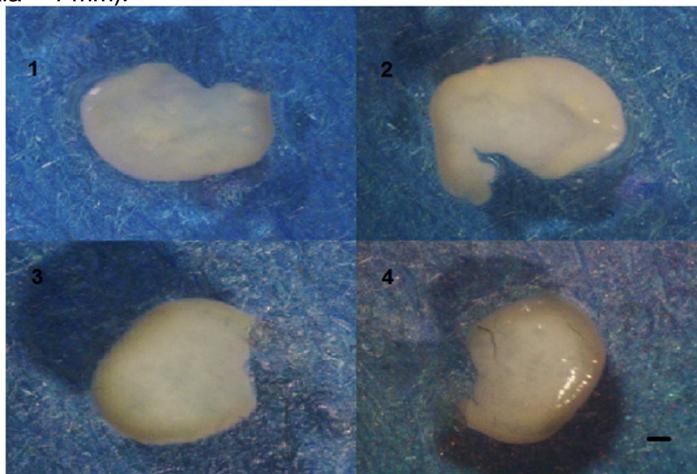
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nos testes realizados com os condrócitos articulares porcinos e humanos, bem como a análise e discussão dos mesmos.

4.1 CONDRÓCITOS PORCINOS

Cartilagens articulares tridimensionais foram produzidas a partir de condrócitos porcinos isolados, de acordo com os protocolos 3.1 à 3.7 apresentados no capítulo anterior. Cultivo em gel de alginato foi realizado para a formação de cultura de alta densidade celular e rediferenciação das células utilizadas para a formação da cartilagem, de acordo com os métodos apresentados anteriormente, cultivadas em agarose. A Figura 1 mostra quatro construções de cartilagens produzidas conforme as técnicas descritas.

Figura 1 – Cartilagens tridimensionais produzidas a partir de 5×10^6 condrócitos articulares porcinos semeados e expandidos em monocamada com 25 mL de meio DMEM enriquecido com FBS e em cultura de gel de alginato. Condições de cultivo: temperatura de 37 °C e atmosfera controlada a 5% de O₂ e 5% de CO₂. Fotos realizadas com o microscópio Stemi 2000-C Zeiss e câmera Canon DS126191 (barra de escala = 1 mm).



As construções de cartilagem tridimensionais, a partir de condrócitos explantados e expandidos em cultura de monocamada, apresentaram um formato esférico irregular com diâmetro médio de 5 mm e massa de (1): 0,0489 g; (2): 0,0533 g; (3): 0,0516 g e (4): 0,0493 g, respectivamente, de acordo com a Figura 1. Obteve-se cor, textura e consistência características de cartilagem suína, apresentado assim, com base na literatura, um resultado satisfatório.

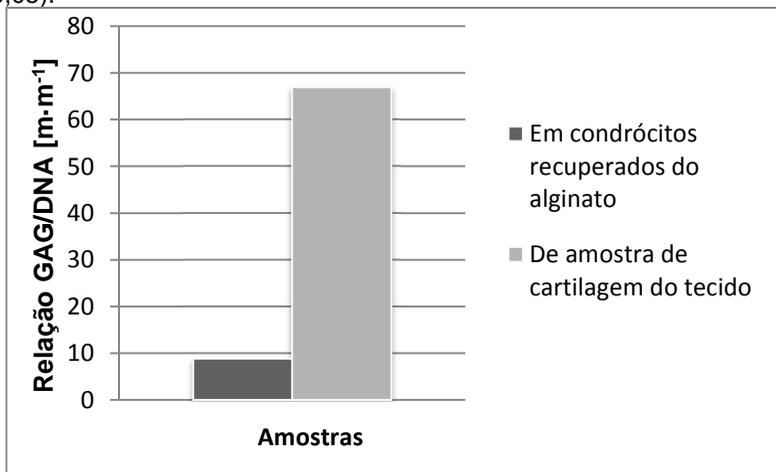
Ao longo do período de proliferação dos condrócitos, pode-se observar que a adição de uma dose baixa de FBS no meio de cultura conduziu de forma consistente à proliferação das células, tanto em monocamada quanto na cultura em gel de alginato. O fator de crescimento bFGF levou a um maior efeito proliferativo durante o cultivo nos fracos-T. Já os fatores de crescimento TGF- β 1 e IGF-1, como também o ASAP (ácido ascórbico 2-fosfato), influenciaram positivamente na formação dos *pellets* de cartilagem durante a cultura de alta densidade celular em gel de alginato. Além disso, o fator de crescimento IGF-1 foi eficaz na proliferação de células e na biossíntese de matriz extracelular, em particular, a produção de proteoglicanos, como investigado e sugerido por Guerne *et al.* (1994), Osch *et al.* (1998), Pei *et al.* (2002) e Blunk *et al.* (2002).

4.11 Parâmetros bioquímicos da concentração de GAG em relação à concentração de DNA

A fim de avaliar a re-diferenciação após a recuperação das células a partir do gel de alginato, a relação de GAG/DNA foi determinada nestas amostras, bem como nas amostras de cartilagem do tecido, de acordo com os protocolos 3.8 e 3.9 apresentados no capítulo anterior.

A Figura 2 mostra a determinação da relação entre GAG e DNA das células recuperadas da cultura de alginato e das amostras de cartilagem do tecido.

Figura 2 – Parâmetros bioquímicos da concentração de GAG em relação à concentração de DNA dos condrócitos recuperados a partir da cultura em alginato, com IGF-1, TGF- β 1 e ASAP, e das amostras de cartilagem do tecido suíno sem fatores de crescimento (n = 18, p < 0,05).



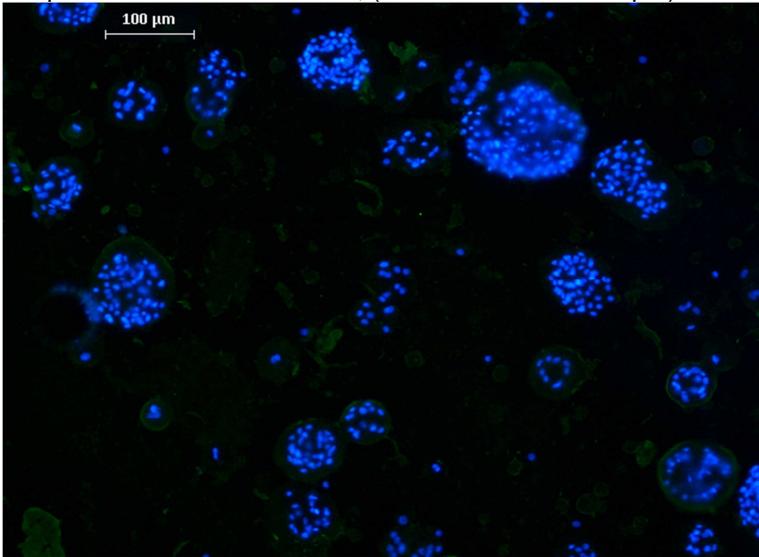
Pode-se observar que a quantidade de GAG formada foi maior nas amostras de cartilagem do tecido do que nas matrizes formadas a partir das células recuperadas do cultivo em gel de alginato. A proporção de GAG para DNA atingiu 13% do valor da cartilagem nativa. No entanto, essa baixa retenção de GAG nos condrócitos recuperados do gel de alginato, deve-se provavelmente à perfusão e às condições catabólicas criadas para o cultivo, como investigado e sugerido por GROGAN *et al.* (2012).

4.1.2 Presença de colágeno tipo I, colágeno tipo II e colágeno tipo VI

Com o intuito de comparar a presença de colágeno tipo I, colágeno tipo II e colágeno tipo VI nas amostras, foi realizado o teste imuno-histológico das amostras de cartilagem, conforme os protocolos 3.10 à 3.13 apresentados no capítulo anterior.

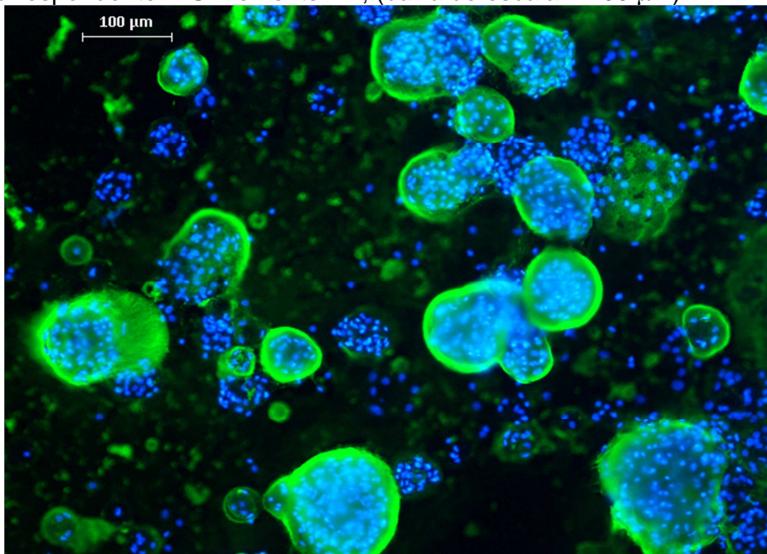
A Figura 3 mostra os núcleos das células agregadas, representados pela cor azul (DAPI), praticamente sem formação de matriz extracelular (MEC), representada pela cor verde (FITC). Essa configuração é característica do colágeno tipo I.

Figura 3 – Coloração imuno-histológica das amostras de cartilagem: Evidência da presença de colágeno tipo I, utilizando anticorpo primário anti-hCL I (MediCorp). Núcleos das células corados em azul por DAPI e MEC coradas em verde por FITC. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR; (barra de escala = 100 μm).



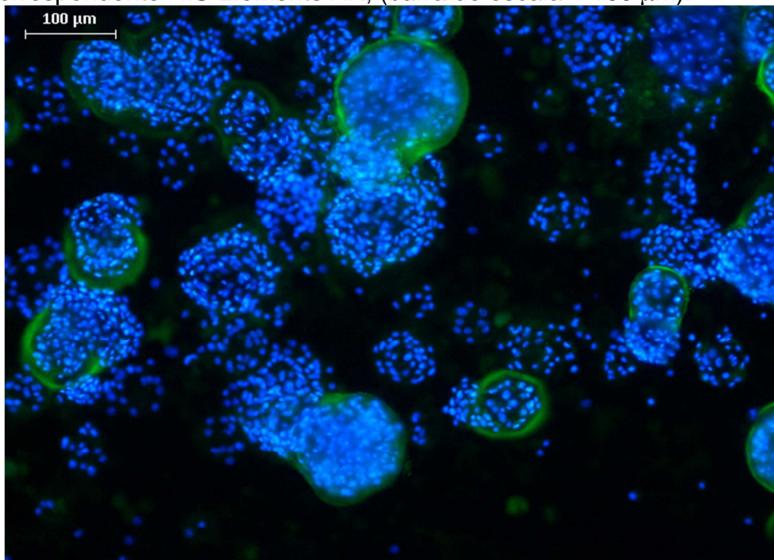
A Figura 4 mostra os núcleos das células agregadas, representada pela cor azul, com alta formação de matriz extracelular (MEC), representada pela cor verde. Essa configuração é característica do colágeno tipo II.

Figura 4 – Coloração imuno-histológica das amostras de cartilagem: Evidência da presença de colágeno tipo II, utilizando anticorpo primário anti-hCL II (MediCorp). Núcleos das células corados em azul por DAPI e MEC coradas em verde por FITC. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR; (barra de escala = 100 μm).



A Figura 5 mostra os núcleos das células agregadas, representada pela cor azul, com baixa formação de matriz extracelular (MEC), representada pela cor verde. Essa configuração é característica do colágeno tipo VI.

Figura 5 – Coloração imuno-histológica das amostras de cartilagem: Evidência da presença de colágeno tipo VI, utilizando anticorpo secundário de cabra anti-rato biotinado; (Southern Biotechnology Associates Inc.). Núcleos das células corados em azul por DAPI e MEC coradas em verde por FITC. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR; (barra de escala = 100 μm).



As imagens imuno-histológicas (Fig. 3, 4 e 5) mostram uma coloração mais proeminente para colágeno tipo II do que para colágeno tipo VI e colágeno tipo I em todos os casos. Esse resultado condiz com a afirmação de Wiegandt (2007), de que nas culturas realizadas sem quaisquer fatores de crescimento, durante a cultura em alginato, as construções mostraram um tecido intercalado com orifícios. Em contraste, as culturas com IGF-1 e TGF- β 1 resultaram em tecido homogêneo em que os condrócitos se mostraram mais uniformemente distribuídos.

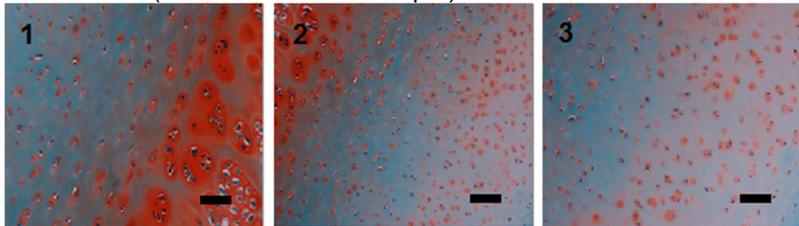
A ausência de quaisquer fatores de crescimento, durante o cultivo em gel de alginato, resultou em uma relação elevada entre GAG e DNA de 66,92 $\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$, mas o número de células que produziram o colágeno tipo II foi menor do que as células cultivadas com IGF-1 e TGF- β 1.

O colágeno do tipo II é um importante componente da matriz extracelular, ao passo que o colágeno tipo I não está, geralmente, presente na cartilagem articular [54]. Assim, estes resultados demonstram que os fatores de crescimento utilizados podem apoiar a rediferenciação, aqui identificada pela produção de colágeno do tipo II.

A coloração com safranina O, representada pela Figura 6, mostra que as células condrogênicas em cultivo tridimensional foram capazes de sintetizar matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos sulfatados (1, 2 e 3).

O grau de diferenciação pode ser observado de acordo com a morfologia celular e coloração da matriz. Quanto mais arredondadas as células e mais forte é a marcação da matriz, maior é o potencial condrogênico das células [57].

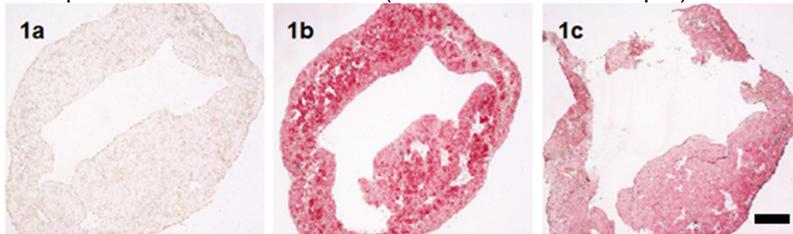
Figura 6 – Coloração histológica de três amostras de cartilagem: Análise da produção de glicosaminoglicanos corados em vermelho por Safranina O. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR (barra de escala = 100 μm).



Os cortes histológicos na Figura 6 exibiram um tecido contínuo e sem falhas em todos os casos. Analisando as imagens nota-se a concentração clara de GAG em algumas regiões, evidenciando a formação de matriz extracelular nessas construções de tecido desenvolvidas em cultura de condrócitos articulares. A deposição mais uniforme de agregano (proteoglicano predominante na cartilagem articular) observada ao longo do gel, juntamente com o padrão de coloração da proteína, é compatível com os níveis de GAG, detectados nas análises bioquímicas, demonstrados anteriormente na Figura 2.

A formação de colágeno tipo I, tipo II e tipo VI foi confirmada pela coloração imuno-química de cortes histológicos por Nova Fucsina, demonstrada na Figura 7.

Figura 7 – Coloração imuno-histológica por Nova Fucsina para análise da formação de colágeno: (1a) colágeno tipo I, (1b) colágeno tipo II, (1c) colágeno do tipo VI. Imagem capturada pelo microscópio de fluorescência (Nikon, Alemanha) e analisada com o software correspondente NIS Elements AR (barra de escala = 100 μ m).



As imagens imuno-histológicas da Figura 7 mostram uma coloração mais proeminente para colágeno tipo II do que para colágeno tipo I e colágeno tipo VI. Mais uma vez, a coloração da construção de cartilagem mostrou que a cultura com IGF-1 e TGF- β 1 resultou em tecido homogêneo em que os condrócitos foram uniformemente distribuídos.

Ao final do cultivo da cartilagem *in vitro*, a concentração de DNA (densidade de células) e a concentração de GAGs atingiram cerca de 13% do valor da cartilagem articular suína. A produção de colágeno do tipo II e a síntese de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos sulfatados foram semelhantes à da cartilagem articular nativa. Juntos, estes resultados sugerem a formação de uma matriz funcional mecânica e bioquimicamente.

4.2 CONDRÓCITOS HUMANOS

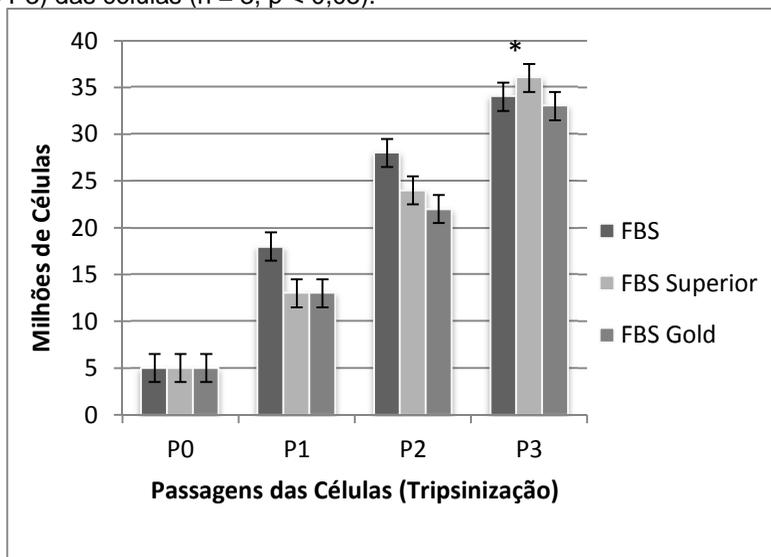
4.2.1 Avaliação da eficiência dos soros FBS, FBS Superior e FBS Gold

Com o intuito de avaliar a eficácia dos soros FBS, FBS Superior e FBS Gold na expansão dos condrócitos humanos, bem como no cultivo em gel de alginato, três diferentes culturas foram realizadas nas mesmas condições com meio de cultura

DMEM enriquecido com cada um dos soros fetais, de acordo com o protocolo 3.14 apresentado no capítulo anterior.

A Figura 8 mostra a evolução do número de células durante a expansão realizada com cada um dos soros, em cada uma das passagens.

Figura 8 – Expansão dos condrócitos articulares humanos em monocamada com meio de cultura DMEM suplementado com os soros FBS, FBS Superior e FBS Gold analisada a cada passagem (P0, P1, P2 e P3) das células (n = 3, p < 0,05).



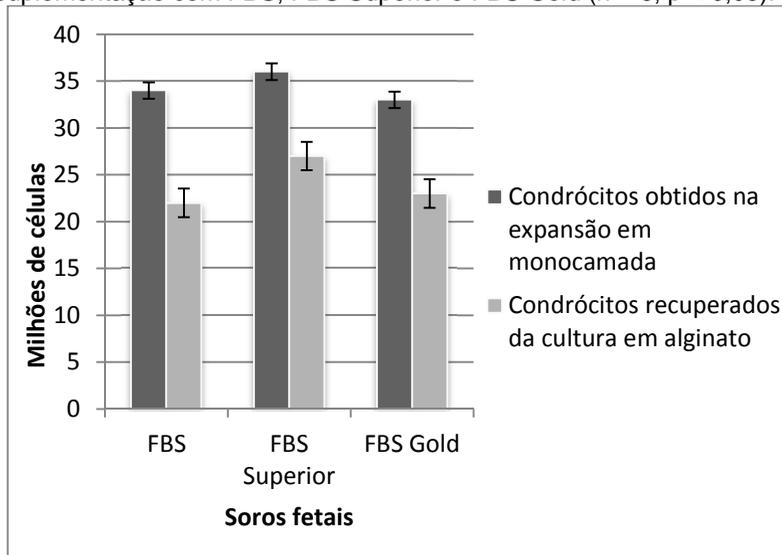
* Apesar de não ter significância no valor do número de células das expansões suplementadas com os soros FBS, FBS Superior e FBS Gold na passagem P3, houve uma tendência de significância de acordo com o valor de p < 0,05.

Pode-se observar que a proliferação ocorreu de maneira mais significativa quando a suplementação do meio de cultura foi realizada com o soro FBS Superior, do que com os soros FBS e FBS Gold, atingindo uma produção final de $3,59 \times 10^7$ células.

Após a recuperação dessas células da cultura em alginato, foi realizada uma nova contagem com o objetivo de avaliar a eficácia de cada soro nesta etapa do processo da produção de cartilagem. A Figura 9 oferece uma comparação

entre a quantidade de células obtidas ao final da expansão e a quantidade de células recuperadas a partir da cultura de alginato para cada uma das culturas realizadas com os diferentes soros.

Figura 9 – Contagem dos condrócitos articulares humanos ao final da expansão em monocamada e após a recuperação das células a partir da cultura em gel de alginato, com meio de cultura DMEM e a suplementação com FBS, FBS Superior e FBS Gold (n = 6, p < 0,05).



A partir da Figura 9, pode-se observar que a recuperação das células a partir da cultura de alginato foi maior para o cultivo suplementado com o soro FBS Superior, 75,0%, em comparação com a recuperação das células cultivadas com FBS, 64,7%, e das células cultivadas com FBS Gold, 69,7%.

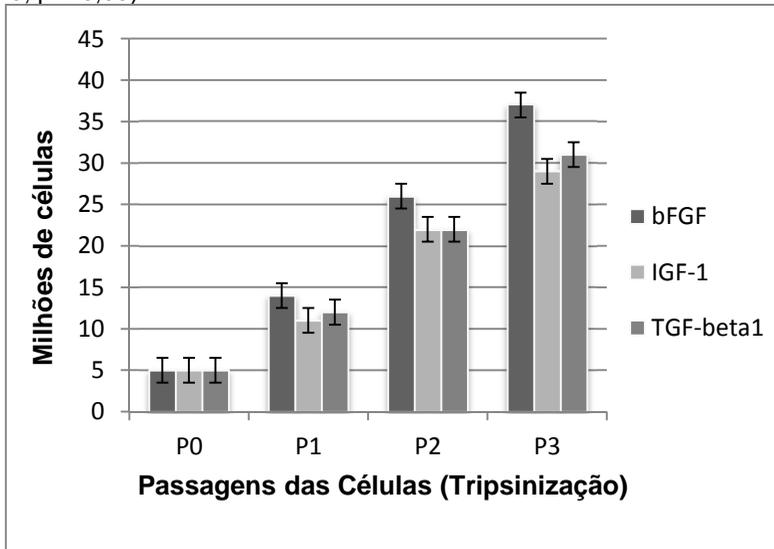
O soro FBS Superior demonstrou ter melhor desempenho de proliferação tanto na expansão em monocamada, como também durante a rediferenciação das células em cultivo de gel de alginato. Esta eficácia pode ser justificada pelo fato de o soro FBS Superior ser produzido com suplementos sintéticos selecionados, garantindo assim, um nível elevado de qualidade uniforme e constante [34, 35]. Este resultado é bastante satisfatório, pois o uso do soro FBS Superior apresenta diversas vantagens em relação ao FBS tradicional. Enquanto este é um

produto que pode ser obtido somente em regiões de grande criação de gado, onde uma quantidade suficiente de fetos bovinos pode ser acumulada durante o processo de abate, o FBS Superior está sempre disponível [58]. Além disso, uma vez testado, fornece um perfil constante de crescimento equilibrado. Outra vantagem importante do uso de FBS Superior é a garantia da ausência de micoplasma [36], gênero de bactérias que não possuem parede celular e que, por este motivo, não são afetados por muitos antibióticos comuns que visam a síntese da parede celular, como a penicilina [59], a qual foi utilizada no presente estudo, evitando, assim, contaminações inesperadas e aparentemente inexplicáveis durante o cultivo das células.

4.2.2 Avaliação da eficiência dos fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1

Com o intuito de avaliar a eficácia dos fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1 na expansão dos condrócitos humanos, bem como, no cultivo em alginato, três diferentes culturas foram realizadas nas mesmas condições, todas suplementadas pelo soro FBS Superior com cada um dos fatores de crescimento. A Figura 10 mostra a evolução do número de células durante a expansão realizada com meio de cultura DMEM enriquecido com cada um dos fatores de crescimento, em cada uma das passagens.

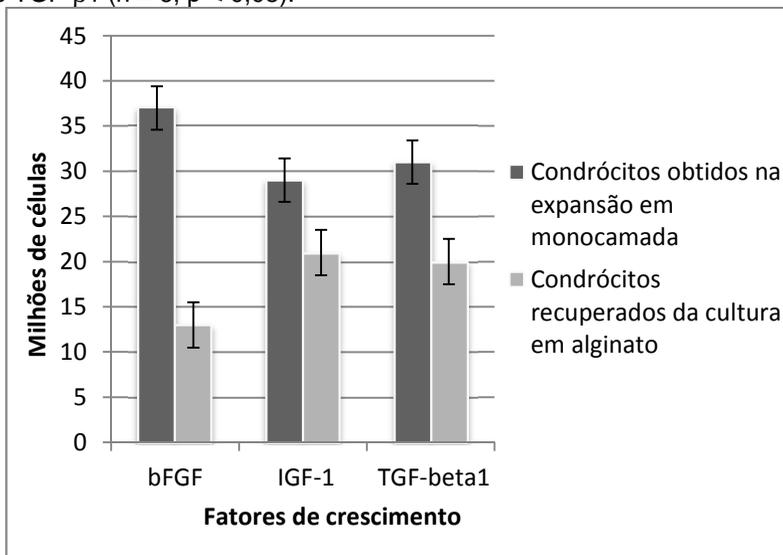
Figura 10 – Expansão dos condrócitos articulares humanos em monocamada com o meio de cultura DMEM suplementado com soro FBS Superior e enriquecido com os fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1 analisada a cada passagem (P0, P1, P2 e P3) das células (n = 3, p < 0,05).



Pode-se observar que a proliferação ocorreu de maneira mais significativa quando o meio de cultura foi enriquecido com o fator de crescimento bFGF, do que com os fatores IGF-1 e TGF- β 1, atingindo uma produção final de $3,74 \times 10^7$ células.

Após a recuperação dessas células da cultura em alginato, foi realizada uma nova contagem com o objetivo de avaliar a eficácia de cada fator de crescimento nesta etapa do processo da produção de cartilagem. A Figura 11 oferece uma comparação entre a quantidade de células obtidas ao final da expansão e a quantidade de células recuperadas a partir da cultura de alginato para cada uma das culturas enriquecidas com os diferentes fatores de crescimento.

Figura 11 – Contagem dos condrócitos articulares humanos ao final da expansão em monocamada e após a recuperação a partir da cultura em gel de alginato com meio de cultura DMEM suplementado com soro FBS Superior e enriquecido com os fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1 (n = 6, p < 0,05).



A partir da Figura 11, pode-se observar que a recuperação das células a partir da cultura de alginato foi maior para o cultivo enriquecido com o fator de crescimento IGF-1, onde 72,14% das células foram recuperadas, em comparação com a recuperação das células cultivadas com TGF- β 1, 64,52%, e das células cultivadas com bFGF, onde apenas 35,14% das células foram recuperadas.

5 CONCLUSÕES

Os condrócitos articulares suínos representam uma fonte versátil em relação às potenciais aplicações nas áreas tecnológicas e da medicina. Sua tecnologia de isolamento, expansão *ex vivo* e cultivo em três dimensões, poderá ser utilizada em diversos protocolos de engenharia de tecidos.

Neste estudo, confirma-se que a adição dos fatores de crescimento bFGF, IGF-1 e TGF- β 1 durante a geração de *pellets* de implantes condrais, tem efeito significativo sobre as propriedades de crescimento do tecido cartilaginoso. Com a adição de TGF- β 1 e IGF-1 ao meio de cultura, a concentração de soro pode ser grandemente reduzida sem comprometer a proliferação celular. Determinou-se as necessárias combinações de fatores de crescimento, durante as diferentes etapas do processo de cultivo: 0,1 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bFGF durante a expansão em monocamada, e 1,5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IGF-1, 1,5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TGF- β 1 e 15 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ASAP durante a cultura em gel de alginato. Afirma-se então, que estes fatores suportam a re-diferenciação e a formação de cartilagem *in vitro* e, assim, melhoram as propriedades bioquímicas das cartilagens porcinas, como sugerido pela produção de glicosaminoglicanos nos *pellets* produzidos. Os cortes histológicos mostraram matriz rica em proteoglicanos e fibras colágenas em desenvolvimento em torno das células individuais.

Para os condrócitos humanos é possível determinar o FBS Superior como o soro mais eficaz, que aumentou o número de células em 7 vezes durante o processo de expansão em monocamada e apresentou uma recuperação das células de 75% a partir da rediferenciação dos condrócitos em cultura em gel de alginato. Determinou-se, também, o fator de crescimento mais eficaz em cada uma das etapas do cultivo, sendo demonstrado que o bFGF proporcionou aos condrócitos um melhor desempenho de expansão em monocamada, ao passo que os fatores de crescimento IGF-1 e TGF- β 1 se demonstraram eficazes na cultura dos condrócitos em gel de alginato. Esse resultado para a produção de cartilagem humana é compatível com os protocolos já estabelecidos para a produção de

cartilagem suína e, assim, reforça que o fator de crescimento bFGF leva a um maior efeito proliferativo durante o cultivo nos fracos-T, enquanto que os fatores de crescimento TGF- β 1 e IGF-1 influenciam positivamente na formação dos *pellets* de cartilagem durante a rediferenciação dos condrócitos em cultura de gel de alginato.

O tecido cartilaginoso porcino, produzido no presente trabalho, demonstra características promissoras para a produção de implantes condrais articulares, com relação à expansão celular e à matriz extracelular, conforme demonstrado pela produção homogênea de colágenos do tipo I, II e VI. A predominância de colágeno II, como mostrado, é uma característica histológica intrínseca da cartilagem articular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abt Associates Incorporation. The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field. Cambridge, MA, 2003.
2. GODBEY, W. T.; ATALA, A. In Vitro Systems for Tissue Engineering. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 961, p. 10–26, 2002.
3. GLOWACKI, J. In Vitro Engineering of Cartilage. Journal of Rehabilitation Research & Development, v. 37, p. 171 – 178, 2000.
4. LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. Science, v. 260, p. 920–926, 1993.
5. VACANTI, J. P.; LANGER, R. Tissue Engineering: The Design and Fabrication of Living Replacement Devices for Surgical Reconstruction and Transplantation. Lancet, v. 354: p. 32–34, 1999.
6. LAWRENCE, R. C.; FELSON, D.; HELMICK, C. G.; *et al.* Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States: Part II. Arthritis & Rheumatology, v. 58, p. 26-35, 2008.
7. HUNZIKER, E. B. Articular Cartilage Repair: Basic Science and Clinical Progress. A review of the Current Status and Prospects. Osteoarthritis and Cartilage, v. 10, p. 432–463, 2001.
8. MARTINOLI C.; VALLE, M.; MALATTIA, C.; DAMASIO, M. B.; TAGLIAFICO, A. Pediatric Musculoskeletal US Beyond the Hip Joint. Pediatric Radiology, v. 41, p. 113-124, 2011.
9. WISE, C. Osteoarthritis. ACP Medicine, p. 1-12, 2010.

10. PULAVARTI, R. S.; RAUT, V. V.; McLAUHLAN, G. J. Patella Denervation in Primary Total Knee Arthroplasty - A Randomized Controlled Trial with 2 years of Follow-up. *Journal of Arthroplasty*, p. 977-981, 2014.
11. LANZA, R.; LANGER, R.; VACANT, J. *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier, 4th edition, p. 189-208, 2014.
12. RISBUD, M. V.; SITTINGER, M. *Tissue Engineering: Advances in Vitro Cartilage Generation*. *Trends in Biotechnology*, v. 20, p. 351–356, 2002.
13. VACANTI, J. P.; MORSE, M. A.; SALTZMAN, W. M.; DOMB, A. J.; PEREZ ATAYDE, A.; LANGER, R. Selective Cell Transplantation Using Bioabsorbable Artificial Polymers as Matrices. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 23, p. 3–9, 1988.
14. LANGER, R. *Tissue Engineering*. *Molecular Therapy*. Massachusetts Institute of Technology, v. 1, p. 12–15, 2000.
15. GREEN, W. T. Jr. Articular Cartilage Repair: Behavior of Rabbit Chondrocytes During Tissue Culture and Subsequent Allografting. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 124, p. 237-250, 1977.
16. GRANDE, D. A.; PITMAN, M. I.; PETERSON, L.; MENCHE, D.; KLEIN, M. The Repair of Experimentally Produced Defects in Rabbit Articular Cartilage by Autologous Chondrocyte Transplantation. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 7, p. 208-218, 1989.
17. BRITTBERG, M.; LINDHAL, A.; NILSSON, A.; OHLSSON, C.; ISAKSSON, O.; PETERSON, L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *New England Journal of Medicine*, v. 331, p. 889–895. 1994.
18. HAISCH, A.; MARZAHN, U.; MOBASHERI, A.; SCHULZE-TANZIL, G.; SHAKIBAEI, M. Development and Phenotypic

- Characterization of a High Density in Vitro Model of Auricular Chondrocytes with Applications in Reconstructive Plastic Surgery. *Histology and Histopathology*, v. 21, p. 467-476, 2006.
19. BENYA, P. D.; SHAFFER, J. D. Dedifferentiated Chondrocytes Reexpress the Differentiated Collagen Phenotype when Cultured in Agarose Gels. *Cell Press*, v. 30, p. 215-224, 1982.
 20. SHAKIBAEI, M.; ZIMMERMANN, B.; MERKER, H. J. Changes in Integrin Expression During Chondrogenesis in Vitro: An Immunomorphological Study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 43, p. 1061-1069, 1995.
 21. SCHULZE-TANZIL, G.; de SOUZA, P.; VILLEGAS CASTREJON, H.; JOHN, T.; MERKER, H. J.; SCHEID, A.; SHAKIBAEI, M. Redifferentiation of Dedifferentiated Human Chondrocytes in High-Density Cultures. *Cell and Tissue Research*, v. 308, p. 371-379, 2002.
 22. PÖRTNER, R.; GOEPFERT, C.; WIEGANDT, K.; JANSSEN, R.; ILINICH, E.; PAETZOLD, H.; EISENBARTH, E.; MORLOCK, M. Technical Strategies to Improve Tissue Engineering of Cartilage-Carrier-Constructs. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 112, p. 145–181, 2009.
 23. KUO, C. K.; LI, W. J.; MAUCK, R. L.; TUAN, R. S. Cartilage Tissue Engineering: Its Potential and Uses. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 18, n 1, p. 64–73, 2006.
 24. PÖRTNER, R.; NAGEL-HEYER, S.; GOEPFERT, C.; ADAMIETZ, P.; MEENEN, N. M. Bioreactor Design for Tissue Engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, p. 235–245, 2005.

25. RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011.
26. BOURHIS, J. M.; MARIANO, N.; ZHAO, Y.; HARLOS, K.; EXPOSITO, J. Y.; JONES, E. Y.; *et al.* Structural Basis of Fibrillar Collagen Trimerization and Related Genetic Disorders. Nature Structural & Molecular Biology, v.19, p. 1031–1036, 2012.
27. MESCHER, A. L. Junqueira's Basic Histology. McGraw-Hill, 13th edition, 2013.
28. SCHAUSS A. G.; STENEHJEM, J.; PARK, J.; ENDRES, J. R.; CLEWELL, A. Effect of the Novel Low Molecular Weight Hydrolyzed Chicken Sternal Cartilage Extract, BioCell Collagen, on Improving Osteoarthritis-Related Symptoms: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, p. 96-101, 2012.
29. SÖDER, S.; HAMBACH, L.; LISSNER, R.; KIRCHNER, T.; AIGNER, T. Ultrastructural Localization of Type VI Collagen in Normal Adult and Osteoarthritic Human Articular Cartilage. Osteoarthritis Cartilage, p. 464-470, 2002.
30. NANJI, A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. Elsevier, 8th edition, 2013.
31. JOCHEMS, C. E. A.; VALK, J. B. F.; STAFLEU, F. R.; BAUMANS, V. The Use of Fetal Bovine Serum: Ethical or Scientific Problem?. Alternatives to Laboratory Animals, p. 219–227, 2002.
32. GENDEPOT. Descrição técnica do FBS Gold: Catálogo online de produtos da empresa GenDepot. Disponível em: <http://www.gendepot.com/kb/subview.php?sel_a=25&sel_b=26&sel_c=&idx=1147&sel_page=sub_view_new>. Acesso em: 15 de junho de 2014.

33. BRUNSCHWIG. Descrição técnica do FBS Gold: Catálogo online de produtos da PAA The Cell Culture Company. Disponível em: <http://www.brunschwig-ch.com/pdf/downloads/PA_Serum_Brochure.pdf>. Acesso em: 15 de junho de 2014.
34. BIOCHROM. Descrição técnica do FBS Superior: Catálogo online de produtos da empresa Biochrom. Disponível em: <http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/produktinformation/englisch/BC_catalogue_18_Other_Sera.pdf>. Acesso em: 15 de junho de 2014.
35. LIFESCIENCES. Descrição técnica do FBS Superior: Catálogo online de produtos da empresa Lifesciences. Disponível em: <<http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/ClientUpload/ProductInfo/S0615.pdf>>. Acesso em: 15 de junho de 2014.
36. GENTAUR. Descrição técnica do FBS Superior: Catálogo online de produtos da empresa Gentaur. Disponível em: <http://gentaur-worldwide.com/index.php?option=com_k2&view=item&id=177:fb-superior-standardized-serum&Itemid=564>. Acesso em 15 de junho de 2014.
37. HOUSE, S. L.; BOLTE, C.; ZHOU, M.; DOETSCHMAN, T.; KLEVITSKY, R.; NEWMAN, G.; SCHULTZ, J. Cardiac-Specific Overexpression of Fibroblast Growth Factor-2 Protects Against Myocardial Dysfunction and Infarction in a Murine Model of Low-Flow Ischemia. *Circulation*, p. 140-148, 2003.
38. PEREIRA, R. C.; ECONOMIDES, A. N.; CANALIS, E. Bone Morphogenetic Proteins Induce Gremlin, a Protein That Limits Their Activity in Osteoblasts. *Endocrinology*, p. 558-63, 2000.

39. LIU, Y.; SONG, Z.; ZHAO, Y.; QIN, H.; CAI, J.; ZHANG, H.; YU, T.; JIANG, S.; WANG, G.; DING, M.; DENG, H. A Novel Chemical-Defined Medium with bFGF and N2B27 Supplements Supports Undifferentiated Growth In Human Embryonic Stem Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 131–139, 2006.
40. KÜHN, M. C.; WILLENBERG H. S.; SCHOTT, M.; PAPEWALIS, C.; STUMPF, U.; FLOHÉ, S.; SCHERBAUM, W. A.; SCHINNER, S. Adipocyte-Secreted Factors Increase Osteoblast Proliferation and the OPG/RANKL Ratio To Influence Osteoclast Formation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, p. 180-188, 2012.
41. LEE, T. J.; JANG, J.; KANG, S.; JIN, M.; SHIN, H.; KIM, D. W.; KIM, B. S. Enhancement of Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells by Mesodermal Lineage Induction with BMP-4 and FGF2 Treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 793–797, 2013.
42. TSUKAZAKI, T.; USA, T.; MATSUMOTO, T.; ENOMOTO H.; OHTSURU A.; NAMBA H.; IWASAKI K.; YAMASHITA S. Effect of Transforming Growth Factor- β on the Insulin-Like Growth Factor-I Autocrine/Paracrine Axis in Cultured Rat Articular Chondrocytes. *Experimental Cell Research*, v. 215, p. 9-16, 1994.
43. GUERNE, P.; SUBLET, A.; LOTZ, M. Growth Factor Responsiveness of Human Articular Chondrocytes: Distinct Profiles in Primary Chondrocytes, Subcultured Chondrocytes and Fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, v. 158, p. 476-484, 1994.
44. YAEGER, P. C.; MASI, T. L.; de ORTIZ J. L., BINETTE F., Tubo R., McPHERSON J.M. Synergistic Action of Transforming Growth Factor- β and Insulin Like Growth Factor-I Induces Expression of Type II Collagen and

- Aggrecan Genes in Adult Human Articular Chondrocytes. *Experimental Cell Research*, v. 237, p. 318-325, 1997.
45. WIEGANDT, K.; GOEPFERT, C.; PÖRTNER, R. Improving In Vitro Generated Cartilage-Carrier-Constructs by Optimizing Growth Factor Combination. *The Open Biomedical Engineering Journal*, v. 1, p. 77-82, 2007.
 46. WOLF D.; KUHLMANN, M. D. Histological Staining Techniques. Division of Radiooncology, Deutsches Krebsforschungszentrum, 69120 Heidelberg, Germany, 2008.
 47. RAMOS-VARA J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v. 42, p. 405-426, 2005.
 48. MARTIN, I.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; YANG, J.; LANGER, R.; FREED, L. Mammalian Chondrocytes Expanded in the Presence of Fibroblast Growth Factor 2 Maintain the Ability to Differentiate and Regenerate Three-Dimensional Cartilaginous Tissue. *Experimental Cell Research*, v. 253, p. 681-688, 1999.
 49. NAGEL-HEYER, S.; GOEPFERT, C.; FEYERABEND, F.; *et al.* Bioreactor Cultivation of Three-Dimensional Cartilage-Carrier-Constructs. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 27, p. 273-280, 2005.
 50. BUSCHMANN, M.; GLUZBAND, Y.; GRODZINSKI, A.; KIMURA, J.; HUNZICHER, E. Chondrocytes in Agarose Culture Synthesis a Mechanically Functional Extracellular Matrix. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 10, p.745-758, 1992.
 51. NAGEL-HEYER, S.; GOEPFERT, C.; MORLOCK, M.; PÖRTNER, R. Relationship Between Physical, Biochemical

and Biomechanical Properties of Tissue-Engineered Cartilage-Carrier-Constructs. *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 187-192, 2005.

52. GOEPFERT, C.; LUTZ, V.; LÜNSE, S.; *et al.* Redifferentiation Capacity of Human Articular Chondrocytes (HAC) Expanded on Microcarriers. Abstracts of the 2nd International Conference of Strategies in Tissue Engineering, Cytotherapy, v. 8, p. 29, 2006.
53. OSCH, G. J. van; DEN BERG, W. B. van; , HUNZIKER, E. B.; HÄUSELMANN, H. J. Differential Effects of IGF-1 and TGFbeta-2 on the Assembly of Proteoglycans in Pericellular and Territorial Matrix by Cultured Bovine Articular Chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 6, p. 187-195, 1998.
54. PEI, M.; SEIDEL, J.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; Freed L. E. Growth Factors for Sequential Cellular de- and re-differentiation in Tissue Engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 294, p. 149-154, 2002.
55. BLUNK, T.; SIEMINSKI, A. L.; GOOCH, K. J.; COURTER, D. L.; HOLLANDER, A. P.; NAHIR, A. M.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FREED, L. E. Differential Effects of Growth Factors on Tissue-Engineered Cartilage. *Tissue Engineering*, v. 8, p. 73-84, 2002.
56. GROGAN, S. P.; SOVANI, S.; PAULI, C.; CHEN, J.; HARTMANN, A.; COLWELL, C. W. JR.; LOTZ, M. .K.; D'LIMA, D. D. Effects of Perfusion and Dynamic Loading on Human Neocartilage Formation in Alginate Hydrogels. *Tissue Engineering Part A*, p. 1784-1792, 2012.
57. MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; MURPHY, J. M.; BARRY, F. P.; CHICHESTER, C. O.; PITTENGER, M. F. Chondrogenic Differentiation of Cultured Human Mesenchymal Stem Cells From Marrow. *Tissue Engineering*, p. 415-428, 1998.

58. BIOCHROM. Descrição técnica do FBS: Catálogo online de produtos da empresa Biochrom. Disponível em: <<http://www.biochrom.de/en/products/sera/fetal-bovine-serum-fbs/>>. Acesso em: 15 de junho de 2014.
59. RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of Mycoplasma Research - An Historical Perspective. *Biologicals*, v. 38, p. 183–190, 2010.