

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE
MEDULA ÓSSEA DE RATO SEDIMENTADAS EM MATRIZ TRIDIMENSIONAL
POLIMÉRICA E POROSA COMPOSTA DE QUITOSANA**

ALUNA: NATÁLIA MARTINS BREYNER

BELO HORIZONTE
2006

NATÁLIA MARTINS BREYNER

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE
MEDULA ÓSSEA DE RATO SEDIMENTADAS EM MATRIZ TRIDIMENSIONAL
POLIMÉRICA E POROSA COMPOSTA DE QUITOSANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós
graduação em Bioquímica e Imunologia da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Imunologia e Bioquímica.

ORIENTADOR: Dr. ALFREDO MIRANDA DE GOES

BELO HORIZONTE
2006

*Aos meus amados pais pelo incentivo e apoio
À minha irmã, minha alma gêmea, pelos momentos de compreensão
e carinho
À Rafaela pela amizade, paciência e horas a fio de dedicação e ensinamentos
À Heloísa pela amizade e por me mostrar que sendo perseverante se
conquista vitórias.*

Agradecimentos:

Ao CNPq, Fapemig e CAPES.

Ao Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes e equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia

Ao CDTN/CNEN e ao Prof. Dr. Antero.

“Quando um navegante começa a viagem, prepara seu barco, estuda sua rota e zarpa; não pode fazer mais nada. Não pode saber quais tormentas o atingirão, nem se retornará. Mas zarpa...”

(Edward Rutherford)

RESUMO

A cartilagem apresenta-se histologicamente descrita como um tecido avascular, o que lhe confere, junto a outras características, uma limitada capacidade de reparo. Conseqüentemente, pequenas lesões podem acarretar em danos progressivos e/ou processos degenerativos, como osteoartrite. Para o tratamento de lesões da cartilagem, técnicas de engenharia de tecido têm sido indicadas. Neste trabalho, foi demonstrado que a matriz 3D (tridimensional) de quitosana se apresentou adequada ao processo de adesão e diferenciação de CTM (Células-tronco mesenquimais) após a adição do meio condrogênico contendo TGF- β e dexametasona. As CTM cultivadas em matriz 3D de quitosana se apresentaram viáveis durante as 9 semanas de cultivo, além de apresentarem uma redução na produção de FA, o que indica alteração fenotípica das células. Corroborando com esses resultados, a produção de colágeno pelas CTM cultivadas neste tipo de matriz aumentou no decorrer do período de cultivo, indicando um início de diferenciação. Entretanto, ao adicionar gelatina à constituição da matriz os resultados obtidos não foram satisfatórios. Diante dos excelentes resultados apresentados pela matriz 3D à base de quitosana na promoção da condrogênese usando CTM, podemos apontar essa estrutura orgânica com um dos principais candidatos em implantes de biomateriais colonizados por células tronco para recuperação tecidual em medicina regenerativa.

ABSTRACT

Cartilage is known to be an avascular tissue and this characteristic taken together with others provides the tissue a very limited regeneration capacity. Consequently, a small damage to the tissue results in progressive damages or degenerative processes like osteoarthritis. Tissue engineering techniques has been applied not only in the treatment of cartilage damage but also in other medical fields such as orthopedic and odontology. In the present work, it was demonstrated that the 3D (tridimensional) chitosan scaffold was efficient in the adhesion and differentiation process of the MSCs (Mesenchymal Stem Cells) after the addition of a chondrogenic medium containing TGF- β and dexamethasone. The cultured MSCs in the 3D chitosan scaffold were more viable during the first nine weeks of culture, demonstrating a reduction in the production of Alkaline Phosphatase, which indicates phenotypic changes of the cells. Confirming these results, the collagen production of the MSCs cultured in this kind of scaffold increased together as the culture period indicating the beginning of a differentiation. However, when gelatin is added to the scaffold constitution, the results were not satisfactory. Ahead of the excellent results using a matrix made of chitosan in the promotion of MSCs differentiation. It becomes clear that this 3D organic structure is one of the best candidates for biomaterial implants colonized by stem cells in the tissue recovering in regenerative medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cartilagem Hialina (HE).....	16
Figura 2 – Cartilagem elástica (orceína).....	17
Figura 3 – Cartilagem fibrosa (HE).....	17
Figura 4 – Esquema representativo da metodologia e dos princípios da Bioengenharia tecidual.....	21
Figura 5 – Definição de Células Tronco Embrionária e Adulta	29
Figura 6 – Colônia de CTM derivada de medula óssea.....	33
Figura 7 – Aspectos morfológicos de CTM em cultura com meio controle.....	48
Figura 8 – Aspectos fenotípicos das CTMs em cultura de monocamada e meio condrogênico.....	51
Figura 9 – Colonização da matriz 3D por CTMs.....	52
Figura 10 – Aspectos morfológicos das culturas de CTM em monocamada e meio condrogênico relativos à metabolização de MTT.....	55
Figura 11 – Aspectos morfológicos das culturas de CTM em monocamada e meio condrogênico relativos à fosfatase alcalina.....	60
Figura 12 – Aspectos morfológicos das culturas de CTM em monocamada e meio condrogênico relativos à produção de colágeno.....	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Metabolização de MTT durante o cultivo em monocamada de CTMs na presença de meio condrogênico.....	54
Gráfico 2 – Metabolização de MTT durante o cultivo em de CTMs na presença de matriz 3D de quitosana com meio condrogênico.....	56
Gráfico 3 – Metabolização de MTT durante o cultivo de CTMs na presença de matriz 3D de quitosana e gelatina com meio condrogênico.....	57
Gráfico 4 – Porcentagem da atividade da FA em CTMs cultivadas em monocamada na presença de meio condrogênico.....	59
Gráfico 5 – Porcentagem da atividade da FA em CTMs cultivadas na presença de matriz 3D de quitosana em meio condrogênico.....	62
Gráfico 6 – Porcentagem da atividade da FA em CTMs cultivadas na presença de matriz 3D de quitosana e gelatina em meio condrogênico.....	64
Gráfico 7 – Curva padrão de concentração de colágeno.....	66
Gráfico 8 – Concentração da produção de colágeno pelas CTMs cultivadas em monocamada e na presença de meio condrogênico.....	68
Gráfico 9 – Concentração da produção de colágeno pelas CTMs cultivadas na presença de matriz 3D de quitosana e meio condrogênico.....	70
Gráfico 10 – Concentração da produção de colágeno pelas CTMs cultivadas na presença de matriz 3D de quitosana e gelatina e meio condrogênico.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP – “5-bromo,4-chloro,3-indolyphosphate”
BSA – albumina de soro bovino
BMP – proteína morfogenética óssea
CA – California, Estados Unidos da América
CTM – células tronco mesenquimais (MSC)
CFU-F – unidade formadora de colônia semelhante ao fibroblasto
CDTN/CNEN - Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear/ Centro Nacional de Energia Nuclear
CETEA – Comitê de ética em experimentação animal
DMEM – Dulbecco’s Modified Eagles Medium
ECM – matriz extracelular
EDAC – N-(3-dimethylaminopropyl)-N’-ethylcarbodiimide
EGF – fator de crescimento epidérmico
FA – fosfatase alcalina (ALP)
G - gentamicina
GAG – glicosaminoglicano
GDF – fator de crescimento e diferenciação
HE – Hematoxilina e eosina
MTT – “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide”
M.O. – Microscópio óptico
NBT – nitroblue tetrazolium
PBS – tampão fosfato salina
PCR – reação em cadeia da polimerase
PDGF – fator de crescimento derivado de plaqueta
PLLA – ácido poli-L-lactico
PGA/PLA – ácidos poliglicólicos/polilácticos
PSA – Penicilina, Streptomina e Anfotericina
RPM – rotações por minuto
RGD – Arginina, Glicina, Aspartato

SDS – sódio dodecil sulfato

SFB – soro fetal bovino

SHR – do inglês, linhagem isogênica de hipertensão

TGF-B – fator de crescimento de transformação beta

3D –Tridimensional

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO	15
➤ TECIDO CARTILAGINOSO.....	15
➤ ENGENHARIA DE TECIDOS	21
➤ CÉLULAS TRONCO	30
2- OBJETIVOS	38
2 – METODOLOGIAS.....	39
➤ ANIMAIS	39
➤ PREPARO DO MEIO DMEM	41
➤ PREPARAÇÃO DA MATRIZ 3D	42
➤ DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	43
➤ DESENHO EXPERIMENTAL	44
➤ ANÁLISES DAS CULTURAS DE CTMs	45
➤ ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DA MATRIZ	48
➤ ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
3 – RESULTADOS	49
4 – DISCUSSÃO	76
5 – CONCLUSÃO	87
6 – PERSPECTIVAS.....	88
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

TECIDO CARTILAGINOSO

A condrogênese inicia-se com a diferenciação das células derivadas do mesoderma com capacidade proliferativa em células especializadas denominadas condroblastos (Optiz, 1996). Inicialmente, as células precursoras alteram-se morfológicamente, retraindo seus prolongamentos e se diferenciam em condroblastos, apresentando-se arredondados e imersos na matriz extracelular. Condroblastos são células constituintes do tecido cartilaginoso imaturo, com capacidade de produzir grande quantidade de matriz extracelular e de dividir, sendo responsável pelo crescimento do tecido. Geralmente, se localizam na periferia da cartilagem, próximas ao pericôndrio (Junqueira e Carneiro, 2000).

No tecido cartilaginoso maduro, as células são denominadas de condrócitos, sendo altamente especializadas e adaptadas morfológicamente. Tem a função de remodelar a matriz extracelular (ECM) e não possuem capacidade de divisão. Os condrócitos se localizam em lacunas, espaços na matriz extracelular, podendo ser agrupados, denominados grupos isogênicos, derivados de um único condroblasto (Junqueira e Carneiro, 2000).

O tecido cartilaginoso apresenta-se histologicamente descrito como tecido conjuntivo e é caracterizado pela sua consistência firme e elasticidade. Diferente dos outros tecidos conjuntivos, a cartilagem é um tecido avascular e, portanto, sua nutrição ocorre por difusão de substâncias entre os vasos sanguíneos do tecido

conjuntivo circunjacente, denominado pericôndrio, e os condrócitos. Essas características além de outras conferem – no uma limitada capacidade de regeneração e auto-reparo. Conseqüentemente, pequenas lesões podem acarretar em progressivos danos. Esses danos podem ser observados em vários casos de processos degenerativos do tecido cartilaginoso tais como anormalidades no desenvolvimento, traumas ou degenerações relacionadas com a idade, como osteoartrite (Chen, et.al., 2004, Junqueira e Carneiro, 2000).

As células do tecido cartilaginoso estão circundadas por matriz extracelular constituída principalmente de colágeno do tipo II e de proteoglicanos, substância formada por proteínas e glicosaminoglicanas. As glicosaminoglicanas específicas da cartilagem são condroitina-4- e condroitina-6-sulfato, ácido hialurônico e agregana. Estes compostos da substância fundamental fornecem à cartilagem sua consistência firme e elasticidade (Junqueira e Carneiro, 2000).

Esse tecido pode ser classificado baseado nas diferentes concentrações das substâncias e tipos de fibras na matriz. Existem três classes de cartilagem: hialina, elástica e fibrocartilagem (Junqueira e Carneiro, 2000).

A cartilagem hialina é a classe mais comum e mais estudada. É encontrada no anel da traquéia, laringe, brônquios e na superfície das articulações dos ossos, e uma vez que se localiza no disco epifisário é responsável pelo crescimento em extensão do osso, além de estar presente no esqueleto fetal. (Junqueira e Carneiro, 2000).

Esse tipo de cartilagem apresenta uma matriz amorfa homogênea, devido ao pequeno tamanho das fibrilas colágenas e pelo fato de que a substância fundamental e o colágeno têm aproximadamente o mesmo índice refratário (Fig. 1)

A cartilagem hialina é caracterizada por apresentar grupos isogênicos, ou seja, duas células derivadas de um mesmo precursor celular localizadas numa mesma lacuna e pericôndrio (Junqueira e Carneiro, 2000).



Figura 1 – Cartilagem hialina. Coloração HE. Fonte: Xavier et.al., 1999.

Já a cartilagem elástica como o próprio nome a descreve é composta de fibras elásticas na matriz. Essas fibras são demonstradas histologicamente apenas com colorações especiais como, por exemplo, resorcina-fucsina e orceína (Fig. 2). Semelhante a cartilagem hialina, a cartilagem elástica também contém fibrilas colágenas na sua matriz, principalmente colágeno tipo II, grupos isogênicos e pericôndrio. A cartilagem elástica é encontrada na orelha externa, tuba auditiva e em algumas cartilagens da laringe (Junqueira e Carneiro, 2000).

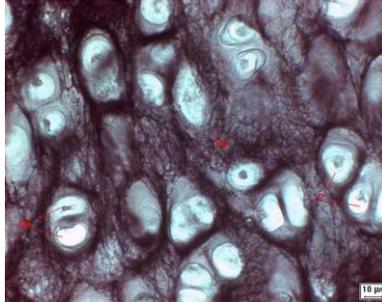


Figura 2 – Cartilagem elástica. Coloração Orceína. Fonte: Atlas virtual de histologia da PUC – RS.

E finalmente a fibrocartilagem ou cartilagem fibrosa consiste de feixes de fibras colágenas, principalmente colágeno tipo I, organizadas paralelamente entre fileiras de condrócitos (Fig. 3). É caracterizada pela ausência de pericôndrio e baixa quantidade de matriz extracelular. A fibrocartilagem é encontrada nos discos intervertebrais, na sínfise púbica, nas inserções dos tendões ou ligamentos e no disco temporomandibular (Junqueira e Carneiro, 2000).

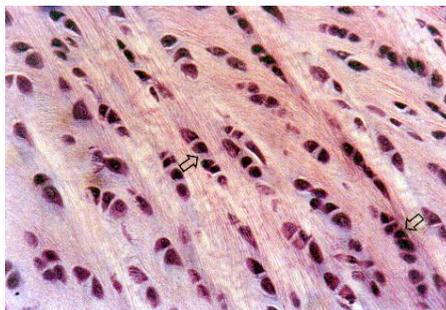


Figura 3 - Cartilagem fibrosa. Coloração HE. Fonte: <http://acd.ufrj.br/labnac>. As setas indicam fileiras de condrócitos.

De acordo com Hipócrates e baseado nas características do tecido, a cartilagem uma vez destruída não é reparada. Essa limitação é devido à distribuição esparsa e altamente diferenciada dos condrócitos e a características tais como: a não ocorrência de divisão celular, baixa reposição de matriz, baixa quantidade de células progenitoras e ausência de suplemento vascular (Wang, et.al., 2005).

Baseado nessa limitação, uma enorme quantidade de pesquisadores tem têm levantados propostas para estudar e entender os processos biológicos de reparo. De fato, atualmente, o processo de tratamento da cartilagem tem sido por intervenção cirúrgica, com a finalidade de diminuir a dor e de restaurar as funções das superfícies de articulação. A engenharia de tecidos é uma proposta alternativa no tratamento de cartilagem. Nesse cenário, os condrócitos cresceriam em um ambiente in vitro e seriam implantados na cartilagem lesionada (Francis Suh, et.al., 2000). Progressos na biologia celular viabilizaram o uso de células indiferenciadas capazes de se diferenciar de acordo com estímulos adequados em células especializadas e funcionais. Tais células indiferenciadas são denominadas células-tronco. Desde então, é mais interessante do ponto de vista clínico usar as células-tronco extraídas de diversas fontes ao invés de retirar condrócitos de cartilagens sadias a fim de restaurar uma lesão. (Cancedda, et.al., 2003; Chen, et.al., 2004).

ENGENHARIA DE TECIDO

No organismo vivo, o substrato autêntico da maioria das células é a matriz extracelular (ECM), que adere às células via receptores de membrana. Através dessa adesão célula-matriz há, via matriz extracelular, transmissão dos sinais de regulação de crescimento, proliferação, diferenciação celular e remodelamento da matriz. (Bagby et.al., 2004).

A engenharia tecidual tem sido definida como um campo interdisciplinar que aplica princípios de engenharia, ciências dos materiais e ciências biológicas através do desenvolvimento de substratos para reparo ou reconstituição de tecidos e órgãos. Essa alternativa enfatiza o estudo e a aplicação da substituição de órgãos, utilizando células indiferenciadas associadas a material biodegradável ou biocompatível e durável (Arosarena, 2005 e Chen, et.al., 2004).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que as funções celulares variam em culturas bi ou tridimensionais. No caso da engenharia de tecido, especificamente do tecido cartilaginoso, o ambiente para cultura de condrócitos mais eficiente foi tridimensional. Uma vez que no ambiente 3D a presença de porosidade permite migração celular, possibilidade de sedimentar maior quantidade de células, bem como distribuição de nutrientes e metabólitos (Yamane, et.al., 2005).

A biocompatibilidade dos materiais utilizados na engenharia de tecidos é muito importante e estudos têm demonstrado que alguns biomateriais sintéticos implantados desencadeiam resposta imune em seus hospedeiros (Vacanti et.al., 1994; Britt e Park, 1998). Desde então, pesquisadores têm focado a encontrar o

melhor biomaterial capaz de mimetizar a matriz, fornecendo suporte para reconstrução de órgãos baseado na engenharia de tecido, além da utilização de células tronco (Fig. 4) (Ng, et.al., 2005).

Um grande número de estudos tem demonstrado a importância da escolha do biomaterial apropriado para adesão, suporte e proliferação das células. Por esta razão, o material escolhido tem que ser semelhante à MEC. (Francis Suh, et.al., 2000).

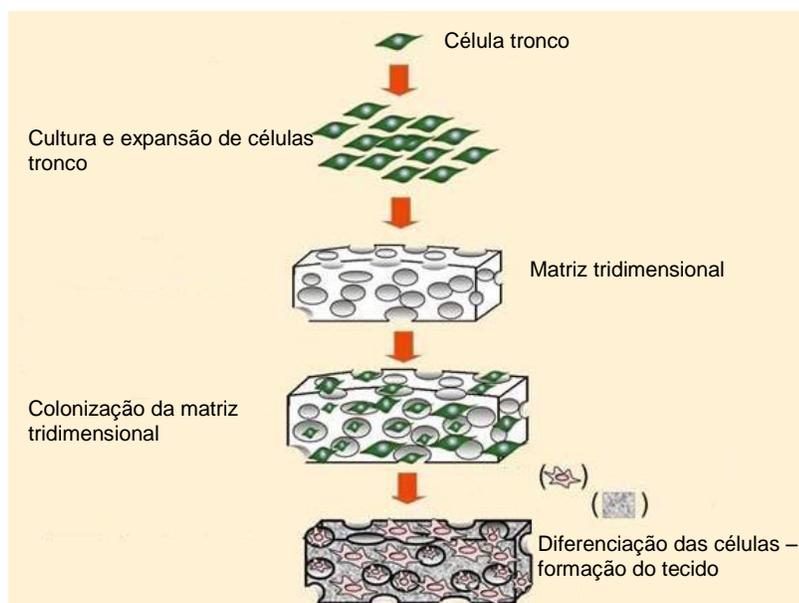


Figura 4 – Esquema representativo da metodologia e dos princípios da bioengenharia tecidual.

Atualmente, a atenção tem se voltado para algumas substâncias amplamente distribuídas na natureza com a finalidade de compor matrizes tridimensionais. Para essas matrizes utilizadas para cultivo celular na engenharia de tecidos, buscam-se características como biocompatibilidade e

biodegradabilidade além da semelhança com a MEC do tecido desejado. A semelhança com a MEC se dá de maneira importante, uma vez que é responsável pela diferenciação e manutenção do fenótipo celular (Francis Suh, et.al., 2000).

Diante dessas necessidades, vários polissacarídeos vem sendo avaliados. Dentre eles, a quitosana atende às necessidades básicas para a escolha do biomaterial constituinte da matriz, apresentando características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, ampla distribuição na natureza e semelhança com a matriz real do tecido desejado, além de apresentar um baixo custo. Esse polissacarídeo, derivado da quitina, principal molécula estrutural da carapaça de crustáceos, é parcialmente deacetilado e tem baixo peso molecular (Di Martino, et.al., 2005, Donati, et. al., 2004).

Estruturalmente, a quitosana é um polissacarídeo linear consistindo de resíduos de D-glicosaminas com ligações β (1 \rightarrow 4), com numerosas ligações randômicas de N-acetil-glicosamina, semelhante às unidades repetitivas de GAGs (glicosamanoglicanos) e ácido hialurônico presente na cartilagem articular. (Di Martino, et.al., 2005, Donati, et. al., 2004).

A quitosana é um polímero semi-cristalino e o grau de cristalinidade é conferida pelo grau de deacetilação. Por causa da estabilidade da estrutura de cristalização, esse polímero é normalmente insolúvel em solução aquosa com pH em torno de 7 (Donati, et. al., 2004). Entretanto, em diluentes ácidos, os grupos de carbonilas livres são protonados e a molécula se torna solúvel. Essa diluição pH dependente provê um mecanismo conveniente para o processamento do biomaterial sob determinadas condições. Devido a sua natureza catiônica, esse

polímero é o principal responsável por interações eletrostáticas com os glicosaminoglicanos aniônicos, proteoglicanos e outras moléculas carregadas negativamente, sendo responsável pela adesão celular. (Midihally, et.al.,1999).

A matriz 3D pode ser manipulada ou montada de acordo com a necessidade tecidual, ou seja, a mimetização do ambiente em que a célula irá se desenvolver. Portanto, a adição de gelatina ao biomaterial a base de quitosana é importante por prover características biologicamente ativas. Uma vez que a gelatina contém resíduos ativos de Arg-Gly-Asp. Essa seqüência semelhante a RGD promove a adesão e migração celular, além de ser capaz formar complexos eletrolíticos. Quando a quitosana e a gelatina são colocadas juntas, a estrutura formada pode afetar a distribuição espacial de ligantes de integrina e a interação dos policatiônicos da quitosana com a superfície aniônica da célula, isso influencia na adesão das células, na bioatividade celular, no processo de remodelamento do tecido e na qualidade da regeneração tecidual (Huang, et.al., 2005).

Dada a importância dos GAGs na estimulação da condrogênese, o uso destas substâncias e similares aumentam o potencial condrogênico, devido ao grande número de citocinas e fatores de crescimento que se ligam aos GAGs. Assim sendo, uma matriz que possui quitosana pode reter e concentrar fatores de crescimento secretados pelas células colonizadoras (Donati, et. al., 2004, Di Martino, et.al., 2005).

Além disso, a quitosana apresenta características como não induzir resposta inflamatória em modelos implantados (Donati, et.al., 2004). A semelhança com o glicosaminoglicano sugere que a quitosana é um polímero bioativo, uma vez que esta garante adesão celular através de proteínas receptoras

presentes nas membranas das células, estimulando a proliferação e diferenciação (Di Martino, et.al., 2005).

A construção da matriz ou suporte de estrutura porosa a base de quitosana pode ser feita por congelamento e liofilização de soluções de quitosana e ácido acético. Durante o processo de congelamento, formam-se cristais de gelo que crescem ao longo da linha de gradiente térmico. A exclusão do sal acetato por lavagens sequenciais e a remoção dos cristais de gelo é feita pelo processo de liofilização. Dessa forma, cria-se uma matriz porosa sendo possível controlar a porosidade do material, a orientação e a geometria dos poros. A importância dos poros da matriz ou suporte se dá pelo fator de biodegradação, além de criar um ambiente favorável para as células e para localização de proteínas biologicamente ativas (Francis Suh, et.al., 2000).

Além de várias características já citadas da quitosana, existe também, a de atividade antimicrobiana que está relacionada à interação entre o grupo carregado positivamente da quitosana com o grupo carregado negativamente da membrana celular do microrganismo (Huang, et.al., 2005, Di Martino, et.al., 2005). Em adição, têm demonstrado na literatura funções da quitosana agindo na cartilagem articular, aumentando sua cicatrização pela inibição de proteínas pró-inflamatórias (Kofugi, et.al., 2005).

Um grande número de pesquisadores tem examinado a resposta imunológica do hospedeiro ao tecido implantado a base de quitosana. Em geral, esses materiais evocam uma pequena reação de corpo estranho, com pouca ou nenhuma encapsulação fibrosa. Esse efeito imunomodulatório tem se apresentado

como um estimulador para a integração do biomaterial implantado no organismo hospedeiro (Francis Suh, et.al., 2000).

Quitosana tem sido combinada com uma variedade de materiais com alginato, hidroxiapatita, ácido hialurônico, fosfato de cálcio, ácido poli-L-lactico (PLLA) e fatores de crescimento para potencial aplicação em ortopedia. Sobretudo, a quitosana apresenta-se adequada para engenharia tecidual baseada em células, através da preparação da matriz para cultura de células ajustadas às propriedades de adesão e comportamento mecânico para aplicações clínicas (Di Martino, et.al., 2005).

Para a engenharia de tecido o tipo de célula para o cultivo é crucial. Vários estudos têm sido feitos em torno dessa questão. De acordo com alguns estudiosos, a engenharia de tecido envolve o isolamento de células precursoras ou especializadas e que posteriormente serão cultivadas em matriz biocompatível para implantação. (Francis Suh, et.al., 2000).

Foi visto que condrócitos autólogos ou células-tronco mesenquimais cultivadas em matriz tridimensional (3D) e sob indução à diferenciação, crescimento e produção de nova matriz extracelular são convenientes para implantes in vivo. A relevância do uso das células-tronco mesenquimais se dá pelo principal motivo de não lesionar uma cartilagem saudável a fim de reparar a outra degenerada (Francis Suh, et.al., 2000).

As células-tronco são capazes de se diferenciar em quaisquer tipos celulares de origem mesenquimal, dependente de estímulo. Portanto, a fase anterior ao implante é a diferenciação das células precursoras em cultivo. Para isso a condrogênese depende de vários fatores, tais como adesão celular,

proliferação e diferenciação. In vitro, os fatores como TGF- β (fator de crescimento e transformação) e dexametasona estimulam a diferenciação, além de um suporte tridimensional que permita a adesão, estimule a proliferação e mantenha o fenótipo de diferenciação (Wang, et.al., 2005; Lisignoli, et.al., 2005). Outras substâncias necessárias são colágeno do tipo II e glicosaminoglicanas que iniciam um papel importante na expressão do fenótipo de condrócito e mantém essa expressão in vitro e in vivo (Francis Suh, et.al., 2000).

A diferenciação condrogênica de células derivada da medula óssea requer um meio onde são adicionados certos fatores biológicos, tais como insulina, transferrina, piruvato e TGF- β . Recentes estudos têm demonstrado que TGF- β e outros fatores como BMP-2 e GDF-5 (fator de crescimento e diferenciação), induzem rapidamente a expressão de colágeno do tipo II, sugerindo um papel crítico na sinalização da superfamília TGF- β na expressão de genes específicos de condrócitos (Lee, et.al., 2004).

CÉLULAS-TRONCO

Uma vez estabelecida e construída a matriz ou suporte, seguindo os princípios da engenharia de tecido, é fundamental a escolha do tipo de célula que se vai trabalhar. Dentre vários tipos de células já citadas anteriormente, para o tratamento utilizando a engenharia de tecidos. As células- tronco têm sido o objeto de grandes interesses científicos, devido as suas inúmeras aplicações biomédicas. As células-tronco são capazes de se auto-renovar, ou seja, podem ser mantidas

continuamente em cultura em um estado indiferenciado, e após estímulo podem diferenciar em células especializadas (Davila, et.al., 2004; Li and Xie, 2005). Dentre as células-tronco, existem dois tipos principais: as embrionárias e as adultas (Figura 5).

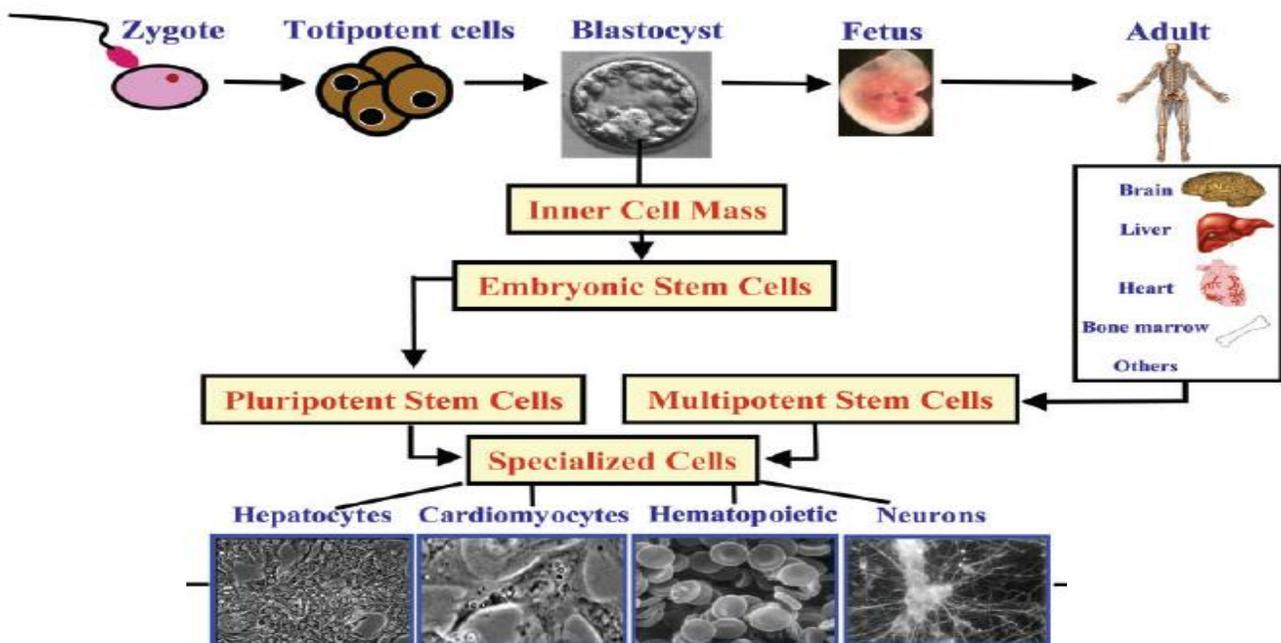


Figura 5 – Definição de células tronco embrionária e adulta. Fonte: Davila, et.al., 2004.

A diferenciação das células-tronco, sejam elas embrionárias ou adultas, é um processo em que as células adquirem novas características morfológicas e funcionais. In vivo, a diferenciação é governada pelas células precursoras de linhagens somáticas derivadas das camadas germinativas durante o desenvolvimento do organismo. Esse processo permanece no reparo e manutenção de tecidos durante a vida pós natal e adulta, bem como na diferenciação das células da medula óssea em células sanguíneas eritróides e

mielóides funcionais, garantindo a homeostase (Davila et.al., 2004). Como já foi dito anteriormente, essas células são encontradas em vários tecidos, e possuem uma característica denominada plasticidade transgêrmica, que é a capacidade das células de diferenciar em vários tipos de células fenotipicamente não relacionados em seu tecido de origem (Bianco et.al., 2001).

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto e são denominadas pluripotentes. Dessa forma, são capazes de dar origem a três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma, além de células dos anexos embrionários, capazes de sustentar o trofoblasto. Dentre as células embrionárias existem as linhagens de células-tronco germinativas, para reprodução e de células-tronco somáticas, para a organogênese. Embora sejam diferentes, elas mantêm a característica de auto-renovação. Células-tronco embrionárias humanas foram isoladas pela primeira vez, em 1998, por Thomson e colaboradores. Neste trabalho, as células-tronco embrionárias apresentaram a mesma plasticidade que as células-tronco embrionárias de rato até então descritas. Tanto a humana quanto a de rato têm a capacidade de diferenciar em várias células funcionais somáticas ou semelhantes a somáticas como neurônios, hepatócitos, cardiomiócitos, células do trofoblasto e outras (Li and Xie, 2005; Lakshmiathy, et.al.,2005, Davila, et.al., 2004).

As células-tronco adultas, também conhecidas como células-tronco mesenquimais ou células progenitoras adultas multipotentes, são células capazes de se diferenciar em vários tipos celulares. Estão distribuídas nos tecidos, encontrando-se em nichos. As células-tronco adultas/somáticas são componentes essenciais para a homeostase, elas amparam a regeneração tecidual, repõem

perda de células por morte natural (apoptose) ou por lesão. Para sustentar essa função através do tempo de vida do organismo, há um delicado balanço entre as diferenças e as semelhanças funcionais e estruturais dos nichos de células tronco nos diferentes sistemas do organismo e essas informações são utilizadas para definir fatores básicos em cada nicho (Li and Xie, 2005 e Davila, et.al., 2004).

As CTM (células-tronco mesenquimais) adultas derivadas de medula óssea foram descritas pela primeira vez por Friedenstein (1966), que as apresentou como células com capacidade de aderência, de divisão clonal, plasticidade e diferenciação (Gregory, et.al., 2005). Esses cientistas fizeram inúmeros ensaios a fim de caracterizar as células presentes no estroma da medula óssea (Bianco, et.al., 2001). Características como auto-renovação e auto-manutenção também são atribuídas às células tronco, porém não são exclusivas.

As células-tronco adultas são indiferenciadas e não especializadas, encontradas em tecido especializado (nichos) e, portanto, diferenciado. Recentemente, pesquisadores têm demonstrado que células-tronco mesenquimais multipotentes são capazes de recuperar uma variedade de outros tecidos adultos e diferenciar em numerosos tecidos como muscular, hepático, ósseo, cartilaginoso, adiposo e possivelmente, em tecido neural (Cancedda, et.al., 2003).

As fontes de células-tronco adultas são medula óssea, cérebro, córnea e retina, pulpa dental, fígado, pele, trato gastrointestinal, tecido adiposo, placenta, pâncreas, dentre outros. Talvez, as células-tronco mesenquimais melhor caracterizadas são as derivadas de medula óssea como descrito por Reyes e colaboradores (2001). Pesquisas recentes têm sugerido que as células-tronco derivadas do cérebro e da medula óssea podem ser cultivadas e expandidas em

um significativo número de passagens sem apresentar nenhum sinal de senescência (Cancedda, et.al., 2003, Zuk, et.al., 2002, Matikainen, et.al., 2005, Davila, et.al., 2004).

As células- tronco derivadas da medula óssea podem ser divididas em dois grupos: as hematopoiéticas, que foram bem estudadas após o ataque por bomba atômica em Hirishima e Nagasaki. Essas células dão origem aos componentes do sangue e do sistema imune. O outro grupo, o das mesenquimais, normalmente dão origem a osteoblastos, condroblastos e adipócitos, células endoteliais, células do músculos esqueléticos, cardiomiócitos (Conrad, et.al., 2004 e Davila, et.al., 2004).

Diante das inúmeras possibilidades de fontes de extração de células-tronco, bem como o padrão já estabelecido e mais estudado. Nesse trabalho a fonte de células-tronco foi a medula óssea de *Rattus norvegicus*, que de acordo com Bianco (2001), tem sido tradicionalmente vista como um órgão composto de duas distintas linhagens, o tecido hematopoiético e o tecido de suporte associado ao estroma. Portanto, possui duas linhagens de células-tronco distintas e separadas, além de ser um sistema dependente ele não somente coexiste como também coopera funcionalmente.

Ainda, segundo o mesmo autor, as CTM derivadas de medula óssea apesar de estarem em baixa densidade, se aderem rapidamente à superfície plástica e podem ser separadas das demais células do estroma medular por lavagens repetidas. E em meio de cultura, em condições apropriadas, as CTM apresentam-se morfológicamente fusiformes e com capacidade de formar colônias distintas, cada uma derivada de um único precursor celular, denominada CFU-F (unidade

formadora de colônia semelhante ao fibroblasto – Figura 6) e sob estímulos determinados ocorre sua diferenciação em condrócitos, osteoblastos e adipócitos, por exemplo (Kassem, et.al., 2004).

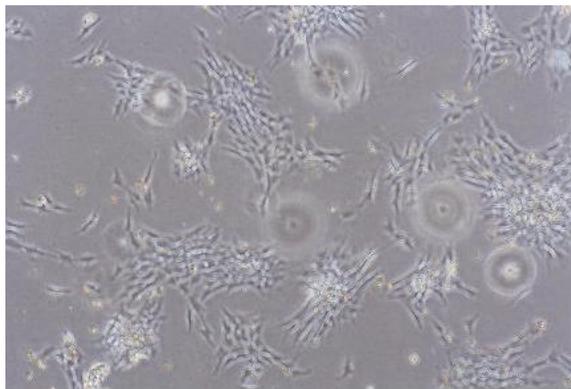


Figura 6 – Colônias de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea. M.O. Aumento – 60 X. Natália Martins Breyner

Os fatores mitogênicos requeridos para a proliferação das células semelhantes a fibroblastos não são completamente conhecidos, porém existe uma lista que incluem fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento básico de fibroblasto, TGF- β e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (Bianco, et.al., 2001).

Sabe-se que sob condições controle de soro e densidade celular, as células-tronco mesenquimais têm a capacidade de se diferenciar em linhagens somáticas multimesenquimais (osteoblastos, condrócitos e adipócitos) e linhagens mioblásticas. Como essas células são obtidas de várias fontes e com facilidade, elas são candidatas à terapias gênica e celular (Conrad, et.al., 2004).

Já que as células-tronco são capazes de se auto-renovar e de se diferenciar em células especializadas, elas podem tornar-se amplamente utilizadas nas terapias de reposição celular e no tratamento de um grande número de doenças, incluindo diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças isquêmicas (como infarto do miocárdio e do cérebro), lesão na coluna espinhal, entre outras (Matikainen, et.al., 2005).

De fato, a disponibilidade em grande número, a facilidade de ser isoladas, e a possibilidade de purificação e expansão sem indução espontânea de diferenciação, bem como a capacidade de diferenciação em qualquer tipo de célula especializada desejada faz das células-tronco mesenquimais uma potencial ferramenta para tratamentos de lesões articulares, bem como outras doenças degenerativas (Matikainen, et.al., 2005).

Segundo Donati e colaboradores, 2004, a engenharia de tecido tem sido utilizada como uma das principais tendências na recuperação de tecido cartilaginoso.

Diante do exposto e de dados relacionados com estatísticas mundiais e brasileiras de doenças que envolvem o tecido cartilaginoso, seja em idosos ou em jovens, incapacitando ou limitando as atividades normais do paciente envolvido e sabendo que a cartilagem por si só não se regenera. Este trabalho experimental tem o intuito de avaliar o potencial da quitosana como biomaterial e das células-tronco mesenquimais para futuras aplicações na bioengenharia de cartilagem.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Realizar condrogênese de células tronco derivadas de medula óssea de ratos em matriz orgânica 3D a base de quitosana.

Objetivos específicos:

- 1- Obter e estabelecer cultura de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de rato, durante nove semanas analisando as variações morfológicas, bioquímicas e comportamentais.
- 2- Construir matriz 3D à base de quitosana para aplicação em engenharia tecidual e posteriormente sua aplicação em terapias celulares.
- 3- Avaliar o potencial de colonização das matrizes 3D por células tronco derivadas de medula óssea de ratos.
- 4- Avaliar viabilidade e alterações fenotípicas das CTMs nas diferentes condições de cultura durante as 9 semanas de cultura.

METODOLOGIA

3.1 - Animais

Os ratos (*Rattus norvegicus*) foram obtidos no biotério do Departamento de Fisiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais estavam em idades entre 4 e 6 semanas, pertenciam à linhagem isogênica hipertensa (SHR), sexo randomizado. Os procedimentos com esses animais foram realizados de maneira ética, segundo consta nas normas seguidas pelo laboratório de acordo com o comitê de ética da UFMG (CETEA).

3.1.1- Extração de medula óssea

A eutanásia dos animais foi realizado com aplicação de Ketamina 10% (120 a 160 mg/Kg), via intramuscular. Em seguida, os ratos foram lavados em álcool 70% para minimizar possíveis contaminações bacterianas e fúngicas na cultura celular. A cavidade abdominal foi exposta e em seguida, foi feita uma incisão na a região da tíbia e fêmur, medialmente, e as partes moles foram afastadas. Esses ossos foram extraídos e acondicionados em Meio DMEM com PSA. Em capela estéril, cortou-se com tesoura a região metafisária dos fêmures e das tíbias. A medula desses ossos foi retirada através de injeção, sob pressão, de meio de cultura DMEM com 10% de SFB em seringa de 20 mL com agulha de 21 *gauge* (Harrison *et.al.*, 1981).

3.1.2 – Extração do baço

Dos animais descritos acima foram excisados também os baços através de incisão lateral-esquerda próxima ao diafragma. Os baços foram colocados em soluções de meio DMEM com 10% de SFB para conservação e lavagem.

Em capela de fluxo horizontal os baços extraídos foram cortados e macerados. Em seguida essa solução, meio e macerado do órgão, foi filtrada em gaze estéril e centrifugada a 1400 rpm por 10 minutos a 4°C. O precipitado resultante foi ressuspenso em 20 mL de DMEM com antibióticos e antimicótico, contendo 20 µg/mL de LPS e 1% de albumina bovina (SIGMA), para estimular as células mononucleares periféricas do baço a produzirem TGF-β.

As células e o meio foram colocadas em garrafas de cultura T-75 (TPP) em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 1400 rpm. Foi coletado o novo sobredante, neste momento rico em TGF-β e separado em volumes de 10 mL e congelado a -20°C (Park et.al., 2005).

3.2- Preparo do meio DMEM

Para o preparo de 1 L de meio de cultura, foram utilizados 1 frasco de meio DMEM (dulbecco's modified eagles medium - Gibco) em pó, sem bicarbonato de sódio, com glicose (high-glucose), 0,02 M NaHCO₃, 60 mg de gentamicina (Gentamicina Ariston 1,5 mL) e 10 mL de antibiótico-antimicótico 100 X (GIBCO - contendo 25 µg/L de anfotericina B; 10.000 U/mL de penicilina G sódica e 10.000 µg/mL de sulfato de estreptomicina).

Os reagentes acima descritos foram solubilizados em 1L de água deionizada. O pH foi ajustado para 7,4 e a solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm de poro (Millipore) para esterilização, de acordo com instruções do fabricante.

3.2.1 – Meio controle

Após o preparo do meio DMEM, utilizou-se para cada 90 mL de DMEM, 10 mL de Soro Fetal Bovino inativado por alta temperatura, constituindo assim o meio DMEM + 10% de SFB necessário para manutenção das células em cultura antes do processo de diferenciação

3.2.2- Meio condrogênico

O meio condrogênico foi feito baseado no protocolo de Lin, et.al., 2005: foram utilizados 10 mL de solução de sobrenadante rico em TGF-β, 10⁻⁷M de

dexametasona (Sigma), 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma), 6,25 µg/ml de insulina (Biobras), 6,25 µg/ml de transferrina (Sigma), 1mM de piruvato (Sigma), 1,25 µg/ml de BSA (Sigma). Para esterilização, essa solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm (Millipore) e o volume foi completado para 100 mL com DMEM (PSA/G - Gibco) acrescido de 1% de SFB. O meio condrogênico foi estocado em geladeira (Im et.al., 2005).

3.3- Preparação da matriz tridimensional (biomaterial)

3.3.1 - Matriz 3D de quitosana:

Para uma placa de cultura de 24 poços (TPP) foram utilizados 700 mg de quitosana (SIGMA) diluídos sob agitação em 28 mL de ácido acético 1M até que a solução adquiriu uma consistência de gel, em seguida foram adicionados 28 mL de EDAC (SIGMA) -1-etil 3-(3-dimetilaminopropyl) carbodiimide- 1% diluído em água deionizada. A solução ficou sob agitação por mais 5 minutos e então o pH da solução foi ajustado para 7 com NaOH 0,5M. A solução foi distribuída em um volume de 2 mL por poço da placa. Essa placa foi levada ao congelador (-20°C) por 24 horas. No dia seguinte, ela foi transferida para o congelador de temperatura de -80°C por 5 horas e, então, foi liofilizada por 24 horas. O processo de congelamento ocorre em gradiente de temperatura, fato importante para formação de poros na matriz. Cada placa foi embalada de modo hermético e esterilizada a 15 KGY no CDTN/CNEN (Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear/ Centro Nacional de Energia Nuclear) (Lee et.al., 2005).

3.3.2- Matriz 3D de Quitosana e Gelatina:

Para a construção dessa matriz, a adição de gelatina se deu na fase de diluição da quitosana em ácido acético. Então, para cada 700 mg de quitosana, diluídos em 28 mL de ácido acético foram adicionados 700 mg de gelatina (SIGMA). Os passos posteriores foram seguidos de acordo com o que foi descrito acima (item 3.4.1). (Lee et.al., 2005).

3.4- Distribuição das células tronco mesenquimais

Após coletada, a medula óssea foi colocada em tubo Falcon 50mL e acrescentado meio de cultura DMEM até completar o volume de 20 mL. Esse material foi homogeneizado e centrifugado a 1.400 rpm, a 10°C, durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 10 mL de DMEM + 10% de SFB (GIBCO), inativado pelo calor e cultivadas em garrafas T-75 (75 cm²), em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado de 3 em 3 dias, até a confluência das células.

Após 10 a 14 dias as células aderentes adquiriram uma confluência de 80 a 90% e foram liberadas das garrafas de cultivo através da reação enzimática. As células foram expostas a 3 mL de tripsina/EDTA (etilenodiaminotetraacético) a 1% (1 mL de tripsina 0,25% / EDTA 0,06% GIBCO), diluída em 9 mL de PBS – Tampão salina) por 10 minutos em estufa de CO₂. A ação da enzima foi inativada com 7 mL de DMEM + 10% de SFB.

Essa suspensão de células foi, então, coletada e transferida para um tubo de 50 mL (Falcon) e centrifugada por 10 minutos a 1400 rpm. O sobrenadante, foi

descartado e as células ressuspendidas em apenas 2 mL de DMEM (PSA/G) + 10% de SFB (Soro Fetal Bovino – Sigma). A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer. Foram recolhidos 2 μ L das células ressuspendidas e acrescentados 98 μ L de reagente de Tuerck (Vertec), foram distribuídos 10 μ L dessa solução em cada parte da câmara de Neubauer e realizada contagem. Então, foi feita a média dos valores obtidos. Para saber o número de células, utilizou-se a fórmula:

$$N = (\text{média do n}^\circ \text{ de células} / 4) \times 50 \times 10^4$$

Sendo N o número de células por mL; 50 o denominador da diluição das células com reagente de Tuerck. Foram distribuídos 1×10^5 células por poço de cada placa de cultura (Valerio et.al., 2004).

3.5- Desenho experimental em placa de 24 poços

Tipos de cultura

3.5.1 – Cultura de CTMs em monocamada.

3.5.2 – Cultura de CTMs em matriz 3D de quitosana.

3.5.3 – Cultura de CTMs em matriz 3D de quitosana e gelatina .

Tempo de cultivo:

(A) 0 semana – período relativo a 24 horas após a distribuição das células nos poços das placas de cultura em meio controle.

(B) 1 semana – período relativo da cultura em meio condrogênico.

(C) 3 semanas – período relativo da cultura em meio condrogênico.

(D) 9 semanas – período relativo da cultura em meio condrogênico.

Foram utilizadas então um total de 24 placas de cultura, uma vez que cada tipo de cultura combinou uma a uma com cada tempo de cultivo.

3.6– Análises das culturas de CTMs

3.6.1 - Ensaio metabolização de MTT

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é um método colorimétrico quantitativo e qualitativo que mensura a viabilidade, a proliferação e o estado de ativação celular. As células viáveis convertem o dimetiltiazol (MTT) em cristais de formazan (insolúveis em água), através de enzimas presentes nas mitocôndrias. Portanto a quantidade de formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983).

Para realizar esse ensaio foi retirado o meio de três poços de cada placa de cultura e lavados com PBS 0,15M por uma vez. Em seguida, foram adicionados 210 μ L de meio DMEM (PSA/G) e posteriormente mais 170 μ L de MTT (5mg/ml) por poço. Cada placa foi incubada por 2 horas em estufa 5% de CO₂ e 37°C e solubilizada com 210 μ L da solução de HCl-10% SDS por 24 horas. O controle (branco) foi feito com 210 μ L do meio de cultura e acrescentou-se 170 μ L de solução estoque de MTT e 210 μ L de SDS 23% dimetilformamida 50%. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro a 595 nm (Amaral et.al., 2002).

3.6.2 - Ensaio da atividade de fosfatase alcalina

A produção da fosfatase alcalina (FA) pelas células pode ser medida através do ensaio BCIP-NBT (5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate - nitroblue tetrazolium) (GIBCO). BCIP-NBT é usado como substrato para a enzima fosfatase alcalina. A FA cliva o grupo fosfato do BCIP produzindo uma coloração azulada e um próton, que por sua vez reduz o NBT. A redução do NBT produz um precipitado insolúvel de cor púrpura.

Para essa análise, retirou-se o meio de três poços da placa de cultura. Em seguida, foram adicionados 200µl de solução de BCIP/NBT (GIBCO) – descrita no item 3.6.2.1. A reação ocorreu por 2 horas em estufa 5% de CO₂ e 37°C e foi solubilizada com 210 µL da solução de HCl-10% SDS por 24 horas. O controle (branco) foi feito com 300 µL de meio de cultura acrescido de 100 µL de solução NBT-BCIP-tampão fosfato. A reação foi lida no espectrofotômetro a 595 nm, de acordo com instruções do fabricante.

3.6.2.1– Preparo da solução de BCIP/NBT – Tampão fosfato

Primeiramente foi preparado o tampão fosfato. Pesou-se 0,242 g Tris, 0,584 g NaCl e 0,1 g MgCl₂-6H₂O, que foram dissolvidos em 80 mL de água Milli-Q. O pH foi ajustado para 9,5 e o volume foi completado para 100 mL. Para o preparo da

solução NBT-BCIP-Tampão fosfato, foram homogeneizados 1 mL de tampão fosfato, 4,4 μ L de NBT e 3,3 μ L de BCIP, conforme instruções do fabricante.

3.6.3 Ensaio de produção de colágeno

A produção do colágeno foi verificada através de marcação com SIRCOL Collagen Assay (Biocolor) (Valerio, et al., 2004). O corante (Sirius Red), presente no Kit, é aniônico, com grupos de cadeias laterais de ácido sulfônico, que reagem com grupos de cadeias laterais dos aminoácidos presentes no colágeno. Esse corante tem a propriedade de se ligar seletivamente à seqüência terminal do colágeno de mamíferos, composta por tripeptídeos [Gli-X-Y]. Esse ensaio não diferencia os tipos de colágeno entre si. A reação de solubilização do marcador foi lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm.

Para essa análise, retirou-se o meio de três poços da placa de cultura. As células foram fixadas com 1 mL de Bouin por 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram lavados com bastante água e depois deixados para secar naturalmente.

Foram diluídos para cada poço 0,6 mg de Sircol Red em 1 mL de ácido pícrico. A reação foi incubada sob agitação por 30 minutos, a 37°C. Retirou-se o sobrenadante com pipeta, e o excesso de corante foi retirado com HCl 0,01N. Para leitura o corante foi solubilizado com 300 μ L de NaOH e a solução resultante foi lida no espectrofotômetro.

Foi feita uma curva de concentração de colágeno de acordo com especificações do fabricante. A absorbância das amostras foi comparada à absorbância dos padrões 12,5; 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$, determinando-se, dessa forma, a quantidade de colágeno presente nas amostras (Tullberg et.al., 1999).

3.7- Ensaio de verificação da colonização da matriz 3D

Com a finalidade de analisar a colonização da matriz 3D pelas células tronco foram feitos ensaios de incorporação de substâncias corantes na fase inicial de cultivo celular. Foi utilizada uma solução de $1\mu\text{M}$ de DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) em PBS 0,15M. Foram adicionados $500\mu\text{L}$ por poço. O DAPI marca o núcleo das células, permitindo a sua visualização. Incubou-se a placa em estufa 37°C , 5% de CO_2 por 2 horas. Após esse período os poços foram fotografados utilizando luz fluorescente num comprimento de onda de excitação de 500 nm. As fotografias foram tiradas de um mesmo campo, com fluorescência, utilizando somente luz U.V. e com sobreposição de luz visível e luz U.V. em microscópio invertido com filtro de fluorescência (Olympus), de acordo com instruções do fabricante.

3.8 - Análises estatísticas

Todos os dados quantitativos apresentados foram expressos pela média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o programa PRISM statistical

software (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando os testes estatísticos one-way ANOVA, utilizando Bonferroni, como post-t

RESULTADOS

4.1 – Obtenção e cultura de células tronco mesenquimais

Após os procedimentos descritos na metodologia, foram obtidas as culturas de Células Tronco Mesenquimais (CTM) utilizando meio controle (DMEM+10% de SFB) em garrafas de cultura 75 mm³.

A observação dessas células ao microscópio ótico (M.O.) revelou uma população de células com morfologia fusiforme semelhante a fibroblasto (Fig. 7A) e com tendência a formar colônias (Fig. 7B).

Ainda pela observação diária das culturas ao M.O. foi possível verificar uma população celular com características morfológicas e comportamentais diferentes das células tronco mesenquimais, tais como não aderência à superfície da placa de cultura e com formato arredondado (Fig. 7C). A partir da quarta renovação de meio de cultura não foi observada a presença de células não aderentes, restando apenas as células com aderência seletiva e potencial de auto-renovação, estabelecendo-se assim uma cultura homogênea de CTMs.

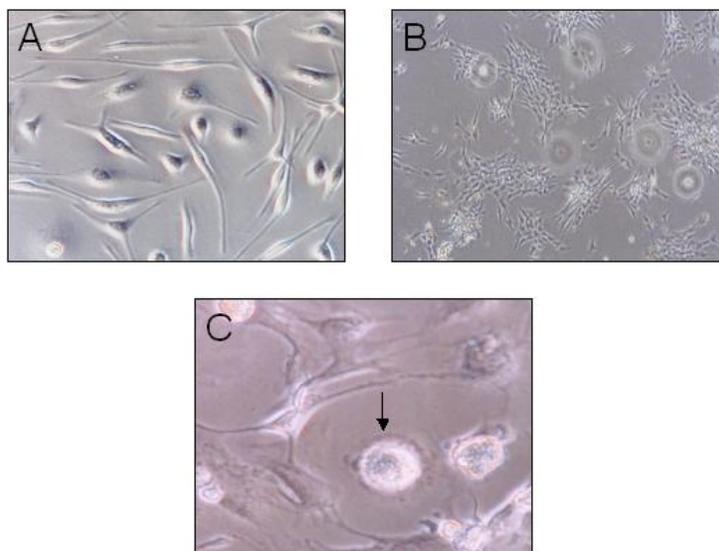


FIGURA 7 – Aspectos morfológicos de CTMs em cultura com meio controle.

(A) População de células aderentes com morfologia fusiforme. Aumento 100 X.

(B) Colônias de células aderentes e fusiformes. Aumento 60 X

(C) Células não aderentes (seta). Aumento 300X.

4.2 – Expansão e semeadura de CTMs em cultura

Uma vez estabelecida a cultura, estas eram monitoradas através de observações do aspecto das células ao M.O. e da coloração do meio de cultura. Essas células apresentaram uma alta capacidade de replicação, atingindo a confluência após 13 dias de cultura, quando eram tratadas com tripsina sendo redistribuídas em novas garrafas de 75 mm³. Este processo foi repetido por quatro confluências consecutivas, sendo importante ressaltar que as células mantiveram seu fenótipo estável.

Ao atingirem a quinta confluência, as culturas foram novamente submetidas a ação da tripsina e semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 1×10^5 células por poço. Após 24 horas de distribuição, as células foram observadas apresentando-se fenotipicamente estáveis, uma vez que se encontravam aderidas à superfície dos poços da placa de cultura e com morfologia semelhante a fibroblasto (dados não apresentados).

4.3- Indução da diferenciação das CTMs em condroblastos

As culturas foram acompanhadas através de M.O. durante 9 semanas, sendo o tempo relativo a 24 horas após a semeadura das células em placas de cultura de 24 poços e cultivadas com meio controle, denominado semana 0 (Figura 8A). A partir da semana 0 foi adicionado meio de indução da condrogênese, e denominou-se como 1, 3 e 9 semanas, os respectivos períodos de cultivo com meio indutor.

Durante o acompanhamento das culturas (0, 1, 3 e 9 semanas) foi analisado o perfil morfológico, comportamental, viabilidade, proliferação, análise da atividade da fosfatase alcalina e produção de colágeno total por essas células.

Após 1 semana da adição do meio de indução não foram observadas alterações significativas na morfologia e no comportamento celular, uma vez que ainda apresentavam-se aderidas às superfícies plásticas e com morfologia fusiforme (Fig. 8B).

Na 3^a semana de cultivo de CTMs em monocamada com meio condrogênico, pôde-se observar alterações tanto morfológicas quanto

comportamentais. As CTM tiveram seus prolongamentos retraídos, sendo que sua forma inicial fusiforme deu lugar ao formato arredondado. Nesse período, as células começaram a apresentar perda de aderência às superfícies das placas de cultura, além da tendência de formar agregados celulares (Fig. 8C).

As células foram gradativamente alterando seu perfil fenotípico atingindo o ponto elevado de diferenciação na 9ª semana de cultivo com meio indutor. Neste período as células adquiriram uma morfologia completamente diferente da inicial, apresentando-se totalmente arredondadas. Essas células encontravam-se agrupadas no sobrenadante da cultura, mostrando a perda total da capacidade de aderência à superfície da placa de cultura (Figura 8 D).

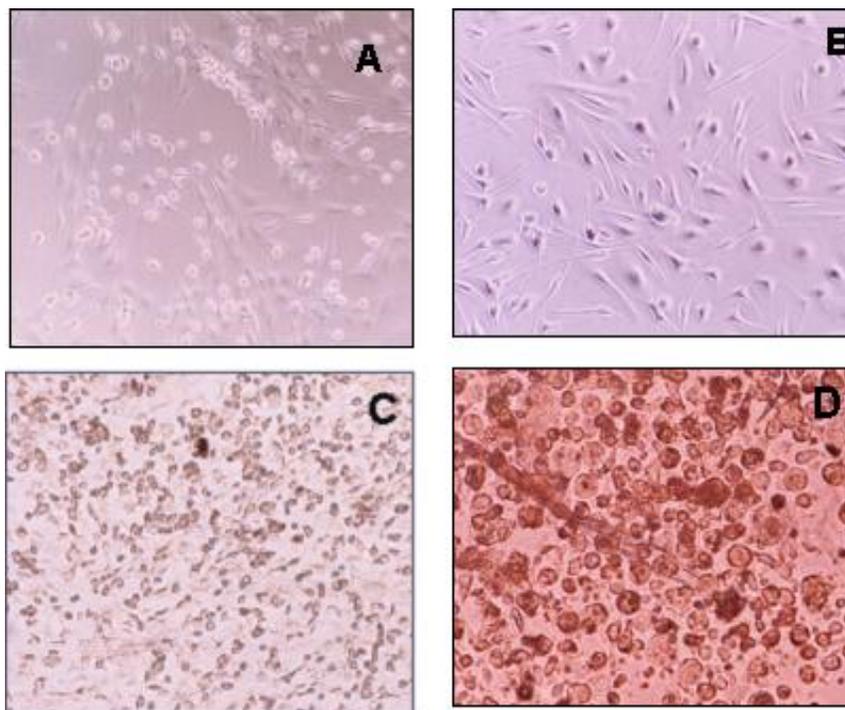


FIGURA 8 – Aspectos fenotípicos das CTMs em cultura de monocamada e meio condrogênico.

- (A) Aspecto fenotípico das células na semana 0 de cultura em meio controle. Observaram-se células fusiformes e aderidas. Aumento – 60 X
- (B) Aspecto fenotípico das células na 1^a semana de cultivo em meio condrogênico. Observaram-se células aderidas e fusiformes. Aumento – 60 X
- (C) Aspecto fenotípico das células na 3^a semana de cultivo em meio condrogênico. Observaram-se células não aderidas à superfície da placa de cultura e com morfologia arredondada. Aumento –40 X
- (D) Aspecto fenotípico das células na 9^a semana de cultivo em meio condrogênico. Observaram-se células, estas não aderidas à superfície da placa de cultura e com morfologia arredondada. Aumento – 100X

4.4- Colonização das matrizes 3D pelas CTM

Com o intuito de avaliar a colonização das matrizes 3D a base de quitosana foi usado o corante de DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindole). Este corante apresenta a propriedade de interagir com a cromatina nuclear. Os núcleos marcados são visualizados por uma fluorescência azul em microscópio com emissão de luz U.V. Esse artifício nos permite visualizar a colonização do biomaterial de estrutura 3D pelas CTMs em diversos planos (Fig. 9 A).

Na figura 9 B está representado tanto as células coradas em azul e o biomaterial não fluorescente após a associação de incidência de luz U.V. e com sobreposição de luz visível.

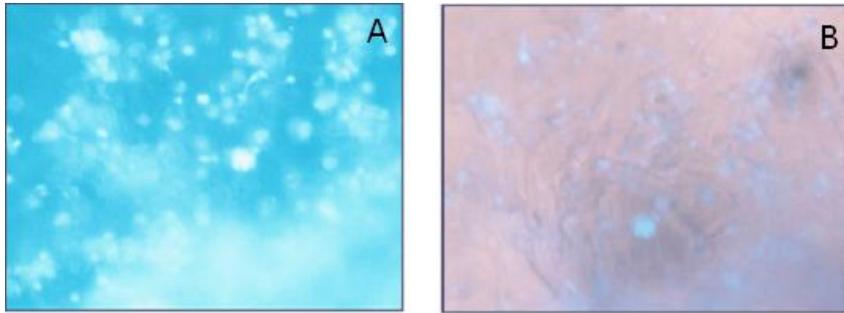


FIGURA 9 – Colonização da matriz 3D por CTMs.

- (A) Núcleos fluorescentes marcados com DAPI em diferentes planos da matriz 3D. (Luz U.V). Aumento 100 X.
- (B) Núcleos fluorescentes marcados com DAPI por entre as fibras da matriz 3D em diferentes planos (Luz U.V com sobreposição de luz visível). Aumento 100 X.

4.5- Análises das culturas de CTMs em monocamada e em matriz 3D

4.5.1- Metabolização do MTT

As culturas foram testadas quanto a viabilidade e proliferação celular através da reação de metabolização do MTT nas semanas 0, 1, 3 e 9. Os resultados de metabolização de MTT foram expressos em porcentagens, considerando 100% da atividade metabólica o valor da densidade ótica (D.O.) obtida no tempo 0 semana lidos no comprimento de onda de 595 nm.

4.5.1.1 – Cultura de CTMs em monocamada na presença de meio condrogênico (Gráfico 1)

Nas culturas de CTMs a taxa de formação de cristais de formazan manteve-se constante segundo análise estatística nas semanas 0 e 1 após adição de meio condrogênico.

Porém, ocorreu uma redução significativa da produção destes cristais na 3^a e 9^a semanas de cultivo em meio condrogênico, em relação à 0 e 1 semana de cultivo ($p < 0,05$). Entretanto, comparando-se as 3^a e 9^a semanas não foi verificado uma diferença estatisticamente significativa.

Estes resultados apresentados no gráfico 1 foram confirmados através da representação fotográfica da cultura, sendo as figuras 10 A, 10 B, 10 C e 10 D correspondentes às semanas 0, 1, 3 e 9, respectivamente.

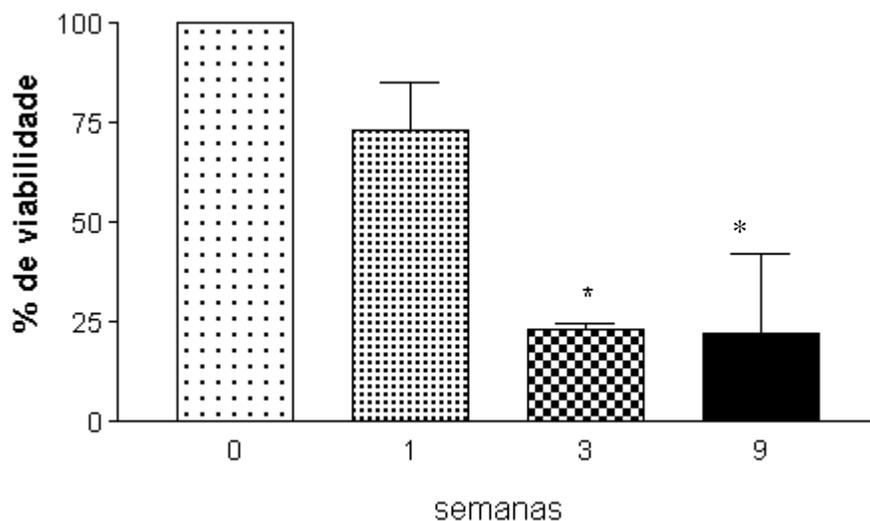


GRÁFICO 1- Metabolização do MTT durante o cultivo em monocamada de CTMs na presença de meio condrogênico. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão da porcentagem (%) de metabolização de MTT em triplicata.

(* apresenta a diferença significativa em relação às semanas 0 e 1; valor de $p < 0,05$).

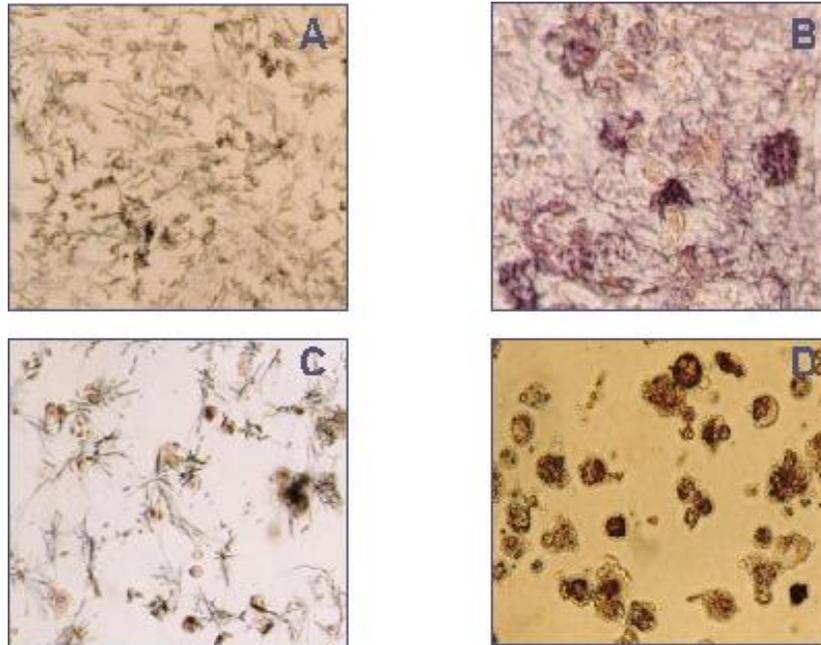


Figura 10 – Aspectos morfológicos das culturas de CTMs em monocamada e meio condrogênico relativos à metabolização do MTT.

- (A) Visualização dos cristais de formazan na semana 0 de cultivo. Aumento – 60 X.
- (B) Visualização dos cristais de formazan na 1^a semana de cultivo. Aumento – 100 X.
- (C) Visualização dos cristais de formazan na 3^a semana de cultivo. Aumento – 60 X.
- (D) Visualização dos cristais de formazan na 9^a semana de cultivo. Aumento – 100 X.

4.5.1.2 – Cultura de CTMs em matriz 3D de quitosana em meio condrogênico (Gráfico 2)

Quando cultivadas em matriz 3D de quitosana em meio condrogênico, as células não apresentaram diferença significativa na produção de cristais de formazan, durante todo período de cultura.

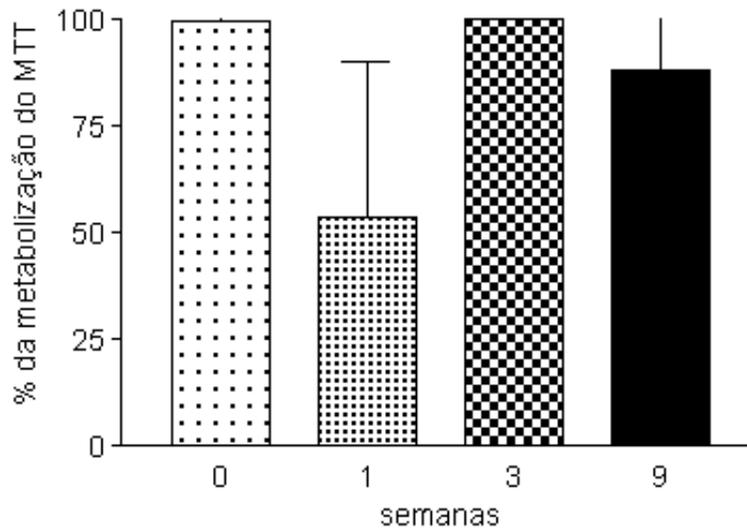


GRÁFICO 2- Metabolização do MTT durante o cultivo de CTMs na presença de matriz 3D de quitosana e meio condrogênico. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão da porcentagem (%) de metabolização de MTT em triplicata.

4.5.1.3 – Cultura de CTMs em matriz 3D de quitosana e gelatina e em meio condrogênico (Gráfico 3)

A porcentagem da metabolização do MTT pelas CTMs em matriz 3D de quitosana e gelatina durante 0, 1 e 3 semanas não apresentou diferença significativa. Entretanto, na 9^a semana de cultivo ocorreu uma queda significativa do metabolismo celular verificado pela redução da atividade mitocondrial, ou seja, diminuição da metabolização do MTT ($p < 0,05$).

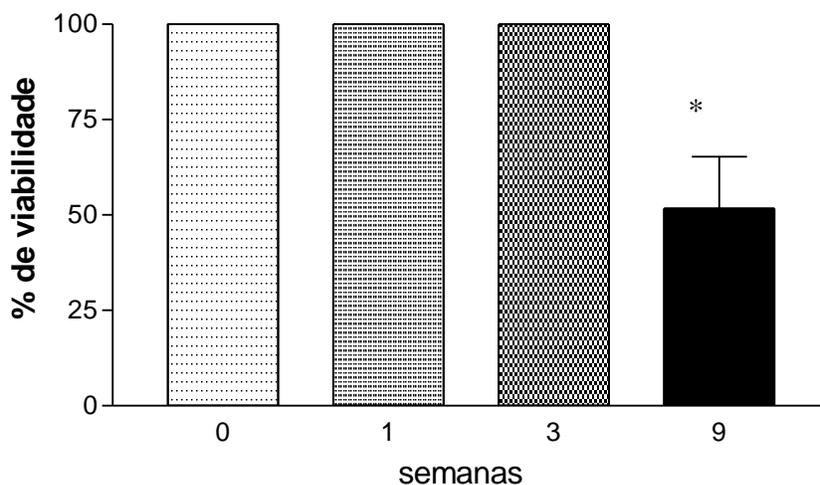


GRÁFICO 3- Metabolização do MTT durante o cultivo de CTMs na presença de matriz 3D de quitosana e gelatina e meio condrogênico. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão da porcentagem (%) de metabolização de MTT em triplicata. (* apresenta a diferença significativa quando $p < 0,05$ em relação às semanas 0, 1 e 3).

4.5.2 – Avaliação da atividade da FA na diferenciação das CTM em condroblastos

Através da atividade da FA, é possível avaliar o nível de diferenciação das células, visto que esta é um marcador celular precoce de células tronco, não ocorrendo em condroblastos. Os resultados da análise da atividade da FA pelas CTMs em cultura com meio condrogênico foram expressos em porcentagem de atividade enzimática considerando 100% de atividade a leitura da D.O. no comprimento de onda de 595 nm da semana 0 de cultivo.

4.5.2.1 – Cultura de CTMs em monocamada com meio condrogênico (Gráfico 4)

Durante as semanas 0 e 1 a atividade da FA manteve-se constante, diminuindo significativamente nas semanas 3 e 9 em relação ao resultado referente à semana 0 ($p < 0,05$).

Quando analisados as 3^a e 9^a semanas notou-se uma diferença significativa entre elas, sendo que na 9^a semana essa atividade apresentou-se em níveis mais baixos que na 3^a semana.

Estes resultados apresentados no gráfico 4 são confirmados através da representação fotográfica da cultura, sendo as figuras 11 A, 11 B, 11 C e 11 D correspondentes às semanas 0, 1, 3 e 9, respectivamente.

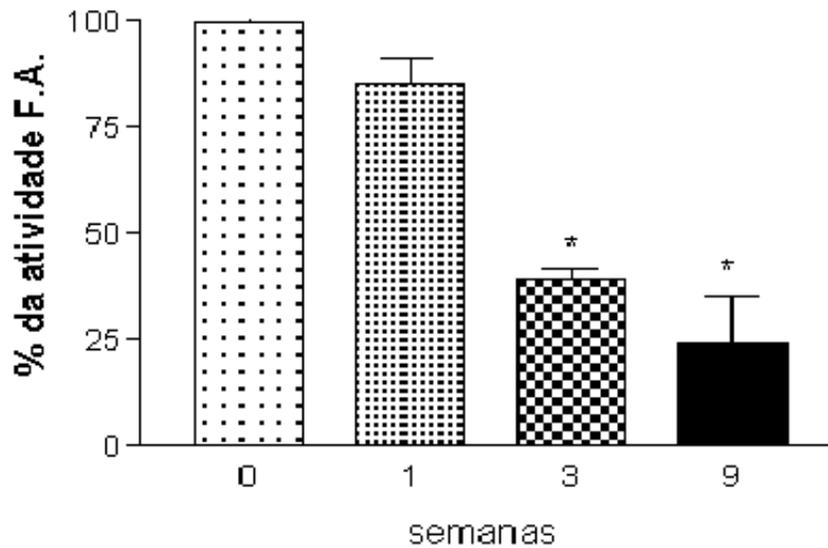


GRÁFICO 4 – Porcentagem da atividade da FA em CTMs cultivadas em monocamada na presença de meio condrogênico. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da porcentagem (%) da atividade da FA em triplicata. (* apresenta diferença significativa das 3^a e 9^a semanas em relação à semana 0 e 1; valor de $p < 0,05$).

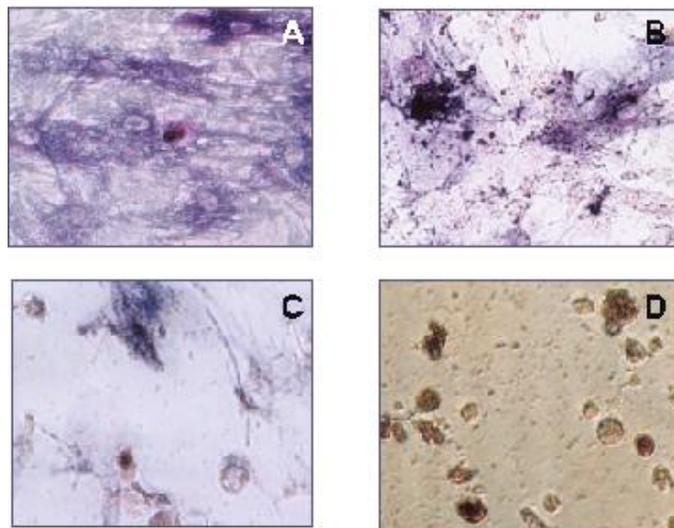


FIGURA 11 - Aspectos morfológicos das culturas de CTMs em monocamada com meio condrogênico relativos à atividade da fosfatase alcalina.

- (A) Visualização da marcação das células em que há atividade da FA em 0 semana de cultivo. Aumento – 150X.
- (B) Visualização da marcação das células em que há atividade da FA na 1^a semana de cultivo. Aumento – 60X.
- (C) Visualização da marcação das células em que há atividade da FA na 3^a semana de cultivo. Aumento – 200X.
- (D) Visualização da marcação das células em que há atividade da FA na 9^a semana de cultivo. Aumento – 200X.

4.5.2.2 – Cultura de CTMs em matriz 3D de quitosana com meio condrogênico (Gráfico 5)

Nos períodos referentes às 1^a e 3^a semanas de cultivo (Gráfico 5) observou-se uma redução significativa da atividade da FA em relação à semana 0. Porém, comparando-as entre si não foi apresentada uma alteração significativa da porcentagem relativa a atividade enzimática.

Já em relação à 9^a semana de cultivo a redução da atividade de FA foi mais acentuada quando comparada às demais semanas. É importante demonstrar que a diferença estatística da 9^a semana em relação às 1^a e 3^a semanas apresenta-se em menor nível, quando comparada com a semana 0.

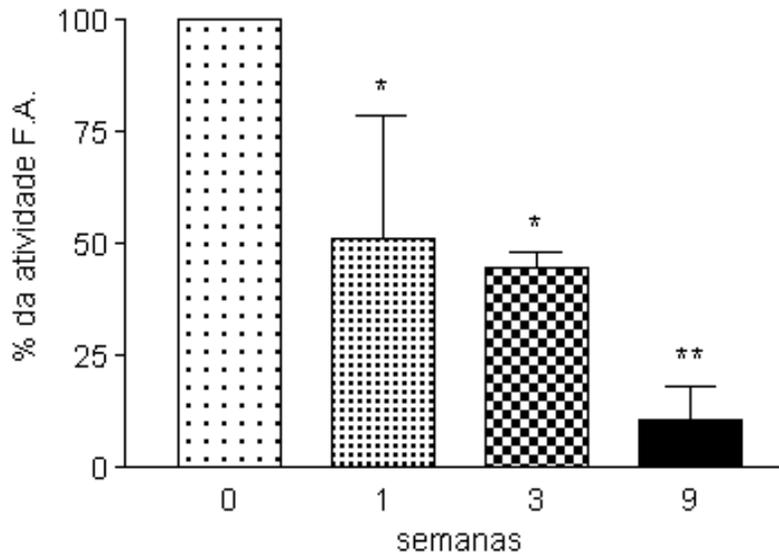


GRÁFICO 5- Porcentagem da atividade da FA em CTMs cultivadas na presença de matriz 3D de quitosana em meio condrogênico. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da porcentagem (%) da atividade da FA em triplicata. (* apresenta diferença significativa das 1^a e 3^a semanas em relação à semana 0 ** apresenta diferença significativa da 9^a semana em relação às demais semanas, valor de $p < 0,0017$).

4.5.2.3 – Cultura de CTMs em matriz 3D de quitosana e gelatina com meio condrogênico (Gráfico 6)

No resultado representado pelo gráfico 6, quando se compara a 1^a semana de cultivo com a semana 0 não se observa variação significativa da porcentagem de atividade da FA.

Entretanto, quando se comparou a porcentagem da atividade enzimática na 3^a semana de cultivo com o tempo 0 semana neste mesmo gráfico, foi apresentada uma redução significativa da mesma.

Já em relação à 9^a semana de cultivo (Gráfico 6), a atividade da FA em relação aos tempos de 0 e 1 semana revelou-se bem mais reduzida que quando comparada com o tempo de 3 semanas de cultivo.

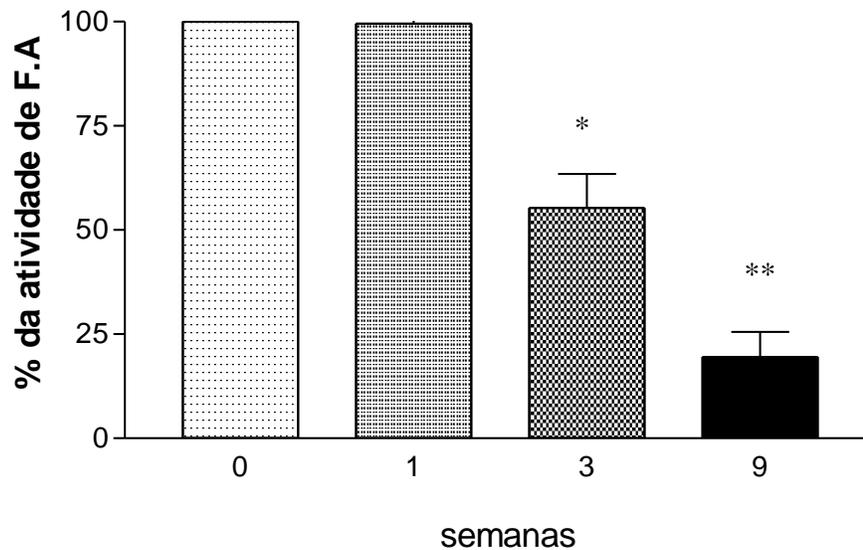


GRÁFICO 6- Porcentagem da atividade da FA em CTMs cultivadas na presença de matriz 3D de quitosana e gelatina em meio condrogênico. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da porcentagem (%) da atividade da FA em triplicata. (* apresenta diferença significativa da 3^a semana em relação às semanas 0, 1 e 9. ** apresenta diferença significativa da 9^a semana em relação às demais semanas. O valor de $p < 0,0463$).

4.5.3 – Avaliação da produção de colágeno no processo de diferenciação de CTMs a condroblastos.

O teste de colágeno foi realizado com intuito de avaliar o processo de diferenciação celular, uma vez que células de linhagem condrogênica são sabidamente produtoras de colágeno.

Para análise da produção de colágeno utilizou-se como referência a curva padrão expressa no gráfico 7. O eixo das abscissas representa os valores referentes à leitura da média da absorbância \pm desvio padrão, relativa às soluções de diluição de colágeno. No eixo da coordenada estão expressos os valores da concentração desta solução.

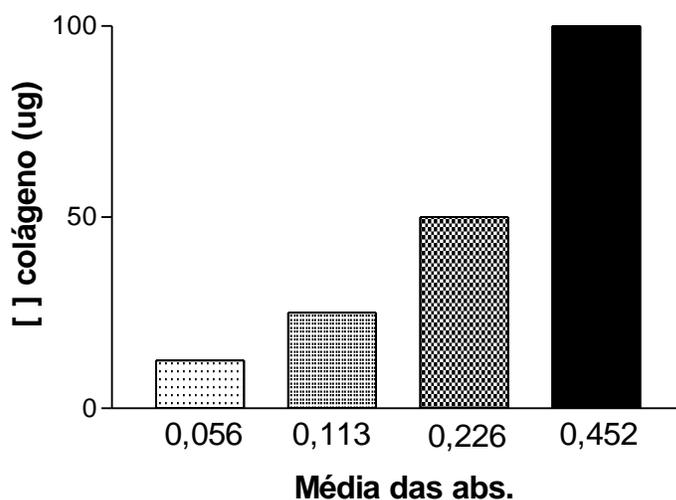


GRÁFICO 7- Curva padrão de concentração de colágeno. Os resultados apresentados no eixo de X são expressos como a média \pm desvio padrão da leitura da absorbância das soluções de diluições padronizadas de colágeno em duplicata. No eixo Y estão expressos os valores referentes à concentração de colágeno.

4.4.3.1- Culturas de CTMs em monocamada e em meio condrogênico (Gráfico 8).

Os resultados obtidos mostraram que os níveis de colágeno detectados na semana 0 e 1 de cultivo mantiveram-se baixos e constantes, apresentando um mesmo nível entre si podendo também ser visualizado pelas Figuras 12 A e B.

Comparando o resultado expresso no gráfico 8 e analisando a figura 12C referente à 3^a semana de cultivo com os valores representados pelas semanas 0 e 1 de cultivo, foi observado um aumento significativo dos níveis de colágeno produzido pelas CTM em diferenciação ($p < 0,05$).

Já em relação à 9^a semana de cultivo tanto no gráfico 8 como na figura 12D a produção de colágeno se apresentou em um maior nível, tanto em relação à 0 e 1 semana quanto à 3^a semana de cultivo.

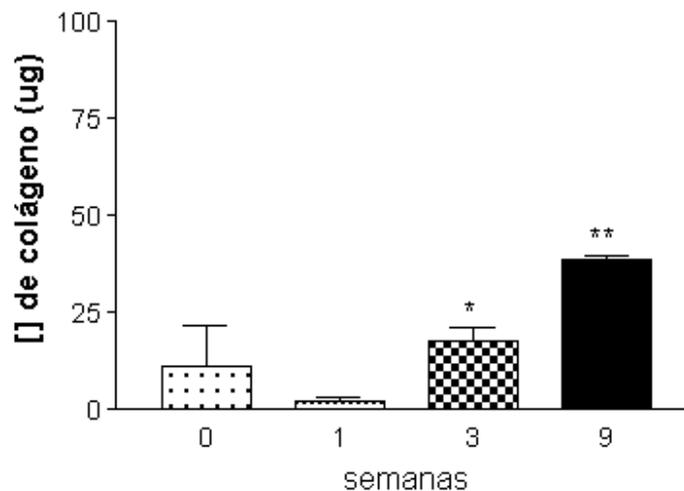


GRÁFICO 8 – Concentração da produção de colágeno pelas CTMs cultivadas em monocamada e na presença de meio condrogênico. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da concentração da produção de colágeno em

triplicata. (* apresenta a diferença significativa da 3^a semana em relação às semanas 0 e 1, ** apresenta a diferença significativa da 9^a semana em relação às demais, valor de $p < 0,0001$).

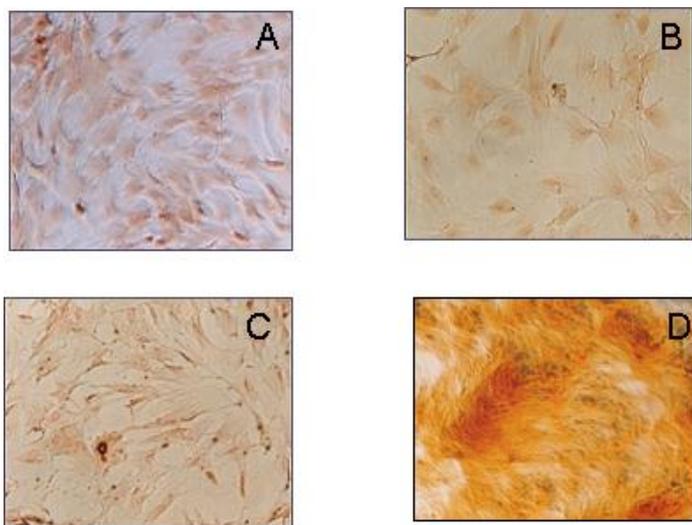


FIGURA 12 – Aspectos morfológicos das culturas de CTMs em monocamada e meio condrogênico relativos à produção de colágeno.

- (A) Visualização da marcação da presença de colágeno produzido pelas CTMS em 0 semana de cultivo. Aumento – 100 X.
- (B) Visualização da marcação da presença de colágeno produzido pelas CTMS na 1^a semana de cultivo. Aumento – 100 X.
- (C) Visualização da marcação da presença de colágeno produzido pelas CTMS na 3^a semana de cultivo. Aumento – 100 X.
- (D) Visualização da marcação da presença de colágeno produzido pelas CTMS na 9^a semana de cultivo. Aumento – 100 X.

4.5.3.2- Cultivo de CTMs em matriz 3D de quitosana e em meio condrogênico (Gráfico 9)

Na semana 0 e 1 do cultivo de CTMs em matriz 3D de quitosana foram representados no gráfico 9, níveis constante de produção de colágeno por essas células, não apresentando diferenças significativas entre si.

Na 3^a semana de cultivo a produção de colágeno atingiu um maior valor de concentração quando comparada à semana 0 e 1. Porém este valor se apresentou menor quando comparado com a 9^a semana de cultivo, sendo esta última expressa em maiores índices de produção durante o processo de diferenciação das CTMs em condroblastos.

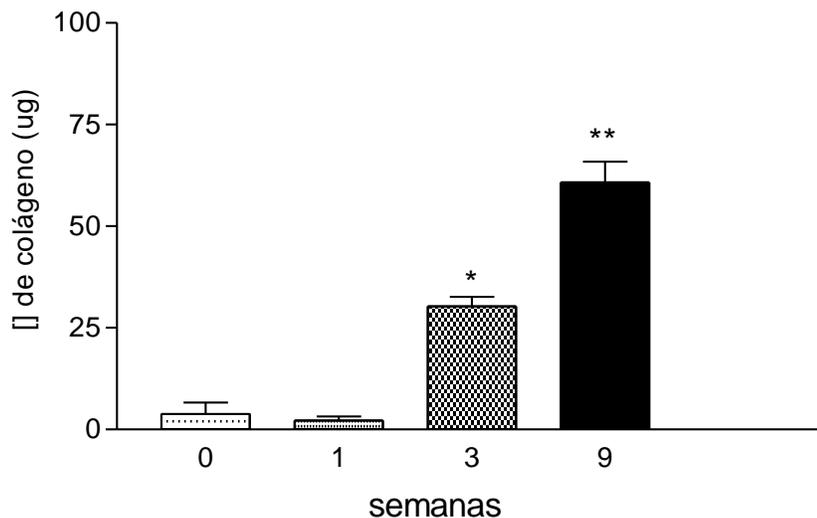


GRÁFICO 9 – Concentração da produção de colágeno pelas CTMs cultivadas na presença de matriz 3D de quitosana e meio condrogênico. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da concentração da produção de colágeno em triplicata. (* apresenta a diferença significativa da 3^a semana em relação às semanas 0 e 1, ** apresenta a diferença significativa da 9^a semana em relação às demais, valor de $p < 0,001$).

4.4.3.3 – Cultura de CTMs em matriz 3D de quitosana e gelatina e meio condrogênico (Gráfico 10)

A produção de colágeno foi detectada desde a semana 0 de cultura, apresentando níveis semelhantes com a 1^a semana de cultivo. Porém, esses valores de concentração de colágeno apresentam em maiores níveis quando se compara com os estágios mais avançados de diferenciação.

Assim sendo, em relação à 3^a semana de cultivo os níveis de produção de colágeno apresentaram uma redução significativa quando comparados com a semana 0 e 1 de cultivo.

Já em relação à 9^a semana, os níveis de produção de colágeno comparados com 0 e 1 semana também apresentou uma redução significativa. Porém, quando foram comparados os níveis de colágeno produzido pelas CTMs em processo de diferenciação, ou seja, na 3^a e 9^a semana não foram observadas diferenças significativas de produção de colágeno entre os dois períodos.

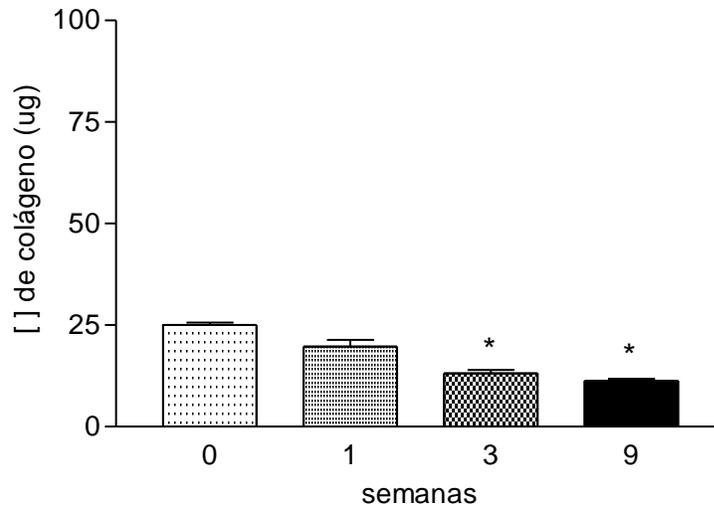


GRÁFICO 10 - Concentração da produção de colágeno pelas CTMs cultivadas na presença de matriz 3D de quitosana e gelatina e meio condrogênico. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da concentração da produção de colágeno em triplicata. (* apresenta a diferença significativa das 3^a e 9^a semanas em relação às demais, valor de $p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

O tecido cartilaginoso tem uma limitação na capacidade de auto-reparo, devido à distribuição esparsa e altamente diferenciada dos condrócitos e características como: a não ocorrência de divisão celular, baixa reposição de matriz, baixa quantidade de células progenitoras e ausência de suplemento vascular (Wang, et.al., 2005).

Assim, a lesão do tecido cartilaginoso não é bem reparada até mesmo quando células, como condrócitos autólogos são transplantadas no local. Isso ocorre devido à falta de retenção das células e da fraca incorporação destas com as extremidades da lesão (Glowacki, et.al., 2005). Dessa forma, várias pesquisas são conduzidas para propor modelos adequados que sejam eficientes para o reparo de cartilagem lesionadas. Uma das propostas é a utilização da engenharia de tecido, visando construir um arcabouço ou matriz que funcione como suporte para colonização e diferenciação de células-tronco e posterior formação de tecidos. Esse modelo pode ser aplicado na recuperação de tecidos danificados.

Neste trabalho foi avaliado o cultivo de CTM em matrizes orgânicas 3D à base de quitosana e a sua diferenciação em condroblastos, visando sua utilização na engenharia de tecidos e posterior aplicação na regeneração da cartilagem lesada.

Estudos anteriores mostraram que as CTM podem ser obtidas de várias fontes, sendo as mais estudadas, as CTM derivadas de medula óssea (Gregory, et.al., 2005).

A cultura celular de CTM já está bem estabelecida e o conhecimento da fisiologia destas no que tange a cinética de proliferação e diferenciação são bem estáveis. Por essas vantagens, o uso de CTM derivadas de medula óssea se torna interessante no tratamento de várias doenças degenerativas relacionadas à cartilagem e também na recuperação de tecidos lesados como tecido ósseo, na tentativa de restabelecer as funções do paciente. (Ferrari, et.al., 1998; Caplan, 1991; Solursch, et.al., 1991; Nakahara, et.al., 1990; Williams, et.al., 1999).

Neste trabalho, as células obtidas da medula óssea de ratos foram cultivadas com o objetivo de gerar culturas de CTM homogêneas (Figura 7A) como descrito por Pountos, et.al., 2005, uma vez que as CTM são seletivamente aderentes à superfícies plásticas e as células não aderentes (Figura 7C) foram retiradas da cultura com as trocas de meio sequenciais.

As células aderentes apresentaram morfologia semelhante a fibroblasto como descrito por vários autores, tais com Keilhoff, et.al., 2006, Phinney, et.al.,1999, Tropel, et.al.,2004, Kassem et.al., 2004 e Johnstone et.al., 1998 e com o decorrer da cultura, apresentaram formações de colônias, denominadas unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (Cfu-F), como descrito por Bianco, et.al., 2001 e representado pela figura 7B. Com os resultados relativos a Figura 7, sugere-se um início do processo de diferenciação, uma vez que a adição de meio de diferenciação promoveu alterações na sua morfologia e aumento da secreção de colágeno, concordando com Vacanti, et.al., 2005.

CTM cultivadas em monocamada na presença de meio condrogênico, foram caracterizadas morfológica e bioquimicamente, a fim de confirmar a indução de diferenciação em condroblastos. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas através do ensaio de metabolização do MTT, como apresentado por Berridge, et.al., 1993 e Fotakis, et.al., 2005 e descrito por Mosmann, 1983. Foram observados, neste ensaio, uma produção maciça de cristais de formazan e um declínio dessa mesma produção nos estágios mais avançados de diferenciação (Figura 10 e Gráfico 1).

Essa redução da metabolização do MTT pode ser justificada pela diminuição do potencial de proliferação. Segundo Ochi, et.al., 2006, células em estágios mais avançados de diferenciação apresentam uma diminuição do potencial de proliferação. Estas células, quando em contato com o meio condrogênico retém inicialmente seu potencial de proliferação (Figuras 8A e 8B), entretanto num estágio mais avançado de diferenciação esse potencial reduz-se (Figuras 8C e 8D). Os resultados supracitados concordam com os do Ochi et al., 2006. Esses pesquisadores demonstraram que o processo de condrogênese apresenta uma diminuição da proliferação e é diretamente proporcional à maturação celular.

Alterações fenotípicas e diferenciação celular foram avaliadas também pela produção de FA. Sabe-se que a natureza da fosfatase alcalina é ubíqua. Entretanto, ela está presente como marcador tanto em células germinativas e células-tronco, quanto em osteoblastos, uma vez que se relaciona com o processo metabólico de mineralização óssea e também está presente em processos patológicos. Porém, foi evidenciado que a FA apresenta atividade reduzida no

tecido cartilaginoso (Cox, et.al., 1999; Prasad, et.al., 2005 e Meltzer, et.al., 1997). Como podemos verificar na figura 11 e no gráfico 4, nos estágios avançados de diferenciação a redução da atividade da FA é bastante significativa, ocorrendo na 3^a e 9^a semanas uma diminuição em torno de 60% e 75% da atividade, respectivamente. Esse ensaio corrobora com os resultados encontrados pelos autores supracitados indicando alteração fenotípica das MSCs nessa cultura, sugerindo que essas células estão em processo de diferenciação condrogênica e que o meio foi eficiente para tal propósito.

Porém, uma vez que a atividade da FA diminuiu nas culturas em monocamadas, esse fato pode ter sido causado por dois motivos. O primeiro é que as CTMs estavam se diferenciando e com isso o potencial de proliferação diminuiu, como sugerido acima. O segundo motivo seria a diminuição da viabilidade ou da atividade metabólica das células, uma vez que a metabolização do MTT apresentou-se reduzida na 9^a semana de cultivo das CTM em monocamada e em presença de meio condrogênico (Gráfico 1).

Para solucionar essa dúvida, foi feito o ensaio de análise de produção e dosagem de colágeno. Junqueira e Carneiro, 2000, Lin, et.al., 2005, Glawacki, et.al., 2005 descreveram que a matriz extracelular de tecido cartilaginoso é composta principalmente de colágeno, sendo este produzido pelos condrócitos em tecido maduro ou por condroblastos em tecido jovem.

Segundo os resultados apresentados no gráfico 8, a produção de colágeno aumentou nos períodos de diferenciação mais avançados de cultura. Estes resultados concordaram com os dados apresentados pelos autores acima e podem justificar e comprovar os resultados apresentados neste trabalho de que as

CTM estão em processo condrogênico. Portanto, os resultados aqui apresentados mostram a viabilidade de promover a condrogênese em cultivos de monocamadas, monitoradas através de alterações morfológicas, metabólicas e comportamentais das CTM.

Tendo visto que as CTM foram capazes de se diferenciar em condroblastos e que o tecido cartilaginoso necessita de uma matriz suporte para que as células sejam capazes de se conectar as extremidades da cartilagem lesionada, foram construídos dois tipos de matrizes 3D. Uma delas composta por quitosana e outra constituída de quitosana e gelatina. A semelhança da matriz artificial com a matriz real do tecido depende principalmente da escolha do biomaterial, uma vez que este tem que proporcionar ativação celular, ou seja, apresentar uma bioatividade (Glowacki, et.al., 2005; Kim, et.al., 2003; Xia et.al., 2004; Taravel, et.al., 1995; Tuzlakloglu, et.al., 2004).

Como descrito por Francis Suh, et.al., 2000, Ng, et.al., 2005, Di Martino, et.al., 2005, Donati, et.al., 2004, Midihally, et.al., 1999, a quitosana apresenta ligações lineares de resíduos de D-glucosaminoglicanos ligados β (1 \rightarrow 4) com ligações randômicas de N-acetilglicosaminas. Essa estrutura se assemelha às unidades repetitivas de GAG presentes na matriz extracelular de cartilagem, que além de conferir uma resistência adequada a MEC ainda proporciona adesão célula-matriz. Através dessa adesão célula-matriz, segundo Bagby, et.al., 2004, há transmissão dos sinais de regulação de crescimento, proliferação, diferenciação celular e remodelamento da matriz.

A quitosana tem sido combinada com diferentes materiais na tentativa de melhorar a matriz, permitindo às células uma maior adesão e conseqüentemente, uma maior ativação celular proporcionando diferenciação e produção da matriz extracelular.

Em relação às matrizes 3D, foram feitas avaliações iniciais na tentativa de mostrar a colonização dessas matrizes por CTM. O ensaio consistiu do cultivo inicial das CTM marcadas com DAPI na presença do biomaterial de estrutura 3D (Figura 9). Dessa forma, de acordo com os resultados apresentados neste trabalho, as CTM foram capazes de colonizar as matrizes 3D e de estabelecer uma contato célula–matriz. Esse contato inicial pode promover ativação celular, a qual resulta em adesão e proliferação celular (Huang, et.al., 2005, Donati, et.al., 2004, Di Martino, et.al., 2005, Francis Suh, et.al., 2000). Essa colonização inicial demonstra a eficiência da matriz de quitosana como um biomaterial de escolha na engenharia de tecido.

Como foi constatado que as CTM foram capazes de colonizar as matrizes, foi adicionado meio de diferenciação ao sistema para avaliar o potencial de diferenciação destas células na presença da matriz 3D a base de quitosana. Esses resultados estão de acordo com Malafaya, et.al., 2005 que descreveram a importância da utilização dessa ferramenta na medicina regenerativa de tecidos, aplicável na ortopedia, odontologia, cardiologia entre outras áreas médicas.

Em relação às matrizes constituídas de quitosana e quitosana e gelatina, idealizadas neste trabalho, podemos afirmar que a estrutura tridimensional destas foi adequada para a promoção do cultivo de CTM e sua diferenciação em condroblastos. Uma vez que a arquitetura 3D da quitosana facilita a

intercomunicação entre os poros formados, permitindo a passagem nutriente e a interconectividade entre as células. Como descrito por Arosarena, 2005 e Yamane, et.al., 2005 a geometria formada pela estrutura 3D de quitosana apresenta propriedades mecânicas exigidas pela engenharia de tecido sobretudo o tecido cartilaginoso, como resistência à compressão, flexibilidade e estabilidade funcional.

As culturas celulares nesses dois tipos de matrizes 3D foram avaliadas morfológica e bioquimicamente da mesma forma que as CTM cultivadas em monocamada na presença de meio condrogênico.

O resultado de metabolização de MTT em matriz 3D de quitosana (Gráfico 2) não apresentou alteração significativa durante o período de cultura. Esses resultados foram diferentes daqueles apresentados pelas CTM cultivadas em monocamadas. Esses dados indicam que a matriz de quitosana pode promover uma ativação celular intensa, uma vez que a metabolização do MTT no período de 9 semanas foi constante. Esses resultados estão de acordo com os de Huang, et.al., 2005; Donati, et. al., 2004; Di Martino, et.al., 2005; Francis Suh, et.al., 2000.

Quando comparamos os processos de diferenciação entre cultura de CTM em monocamada e em matriz 3D de quitosana, podemos verificar que na primeira, a atividade de FA reduz significativamente a partir da 3^a semana, enquanto que na segunda essa alteração ocorre a partir da 1^a semana, sugerindo que a diferenciação das CTM em matriz de quitosana ocorre mais rapidamente. Além disso, nota-se que a redução da atividade desta enzima na 9^a semana de cultivo apresenta-se mais acentuada em matriz 3D de quitosana, indicando que o grau de diferenciação das células é maior.

Outro ensaio que corrobora com a hipótese de condrogênese das CTMs em matriz 3D de quitosana foi a avaliação da produção de colágeno total, uma vez que segundo Junqueira e Carneiro, 2000; Lin, et.al., 2005; Glawacki, et.al., 2005 essa proteína se apresenta em abundância na matriz extracelular de cartilagem. Sendo assim, de acordo com os resultados demonstrados neste ensaio (Gráfico 9) houve um aumento significativo da produção de colágeno nos estágios mais avançados de diferenciação, demonstrando mais uma vez que as CTMs em matriz 3D de quitosana estão em processo de diferenciação. Além disso, tanto na cultura de CTMs em monocamada quanto em matriz 3D de quitosana, o aumento da produção de colágeno nos mesmos períodos de diferenciação apresentou-se na mesma proporção.

Outra matriz 3D construída neste trabalho foi à base de quitosana adicionando gelatina na proporção de 1:1 (v/v). Como o intuito da engenharia de tecido é mimetizar o ambiente natural das células, a adição de gelatina (constituída principalmente de colágeno) à matriz de quitosana poderia otimizar o processo de adesão, garantindo de certa forma a ativação celular, o que poderia aumentar a eficiência de proliferação e de diferenciação das CTMs em cultura, segundo Junqueira e Carneiro, 2000; Lin, et.al., 2005; Glawacki, et.al., 2005; Hardingham, et.al., 2002.

O resultado representado pelo ensaio de metabolização do MTT (Gráfico 3) da cultura de CTMs em matriz 3D de quitosana e gelatina apresentou uma queda significativa na 9^a semana de cultura. Quando relacionamos este resultado com o obtido em cultura de monocamada pelo mesmo ensaio, demonstra-se que a matriz 3D forneceu suporte e permitiu a manutenção da viabilidade das CTMs até a 9^a

semana. Entretanto a diminuição da porcentagem da metabolização do MTT seja por perda de viabilidade ou por diminuição da população, no caso da cultura de monocamada, aconteceu mais precocemente, na 3^a semana, e em um grau mais acentuado. Esses resultados corroboram com os de Junqueira e Carneiro, 2000; Hardingham, et.al., 2002.

Entretanto, quando comparamos os resultados obtidos entre as culturas dos dois tipos de matriz 3D, a porcentagem da atividade de metabolização do MTT em matriz de quitosana se manteve estável durante o período de diferenciação, seja por manutenção da viabilidade ou por estabilidade da população celular. Esses resultados discordam daqueles apresentados por Junqueira e Carneiro, (2000); Hardingham, et.al., (2002), uma vez que a matriz de quitosana se mostrou mais eficiente que a matriz composta de quitosana e gelatina na ativação, mantendo a viabilidade celular durante 9 semanas de cultivo.

Avaliando o processo de diferenciação das CTM através da atividade de FA em matriz 3D de quitosana e gelatina verificou-se uma redução significativa a partir da 3^a semana de cultura. Sendo assim, nota-se que o processo de diferenciação nesta matriz apresenta-se mais avançado quando comparado com a cultura de monocamada.

Entretanto, na matriz 3D de quitosana a condrogênese se apresentou num estágio mais avançado que as demais condições de culturas. Nesta matriz as células apresentaram um maior grau de diferenciação em um curto período de tempo quando comparado com as demais culturas, sugerindo que a matriz 3D de quitosana promoveu uma diferenciação mais rápida e mais eficiente, concordando

com Khor, et.al., 2003 e discordando de Junqueira e Carneiro, 2000; Hardingham, et.al., 2002.

Tanaka, et.al., 2004 relataram o aumento da produção de colágeno por CTM derivadas de tecido adiposo cultivadas em matriz de alginato, ou seja a presença de matriz estimularia a diferenciação celular. Entretanto quando relacionamos a cultura de CTM derivada de medula óssea em matriz 3D de quitosana e gelatina com a matriz 3D de quitosana, percebemos que na primeira houve uma diminuição na produção de colágeno, a partir da 3^a semana, refutando os autores. Já na segunda, ocorreu um aumento significativo desta produção na 3^a semana, concordando com esse autor.

Pelo exposto podemos afirmar que a matriz 3D constituída de quitosana forneceu um suporte capaz de permitir a diferenciação das CTM em condroblastos. Entretanto, o mesmo fato não ocorreu na matriz 3D constituída de quitosana e gelatina. Pode-se inferir que o compósito formado pela associação de quitosana e gelatina não apresentou a mesma eficiência quando se utilizou a matriz formada somente por quitosana. Portanto, baseados nos resultados apresentados pode-se concluir que a matriz de quitosana apresenta excelentes qualidades e pode ser utilizada como o principal componente constituinte de um suporte celular na engenharia do tecido cartilaginoso. A construção de matrizes 3D a base de quitosa poderá ser um ponto inicial para a reparação de cartilagem lesionada na medicina regenerativa.

CONCLUSÃO

A quitosana apresentou excelentes qualidades físico-químicas para construção de matrizes de estrutura 3D fornecendo arcabouços porosos que facilitam a colonização de células tronco mesenquimais. Essa colonização foi capaz de promover a ativação celular permitindo a proliferação, diferenciação em condroblastos e secreção de substâncias da matriz extracelular, principalmente o colágeno. Portanto, a construção de matrizes 3D à base de quitosana poderá ser um grande avanço na engenharia de tecidos e poderá ser usada na regeneração de cartilagem lesionada.

PERSPECTIVAS

Em relação à matriz

- 1- Construir matriz 3D de quitosana, com diferentes compósitos em diferentes concentrações como gelatina, condroitina.
- 2- Avaliar cada matriz em relação ao seu potencial condrogênico

Em relação à CTM

- 1- Estabelecer uma fonte alternativa de células-tronco, tal como tecido adiposo.
- 2- Estabelecer cultivo de células tronco derivadas de tecido adiposo de *Rattus norvegicus*.
- 3- Utilizar um modelo de lesão de cartilagem em rato, para implante do enxerto da matriz 3D selecionada com as células diferenciadas derivadas das células-tronco de tecido adiposo de rato.
- 4- Avaliar o processo de regeneração da cartilagem de rato *in vivo*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Arosarena, O. Tissue engineering. Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg. v.13, p. 233-241, 2005.

Amaral M, Costa MA, Lopes MA, Silva RF, Santos JD. Si3N4-bioglass composites stimulate the MG63 osteoblast-like cells. Biomaterials;v.23 p. 4897–906, 2002.

Bagby, G. C., Lipton, J. M., Sloand, E. M. and Schiffer, C. A. Marrow failure. American Society of Hematology, p.318- 337, 2004:.

Berridge, M. V. and Tan, A.S. Characterization of the cellular reduction 3(4,5 dimethylthiazol 2yl) 2, 5 diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Archives of biochemistry and biophysics, v.303, n.2, p.474-482, 1993.

Bianco, P., Robey, P.G. Stem cells in tissue engineering. Nature. v.1, n. 414, p.118-21, 2001.

Britt ,J.C, Park, S.S. Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. v.124, n.6, p.671-7, 1998.

Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P.,Quarto, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. Matrix Biology, v.22, p. 81-91, 2003.

Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. v.9, n.5, p.641-50, 1991

Caplan, A.I and Bruder, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends in Molecular Medicine, v.8 n.7, 2001.

Chen, C.W., Tsai, Y.H., Deng, W.P., Shih, S.N., Fang, C.L., Burch, J.G., Chen, W.H., Lai, W.F. Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research*. n.23, p. 446-453, 2005.

Chen, G., Liu, D., Tadakoro, M., Hirochika, R., Ohgushi, H., Tanaka, J., Tateishi, T. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in cobweb-like biodegradable scaffold. *BBRC* n. 322, p. 50-55, 2004.

Conrad, C., Huss, R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *Journal of Surgical Research*. v.124, p.201 – 208, 2004.

Cox, W.G. and Singer, V. L., A high resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. *J. Histochemistry and Cytochemistry*. v. 47, n.11, p.1443 – 1455, 1999.

Davila, J.C., Cezar, G., Thiede, M., Strom, S., Miki, T., Trosko, J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicological Science*, v.79, p.214-223, 2004.

Di Martino, A., Sittinger, M., Risler, M.Y. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, v.26, p. 5983-90, 2005.

Donati, I., Stredanska, S., Silvestrini, G., Vetere, A., Marcon, P., Marsich, E., Mozetic, P., Gamini, A., Paollet, S., Vittur, F. The aggregation of pig articular chondrocyte and synthesis of extracellular matrix by a lactose-modified chitosan. *Biomaterials*, v.26, p. 987-998, 2004.

Francis-Suh, J.K., Matthew, H.W.T., Application of chitosan-based polysaccharide biomaterial in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, v.21, p. 2589-98, 2000.

Ferrari, G, Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., Mavilio, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. v. 279, n.5356, 1528-30, 1998. Erratum in: *Science* v.281, n.5379, p 923, 1998

Fotakis, G and Timbrell, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 2005.

Glowacki, J., Yates, K.E., Maclean, R., Mizuno, S. In vitro engineering of cartilage: effects of serum substitutes, TGF-beta, and IL-1alpha. *Orthod Craniofac Res*. v.8, n.3, p.200-8, 2005

Gregory, C. A., Prockop, D.J., Spees, J. L. Non hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Experimental Cell Research*. v.306, p.330 – 335, 2005.

Harrison, F.L., Beswick, T.M. e Chesterton, C.J. Separation of haemopoietic cells for biochemical investigation. Preparation of erythroid and myeloid cells from human and laboratory-animal bone marrow and the separation of erythroblasts according to their state of maturation. *Biochem J*. v.15; n.194(3): 789–796, 1981.

Hardingham, T., Tew, S., Murdoch, A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res*. v.4 Suppl 3:S63-8, 2002

Huang, Y., Onyeri.S., Siewe, M., Moshfeghian, A., Madihaly, S. In vitro characterization of chitosan gelatin scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, 2005.

Im, G., Shin, Y.e Lee, K. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *OsteoArthritis and Cartilage* v.13, p. 845-853, 2005.

Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J. *Histologia Básica*, 10^a edição. Guanabara Koogan, 2000.

Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Yoo J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* v. 238, n.1, p. 265-72, 1998.

Kassem, M., Kristiansen, M. and Abdalla, B. M. Mesenchymal stem cells: Cell biology and potential use in therapy. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.* v. 95, p.209 – 214. 2004

Keilhoff, G., Goihl, A., Langnase, K., Fansa, H., Wolf, G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur J Cell Biol.* v. 85, n.1, p.11-24, 2006

Khor, E., Lim, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* v. 24, n.13, p. 2339-49, 2003.

Kim, S.E., Park, H.J., Cho, Y.W., Chung, H., Jeong, S.Y., Lee, E.B., Kwon, I.C. Porous chitosan scaffold contain microspheres loadedwith transforming growth factor β 1: Implications for cartilage tissue engineering. *Journal of controlled Release*, v. 91, p.365-374, 2003.

Kofugi, K., Qian, C.J., Murata, Y., Kawashima, S. The controlled release insulin-mimetic metal ions by the multifunction of chitosan. *J. Inorg. Biochem.* v.99, n.6, p.1329 – 34, 2005.

Lakshmiathy, U. and Verfaillie, C.M. Stem cell plasticity. *Blood reviews* v.19, p.29 – 38, 2005.

Lee, S.J., Jeon, H.B., Lee, J.H., Yoo, J.S., Chun, J-S., Yoo, Y.J. Identification of proteins differentially expressed during chondrogenesis of mesenchymal cells. *FEBS Letters* v.536, p.35-40, 2004.

Lee, J., Kim, K, Kwon, I., Ahn, H., Lee, S., Cho, H., Kim, H., Seong, S., Lee, M. Effects of the controlled-released TGF- β 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials* v.25, p. 4163–4173, 2005.

Li, L. and Xie, T. Stem cell niche: Structure and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Bio.* v. 21, p.605 – 31, 2005.

Lin, Y., Luo, E., Chen, X., Liu, L., Qiao, J., Yan, Z., Li, Z., Tang, W., Zheng, X., Tian, W. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *JCMM*, v.9, p. 929 – 939, 2005.

Lisignoli, G., Cristino, S., Piacentini, A., Toneguzzi, S., Grassi, F., Cavallo, C., Zini, N., Solimando, L., Maraldi, N. M., Facchini, A.. Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three dimensional hyaluronan based scaffold. *Biomaterials*, v.26, p. 5677-5686, 2005.

Malafaya, P.B., Pedro, A.J., Peterbauer, A., Gabriel, C., Redl, H. e Reis, R.L. Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue

engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *Journal of material science*. v. 16, p. 1077-1085, 2005.

Matikainen T., Laine J. Placenta-an alternative source of stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol.*; v.207, (2 Suppl), p. 544-9, 2005.

Meltzer. J.C., Grimm, P.C., Greenberg, A.H. and Nance, D.M. Enhance immunohistochemical detection autonomic nerve fibers cytokines and inducible nitric oxide synthase by light and fluorescent microscopy in rat spleen. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, v.45, p.599-610, 1997.

Midihally, S.V. & Matthew, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v.20, p.1133-1142, 1999.

Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Methods*, v.65 n.1-2, p. 55-63. 1983.

Nakahara, H., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E., Holecek, J.J., Baber, M.A., Goldberg, V.M., Caplan, A.I. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*. v.11, n.3, p.181-8, 1990.

Ng, A.M., Saim, A.B., Tan, K.K., Tan, G.H., Mokhtar, S.A., Rose, I.M., Othman, F., Idrus, R.B. Comparison of bioengineered human bone construct from four sources of osteogenic cells. *J Orthop Sci.*; v.10, n.2, p.192-9, 2005.

Ochi, K., Derfoul, A., Tuan, R.S. A predominantly articular cartilage-associated gene, SCRG1, is induced by glucocorticoid and stimulates chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. v.14, n.1, p.30-8, 2006.

Opitz, J.M. Limb anomalies from evolutionary, developmental, and genetic perspectives. *Birth Defects Orig Artic Ser.* v.30, n.1, p.35-77, 1996.

Park, S.K., Kim, H., Chun, S., Park, J e Kim, P. Mechanisms Underlying the Effects of LPS and Activationinduced Cytidine Deaminase on IgA Isotype Expression. *Mol. Cells*, v. 19, n. 3, p. 445-451, 2005.

Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., Prockop, D.J. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* v.75, n.3, p.424-36, 1999.

Pountos, I., Giannoudis, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury.* v.36 Suppl 3:S8-S12. 2005

Prasad, R., Lambe, S., Kaler, P., Pathania, S., Kumar, S., Attri, S., Singh, S.K. Ectopic expression of alkaline phosphatase in proximal tubular brush border membrane of human renal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica acta*, 2005.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* v.98, n.9, p. 615-25, 2001.

Solursh, M. Formation of cartilage tissue in vitro. *J Cell Biochem.*v.45, n.3, p.258-60. 1991

Tanaka, H., Murphy, C.L, Murphy, C., Kimura, M., Kawai, S., Polak, J.M. Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. *J Cell Biochem.* v.93, n.3, p.454-62, 2004

Taravel, M.N, Domard, A. Collagen and its interaction with chitosan. Influence of the physicochemical characteristics of collagen II. *Biomaterials*.v.16, n.11, p.865-71, 1995

Tropel, P., Noel, D., Platet, N., Legrand, P., Benabid, A.L, Berger, F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*. v.295, n.2, p.395-406, 2004.

Tullberg-Reinert H, Jundt G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with Sirius–Red based colorimetric microassay. *Histochem Cell Biol* v.112, p.271–6, 1999.

Tuzlakoglu, K, Alves, C.M, Mano, J.F, Reis, R.L. Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications. *Macromol Biosci*. v.4, n.8, p.811-9, 2004.

Vacanti, C.A., Kim, W., Schloo, B., Upton, J., Vacanti, J.P. Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures. *Am J Sports Med*. v.22, n.4, p.485-8, 1994

Vacanti, V., Kong, E., Suzuki, G., Sato. K., Canty, J.M., Lee, T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol*. v. 205, n.2, p.194-201, 2005.

Valerio, P., Pereira, M., Góes, A., Leite, M. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* v.25, p.2941-2948, 2004.

Wang, Y., Kim, U-J., Blasioli, D. J., Kim, H-J. and Kaplan, D.L. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffold and mesenchymal stem cell. *Biomaterials*, 2005.

Williams, J.T., Southerland, S.S., Souza, J., Calcutt, A.F., Cartledge, R.G. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg.* v. 65, n.1, p.22-6, 1999.

Xavier, M. S., Souza, V. C., Gomes, P.O., Corrêa, J.C., Novo, N.F., Juliano, Y. Efeito do enxerto autólogo de pericôndrio costal com butil-2 cianocrilato em lesão provocada na cartilagem articular de coelhos. *Acta Cirurgica Brasileira* v.14, 1999.

Xia, W., Liu, W., Cui, L., Liu, Y., Zhong, W., Liu, D., Wu, J., Chua, K. e Cão, Y. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan –gelatina complex scaffolds. *Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 71B: p. 373–380, 2004

Yamane, S., Iwasaki, N., Majina, T., Funakoshi, T., Masuko, T., Harada, K., Minami, A., Monde, K., Nishimura, S. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hibrid biomaterial for novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v.26, p. 611-619, 2005.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* v.13, n.12, p.4279-95, 2002.

<http://acd.ufrj.br/labnac>

www.pucrs.br/igg/geronto/bioenv/atlas.htm