



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

NATÁLIA MARTINS BREYNER

TESE DE DOUTORADO

DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO EM MATRIZES
TRIDIMENSIONAIS DE QUITOSANA E GELATINA: AVALIAÇÕES *IN*
VITRO* E *IN VIVO

BELO HORIZONTE

2010

NATÁLIA MARTINS BREYNER

**DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO EM MATRIZES
TRIDIMENSIONAIS DE QUITOSANA E GELATINA: AVALIAÇÕES *IN
VITRO* E *IN VIVO***

Trabalho apresentado à banca examinadora como pré-requisito para obter o título de Doutora em Ciências com ênfase em Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular sob orientação do Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes e com financiamento do CNPq.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

BELO HORIZONTE

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATÁLIA MARTINS BREYNER

DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO EM MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE QUITOSANA E GELATINA: AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO*

Trabalho apresentado à banca examinadora como pré-requisito para obter o título de Doutora em Ciências com ênfase em Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular sob orientação do Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes e com financiamento do CNPq.

BANCA EXAMINADORA

Belo Horizonte, 04 de fevereiro de 2010

Sala Baeta Viana, ICB

DEDICATÓRIA

Ao dedicar essa tese, pensei em retribuir a quem sempre me dedicou carinho, apoio, compreensão, confiança e incentivo. Aos meus pais, Luiz e Gilma, que mesmo antes de tudo, quando eu ainda era criança, plantaram em mim o gosto e a responsabilidade no estudo. Dedico esse trabalho a vocês, meus amados pais, e agradeço por sempre me compreenderem e pelo amor oferecido de forma incondicional. A vocês agradeço por me incentivar a buscar os caminhos que busquei, mesmo que para isso sacrificássemos os nossos encontros. Dedico à minha irmã, Liliane, por estar comigo também desde o começo, por ser meu porto seguro, minha vida e por me compreender mesmo nos momentos mais difíceis. Ao meu namorado lindo, Robson, dedico com muito amor essa tese. A você, Lindo, obrigada por me apoiar e por acreditar no meu potencial e, sobretudo, por ter colocado mais amor na minha vida. Meus amores, eu dedico esse trabalho a vocês que sempre me apoiaram mesmo sabendo que eu estaria ausente em alguns momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecer às pessoas pelo que elas fizeram escrevendo ou dizendo: muito obrigada ainda é pouco diante da grandeza das atitudes a mim dispensadas. Ao carinho, a uma palavra amiga, às inúmeras discussões, aos aprendizados, a um olhar, a um sorriso... tantas atitudes e oferecidas sem pedir nada em troca. Agradeço a cada um que contribuiu direta e indiretamente para a realização desse trabalho. Como diria o grande poeta Raul Seixas: Um sonho que se sonha só é apenas um sonho, mas um sonho que se sonha junto se torna realidade! Obrigada por tornarem junto comigo meu sonho realidade!

Professor Alfredo, muito obrigada pela confiança, pelo incentivo e pelos grandes momentos de aprendizado e convivência.

Amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular II: Professor Dawidson, Michele, Carol, Ana Carolina, Cláudia e Bruno.

Amigos do Lab: Alessandra (Lelê), Adriana (Dri), Bernardo (Bê), Betinha, Caryninha, Cíntia, Claudinha, Carol Barcellos, Cris, Cris Torres, Carolzinha, Carol Muniz, Dani Rolim, Elis, Estefânia (Teté), Helô, Inácio, Ju Lott, Ju Barbosa, Luiza, Lílian, Naira, Marina, Mário, Patrícia Valério (Pat), Patrícia Rabelo (Patty), Paula, Priscila (Pri), Rafa, Suzana, Silviene (Sil), Tiago, Tércio, Vivizinha e Vivi Gomide (Gogo).

Em especial, agradeço à Sil por mudar a minha concepção de pesquisa e consequentemente, a minha vida! E por me ajudar sempre que precisei e com a maior disposição!

Amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento: Professora Gerluza, Estéfane, Suzana, Chico, Professor Anderson e Renato. Meu agradecimento especial ao Chico, pelas lâminas de H&E.

Amigos do Laboratório de Patologia Veterinária: Professora Rogéria, Professora Natália, Jankerle, Fátima, Flávia e Melissa.

Professora Marivalda e a turma da Escola de Engenharia, Patrícia do MEV e Ildeu.

Meus amigos: Clarissa, Raul, Luciana, Fabíola, Thaís, Óliver, Mariana, Rosana, Diogo, Luciane, Vinícius e aos novos integrantes: Davi, Helena, Júlia, Gabriel e Pedro.

Aos meus tios, tias, primos e primas que sempre torceram pela minha vitória.

Ao CNPq pelo financiamento.

DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO EM MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE QUITOSANA E GELATINA: AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO*

RESUMO

O tecido cartilaginoso é constituído de um único tipo celular, o condrócito, embebido em matriz extracelular (MEC) composta principalmente de colágeno. Entretanto, esse tecido é desprovido de vasos sanguíneos e assim, possui ineficiente processo de auto-reparo. De forma que qualquer tipo de lesão nesse tecido tende a progredir, acarretando em degeneração, causando osteoartrite. Essa lesão compromete a qualidade de vida do paciente e, portanto, tem estimulado os pesquisadores a buscar soluções a fim de minimizar o desconforto e melhorar a qualidade de vida destes pacientes. Atualmente, surge no cenário clínico e científico, a Engenharia de Tecidos. Essa estratégia utiliza três ferramentas: matriz 3D, células e moléculas sinalizadoras. Partindo desse princípio, o presente trabalho visou criar dois tipos de matrizes 3D constituída de quitosana e gelatina e variando apenas no reticulante (glutaraldeído e genipina). Tanto a quitosana quanto a gelatina possuem características que se assemelham à MEC de tecido cartilaginoso e, além disso, a união desses biomateriais poliméricos permitiu construir um suporte poroso. A porosidade facilita a difusão de nutrientes, bem como a retirada de metabólitos, além de favorecer a adesão, migração, comunicação e diferenciação celular. Para promover a regeneração tecidual guiada, utilizando uma matriz 3D, é necessária a presença de fatores biologicamente ativos. As células-tronco (CTM) derivadas de tecido adiposo de ratos foram utilizadas nesse trabalho por terem a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares, quando estimuladas adequadamente. Portanto apresentam um atraente potencial para a terapêutica desejada. Essas células foram cultivadas em meio indutor condrogênico, contendo TGF- β e dexametasona. Tais moléculas ativam cascatas de sinalização intracelular que favorecem a diferenciação das CTM em condrócito. Foram realizados testes *in vitro*, a fim de avaliar a capacidade de diferenciação das CTM em meio indutor condrogênico. Notou-se que a partir da 3ª semana de cultivo houve redução na proliferação celular e da atividade da FA, além de aumento na síntese de colágeno total e da expressão de colágeno do tipo II. *In vivo*, foi avaliada a capacidade de reabsorção das matrizes, ambas foram completamente reabsorvidas na 9ª semana. Além disso, avaliou-se a capacidade dessas matrizes em manter o fenótipo diferenciado das células por período prolongado *in vivo*, uma vez que foram implantadas matrizes colonizadas por células diferenciadas previamente durante 3 semanas. Pode-se observar que na 6ª semana após o implante havia a expressão de colágeno do tipo II. Os dados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que as células foram capazes de se diferenciar *in vitro* e quando colonizam matrizes 3D de quitosana e gelatina e são implantadas *in vivo* mantém o fenótipo diferenciado, demonstrando que as matrizes mimetizam adequadamente a MEC nativa. Maiores estudos são necessários para moldar as matrizes de forma a se adequarem ao tecido a ser tratado.

Palavras-chaves: Células-tronco, Engenharia de Tecidos, matriz 3D, cartilagem, quitosana.

CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF STEM CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE MATRIX OF THREE-DIMENSIONAL GELATIN AND CHITOSAN: EVALUATION *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Abstract

Cartilage is composed of specialized cells called chondrocytes which produce a large amount of extracellular matrix composed mainly of collagen fibers. Unlike other connective tissues, cartilage does not contain blood vessels, and therefore, presents limited repair capability. If damaged, cartilage doesn't heal. Over the last years, surgeons and scientists have elaborated a series of cartilage repair procedures that help to postpone the need of joint replacement. Nowadays, bioengineering and tissue engineering techniques are being developed aiming the generation of cartilage tissue using a cellular scaffolding material to support cell growth and promoting new cartilage tissue formation. Following the same principle, this work aims to create two types of chitosan/gelatin composed 3D matrices in order to support cartilage tissue formation. Matrices differ only in the crosslinker used (glutaraldehyde or genipin). Chitosan and gelatin were chosen for their resemblance with the cartilage's extracellular matrix, their capacity to promote cell adhesion, migration, communication and differentiation. Both biomaterials also present the property of forming a porous scaffold when united, which facilitates the diffusion of nutrients and the removal of metabolites. The promotion of guided tissue regeneration requires the presence of 3D support and biologically active factors, or cells. In the present study, rat adipose tissue derived stem cells were used. These cells have the ability to differentiate into several cell lines, when stimulated properly, thus present an attractive potential for the treatment desired. Cells were cultured in chondrogenic induction medium containing TGF- β and dexamethasone. Those molecules were employed as they activate intracellular signaling cascades that promote the differentiation of stem cells towards the chondrogenic lineage. Tests were performed *in vitro*, in which the cells were cultured in induction medium and evaluated for the ability of differentiation. It was noted that from the 3rd week of culture on, there was a reduction in cell proliferation and alkaline phosphatase activity, as well as increased synthesis of collagen and expression of type II collagen. *In vivo*, reabsorption rate of the scaffolds was assessed and both were completely absorbed by the 9th week of implantation, presenting total tissue remodeling. In addition, we evaluated the ability of these scaffolds to maintain the differentiated phenotype of the cells for prolonged periods after implantation, since the scaffolds were colonized by cells cultured in induction medium for 3 weeks in advance. After 6 weeks of implantation, type II collagen expression was still present, indicating maintenance of the chondrogenic phenotype. Taken together, the data obtained in this study revealed that the rat adipose tissue derived cells were able to differentiate into chondrocytes *in vitro* when cultured in monolayer and in 3D chitosan-gelatin based scaffolds. Data indicates as well that even after 6 weeks of implantation cells maintained the differentiated phenotype, demonstrating that the matrices studied adequately mimic the native ECM. Further studies are required to enhance 3D matrices' capability of shape manipulation.

Keywords: Stem Cells, Scaffolds, Tissue engineering, cartilage, chitosan.

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C	Antes de Cristo
BCIP	5-Bromo, 4-Cloro,3-indolil Fosfato
BSE	Eletrons retroespalhados
BSA	Albumina do Soro Bovino
°C	Grau Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CD	Grupo de diferenciação
CETEA	Comitê de ética
CEMEL	Centro de Microscopia Eletrônica
CDTN	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
CNEN	Centro Nacional de Energia Nuclear
CTH	Células-tronco hematopoiética
CTM	Células-tronco mesenquimal
DEPC	Dimetil Pirocarbonato
DNA	Acido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ácido tetracético Etilenodiamidina
eGFP	Proteína Verde Fluorescente
EGTA	Ácido tetracético Etileno Glicol
ES	Elétrons Secundários
ESC	Células-tronco embrionárias
FA	Fosfatase Alcalina

FITC	Isotiacinato de Fluoresceína
FSC	Dispersão direta (eixo X)
Gli	Glicina
GAG	Glicosaminoglicano
HE	Hematoxilina & Eosina
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	Imunoglobulina G
iPS	Células de pluripotência induzida
Kgy	Kilo Gray
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MTT	3(4,5 – Dimetiltiazol – 2- il) 2, 5 – brometo de difeniltetrazolium
NBT	Nitro blue tetrazolium
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PVPI	Iodopovidona
PVDF	Fluoreto de Polivideno
PFA	Paraformaldeído
PSA/G	Penicilina Estreptomicina Anfotericina e Gentamicina
rpm	Rotações por minuto
RGD	Motivo de arginino, glicina e asparagina
RNA	Ácido desoxirribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSC	Dispersão lateral (eixo Y)
U	Unidade

USA	Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Sequência senso e antisenso dos primers utilizados para amplificação dos segmentos gênicos Colágeno II, β -actina e osteopontina.....	54
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema explicativo sobre o mecanismo da Engenharia de Tecidos (adaptado - Chiang, 2009).
.....23
- Figura 2 - Esquema explicativo dos tipos de divisão de células-tronco. (adaptado de Mountifourd, 2008).25
- Figura 3 - Gráfico granulocidade (SSC) versus tamanho (FSC) gerado pelo Cell Quest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).....49
- Figura 4 - Representação esquemática da citometria de fluxo. Após a marcação celular utilizando FITC ou PE, as células são submetidas a citometria de fluxo e a intensidade da fluorescência é interpretada pelo programa CellQuest. Os dados obtidos são analisados pelo programa WinMid 2.8.....50
- Figura 5 - Marcação da enzima fosfatase alcalina presente nas células tronco de tecido adiposo após reação com NBT- BCIP (100X). Fonte: Natália Martins Breyner.55
- Figura 6 - Equação da reta. Dosagem da fosfatase alcalina, no eixo X expressa-se a concentração da enzima, no eixo Y as absorbâncias.....56
- Figura 7 - Matrizes 3D. (A) Placa contendo matriz 3D de gelatina, quitosana e genipin. (B) Placa contendo matriz 3D de quitosana, gelatina e glutaraldeído.61
- Figura 8 - Desenho experimental dos implantes em dorso de rato. (A) Implante de matriz não colonizada. (B) implante de matriz colonizada por CTM. (C) Implante de matriz colonizada por CTM diferenciadas durante 3 semanas em meio indutor condrogênico.64
- Figura 9 - Implante. (A) Região tricotomizada do dorso do Rato. (B) Incisão em meia lua para introdução da matriz. (C) Região do implante suturada.66
- Figura 10 - CTM após 21 dias de cultivo, observa-se organização das células em colônias, além de morfologia fibroblastóide e aderência à superfície plástica da placa de cultura (Aumento 60X).....71
- Figura 11 - Análise fenotípica das CTM por citometria de fluxo. (A) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população selecionada R1.73
- Figura 12 - Análise fenotípica das CTM – EGFP por citometria de fluxo e imunofluorescência. (A) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população selecionada. (B) Imunofluorescência apresentou a expressão de CD54, CD73, CD90 (verde), GFP (vermelho) e a não expressão de CD45. O núcleo está marcado com Hoechst (azul). Imagem obtida através da microscopia de confocal LSM 510 Meta (sobreposição).74
- Figura 13 - Representação gráfica da avaliação da capacidade proliferativa das CTM através da porcentagem de metabolização de MTT. As avaliações foram realizadas após 72 horas de cultivo das CTM em meio basal (considerada 0 semana) e com 1, 3, 6 e 9 semanas de cultivo das CTM em meio de indução condrogênica. Houve uma redução significativa da proliferação celular a partir da 1ª semana, diminuindo ainda mais na 3ª semana (**/***p < 0,001).....76
- Figura 14 - Representação gráfica da avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) em CTM. As avaliações foram realizadas após 72 horas de cultivo das CTM em meio basal e com 1, 3, 6 e 9 semanas de cultivo das CTM em meio de indução condrogênica. Houve uma redução significativa da atividade da fosfatase alcalina a partir da 1ª semana, reduzindo ainda mais a partir da 3ª semana e posteriormente na 9ª semana (**/**** p < 0,001).....76
- Figura 15 - Representação gráfica da avaliação da síntese de colágeno total em CTM. As avaliações foram realizadas após 72 horas de cultivo das CTM em meio basal e com 1, 3, 6 e 9 semanas de cultivo das CTM em meio indutor de condrogênese. Houve um aumento significativo da síntese de colágeno total a partir da 3ª semana em relação a 0 e 1 semana. E na 6ª semana houve um aumento significativo da síntese do colágeno total em relação à 3ª semana, bem como dos demais períodos avaliados (**/**** p < 0,001).77
- Figura 16 - Análise da síntese de colágeno do tipo II pelas CTM através da amplificação de transcritos gênicos. O período analisado foi de 0, 1, 3, 6 e 9 semanas, considerando 0 o controle da reação que consta de CTM cultivadas em meio basal por 72 horas. O período que vai da 1ª à 9ª semana as células

- foram cultivadas em meio indutor de colágeno. (A) Amplificação do gene de colágeno do tipo II (492 pb). (B) $\beta 1$ - actina (540 pb).77
- Figura 17 - Análise de imunofluorescência da diferenciação das CTM cultivadas em meio indutor de diferenciação durante 9 semanas. O resultado apresenta a não expressão de CD45, CD90, CD54 e Osteocalcina e a expressão de CD73 e Colágeno do tipo II (em vermelho) e de GFP (em verde). As imagens foram obtidas por sobreposição de filtros em microscópio confocal. A marcação em azul (Hoechst) evidenciou os núcleos. Objetiva de 63X em óleo de imersão.78**
- Figura 18 - Avaliações macroscópicas e microscópicas das matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído (A e C) e reticuladas com genipina (B e D). (A) matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído após a liofilização embebidas em álcool etílico 100%. (B) matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com genipina após a liofilização embebidas em álcool etílico 100%. (C) Microfotografia de matriz de Q+G reticulada com glutaraldeído (MEV). (D) Microfotografia de matriz de Q+G reticulada com genipina.80**
- Figura 19 - Representação gráfica da metabolização do MTT das CTM cultivadas em matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído ou genipina por 3 e 7 dias. CTM – células tronco mesenquimais (controle positivo), Glut – matriz de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído, Gen – matriz de quitosana e gelatina reticulada com genipina. Glut cel 3 dias/Glut cel 7 dias – período de cultivo das CTM em matriz de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído. Gen cel 3 dias/Gen cel 7 dias – período de cultivo das CTM em matriz de quitosana e gelatina reticuladas com genipina (* p < 0,05).....81**
- Figura 20 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com genipina não-colonizada. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado.86**
- Figura 21 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes por campo em implantes de matriz reticulada com genipina não colonizada. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo na 3ª semana após o implante em relação à 1ª e a 6ª semanas após o implante. (* p < 0,05).86**
- Figura 22 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de neovascularização em implantes de matriz reticulada com genipina não colonizada. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo de neovascularização na 6ª semana comparada com os demais períodos avaliados. (* p < 0,05).87**
- Figura 23 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com genipina colonizada por CTM. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. (D) Corte histológico referente a 9 semanas após o implante Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado inflamatório.....89**
- Figura 24 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes por campo em implantes de matriz reticulada com genipina colonizada por CTM. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Não foi observado diferença estatística entre os grupos. (* p < 0,05).90**
- Figura 25 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de neovascularização em implantes de matriz reticulada com genipina colonizada por CTM. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo de neovascularização na 3ª semana comparada à primeira semana. Essa quantidade se manteve na 6ª semana, aumentando significativamente na 9ª semana após o implante. (* p < 0,05).90**
- Figura 26 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com genipina colonizada por CTM**

diferenciadas. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado inflamatório.	93
Figura 27 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes por campo em implantes de matriz reticulada com genipina colonizada por CTM diferenciadas in vitro durante 3 semanas. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Foi observado diferença estatística entre a 1ª semana e a 6ª semana após o implante. (* p < 0,05).	94
Figura 28 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de neovascularização em implantes de matriz reticulada com genipina colonizada por CTM diferenciada in vitro durante 3 semanas. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se uma redução significativa de neovascularização na 3ª semana comparada com a 1ª semana e da 6ª semana após o implante comparada com a 1ª semana. (* p < 0,001).	94
Figura 29 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído não-colonizada. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado inflamatório.	97
Figura 30 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes por campo em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído não colonizada. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo na 3ª semana após o implante em relação à 1ª semana e um decaimento na 6ª semana em relação à 3ª semana após o implante. (* p < 0,05).	98
Figura 33 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes multinucleadas (CGM) por campo em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo de CGM a partir da 6ª semana. Na 9ª semana após o implante aumentou significativamente a quantidade de CGM em relação à 6ª semana. (* p < 0,05).	102
Figura 36 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes multinucleadas (CGM) por campo em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM diferenciadas in vitro durante 3 semanas. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se uma redução significativa de CGM a partir da 6ª semana. (* p < 0,001).	106
Figura 39 - Reticulação esquemática de colágeno. (a) Glutaraldeído foi utilizado como reticulante. (b) genipina foi utilizada como reticulante.	121

ÍNDICE

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	iii
DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
<i>Abstract</i>	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELA.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
Introdução.....	21
Objetivos.....	43
Objetivos específicos	44
Materiais e métodos.....	46
I – Modelos animais.....	46
II - Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de ratos	46
III - Matrizes tridimensionais	60
IV - Interação matriz-CTM.....	62
V- Análise estatística	68
Resultados.....	70
Procedimentos in vitro	70
1- Caracterização das CTM.....	70
2- – Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> das matrizes 3D	79
Procedimentos in vivo	82
3- Interação célula-matriz.....	82
Discussão.....	111
Conclusão	128

Referências Bibliográficas.....	130
Anexo	137

Introdução

Alguns tecidos altamente expostos ao estresse possuem grande capacidade de regeneração, tais como epitélio intestinal, cutâneo e tecido hematopoiético. Entretanto, há tecidos que lesionados por trauma, doença ou senescência eventualmente não se regeneram adequadamente, de forma que ocorre o processo de cicatrização, comprometendo assim a função tecidual. Tais danos teciduais estão associados com lesões agudas ou alterações crônicas degenerativas e não havendo intervenção médica, a resposta do organismo não favorecerá à recuperação adequada do tecido ou do órgão afetado (Williams et al., 2006).

As cirurgias reconstrutivas, a utilização de órgãos e tecidos artificiais e a realização de transplantes de órgãos e tecidos são as principais escolhas para reconstruir o tecido ou órgão comprometido (Ikada et al., 2006; Tabata et al., 2009). Entretanto, essas técnicas apresentam importantes limitações. Na cirurgia reconstrutiva não há substituição completa das funções biológicas e conseqüentemente, não previne a deterioração progressiva do tecido ou órgão acometido (Tabata et al., 2006). Em relação ao transplante de órgão ou de tecido há necessidade de aumentar a sobrevida do transplante no hospedeiro, reduzindo a resposta imune, por meio de terapia imunossupressora contínua e permanente (Ikada et al., 2006; Tabata et al., 2009). Essas razões estimularam o desenvolvimento de terapias alternativas.

Mesmo com as limitações acima citadas em relação às cirurgias reconstrutivas e transplantes, tais técnicas apresentaram um grande avanço na medicina. Uma vez que há 50 anos, lesões em órgãos ou tecidos não eram tratadas e realizava-se a excisão da parte afetada e posterior substituição por uma estrutura semelhante a essa parte retirada com o intuito de executar a função perdida (Williams et al., 2006). Mais recentemente, há 30 anos, surgiu a Engenharia de Tecido, uma nova e estratégica área com características multidisciplinares.

Essa tecnologia inovadora busca criar condições ideais para a regeneração e/ou a substituição de tecidos lesados, fornecendo elementos celulares, fatores de crescimento e diferenciação e, também, estruturas supramoleculares que permitam aos tecidos tratados uma adequada organização celular espacial e funcional, assim como sua integração sistêmica (Langer e Vacanti, 1993; Ikada et al., 2006).

Conceitualmente, Engenharia de Tecido é baseada na criação de um novo tecido, semelhante ao tecido perdido, através da regeneração induzida ou da persuasão do organismo na sua própria cura, através do endereçamento, ao local apropriado, de promotores de regeneração, tais como: células, moléculas sinalizadoras, sinais mecânicos e uma estrutura de suporte (Williams et al., 2006). Para regenerar o tecido ou órgão lesado, a Engenharia de Tecidos utiliza três ferramentas básicas: células, matrizes tridimensionais (3D) e fatores de crescimento. Embora o cultivo de células *in vitro* seja feito há muitos anos, a possibilidade de cultivar tecidos tridimensionais complexos é bastante recente. Esse tipo de processo requer conhecimentos científicos de múltiplas áreas e uma interação estreita entre cientistas com distintas formações e constitui uma área recente de pesquisa multidisciplinar. A definição mais ampla dessa técnica incluiria, entre seus objetivos, o desenvolvimento e a manipulação de implantes artificiais, de tecidos gerados em laboratório, e/ou células e moléculas capazes de substituir ou estimular funcionalmente partes defeituosas ou lesadas (Ikada et al., 2006; Tabata et al., 2009).

Na Engenharia de Tecidos, as células colonizam a matriz 3D e são as responsáveis pela síntese de matriz extracelular (MEC) do novo tecido, enquanto a matriz 3D é responsável por fornecer um meio ambiente favorável à execução adequada das funções celulares. A adição de fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras ao construto (matriz 3D-célula) facilita e promove a regeneração do novo tecido (Ikada, 2006). Diante dessa idéia da

Engenharia de Tecidos, Chiang e colaboradores (2009) propôs uma explicação e para isso fez uma alusão à técnica de plantio utilizada na agricultura com a Engenharia de Tecido e descreveu a matriz 3D como o solo, ou seja, a terra que deve ser preparada para ser semeada. Neste contexto, ele denomina de semente, as células e de adubo ou fertilizante, os fatores de crescimento, como mostra a figura 1.

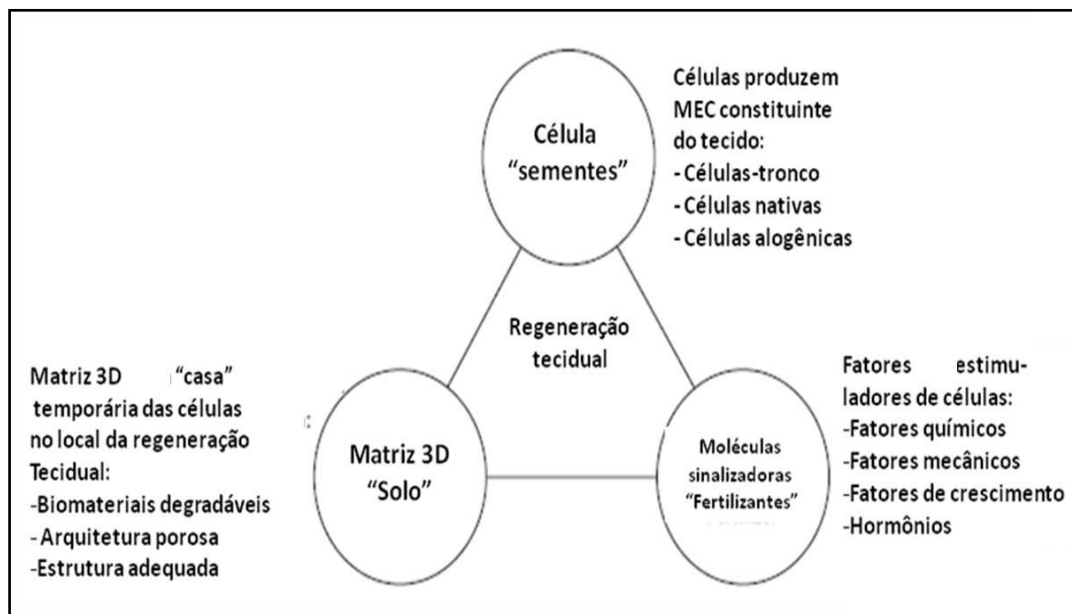


Figura 1 - Esquema explicativo sobre o mecanismo da Engenharia de Tecidos (adaptado – Chiang et al., 2009).

No topo da explicação de Chiang e colaboradores (2009) encontram-se as células. Segundo Chiang e cols (2009) e Ikada e cols (2006), as células tem uma enorme influência no sucesso da Engenharia de Tecidos. Três diferentes fontes celulares podem ser utilizadas para essa estratégia: autólogas, alogênicas e xenogênicas. As células autólogas são mais atraentes no uso clínico, já que elas não apresentam risco de rejeição imunológica. Tais células são derivadas do próprio indivíduo a ser tratado. Enquanto que as células de origem alogênica, derivadas de indivíduos diferentes da mesma espécie e as células xenogênica, derivadas de espécies diferentes, necessitam de estratégias para evitar a rejeição imunológica. Porém, a

disponibilidade limitada das células autólogas em algumas situações, seja idade do paciente ou estado de saúde do mesmo, intensificou o interesse na abordagem e utilização de células de origem diversificada.

Independente da sua fonte, as células-tronco apresentam um grande potencial para aplicação terapêutica e Engenharia de Tecidos devido ao seu potencial de auto-renovação, diferenciação em diversas linhagens celulares e cultivo *in vitro* durante longo período sem apresentar senescência (Zuk et al., 2002). A capacidade de auto-renovação *in vivo* por tempo prolongado garante uma população de células-tronco capaz de manter a viabilidade e a funcionalidade dos tecidos ao longo da vida do organismo. (Rodriguez et al., 2005 e revisado por Nardi et al., 2006 e Mountford et al., 2008). A capacidade de auto-renovação e de diferenciação das células-tronco foi descrita sucintamente por Mountford e cols (2008): qualquer célula somática é capaz de se renovar através de divisão simétrica, onde as duas células-filhas são idênticas genética e fenotipicamente à célula-mãe. Ou essas células podem se dividir através da divisão assimétrica, em que uma das células-filha é genética e fenotipicamente igual à célula-mãe e a outra célula-filha se altera e inicia o processo de diferenciação, como mostra a figura 2.

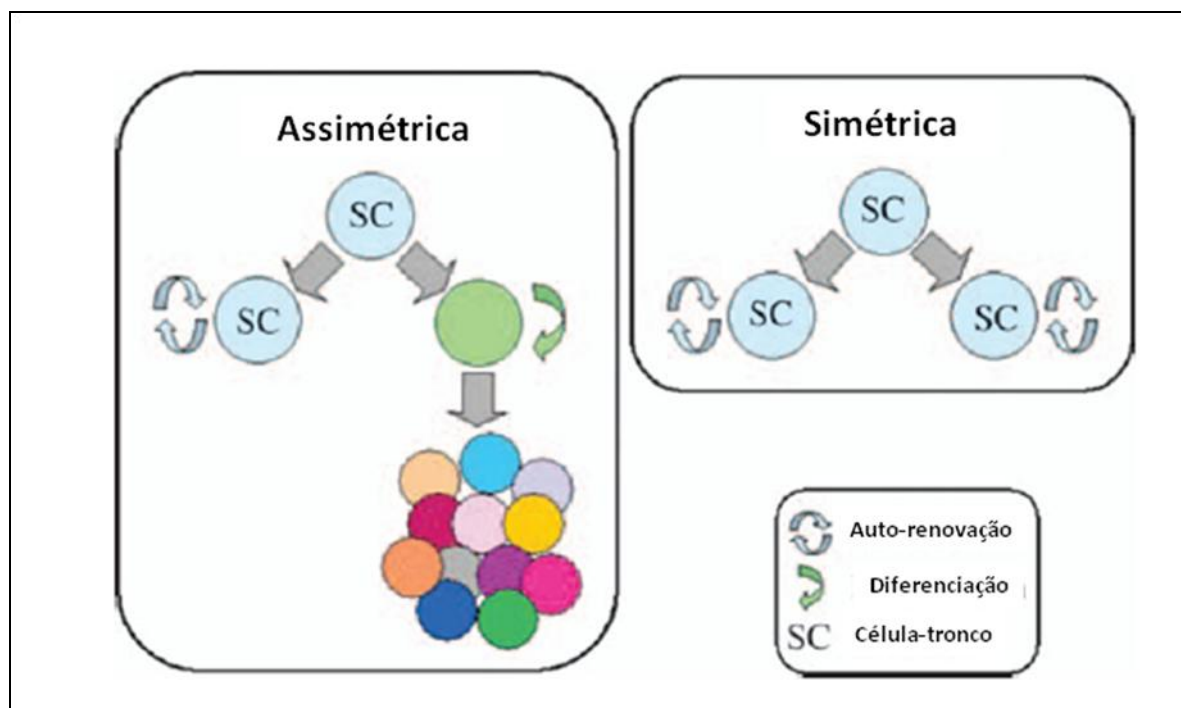


Figura 2 - Esquema explicativo dos tipos de divisão de células-tronco. (adaptado de Mountifourd et al., 2008).

As células-tronco podem também ser classificadas de acordo com o seu potencial de diferenciação: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células classificadas como totipotentes, dão origem às células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) além das células dos anexos embrionários e são representadas pelas células-tronco embrionárias derivadas de zigoto após 2 dias de fecundação. As células denominadas pluripotentes dão origem às células das três linhagens germinativas: endoderma, ectoderma e mesoderma e são representadas pelas células-tronco embrionárias (ESC), derivadas da massa interna do blastocisto e pelas células-tronco de pluripotência induzida (iPS). Já as células multipotentes são classificadas *a priori* por serem capazes de se diferenciar em células da linhagem a qual a célula-tronco foi extraída, ou seja, células-tronco derivadas de linhagem mesodérmica dariam origem a células de linhagem mesodérmica, tais como células da linhagem condrogênica, osteogênica, miogênica e adipogênica e são representadas pelas

células-tronco mesenquimais (CTM). As células-tronco mesenquimais podem ser obtidas de diversas fontes, do líquido amniótico, do cordão umbilical, da medula óssea e do tecido adiposo, por exemplo. As células-tronco multipotentes derivadas da medula óssea são divididas em células-tronco hematopoiéticas (CTH) que originam as células componentes do sangue e do sistema imune e células-tronco mesenquimais (CTM), como descrito acima (Friedenstein et al., 1966; Owen et al., 1988; Zuk et al., 2002 e Conrad et al., 2004).

A primeira linhagem de ESC derivada de massa interna de blastocisto de camundongos cultivadas com soro e camada alimentadora de fibroblastos foi descrita por Evans & Kaufman (1981), Martin e cols (1981) e revisado por Yu e cols (2008). As células-tronco embrionárias apresentam alta capacidade proliferativa por longo período sem apresentar diferenciação. Entretanto, quando essas células são estimuladas adequadamente ou cultivadas em alto grau de confluência são capazes de gerar espontaneamente células derivadas das três camadas germinativas embrionárias: ectoderma, endoderma e mesoderma. Estudos demonstraram que a introdução dessas células em camundongos imunodeficientes foi capaz de gerar teratoma, um tumor composto de células derivadas de ectoderma, mesoderma e endoderma (Martin et al., 1981; Thomson et al., 1998 e Wang et al., 2005). Todavia, é imprescindível levar em consideração os problemas éticos na utilização dessas células, que variam de país para país, devido à necessidade de destruição de embriões considerados inviáveis pelo tempo de congelamento, para obtê-las. Além disso, também é muito importante estabelecer algumas estratégias para o controle da proliferação dessas células em cultura (Rada et al., 2009 e revisado por Byun et al., 2009). Apesar de algumas restrições, provavelmente as ESC são uma das mais excitantes alternativas celulares para Engenharia de Tecidos (Rada et al., 2009).

As células-tronco de pluripotência induzida tiveram seu estudo iniciado a partir da clonagem da ovelha Dolly, em 1997 por Wilmut e cols na Escócia. Esse experimento demonstrou que a transferência do núcleo de uma célula diferenciada para um oócito foi capaz de alterar o estado epigenético deste núcleo para o estado totipotente. Pressupôs-se que o microambiente do citoplasma do oócito contém informações importantes na conversão do núcleo ao estado pluripotente. A partir daí, novas idéias, antes consideradas impossíveis em células de mamíferos, começaram a aparecer. Dentre elas, a transferência nuclear para células somáticas e sua posterior reprogramação, visando terapia paciente-específica, ou seja, evitando a rejeição imunológica. O progresso da reprogramação nuclear como o desenvolvimento de vetores para a introdução de genes proporcionou rapidamente o avanço da Engenharia Genética. As células obtidas por essa estratégia apresentam características bastante semelhantes à das ESC, devido à super-expressão de alguns genes como *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*, *Nanog* e *Lin 28* que foram suficientes para reprogramar fibroblastos murinos e humanos em células pluripotentes. Tanto a iPSC como ESC apresentaram a possibilidade de gerar teratocarcinomas. Além dessa semelhança, podem ser citadas também as conformidades morfológicas, fenotípicas, ou seja, presença dos mesmos marcadores de superfície e a capacidade de diferenciação em todas as linhagens celulares presentes em organismo adulto (Takahashi et al., 2006, Yu et al., 2008 e Yamanaka et al., 2009).

Além das ESC e das iPS, células-tronco adultas atraíram a atenção dos pesquisadores e tem sido intensamente estudadas. Apesar de ser demonstrado que as células-tronco adultas alogênicas são capazes de incentivar uma rejeição imunológica, também se apresentou a vantagem de essas células na secreção de fatores de crescimento desejáveis ao reparo tecidual, como por exemplo, no tratamento de grandes queimados. Nesse contexto, as células-tronco alogênicas são utilizadas, por exemplo, na Engenharia de Tecido de Pele, funcionando

juntamente com a matriz 3D, como curativo biológico, favorecendo o reparo tecidual (Ikada, 2006). De forma contrária aos dados relativos à rejeição imunológica das células-tronco alogênicas, alguns estudos mostraram que essas células apresentam capacidade de promover um ambiente favorável à recuperação tecidual, através do potencial imunorregulador. Em decorrência dessa atividade regulatória, foi demonstrado que as células-tronco tem baixa capacidade de estimular células T mesmo na presença de aloantígenos, provavelmente devido à ausência de expressão de MHC de classe II e baixa expressão de MHC de classe I. Estudos apresentaram, também, que várias moléculas, participantes das vias pró e anti-inflamatórias, estimulam as células-tronco na regulação da resposta imune. Por exemplo, INF γ estimula as células-tronco a produzirem e secretarem IDO (indoleamina 2,3-deoxigenase). Esta enzima cliva triptofano em kinurenina e conseqüentemente inibe a proliferação de células T (Ucelli et al., 2006).

Dentre as células-tronco adultas, consideradas multipotentes, tem-se as derivadas de medula óssea que despertaram a atenção dos pesquisadores devido às possibilidades de cura de doenças hematológicas e, portanto, inúmeros estudos tem sido realizados. De forma que a medula óssea foi caracterizada por ser constituída principalmente de dois grupos celulares: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e mesenquimais (CTM). As células-tronco hematopoiéticas (CTH) originam os componentes do sangue e do sistema imune e começaram a ser estudadas em 1964 por Lewis & Trobaugh. Essas células podem ser extraídas tanto do próprio paciente, denominadas autólogas e eventualmente de um doador, então consideradas alogênicas, Já as células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas de medula óssea foram estudadas pela primeira vez por Friedenstein e cols, 1966. Este pesquisador demonstrou que tais células tinham capacidade de aderir à superfície plástica da placa de cultura, além de diferenciar em osteoblastos e outras linhagens celulares (Friedenstein et al., 1966; Owen et al.,

1988; Conrad et al., 2004; Davila et al., 2004 e Gregory et al., 2005). Tais células representam uma promissora estratégia para a Engenharia de Tecidos, entretanto, a coleta dessas células na medula óssea apresenta baixo rendimento. Assim, se tornou necessária a busca de fontes alternativas de CTM tanto autólogas quanto alogênicas, que sejam de fácil obtenção, com rendimento maior de células, reduzindo significativamente o passo de expansão das células *in vitro* (Zuk et al., 2001; Rada et al., 2009). Diante dessas necessidades, o tecido adiposo apresenta-se como uma fonte alternativa de CTM (Zuk et al., 2002).

Da mesma forma que a medula óssea, o tecido adiposo é derivado do mesoderma embrionário, além de ser abundante no organismo é facilmente acessível. As CTM derivadas de tecido adiposo tem outras similaridades com as células-tronco derivadas de medula óssea no que se refere à morfologia, à capacidade de proliferação e à diferenciação. Essas células apresentam morfologia fusiforme, semelhantes a fibroblastos, são capazes de se aderir à superfície plástica da placa de cultivo e através de estímulos adequados são capazes de se diferenciar em diversas linhagens celulares (Zuk et al., 2001 e 2002).

Ao levar em consideração as possibilidades de diferenciação das células-tronco, de utilização como célula secretora de fatores de crescimento e do potencial imunorregulador, o objetivo da Engenharia de Tecidos é criar um ambiente bastante parecido com a MEC do tecido nativo *in vitro* a fim de promover e facilitar a diferenciação celular assim como a manutenção do fenótipo diferenciado. Nesse cenário, a matriz 3D visa imitar o microambiente tecidual, facilitando a regeneração do tecido comprometido tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O meio ambiente 3D utilizado para cultivo celular tem sido, portanto, apresentado com sucesso na Engenharia de Tecido, uma vez que baseado nessa idéia é possível criar um dispositivo biológico viável, que imite as condições fisiológicas do tecido nativo e permite o comportamento adequado das células *in vitro* e *in vivo* (Bonfield et al., 2006).

É sabido que quando um tecido ou um órgão é acometido por degeneração e apresenta deficiência na regeneração, seja devido às condições do paciente, como idade e saúde, ou devido à natureza do tecido ou órgão afetado, é necessária intervenção médica. Uma vez que em consequência a essa incapacidade de regeneração pode ser formada uma cicatriz, comprometendo a função do órgão ou tecido ou ainda, a lesão pode progredir, levando a degeneração tecidual. Portanto, o ponto de partida da Engenharia de Tecido é saber que o tecido em questão pode ser substituído e daí então partir para a criação de uma matriz 3D semelhante à MEC do tecido nativo. Essa semelhança favorece a interação adequada das células com a matriz 3D, o recrutamento de células “chaves” para o local da lesão e a comunicação entre as células, permitindo a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular tanto *in vitro* como *in vivo* (Bonfield et al., 2006; Hwang et al., 2006). Para criar esse ambiente semelhante à MEC do tecido nativo utilizam-se materiais especiais, denominados de biomateriais.

O emprego de biomateriais com a finalidade de reparar tecidos lesionados vem aumentando consideravelmente, graças à descoberta e ao desenvolvimento de novos materiais e a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação fisiológica desses com os organismos vivos (Jinakang et al., 2009; Tortelli e Cancedda, 2009). A maioria dos biomateriais são alternativas efetivas para a substituição de tecidos, pois não apresentam risco de transmissão de doenças e nem estimulam a rejeição imunológica, além de possivelmente serem disponíveis na natureza. Os biomateriais podem ser classificados em sintéticos (cerâmicas, metais, polímeros sintéticos); naturais (colágeno, quitosana, queratina, amido, polissacarídeo e tecidos naturais); e compósitos (compostos por mais de um tipo de material), segundo Caplan e cols (2001). De acordo com o propósito da Engenharia de Tecidos, os biomateriais são utilizados para criar as matrizes 3D, temporárias e semelhantes à MEC,

favorecendo o controle do comportamento celular, tal como adesão, proliferação, diferenciação, função e viabilidade das células, além disso, *in vivo* essa matriz deve ser degradada e conseqüentemente, promover o remodelamento tecidual (Bacakova et al., 2004).

Na criação das matrizes há duas direções diferentes que visam modular a interação célula-matriz 3D. Uma delas é criar uma matriz com superfície inerte de forma a não promover adesão celular, prevenindo ativação do sistema imune, coagulação sanguínea, trombose, deposição de MEC, além de outras interações entre o biomaterial e o microambiente do hospedeiro. Esse tipo de matriz, segundo Bacakova e cols (2004), tem sido aplicado na construção de próteses articulares, lentes intraoculares, dispositivos de contato direto com o sangue, como válvulas cardíacas, próteses vasculares, cateteres para hemodiálise e também para o carreamento de drogas terapêuticas.

A outra direção, ainda segundo esse mesmo autor, é considerada mais avançada e tem o objetivo de criar matrizes 3D que promovam interação direta com as células e o microambiente circundante, permitindo adesão, migração, proliferação, diferenciação, viabilidade em longo prazo e funcionamento celular, tais como contração ou secreção de MEC, de maneira controlável. Esses biomateriais podem gerar estruturas bidimensionais nas quais as células colonizam a superfície. Como exemplos podem ser citados as válvulas cardíacas ou próteses vasculares naturalmente trombo-resistente, não imunogênica, capazes de formar uma camada endotelial semipermeável. Além de implantes ósseos que induzam a formação de tecido ósseo mineralizado somente na interface do tecido nativo e matriz, ou também em substituto de pele contendo uma membrana fina e polimérica, com camada alimentadora de fibroblasto coberta por queratinócitos.

Para órgãos de maior complexidade, Bacakova e cols (2004) sugeriu ainda que a tendência atual da Engenharia de Tecido fosse criar o que se chamam de órgão bioartificial

híbrido. Entretanto, sendo grande a necessidade de biocompatibilidade e da biodegradabilidade *in vivo*, a matriz ainda necessitaria de algumas características específicas tais como: arquitetura 3D estável e organizada, capaz de simular a MEC do tecido nativo, apresentar porosidade necessária para permitir a formação de um leito vascular capaz de fornecer nutrição e oxigenação ao neotecido, assim como remover os resíduos metabólicos, além favorecer a adesão, a migração e a diferenciação celular (Jiankang et al., 2009). Essa matriz 3D pode ser colonizada *in vitro* por células obtidas do próprio paciente ou eventualmente por células de um doador e/ou por células comprometidas com uma determinada via de diferenciação induzidas por fatores de crescimento e/ou hormônios, por exemplo. Gradualmente essa matriz 3D deve ser degradada e substituída pela MEC neoformada e células diferenciadas. Portanto, a matriz 3D não deve ser considerada como substituto durável do tecido perdido ou danificado, mas como uma estrutura temporária que promova regeneração tecidual. Essa estratégia tem sido bastante explorada e utilizada na construção de vasos artificiais, ossos, cartilagens e órgãos parenquimatosos como pâncreas e fígado (Bakacova et al., 2004).

Diante do exposto, o tecido cartilaginoso se mostra bastante atraente aos olhos dos pesquisadores da área de Engenharia de Tecidos. De acordo com a revisão feita por Benedek (2006), esse tecido despertou a atenção de estudiosos desde antes de Cristo. Historicamente, há documentações do tecido cartilaginoso de 384 anos a.C atribuído a Aristóteles. Os estudos prosseguiram no que diz respeito à cartilagem e no século XIV depois de Cristo, Andreas Vesalius, o pai da Anatomia Moderna, corroborou com a informação de Galeno datada de 175 anos a.C de que a cartilagem não tinha sensibilidade e nem medula. Além disso, Vesalius também disse que ocorrem alterações na cartilagem relacionadas com a idade:

[...] Em jovens a cartilagem é macia, com a idade esse tecido enrijece, tornando-se frágil e friável [...]

A primeira descrição de osteoartrite foi relatada por Morgani e cols, 1741 que verificou em alguns cadáveres a ausência de cartilagem nas extremidades ósseas, coincidindo com o local de dor e de dificuldade de movimentação relatada por vários pacientes. Em 1743, Hunter descreveu que o tecido cartilaginoso não possuía vasos sanguíneos eficientes à circulação de hemácias e que lesões neste tecido não se curavam (revisado por Benedek et al., 2006).

O tecido cartilaginoso pode ser acometido por lesões traumáticas devido a acidentes desportivos ou automobilísticos, por exemplo, e/ou por degeneração devido ao envelhecimento. Esse tecido encontrado nas articulações ósseas tem a função de manter essa região lubrificada, promovendo a movimentação dos membros sem desgaste dos ossos. Além disso, a cartilagem é formada por apenas um tipo celular, denominado de condrócito, embebido em MEC bastante hidratada composta principalmente de fibras de colágeno, principalmente do tipo II, que garantem a forma e a resistência da matriz; proteoglicanos, que fornecem resistência mecânica; elastina, glicoproteínas e glicosaminoglicanos (GAG) (revisado por Tortelli & Cancedda, 2009). Entretanto, a ausência de vascularização impede a migração de células progenitoras e inflamatórias ao local da lesão, dificultando a regeneração do tecido. Sabe-se que não há um processo de auto-reparo eficiente no tecido cartilaginoso, devido à ausência de vasos sanguíneos e dessa forma a lesão tende a progredir formando uma artrite degenerativa, extremamente dolorosa e reduzindo significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Guo et al., 2006; Hwang et al., 2006; Hoffmann et al., 2009; He et al., 2009 e revisado por Chiang et al., 2009).

Os primeiros tratamentos de osteoartrite visavam apenas em aliviar os sintomas. Posteriormente, pensou-se em uma possível intervenção cirúrgica, denominada condroplastia. Entretanto, a abrasão e o debridamento necessários nessa intervenção foram desfavoráveis à

recuperação do tecido. Vários estudos foram realizados e desde a década de 90, implantes de próteses vem sendo utilizadas para substituir o tecido lesado, porém micro-movimentações acarretam na necessidade de trocas periódicas desta prótese. Outra tentativa foi o implante de alo-cartilagem, mas apesar da natureza avascular do tecido cartilaginoso ocorreu rejeição imunológica (Chiang et al., 2009). Portanto, diante de tantas tentativas sem sucesso ainda hoje, buscam-se alternativas para o tratamento de lesões em tecido cartilaginoso.

Estudos para a criação de tecido cartilaginoso *in vitro* iniciaram em 1998 por Johnstone e cols. Esse pesquisador desenvolveu um modelo de cultivo de células baseado em agregado celular, denominado de micromassa. Essa micromassa foi cultivada em meio de cultura quimicamente definido, levando à geração de uma estrutura 3D semelhante à cartilagem hialina. Detectou-se nessa cultura a presença colágeno dos tipos II e X, porém a expressão de colágeno do tipo X confirmou que a cartilagem se apresentava hipertrófica, ou seja, essa forma de cultivo favoreceu a ossificação endocondral. Portanto, não foi satisfatório para o tratamento de cartilagem articular. Esse tipo de cultura permitiu, posteriormente, que os estudiosos concluíssem que era necessário criar um modelo de cultivo celular com propriedades mecânicas uniformes, além da necessidade de um sistema de perfusão de nutrientes e metabólitos (Johnstone et al., 1998 e revisado por Tortelli & Cancedda, 2009).

Diante dessas necessidades, os pesquisadores projetaram matrizes artificiais 3D compostas por polímeros sintéticos, sendo pioneiro o uso de poliuretano. O poliuretano é um biomaterial biodegradável capaz de promover adesão celular e síntese de proteínas específicas da MEC de tecido cartilaginoso. Esse polímero apresentou-se como um grande avanço na Engenharia de Tecidos, uma vez que foi possível estabelecer uma matriz 3D com propriedades mecânicas capaz de estimular as células a sintetizarem proteoglicanos e colágeno do tipo II, sugerindo o papel ativo dessa matriz na manutenção do fenótipo

condrocitário (revisado por Tortelli & Cancedda, 2009). Ainda segundo esses autores, outros biomateriais sintéticos foram utilizados para criar matrizes artificiais 3D com intuito de substituir o tecido cartilaginoso comprometido.

Recentemente, Jung e colaboradores (2008) desenvolveram uma matriz 3D bastante elástica à base de poli (L-lactideo co- ϵ -prolactona) – PLCL – apesar de haver diferenciação e proliferação celular, outras análises *in vitro* mostraram que essa matriz quando colonizada por células e incubada de modo estático e sem estímulo mecânico não apresentava propriedades condrogênicas. Entretanto, quando essa matriz foi analisada *in vivo*, percebeu-se que a mesma era capaz de transmitir sinais mecânicos ao microambiente biológico, favorecendo a adesão de condrócitos. Esse ensaio sugeriu que matrizes 3D com alta performance *in vivo* podem não promover *in vitro* a diferenciação das células. Portanto, ficou confirmado que matrizes 3D à base de polímeros sintéticos são promissoras na formação de cartilagem *in vitro*, principalmente se forem melhorados os parâmetros de cultivo, tais como tensão de oxigênio e estímulos mecânicos. Entretanto, polímeros sintéticos tem baixa eficiência na adesão celular e apresentam pobre retenção da MEC neoformada (revisado por Tortelli & Cancedda, 2009).

Segundo Tortelli & Cancedda (2009), a associação de polímeros sintéticos a proteínas formando hidrogel ou compósito tem apresentado grande sucesso na Engenharia de Tecido Cartilaginoso. Hidrogéis são formados por uma rede polimérica, hidrofílica, 3D, comumente utilizada para mimetizar MEC de tecido cartilaginoso. Estudos sugeriram que a diferenciação das CTM sedimentadas em hidrogéis 3D dependia diretamente da natureza do biomaterial, entretanto ainda serão necessários mais estudos a fim de compreender o processo de diferenciação em matrizes a base de hidrogel e de polímeros sintéticos.

Pesquisadores da área de Engenharia de Tecidos despertaram um grande interesse em polímeros naturais, devido à biocompatibilidade e funcionalidade. Dentre eles, o colágeno

tem sido explorado por induzir uma alta taxa de proliferação e síntese de MEC do tecido cartilaginoso. O ácido hialurônico, o principal polissacarídeo encontrado em MEC de tecidos mesenquimais embrionários, apresenta propriedades condroindutivas e pode ser utilizado na construção de cartilagem *in vitro* (revisado por Tortelli & Cancedda, 2009). Já a quitosana derivada da quitina, polissacarídeo presente em exoesqueleto de artrópodes, possui natureza catiônica e semelhança com GAG, tal característica atraiu a atenção para a quitosana, uma vez que estudos demonstraram que esse polímero retém o agregano secretado pelos condrócitos, portanto ajuda a restaurar a função do núcleo pulposo dos discos intervertebrais (Roughley et al., 2006). Outros polímeros naturais, Alginato e Agarose, derivados de algas marinhas, são tipicamente inertes devido à ausência de ligantes para interação com células de mamíferos. Entretanto, esses polímeros podem apresentar vantagens para a Engenharia de Tecido, uma vez que a possibilidade de formar hidrogéis injetáveis minimiza a invasividade do procedimento de inserção da matriz 3D no organismo hospedeiro (Awad et al., 2004).

Portanto, uma das possibilidades para a substituição do tecido cartilaginoso degenerado é a Engenharia de Tecidos e um dos principais desafios dessa técnica está associado à escolha do biomaterial para criar a matriz 3D, capaz de formar poros promovendo a tridimensionalidade do meio ambiente para cultivo celular *in vitro*. Em relação aos biomateriais há vários critérios que maximizam a chance de sucesso do reparo: biocompatibilidade, biodegradabilidade, crescimento facilitado do tecido funcional e propriedades mecânicas adequadas (Awad et al., 2004). Baseado nessas características e agregando o baixo custo e a disponibilidade dos biomateriais na natureza, os escolhidos neste trabalho foram quitosana e gelatina. Segundo Jiankang e cols (2009), a matriz 3D de quitosana e gelatina é biodegradável, além de possuir arquitetura organizada, com poros o que garantem a neoformação de um leito vascular, proporcionando a regeneração tecidual. De

acordo com Thei Han e cols (2009), matrizes 3D de quitosana e gelatina tem atividade biológica aumentada, devido à sequência tipo-RGD (Arg-Gli-Asp) que são motivos moleculares mínimos de adesão.

Quitosana é um polímero natural hidrofílico derivado da quitina, polissacarídeo constituinte do exoesqueleto de artrópode, portanto abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose e tem sido amplamente estudada para aplicações clínicas, tanto na Engenharia de Tecidos quanto na liberação de drogas *in vivo*. Quitosana é composta de ligações 1→4 D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina e é obtida da deacetilação de quitina, em meio alcalino. Apresenta-se insolúvel em água, em soluções básicas e na maioria dos solventes orgânicos, entretanto podem ser diluídas em soluções ácidas. Algumas das principais vantagens desse biomaterial são: biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e antitumoral, além do baixo custo. Foi observado que quanto maior o grau de deacetilação da quitosana, maior é a capacidade de promover adesão celular devido ao aumento de hidrofobicidade (Mao et al., 2003). Com a finalidade de melhorar o potencial de adesão da quitosana, algumas estratégias tem sido propostas. Uma delas é a associação a outro polímero com características complementares (Medrado et al., 2006; Machado et al., 2007; Coutinho et al., 2008; Gomes et al., 2008; Martins et al., 2008; Duarte et al., 2009 e Thei Han et al., 2009).

Para atender a essa necessidade, a gelatina, um polímero natural, derivado de colágeno apresenta-se bastante atraente e, por conseguinte tem sido recentemente utilizada na composição de matrizes 3D em Engenharia de Tecidos seja cartilaginosa, hepática ou óssea. Segundo Awad e cols (2004), pouco se sabe sobre as propriedades mecânicas e funcionais desse biomaterial. Estudos mais recentes demonstraram que a gelatina derivada do colágeno parcialmente hidrolizado, aumenta consideravelmente a adesão celular (Jiankang et al., 2009), permitindo um melhor comprometimento das CTM na diferenciação condrogênica (Awad et

al., 2004). Atualmente, demonstrou-se que a gelatina além de ser uma proteína solúvel, possui vários atributos que a torna um material adequado para Engenharia de Tecido, tais como baixo custo, promoção da adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Medrado et al., 2006; Machado et al., 2007 e Thei Han et al., 2009).

Nos últimos dez anos, estudos mais específicos mostraram que a união de quitosana e gelatina tem sido bastante interessante no âmbito da Engenharia de Tecido e com grande potencial de aplicação clínica. Em 1998, Eser Elçin e colaboradores demonstraram que associação de gelatina à quitosana aumentou a área de superfície do substrato de cultivo, melhorando a adesão celular e a citocompatibilidade. Esse estudo foi o primeiro a introduzir a aplicação de matrizes 3D a base de quitosana como substrato de adesão celular com potencial de aplicação na Engenharia de Tecido Neural. Ainda em relação ao sistema nervoso, Ciardelli & Chiono (2006) revelaram que quitosana e gelatina poderiam ser eficazes na regeneração de nervos periféricos, servindo de guias artificiais. Risedred e colaboradores (2001) demonstraram o potencial do compósito de quitosana e gelatina na aplicação da Engenharia de Tecido Traqueal. Em 2006, foi a primeira vez que se testou a quitosana na criação de uma matriz tubular no intuito de desenvolver vasos sanguíneos para a Engenharia de Tecido Vascular (Zhang et al., 2006). Mais recentemente, em 2007 a união de ácido hialurônico ao compósito de quitosana e gelatina objetivou em melhorar as propriedades desse compósito, de forma que o procedimento de preparo da matriz através de congelamento e liofilização permitiu a criação de uma matriz 3D porosa, possibilitando o cultivo de queratinócitos e fibroblastos *in vitro*. Esse estudo demonstrou que matrizes 3D de quitosana e gelatina com ácido hialurônico são promissoras para a criação de epitélio de pele *in vitro*. Além desses estudos, quitosana e gelatina tem sido aplicadas na Engenharia de Tecido Hepático (Jiankang et al., 2006), Ósseo (Machado et al., 2007) e Pancreático (Yang et al., 2008), além de servir como substrato para

reconstrução da córnea (Gao et al., 2008) e potencialmente para utilização na restauração do tecido cartilaginoso (Breyner et al., 2009).

Para garantir o sucesso da Engenharia de Tecidos, o processo de degradação da matriz 3D *in vivo* deve ser controlado de modo que a produção de MEC pelas células diferenciadas vão substituindo a matriz provisória 3D pela matriz funcional (Bacakova et al., 2004). Para aumentar o tempo de degradação da matriz 3D tanto *in vitro* quanto *in vivo*, reticulantes são comumente utilizados. O glutaraldeído é um dos reticulantes mais utilizados na Engenharia de Tecido, favorecendo a criação de matrizes 3D porosas estáveis, através da técnica de congelamento e liofilização (Hoffman et al., 2009). Apesar de ser bastante utilizado, o glutaraldeído tem apresentado efeitos citotóxicos e limitações em reagir com moléculas acetiladas. Na tentativa de superar essas limitações, novos reticulantes tem sido propostos.

Dentre eles, um novo reticulante de origem natural, denominado genipina, tem demonstrado ser menos tóxico (*in vitro* e *in vivo*) que o glutaraldeído (Englert et al., 2007). A genipina é de origem vegetal, derivado da fruta do genipapo (*Gardennia jasminoides* Ellis) e tem apresentado boa capacidade em aumentar as propriedades mecânicas de biomateriais compostos de proteínas, formando poros estáveis e atrasando a degradação (Al Ammar et al., 2009; Beier et al., 2009).

O comportamento das células é influenciado tanto pela qualidade da matriz 3D, quanto pelos estímulos bioquímicos. O meio no qual as células são cultivadas pode ser enriquecido por fatores de crescimento e estimular essas células a se diferenciar no tecido desejado. Os fatores de crescimento são essenciais para auxiliar na diferenciação celular e na regeneração tecidual. Em relação ao tecido cartilaginoso, as células-tronco devem ser estimuladas em se diferenciar em condrócitos, células especializadas do tecido cartilaginoso que expressam e secretam colágeno do tipo II. Para atingir esse objetivo, fatores de crescimento e hormônios

são usados para diferenciação e manutenção do fenótipo condrocitário, mas pouco se sabe ainda sobre as vias de sinalização intracelular envolvidas. Estudos apresentaram que esse processo de diferenciação é ativado principalmente através da presença de TGF- β e dexametasona (Raghunath et al., 2005; Betre et al., 2006; James et al., 2007; Melrose et al., 2008 e Mueller et al., 2008). Lee e cols (2004) e Melrose e cols (2008) descreveram que o TGF- β tem papel importante na diferenciação condrocitária de células-tronco mesenquimais, elevando a síntese de colágeno do tipo II através da super-regulação do gene *Sox-9*. Mueller e cols (2008) acreditam que a dexametasona pode levar a hipertrofia condrocitária, estimulando a síntese de colágeno do tipo X, o que acarretaria na mineralização do tecido. Desse modo, seria formado tecido ósseo a partir da ossificação endocondral em detrimento do tecido cartilaginoso. Entretanto, a maioria dos trabalhos utiliza meio indutor condrogênico contendo a associação de dexametasona e TGF- β , de forma que essa interação se mostra necessária ao processo de diferenciação celular (Otto et al., 2004; Medrado et al., 2006; Huang et al., 2006 e Koay et al., 2007).

O grande avanço da engenharia de tecido cartilaginoso permitiu utilização de modelos de matrizes 3D poliméricas semelhantes ao microambiente tecidual. Essa semelhança é importante para garantir papel ativo da matriz 3D na manutenção do fenótipo diferenciado das células condrocitárias, ou seja, a contínua expressão de colágeno do tipo II e a ausência de mineralização (Tortelli & Cancedda, 2009). Portanto, a construção de uma matriz 3D que possui gelatina, semelhante a colágeno, unida à quitosana que se assemelha quimicamente e estruturalmente aos glicosaminoglicanos, ambos presentes em MEC de tecido cartilaginoso se mostrou adequada a um dos objetivos da Engenharia de Tecidos.

A necessidade de buscar novas estratégias para o tratamento do tecido cartilaginoso tem chamado a atenção dos pesquisadores. Ainda testam-se os polímeros e suas combinações,

avaliam a metodologia adequada para criação de poros e o desenvolvimento de um reticulante menos tóxico e mais eficiente. Em relação a outros objetivos da Engenharia de Tecido, as células mais atraentes são as células autólogas, porém deve ser levado em consideração a fonte dessas células, além do estado geral do paciente. As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo tem sido muito estudadas e conseqüentemente, com grande potencial de aplicação na Engenharia de Tecidos. Porém, ainda existem obstáculos no processo de diferenciação dessas células em relação às vias pelas quais elas são estimuladas à diferenciação.

Finalmente, conhecer com detalhes as características e os mecanismos fisiológicos do tecido cartilaginoso é imprescindível para projetar e escolher as ferramentas a serem utilizadas na Engenharia de Tecido Cartilaginoso. Portanto, esse estudo tem como finalidade apresentar a combinação de dois polímeros naturais com características complementares, quitosana e gelatina, unidos ao potencial de diferenciação das CTM estimuladas com fatores de crescimento com potencial de aplicação na regeneração de tecido cartilaginoso lesado. Acredita-se que este estudo contribuirá muito para o futuro da Engenharia de Tecido cartilaginoso. Além disso, preconiza-se nesse estudo oferecer um modelo para promover a regeneração do tecido cartilaginoso, que possa melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores de degeneração condrocitária.

Objetivos

Objetivos

Objetivo geral

Desenvolver matrizes 3D à base de quitosana e gelatina, visando o cultivo e a diferenciação de células-tronco derivadas de tecido adiposo de ratos, capazes de promover respostas biológicas (*in vitro*) e funcionais (*in vivo*) para potencial aplicação na Engenharia de Tecido Cartilaginoso.

Objetivos específicos

Objetivos específicos

- 1- Estabelecer e caracterizar fenotipicamente Células-Tronco Mesenquimais de tecido adiposo de *Rattus norvegicus albinus* linhagem Wistar e Lewis transgênicos para expressão de eGFP (expressão da proteína fluorescente verde).
- 2- Avaliar o potencial condrogênico das CTM extraídas de tecido adiposo de ratos da linhagem Wistar, através da proliferação celular, atividade da enzima fosfatase alcalina, síntese de colágeno total, expressão de colágeno tipo II.
- 3- Desenvolver matrizes 3D de quitosana e gelatina: (i) reticulada com glutaraldeído e (ii) reticulada com genipina.
- 4- Avaliar a porosidade e sua interconectividade e a citotoxicidade das matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído e genipina.
- 5- Verificar a biofuncionalidade e biorreabsorção *in vivo* das matrizes 3D não colonizadas e colonizadas por CTM.
- 6- Avaliar a manutenção do fenótipo das células-tronco diferenciadas previamente por 3 semanas e colonizadoras das matrizes 3D após longo período de implante *in vivo*, através da permanência da expressão de colágeno do tipo II.

Materiais e métodos

I – Modelos animais

Para esse estudo foram utilizados *Rattus norvegicus albinus*, n = 30, macho e fêmea, da linhagem Wistar, adultos de 4 a 6 semanas de idade, obtidos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Além desses animais foram utilizados ratos da linhagem Lewis, n = 5, 4 a 6 semanas de idade, transgênicos para proteína verde fluorescente – GFP (LEW-Tg eGFP F455/Rrrc) cujas matrizes foram provenientes da Universidade de Missouri nos Estados Unidos da América. As alterações genéticas desses animais transgênicos foram caracterizadas pela presença do vetor lentivirus, contendo o gene eGFP sob o controle do promotor de ubiquitina C. Os experimentos realizados *in vivo* foram conduzidos seguindo-se as normas de ética em experimentação animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA/ UFMG), protocolo 153/2006.

II - Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de ratos

Obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e cultivo primário

Os ratos da linhagem Wistar, macho ou fêmea, com idades entre 4 e 6 semanas foram eutanasiados utilizando uma solução de *overdose* de quetamina e xilazina 1:1 (0,35mL/100g) via intraperitoneal. Após a morte do animal, realizou-se a tricotomia da região abdominal, seguida de assepsia utilizando PVPI (Difluoreto de Polivinilideno - Johnson). Em um fluxo laminar, foi feita uma incisão na região abdominal, expondo o peritônio para a retirada da

gordura inguinal. A seguir, essa gordura foi cuidadosamente conservada em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco, Paisley, UK) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB- Sorallis, Brasil) em tubo de 50 mL até o seu processamento. A fim de separar as CTM da fração adipocitária realizou-se digestão enzimática, com solução de colagenase do tipo II (Sigma, St Louis MO, USA). A solução de colagenase foi preparada em uma concentração final de 0,15%, diluída em PBS 0,15M e filtrada em membrana de PVDF (Difluoreto de Polivinilideno) 0,22 μ m (Millipore ®). O tecido adiposo ficou incubado nessa solução por 60 minutos em estufa (37°C, 5% de CO₂) e periodicamente agitado, com intervalos de 15 minutos. Após esse período de 60 minutos, centrifugou-se a 1400 rpm durante 10 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante. O precipitado contendo CTM foi ressuspendido em meio DMEM suplementado com 10% SFB e, então colocado em frascos de cultura celular de 75 cm² - T75 (TPP, Suíça) e incubado em estufa de CO₂ a 37°C para o crescimento e a expansão das células. O meio de cultura foi trocado 2 vezes por semana. Aos 21 dias, quando as células atingiram em torno de 90% confluência, realizou-se digestão enzimática, com solução de 0,25% tripsina/EDTA (Sigma). Esse tratamento permitiu a purificação, o cultivo e a expansão da população. As células foram mantidas em cultura com repiques sucessivos no máximo até a quinta passagem, a fim de evitar a senescência proliferativa, quando, então, as células foram utilizadas (Zuk et al., 2001 e revisado por Otto et al., 2004).

Para alguns experimentos foram utilizadas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de ratos da linhagem Lewis, de 4 a 6 semanas, transgênicos para a proteína eGFP. O procedimento para obtenção e manutenção destas células foi exatamente o mesmo para a obtenção da CTM derivada de tecido adiposo de ratos da linhagem Wistar.

Meio de cultura basal

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco) foi dissolvido em 1000 mL de água deionizada e enriquecido com 5mM de bicarbonato de sódio (Merck). Em seguida, o pH foi mensurado e acertado para 7,2. Em seguida, foi adicionado uma ampola de gentamicina (60mg, Ariston, Brasil), 10 mL de penicilina, estreptomicina e ampicilina (PSA, Gibco) e suplementado com 10% de SFB. Finalmente, o meio foi filtrado em membrana de PVDF 0,22µm para assim ser utilizado e estocado em geladeira por período máximo de 3 semanas (Zuk et al., 2001 e 2002).

Citometria de fluxo

As células-tronco derivadas de tecido adiposo de rato da linhagem Lewis eGFP e da linhagem Wistar foram cultivadas e expandidas *in vitro* e caracterizadas por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular CD 73, CD 54, CD 90 e CD 45 (Zuk et al., 2002 e revisado por Otto et al., 2004 e Ucelli et al., 2006). Esse ensaio foi realizado com células na 5ª passagem, cultivadas em meio DMEM + 10% de SFB.

Marcação celular com anticorpos primários e secundários

1×10^6 CTM derivadas de tecido adiposo foram incubadas durante 30 minutos a 4°C com 0,4 µg de anticorpos monoclonais de camundongo IgG1 anti CD54, CD45, CD73 e CD90 (Abcam, USA). Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 0,15M e incubadas com 0,4 µg do anticorpo secundário policlonal de cabra anti-IgG1 de camundongo marcado com FITC (Fluoresceína tiocianato – Calbichem, USA), durante 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS 0,15M e depois fixadas em PBS 0,15M contendo 2% de formaldeído e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD, San Jose,

CA, USA). Como controle negativo da reação, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade a fim de estabelecer a população a ser analisada, como mostra a figura 3.

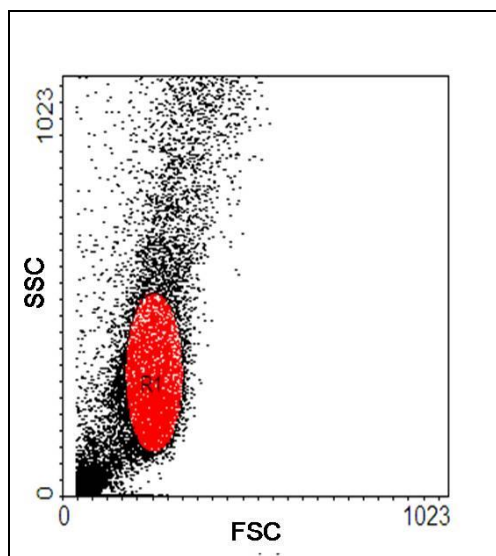


Figura 3 - Gráfico granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) gerado pelo Cell Quest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Leitura no FACScan (BD Immuncitometry System , San Jose, CA)

Um mínimo de 20.000 eventos foi adquirido, utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para captura de fluorescência. Os dados foram analisados no programa WinMid 2.8. Inicialmente, a população de células estudadas foi delimitada através de regiões definidas no gráfico tamanho *versus* granulosidade gerado pela análise de células não marcadas, baseado nos dados obtidos por Zuk e cols (2001 e 2002). Posteriormente, foi utilizado um gráfico de histograma para delimitar a região do controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. A partir da definição desses parâmetros, iniciou-se a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários. Conforme a figura a seguir:

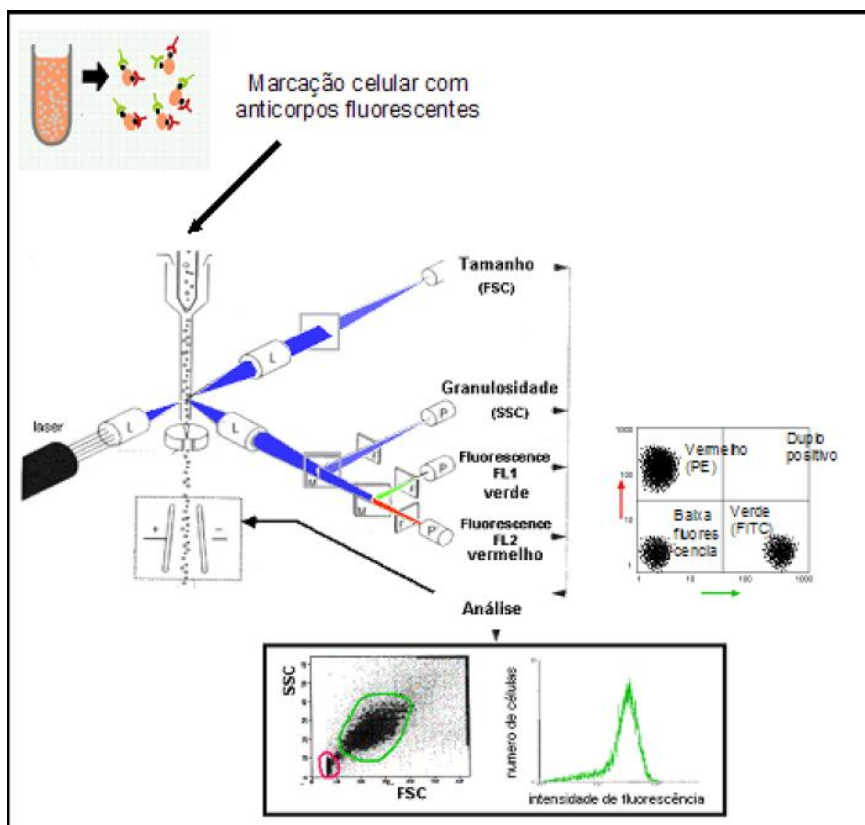


Figura 4 - Representação esquemática da citometria de fluxo. Após a marcação celular utilizando FITC ou PE, as células são submetidas a citometria de fluxo e a intensidade da fluorescência é interpretada pelo programa CellQuest. Os dados obtidos são analisados pelo programa WinMid 2.8.

Meio indutor de condrogênese

O meio indutor condrogênico foi feito baseado no protocolo revisado por Otto, 2004 e realizado por Medrado e cols (2006); Huang e cols (2006) e Koay e cols (2007). Foram utilizados 10µg TGF-β3 recombinante (Bioclone), 10⁻⁷M de dexametasona (Sigma), 50µg/ml de ácido ascórbico (Sigma), 6,25µg/ml de insulina (Biobras), 6,25µg/ml de transferrina (Sigma), 1mM de piruvato (Sigma), 1,25µg/ml de BSA (Sigma). Para esterilização, essa solução foi filtrada em membrana de PVDF 0,22 µm (Millipore) e o completou-se o volume para 100 mL com DMEM (PSA/G - Gibco) acrescido de 1% de SFB. O meio indutor de condrogênese foi estocado em geladeira por no máximo 2 semanas.

Diferenciação das CTM em cultivo bidimensional

Após a 4ª passagem, as CTM passaram pelo processo de tratamento enzimático utilizando tripsina e foram transferidas e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² (TPP, Suíça), contendo meio indutor de condrogênese por 1, 3, 6 e 9 semanas para avaliar proliferação e diferenciação celular. Para demonstrar a diferenciação através da ampliação de transcritos gênicos de colágeno do tipo II, β -1 actina e osteopontina, células-tronco foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² (TPP, Suíça), contendo meio indutor de condrogênese por 1, 3, 6 e 9 semanas. Finalmente, CTM foram cultivadas em meio indutor de condrogênese por 9 semanas para verificar a expressão de CD90, CD45, CD54, CD73, colágeno II e osteocalcina, através de imunofluorescência.

Ensaio 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 dimetilthiazol (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 et al., 1983).

Para realizar esse ensaio foi retirado o meio de três poços de cada placa de cultura contendo 1×10^5 células por poço cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB (controle) por 24 horas e meio indutor condrogênico por 1, 3, 6 e 9 semanas. Para realizar o ensaio retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 1mL/poço de PBS 0,15M para lavagem. Em seguida, foram adicionados 210 μ L de meio DMEM (PSA/G) e posteriormente adicionaram-se 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 a reação foi solubilizada com 210µL da solução de HCl-10% SDS/poço por 24 horas. O controle (branco) consistia de uma solução de 210µL do meio de cultura, 170µL de solução de MTT e 210µL de HCl-10% SDS. O resultado da reação de solubilização foi lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm (Ocarino et al., 2008). A leitura foi realizada em triplicata.

Extração de RNA e RT- PCR

Extração de RNA total e síntese de cDNA

Extraíu-se o RNA total das CTM cultivadas em meio indutor de diferenciação por 0, 1, 3, 6 e 9 semanas. Foi utilizado 1mL do reagente Trizol (Gibco) em cada frasco contendo as células em diferenciação. A reação (Trizol-células) foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200µL de clorofórmio, seguindo-se agitação vigorosa. Outra incubação foi realizada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada (13500 rpm, 15 minutos a 4°C). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500µL de álcool isopropílico gelado. A amostra foi incubada novamente por 10 minutos, à temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugada (13500 rpm, 15 minutos à 4°C). O sobrenadante foi retirado por inversão cuidadosa do tubo e o RNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75%. Após a centrifugação (11500 rpm, 5 minutos a 4°C) e descarte do sobrenadante, o RNA foi solubilizado em 20µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 DNase Promega) a 37°C por 30 minutos em tampão apropriado. A seguir a reação foi interrompida pela adição de 20nM de EGTA e a DNase foi inativada por 10 minutos a 65°C.

A quantificação do RNA foi efetuada em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias 260/280nm.

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit *Superscript III RT* (Invitrogen, Life Technologies). O cDNA foi sintetizados a partir de 1,0µg de RNA total. A cada amostra foram adicionados 2,5µM de oligodT e 1mM de dNTP. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C, seguidos por 1 minuto a 4°C. Adicionou-se: tampão apropriado para a reação de transcrição reversa contendo 10mM MgCl₂ e 8mM DTT; 40U de RNAs *out* e 200U de transcriptase reversa (*Superscript III RT*). A reação ocorreu por 50 minutos a 50°C, seguindo-se 5 minutos a 85°C. Em seguida, as amostras foram tratadas com 2U RNase H de *E.coli* por 20 minutos a 37°C, de acordo com o fabricante.

PCR (Reação em cadeia da Polimerase)

O cDNA sintetizado foi utilizado na reação de amplificação dos genes de colágeno do tipo II, osteopontina e, como controle positivo, β-1 actina. As reações de amplificação do cDNA foram realizadas com um aquecimento inicial de 94°C por 2 minutos para desnaturação da dupla fita. Em seguida, foram realizados 30 ciclos de 60°C por 45 segundos para o anelamento dos iniciadores dos respectivos genes. De forma que cada par de iniciador foi utilizado em uma reação específica, ou seja, não houve mistura dos pares de iniciadores. Posteriormente, as reações foram aquecidas a 72°C por 45 segundos e 72°C por 10 minutos, promovendo a extensão dos amplicons. As reações foram realizadas em um termociclador (PTC-100 MJ Research, Inc.). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio para sua visualização em luz UV.

Os iniciadores utilizados nas reações foram desenhados com o uso do programa *Primer Express* (Applied Biosystems), analisados no programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para verificação de sua especificidade e do programa *GeneRunner* (Hastings Software) para verificação das condições de formação de estruturas como *hairpins* e *dimers*. Sempre que possível os *primers forward* (senso) e *reverse* (antisenso) foram desenhados em éxons separados.

Iniciadores (<i>primers</i>)	
Colágeno II (Senso) GCGTGAGGTCTTCTGTG	Colágeno II (Antisenso) GGAGACTACTGGATTGA
Actina (Senso) CTCCTTAATGTCACGCACGATTC	Actina (Antisenso) GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
Osteopontina (Senso) CCCACAGACCCTTCCAAGTA	Osteopontina (Antisenso) AACCCACTATCACCTCGGC
GFP (Senso) ACGACGGCAACTACAAGACC	GFP (Antisenso) GTCCTCCTGAAGTCGATGC

Tabela 1 - Sequência senso e antisense dos primers utilizados para amplificação dos segmentos gênicos: Colágeno II, β -actina e osteopontina.

Atividade da enzima fosfatase alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) em células pode ser observada e quantificada através do ensaio BCIP-NBT (*5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate - nitroblue tetrazolium*) (GIBCO). BCIP-NBT é usado como substrato para a enzima FA que 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 de cor púrpura (Figura 5).

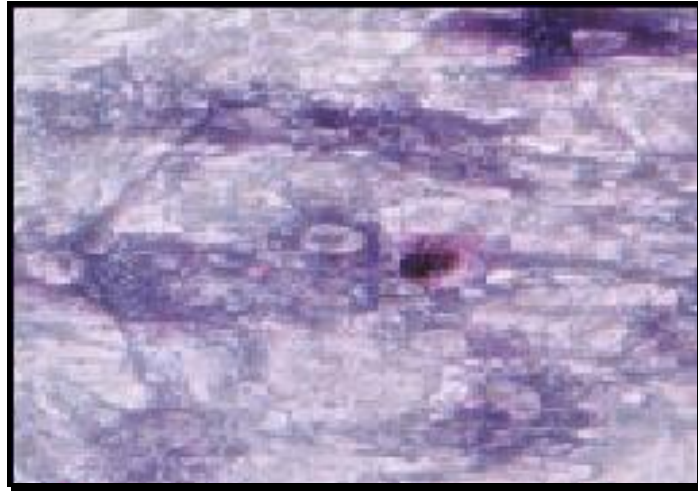


Figura 5 - Marcação da enzima fosfatase alcalina presente nas células tronco de tecido adiposo após reação com NBT- BCIP (100X). Fonte: Natália Martins Breyner.

CTM indiferenciadas e em diferenciação condrogênica foram cultivadas numa densidade de 1×10^5 células/poço em meio DMEM com 10% de SFB (controle) por 24 horas e meio indutor condrogênico por 1, 3, 6 e 9 semanas, respectivamente. Para realização do ensaio de FA o meio de cultivo foi retirado e, em seguida, foi adicionado 200 μ l de solução de BCIP/NBT (GIBCO) – descrita a seguir. A reação ocorreu por 2 horas em estufa (5% de CO₂ / 37°C) e foi solubilizada com 210 μ L da solução de SDS-10% HCl por 12 horas. O controle (branco) foi feito com 300 μ L de meio de cultura acrescido de 100 μ L de solução NBT-BCIP-tampão fosfato. A quantificação da produção de FA das reações foi feita baseada no gráfico abaixo (curva padrão), onde se tem as quantidades conhecidas de Fosfatase Alcalina *versus* o valor da absorbância. As reações foram lidas no espectrofotômetro a uma absorbância de 595 nm (Ocarino et al., 2008 e Valerio et al., 2005). Os valores de absorbância obtidos nas dosagens conhecidas foram comparados com os valores das amostras. As leituras foram feitas em triplicatas.

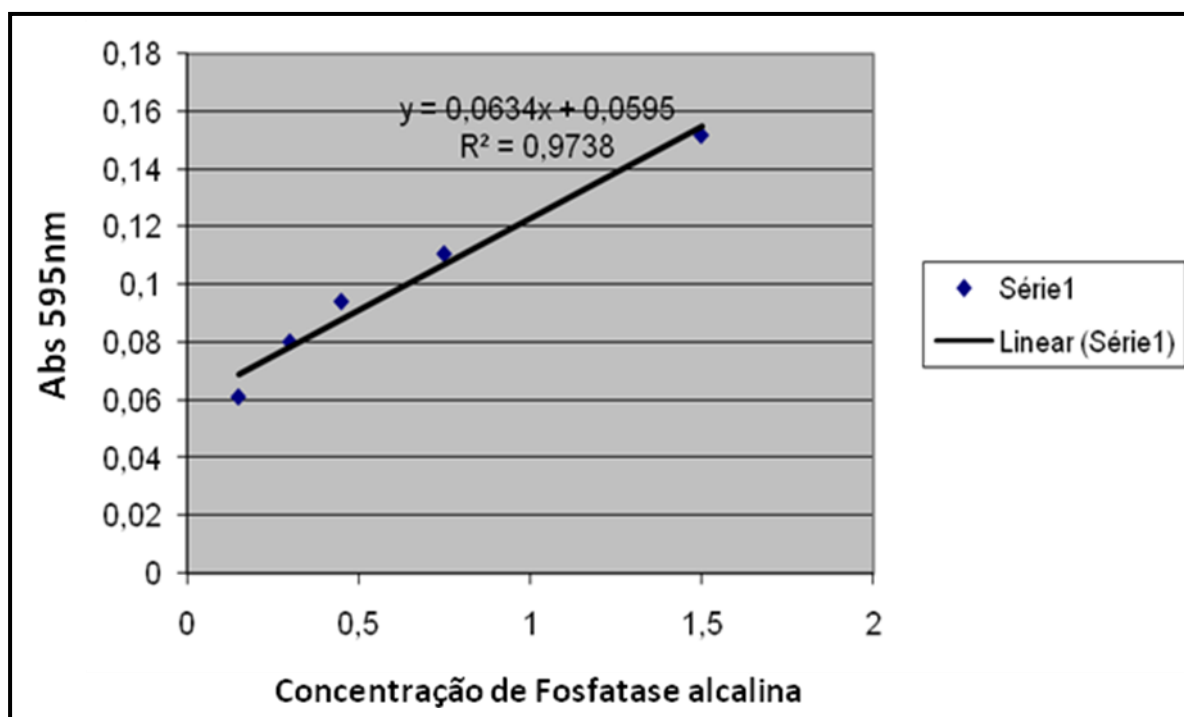


Figura 6 - Equação da reta. Dosagem da fosfatase alcalina, no eixo X expressa-se a concentração da enzima, no eixo Y as absorvâncias

Solução NBT-BCIP

Para diluir os reagentes utilizou-se o Tampão fosfato. Esse tampão foi feito utilizando 0,242 g Tris, 0,584 g NaCl e 0,1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ dissolvidos em 80 mL de água Milli-Q. O pH foi ajustado para 9,5 e o volume completado para 100 mL. Para o preparo da solução NBT-BCIP-Tampão fosfato, foram homogeneizados 1mL de tampão fosfato, 4,4 μL de NBT e 3,3 μL de BCIP, conforme instruções do fabricante.

Síntese de colágeno total

A dosagem do colágeno foi realizada através de marcação com *SIRCOL Collagen Assay* (Biocolor) (Valerio et al., 2005). 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 pelos tripeptídeos [Gli-X-Y]. Esse ensaio não diferencia os tipos de colágeno entre si, somente a expressão total dessa proteína. O ensaio da dosagem de colágeno foi realizado utilizando células que foram cultivadas numa densidade de 1×10^5 células por poço em meio DMEM com 10% de SFB por 24 horas e meio indutor condrogênico, nos tempos pré-estabelecidos (1, 3, 6 e 9 semanas).

O procedimento inicial para realizar o ensaio de dosagem de colágenos é a retirada do meio de cultura dos poços que contém as células e a posterior fixação dessas células com 1mL/poço de Fixador Bouin por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados com bastante água e para secar, foram deixados à temperatura ambiente. Após o período de secagem, em cada poço foi utilizado 0,6 mg de *Sircol Red* em 1 mL/poço de ácido pícrico. A reação foi incubada sob agitação por 30 minutos, a 37°C, após esse período retirou-se o sobrenadante da reação e o estocou. E o excesso de corante de cada poço foi retirado através de duas lavagens com HCl 0,01N.

Para leitura do ensaio em espectrofotômetro, o corante foi solubilizado com 300 µL de NaOH e a solução resultante foi lida no espectrofotômetro a 540nm. Após a leitura construiu-se uma curva de concentração de colágeno de acordo com especificações do fabricante. A absorbância das amostras foi comparada à absorbância das quantidades pré-estabelecidas de colágeno - 12,5; 25, 50 e 100 µg/100µL, determinando-se, dessa forma, a quantidade de colágeno presente nas amostras (Valerio et al., 2005). As leituras foram feitas em triplicatas.

Imunofluorescência em células

CTM derivadas de tecido adiposo de ratos da linhagem Lewis, transgênico para eGFP, adultos, de 4 a 6 semanas, macho ou fêmea foram cultivadas sob lamínulas de vidro numa concentração de 1×10^4 células por lamínula. As células foram cultivadas em DMEM + 10% SFB por 48 horas e em meio condrogênico por 9 semanas.

Para realizar a imunofluorescência, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas gentilmente com PBS 0,15M, pH = 7,2. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) durante 15 minutos em geladeira. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 0,15M e em seguida permeabilizadas através da incubação com Triton X-100 a 0,25% (Roche, Alemanha) em PBS 0,15M por 10 minutos. Posteriormente, as células foram novamente lavadas 3X em PBS por 5 minutos.

Em seguida, as células foram bloqueadas com 1% de BSA e 5% de soro de cabra diluídos em PBS 0,15M durante 2 horas a temperatura ambiente, a fim de evitar reação inespecífica com o anticorpo secundário de origem caprina. Por mais duas vezes as células foram lavadas com PBS 0,15M por 5 minutos cada. Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos anti-moléculas de superfície (CD90, CD73, CD54, CD45, todos IgG1 camundongo anti-rato – BD Transduction Laboratories, USA), colágeno II (Anticorpo policlonal de Coelho anti-rato – Abcam, USA), osteocalcina (Anticorpo policlonal de Coelho anti-rato – Abcam, USA) e somente nas células-tronco indiferenciadas utilizou-se anticorpo anti-GFP (Anticorpo policlonal de Coelho anti-rato – Abcam, USA). As células-tronco em diferenciação condrogênica não foi marcada com anticorpo anti-GFP devido à autofluorescência das células, observadas após ensaios posteriores em microscopia confocal. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de PBS 0,15M + 1% BSA, em uma concentração de 1:500. As lamínulas contendo as células tratadas foram incubadas com os

anticorpos primários por 2 horas em câmara úmida em geladeira (temperatura de 4°C). Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15M 3 vezes por 5 minutos cada e em seguida, realizou-se a incubação com anticorpo secundário diluídos na mesma solução de diluição dos anticorpos primários (1:500).

Os anticorpos secundários (Molecular Probes, USA) utilizados foram: anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488 e anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 555. As lamínulas contendo as células tratadas com anticorpos primário e secundário foram incubadas em câmara escura e úmida por 1 hora à temperatura ambiente. Após o período de incubação as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 0,15M por 5 minutos cada. Em seguida, os núcleos dessas células fixadas sobre as lamínulas foram marcados com Hoescht (0,2µg/mL) durante 20 minutos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Para prevenir a perda de fluorescência e o ressecamento do material, lâminas receberam uma gota Hydromount (National Diagnostics, USA) e colocaram-se as lamínulas com as células fixadas e tratadas com os anticorpos sobre a gota. As amostras foram mantidas sempre protegidas da luz e na geladeira até a análise no microscópio confocal Zeiss 510 Meta (CEMEL, UFMG). As células foram analisadas no microscópio confocal 510 Meta. Como controle negativo foi utilizado células incubadas apenas com o anticorpo secundário. As amostras foram excitadas a 488nm e observadas a 505-550 nm para detectar Alexa 488 e excitadas a 555, observadas a 585 para detectar Alexa 555 (Soliman et al., 2009).

III - Matrizes tridimensionais

Processamento das matrizes 3D

Duas diferentes composições foram preparadas utilizando 0,35g de quitosana 85% deacetilada (Sigma) dissolvida em ácido acético (0,5 M) numa concentração final de 0,7% e 0,35g de gelatina bovina (Sigma) diluída em água deionizada e na mesma concentração. Ambas em recipientes separados e ao abrigo da luz.

Esses tubos foram agitados automaticamente durante 60 minutos e colocados em repouso por 24 horas. Em seqüência, as soluções foram misturadas numa proporção de 3 volumes de quitosana para 1 volume gelatina. De maneira diferenciada, adicionaram-se os reticulantes em recipientes separados, numa concentração de 0,1%. No presente trabalho foram utilizados 2 tipos de reticulante: glutaraldeído (25%, Sigma) e genipin (Challenge Bioproducts). Rapidamente após a adição de cada um dos reticulantes, os tubos contendo as soluções foram agitados em vórtex, de maneira vigorosa. Imediatamente após a agitação vigorosa dos tubos, as soluções foram distribuídas em placas de 24 poços (1mL/poço). As placas com as soluções foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e posteriormente, congeladas a -20 °C por mais 24 horas. Após esse período, os materiais congelados foram liofilizados por 16 horas e enriquecidos novamente com o respectivo reticulante 0,1% (1mL/poço) e as placas colocadas em um agitador mecânico por 30 minutos, sempre protegida da luz.

Em seqüência, as amostras foram levadas à estufa, congelamento e liofilização, novamente seguindo os mesmos períodos de tempo estabelecidos. Finalmente, adicionou-se 1 mL/poço de álcool 100% como mostrado na Figura 4 e as amostras foram secas à

temperatura ambiente. Para esterilização, os materiais foram irradiados a 15 KGy fonte de Co^{60} – CDTN/CNEN (Guo et al., 2006 e Yamane et al., 2005).

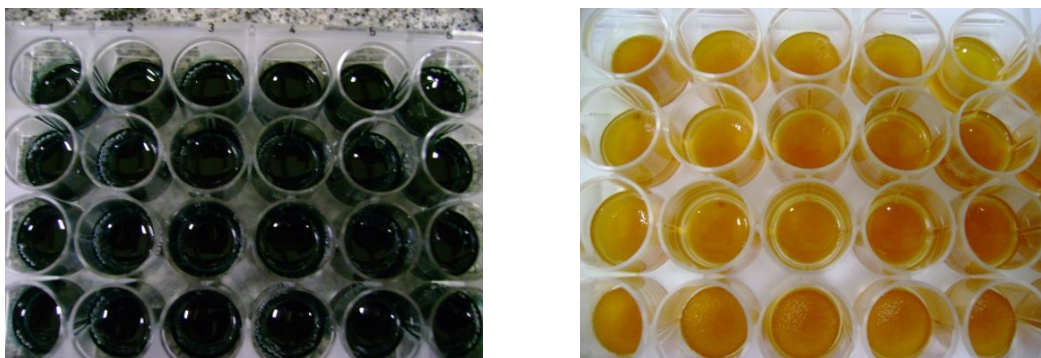


Figura 7 - Matrizes 3D. (A) Placa contendo matriz 3D de gelatina, quitosana e genipin. (B) Placa contendo matriz 3D de quitosana, gelatina e glutaraldeído.

Avaliação da arquitetura e porosidade das matrizes por microscopia eletrônica de varredura

O microscópio eletrônico de varredura permite a obtenção de informações microestruturais de diversas amostras. Assim, quando o feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra, parte dele é refletido e coletado por um detector que converte o sinal numa imagem de BSE (imagem de elétrons retroespalhados) ou a interação da amostra emite elétrons produzindo uma imagem ES (elétrons secundários). As matrizes de quitosana e gelatina foram analisadas no Departamento de Metalurgia e Engenharia de Materiais (Escola de Engenharia - UFMG). As amostras foram cobertas com Ouro (Sputter coater – SPI Supplies) por 90 segundos, 13mA e as suas imagens foram adquiridas utilizando microscópios eletrônico de varredura (JOEL 6360 LV), 15 kV, 750 mA. A partir das imagens pôde se avaliar qualitativamente as amostras quanto à porosidade, morfologia e estrutura dos poros (Machado et al., 2007; Martins et al., 2008 e Gomes et al., 2008).

IV - Interação matriz-CTM

Colonização das matrizes

CTM na 4ª passagem foram tratadas com tripsina EDTA 0,25% (Gibco) e contadas em câmara de Neubauer. Em uma placa de 6 poços, sendo que em 3 deles continham matrizes reticuladas com genipina e nos outros 3 matrizes reticuladas com glutaraldeído, um determinado volume, contendo 1×10^6 células, foi gotejado em cima de cada uma das matrizes e após 30 minutos em estufa de CO₂ foram adicionados 3mL de meio básico (DMEM + 10% SFB). As matrizes colonizadas foram mantidas em estufa durante 1, 2 e 3 semana e dessa forma avaliadas através de MEV, a fim de avaliar a capacidade de colonização das células e verificar a promoção da adesão celular em cada tipo de matriz (Martins et al., 2008 e Gomes et al., 2008).

Avaliação da citotoxicidade da matriz via metabolização de MTT

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através da metabolização do MTT, seguindo o protocolo descrito por Mosmann e cols (1983). A reação de MTT foi avaliada após 3, 7, 14 e 21 dias de cultivo de 3 matriz 3D reticulada com genipina colonizada por CTM e de 3 amostras de matriz 3D reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM. As leituras foram feitas em espectrofotômetro num comprimento de onda de 595 nm. Como controle utilizaram-se 1×10^5 CTM aderidas em poço da placa de cultura (TPP, Suíça) cultivadas em meio básico por 1 dia e as matrizes não colonizadas. Os valores obtidos das leituras de absorvância no espectrofotômetro de cada matriz eram subtraídos das respectivas matrizes colonizadas (Mosmann et al., 1983).

Diferenciação das CTM em matrizes 3D

Determinou-se a 3ª semana como o tempo mínimo de diferenciação das CTM cultivadas em meio indutor condrogênico, devido à expressão de colágeno do tipo II através da amplificação dos transcritos gênicos pela PCR. Matrizes 3D reticuladas com genipina e matrizes 3D reticuladas com glutaraldeído foram colonizadas por CTM e cultivadas em meio indutor de condrogênese por 3 semanas. Posteriormente, essas matrizes foram implantadas em dorso de ratos da linhagem Wistar e avaliadas através de análise histológica e por imunofluorescência (Raghunath et al., 2005; Betre et al., 2006; James et al., 2007; Melrose et al., 2008 e Mueller et al., 2008).

Implantes (avaliação *in vivo*)

Esse experimento se dividiu em 3 grupos: (i) somente matriz 3D, (ii) matriz 3D colonizada com CTM e (iii) matriz 3D colonizadas com células diferenciada. Ratos da linhagem Wistar, macho ou fêmea, adultos de 4 semanas, n = 5 em cada grupo, recebeu um tipo de enxerto subcutâneo no dorso como segue descrito e como pode ser observado no desenho esquemático da figura 8.

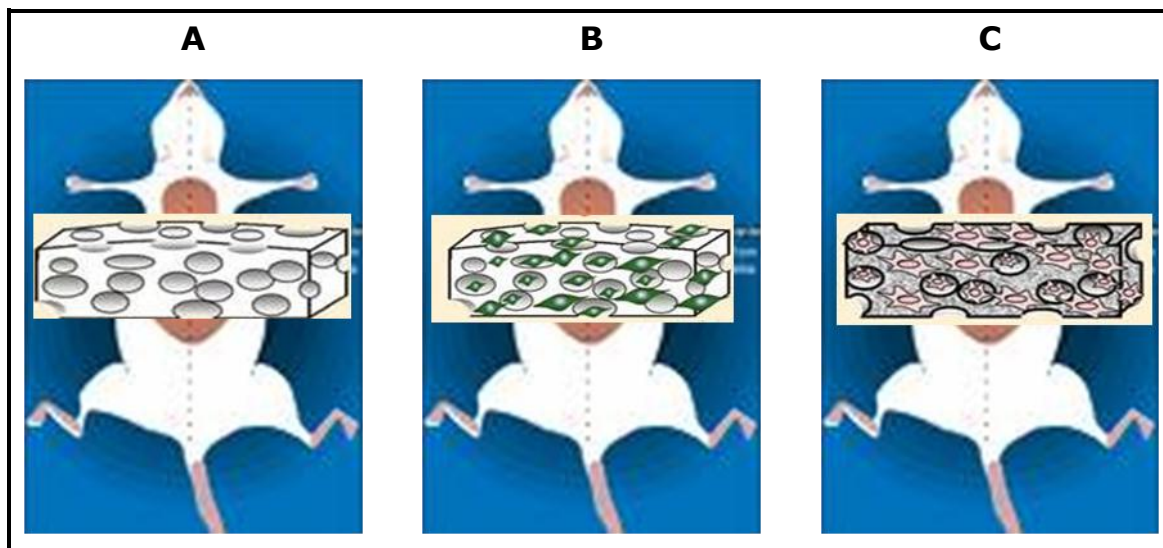


Figura 8 - Desenho experimental dos implantes em dorso de rato. (A) Implante de matriz não colonizada. (B) implante de matriz colonizada por CTM. (C) Implante de matriz colonizada por CTM diferenciadas durante 3 semanas em meio indutor condrogênico.

No grupo (i) $n = 5$ foram implatadas as matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído não colonizadas e no grupo (ii) $n = 5$, matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com genipina não colonizadas (Figura 8A).

No grupo (iii) $n = 5$ foram implantadas as matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído colonizadas CTM indiferenciadas e no grupo (iv) $n = 5$, matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com genipina colonizadas com CTM indiferenciada (Figura 8B).

Finalmente, no grupo (v) $n = 5$ foram implantadas matrizes de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído e colonizadas com CTM diferenciadas por 3 semanas em meio indutor condrogênico e no grupo (vi) $n = 5$, matrizes de quitosana e gelatina reticuladas com genipina e colonizadas com CTM diferenciadas por 3 semanas em meio indutor condrogênico (Figura 8C).

Essas diferentes situações de matrizes foram implantadas em dorso de Ratos da linhagem Wistar, macho ou fêmea, adultos, de 4 semanas e foram avaliadas por 1, 3, 6 e 9 semanas através de hematoxilina e eosina para verificar a biofuncionalidade dos enxertos, ou seja, a promoção de neovascularização e de biodegradação da matriz *in vivo*, através da contagem de células gigantes multinucleadas. Foram também avaliados implantes de matrizes colonizadas com células diferenciadas *in vitro* por 3 semanas, após a 6ª semana do implante, através da imunofluorescência, utilizando anticorpo anti-colágeno do tipo II a fim de demonstrar a capacidade das matrizes em manter o fenótipo das células diferenciadas *in vitro* durante um tempo prolongado *in vivo*.

Para realizar a cirurgia de implantação dos enxertos os animais foram anestesiados com a associação de quetamina (60 a 80 mg) e xilazina (8 a 15 mg) por kg do animal, via intramuscular. Após a sedação, o dorso dos animais foi tricotomizado e realizada a assepsia da região com PVPI, onde se realizou a incisão subcutânea e nela foi inserido o enxerto (Figura 9). Após a sutura dessa região, os animais foram colocados nas respectivas gaiolas e ficaram em observação por 2 horas até o final do efeito sedativo.

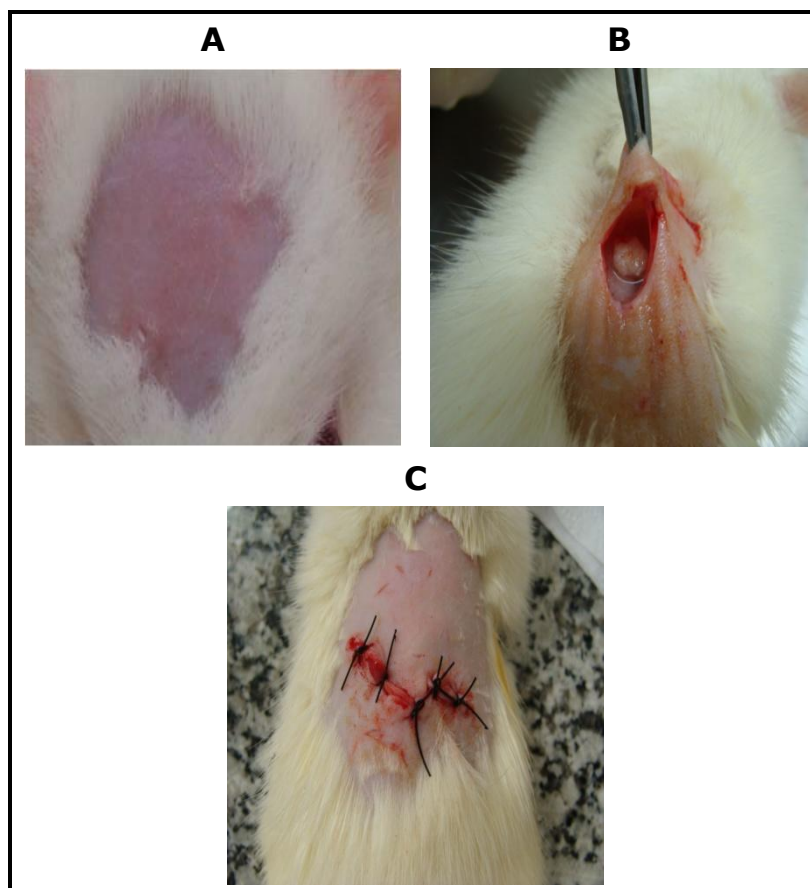


Figura 9 - Implante. (A) Região tricotomizada do dorso do Rato. (B) Incisão em meia lua para introdução da matriz. (C) Região do implante suturada.

Após o período de observação, os animais tiveram a alimentação e água filtrada *ad libitum*. Os animais de cada grupo foram eutanasiados para retirada dos enxertos após 1 (n = 5), 3 (n = 5), 6 (n = 5) e 9 (n = 5) semanas da cirurgia de implante. Após a eutanásia dos animais, nas regiões onde foram feitos os implantes, realizou-se novamente a tricotomia e foi retirado o implante através de uma nova incisão. As amostras coletadas foram fixadas em formaldeído 10% em tampão fosfato pH = 7 por no mínimo 24 horas e no máximo 1 semana e incluídos em parafina para análises histológicas, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Foram feitos cortes longitudinais de 5 a 7 μ m de espessura e corados por Hematoxilina e

Eosina (H&E), cortes dessa mesma espessura também foram utilizados para confeccionar lâminas para avaliações de imunofluorescência (Janune et al., 2006).

Imunofluorescência em tecido

Células-tronco mesenquimais foram diferenciadas por 3 semanas em matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com genipin ou glutaraldeído. Essas matrizes colonizadas foram implantadas em dorso de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, macho ou fêmea, adultos, de 4 semanas de idade. Após 6 semanas da cirurgia de implante, os ratos (n = 5) foram eutanasiados e amostras colhidas, fixadas e incluídas em parafina, conforme descrito acima. Cortes de 5 a 7µm foram utilizados para a realização da imunofluorescência. Essa reação permitiu avaliar a manutenção do fenótipo celular, através da permanência da expressão de colágeno do tipo II.

Para isso, os cortes parafinizados foram aderidos adequadamente em lâminas carregadas eletricamente, *imunoslides* (Erviagas). Esses cortes foram, então, desparafinizados por lavagens em xilol e reidratados em soluções de álcool diluídas de forma seriada e decrescente e, posteriormente em água. Após a reidratação, esses cortes foram bloqueados com solução contendo PBS 0,15M, 5% de soro de cabra (invitrogen) e 1% de BSA (invitrogen) durante 60 minutos e à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas contendo os cortes foram incubadas com anticorpo primário 1:500 (Anticorpo policlonal de Coelho anti – Collagen II de rato – Abcam, USA) durante 2 horas à 4°C em câmara úmida. Em seguida, as lâminas contendo os cortes foram lavadas com 3 banhos seqüenciais de PBS 0,15M (5 minutos cada) e incubadas com anticorpo secundário 1:100 (Anticorpo de Cabra anti-IgG de coelho – Alexa 555 – Mollecular Probes) durante 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida e escura.

Em seguida, retirou-se essa solução de anticorpo secundário e procedeu mais uma sequência de 3 lavagens com PBS 0,15M. Adicionou-se hydromount (National Diagnostics, USA) em lâminas que receberiam as lamínulas com cortes tratados, a fim de reduzir a perda da fluorescência e evitar ressecamento do corte. Após a secagem em câmara escura, as lâminas foram avaliadas em microscópio confocal (510 Meta, Cemel, ICB, UFMG) e as imagens obtidas através do *software* LSM Image Browser. As imagens foram visualizadas e capturadas separadamente em filtros de 510 a 560 nm (verde) e 663 a 738 nm (vermelho). Para fins de análise foram obtidas imagens de sobreposição com os dois filtros (Watanabe et al., 2004).

V- Análise estatística

Os ensaios de MTT, FA, colágeno, número de células gigantes multinucleadas e número de neovascularização foram analisados através do *software Prism statistical software* (Graphpad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando *One way* ANOVA, utilizando Bonferroni, dados não paramétricos, com valores de $p < 0,05$ estatisticamente significativos.

A avaliação da quantidade de células gigantes e neovascularização foi feita utilizando a ferramenta *Cell Counter* do *Image J software*. Foram selecionadas 3 microfotografias aleatórias de cada período de cada grupo de animal avaliado. Os resultados obtidos foram analisados no *Prism statistical software* como descrito acima.

Resultados

Resultados

Procedimentos *in vitro*

1- Caracterização das CTM

1.1 – Morfologia

Após o procedimento de obtenção das células do tecido adiposo, observou-se uma cultura heterogênea, na qual se observava a presença de células arredondadas, não aderentes e também de micelas lipídicas no sobrenadante da cultura. Após dez dias de cultivo, já havia predominância de células aderentes na cultura, com morfologia fibroblastóide (Figura 10). Tanto as células não aderentes como as micelas lipídicas foram retiradas da cultura a cada troca de meio. Observou-se que as células aderentes se organizavam em colônias, como pode ser visualizado na figura 10. Durante todo o período de cultivo as células aderentes mantiveram-se fenotipicamente estáveis sem sinais de senescência. Essas células foram cultivadas até a 4^a passagem quando foram utilizadas para a realização dos ensaios.

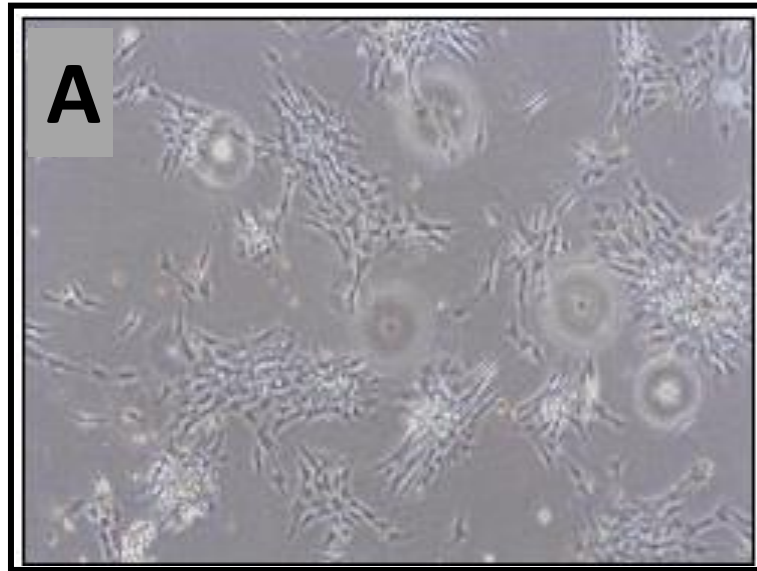


Figura 10 - CTM após 21 dias de cultivo, observa-se organização das células em colônias, além de morfologia fibroblastóide e aderência à superfície plástica da placa de cultura (Aumento 60X).

1.2 – Análise fenotípica por citometria de fluxo e imunofluorescência

Para analisar o fenótipo celular através da expressão das moléculas de superfície (CD – *cluster of differentiation*) foram realizados ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência em células fixadas sobre lamínulas. Para o ensaio de citometria de fluxo, foram utilizadas 1×10^6 células derivadas de tecido adiposo de ratos da linhagem Wistar na 4ª passagem. Essas células foram incubadas com anticorpos monoclonais selecionados a fim de avaliar a expressão de CD54, CD73 e CD90, moléculas eleitas para a caracterização das células-tronco mesenquimais. Utilizou-se também anticorpo anti-CD 45 que é característico de precursor hematopoiético. Cerca de 87% das células derivadas de tecido adiposo expressaram CD90, 94% expressaram CD73 e 95%, CD54. O CD45 foi detectado em apenas 3% das células analisadas. O conjunto de marcadores utilizados permitiu inferir que a população celular isolada e cultivada era homogênea, claramente distinta da linhagem hematopoiética. Os dados obtidos foram reunidos em uma representação gráfica apresentada na figura 11.

O ensaio de citometria de fluxo também foi realizado com as células eGFP derivadas de tecido adiposo de ratos da linhagem Lewis transgênicos para a proteína GFP. As culturas foram conduzidas exatamente nas mesmas condições que as células-tronco derivadas de tecido adiposo de ratos da linhagem Wistar e o ensaio também foi realizado com 1×10^6 células na 4ª passagem. Cerca de 91% das células co-expressaram GFP e CD54, 90% co-expressaram GFP e CD73 e 95%, GFP e CD90 e aproximadamente 2% co-expressaram GFP e CD45. Os dados foram compilados em uma representação gráfica apresentada na figura 12A.

Para realização do ensaio de imunofenotipagem utilizou-se células-tronco mesenquimal derivadas de tecido adiposo de ratos da linhagem Lewis, transgênicos para eGFP, na 4ª passagem e fixadas sobre lamínulas esterilizadas. Foram também utilizados os mesmos anticorpos monoclonais no ensaio de citometria de fluxo. A visualização da presença dos marcadores celulares em ensaios de imunofluorescência objetivou comprovar de forma qualitativa o fenótipo das células-tronco derivadas de tecido adiposo. Através das imagens de sobreposição, obtidas em microscopia confocal, pode-se verificar que as células expressavam CD54, CD73 e CD90 e não expressavam CD45 e que os núcleos dessas células estavam corados de azul (Hoechst). O anticorpo secundário utilizado nesse ensaio foi o Alexa 555 (Fig. 12 B).

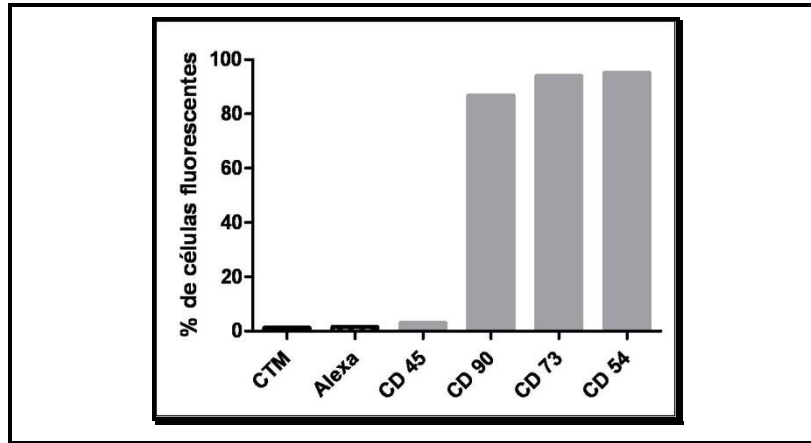


Figura 11 - Análise fenotípica das CTM por citometria de fluxo. Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população selecionada R1.

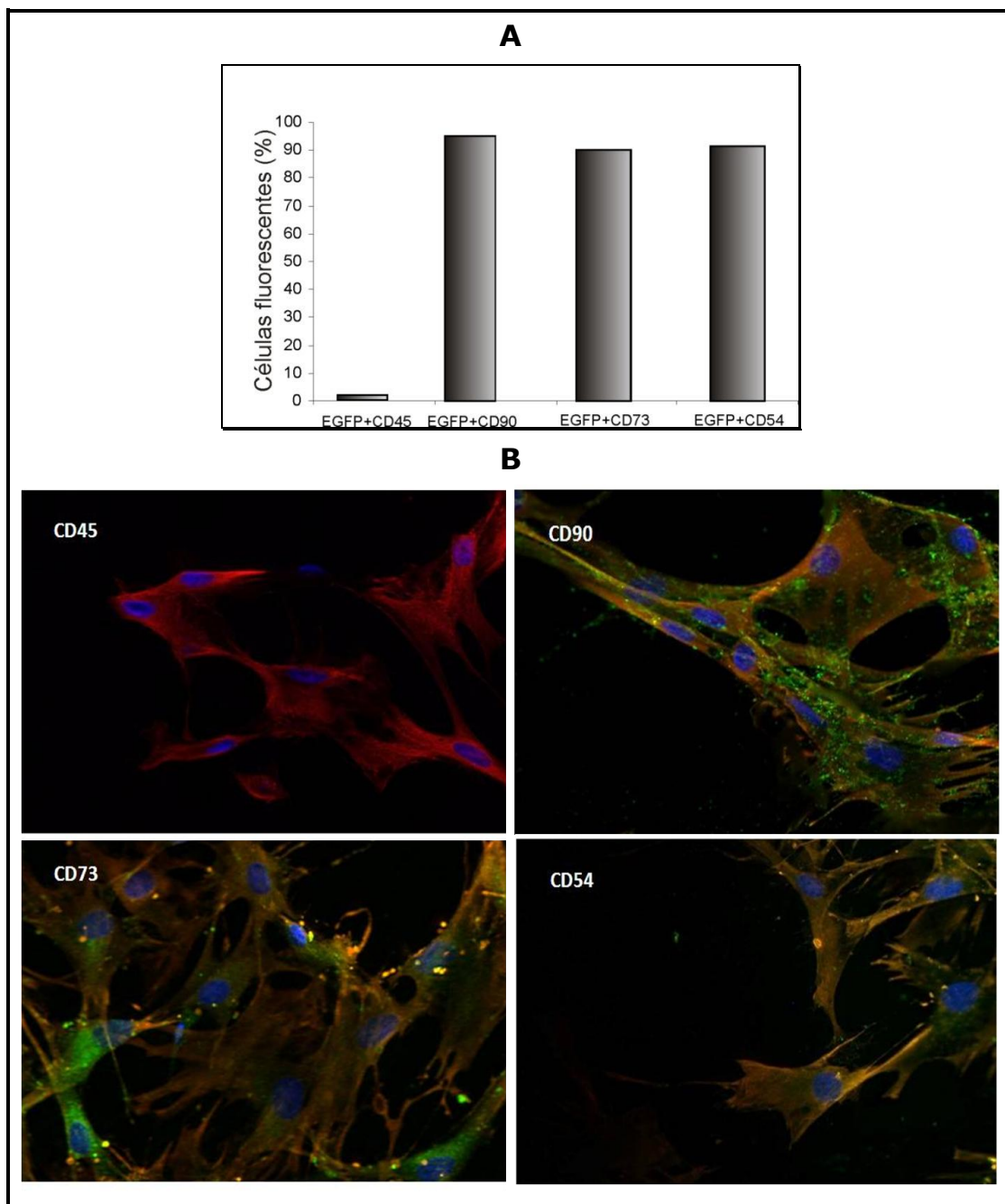


Figura 12 - Análise fenotípica das CTM – EGFP por citometria de fluxo e imunofluorescência. (A) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população selecionada. (B) Imunofluorescência apresentou a expressão de CD54, CD73, CD90 (verde), GFP (vermelho) e a não expressão de CD45. O núcleo está marcado com Hoechst (azul). Imagem obtida através da microscopia de confocal LSM 510 Meta (sobreposição).

1.3 – Análise das células-tronco derivadas de tecido adiposo de ratos da linhagem Wistar cultivadas em meio indutor condrogênico

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de ratos da linhagem Wistar na 4ª passagem foram distribuídas em placas de cultivo contendo 24 poços na densidade de 1×10^5 células por poço. Após a adesão das células na placa de cultura, estas foram incubadas com meio indutor condrogênico, contendo TGF- β e dexametasona, durante 9 semanas. O controle dos experimentos foi o cultivo das CTM em meio de cultivo basal (DMEM + 10% de SFB) durante 72 horas. Todas as avaliações foram feitas em triplicata.

Durante o período de análise, observou-se que a partir da terceira semana de cultivo em meio indutor condrogênico houve uma redução significativa da capacidade proliferativa das CTM (Fig. 13) e da atividade da enzima fosfatase alcalina (Fig. 14), porém um significativo aumento da síntese de colágeno total (Fig 15). Nesse mesmo período, avaliou-se qualitativamente a expressão de colágeno do tipo II, através da técnica de PCR (Fig. 16) e em nenhum momento avaliado houve expressão de osteopontina.

Em seguida, CTM extraídas de tecido adiposo de ratos da linhagem Lewis transgênico para a proteína GFP foram cultivadas sobre lamínulas durante 9 semanas. Ao final desse período, as células foram fixadas e incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD90, anti-CD73, anti-CD54, anti-CD45, anti-colágeno tipo II e anti-osteocalcina. Nesse ensaio não foi utilizado anticorpo anti-GFP devido à auto-fluorescência das células observada em microscopia confocal. Os núcleos foram marcados com Hoechst (Molecular Probes) e, portanto, apresentam-se corados em azul. Como pode ser visualizado pela imagem de sobreposição, na figura 17, as células expressavam GFP em verde, CD73 e colágeno do tipo II ambos em vermelho e os núcleos estavam corados de azul. Porém, não expressavam CD45, CD54 e CD90.

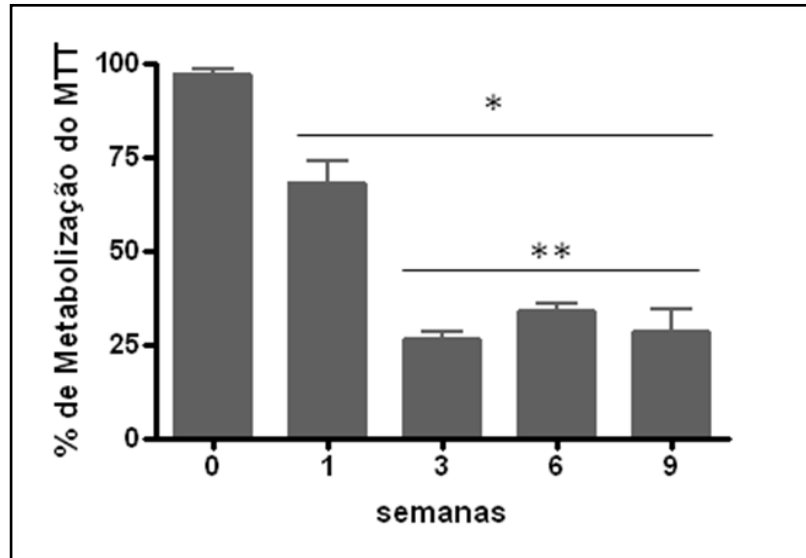


Figura 13 - Representação gráfica da avaliação da capacidade proliferativa das CTM através da porcentagem de metabolização de MTT. As avaliações foram realizadas após 72 horas de cultivo das CTM em meio basal (considerada 0 semana) e com 1, 3, 6 e 9 semanas de cultivo das CTM em meio de indução condrogênica. Houve uma redução significativa da proliferação celular a partir da 1ª semana, diminuindo ainda mais na 3ª semana (*/**p < 0,001).

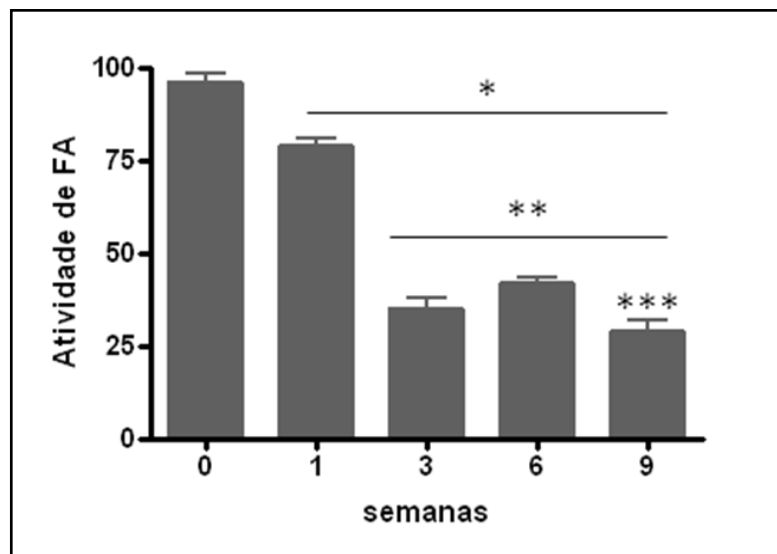


Figura 14 - Representação gráfica da avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) em CTM. As avaliações foram realizadas após 72 horas de cultivo das CTM em meio basal e com 1, 3, 6 e 9 semanas de cultivo das CTM em meio indutor condrogênico. Houve uma redução significativa da atividade da fosfatase alcalina a partir da 1ª semana, reduzindo ainda mais a partir da 3ª semana e posteriormente na 9ª semana (*/**/*** p < 0,001).

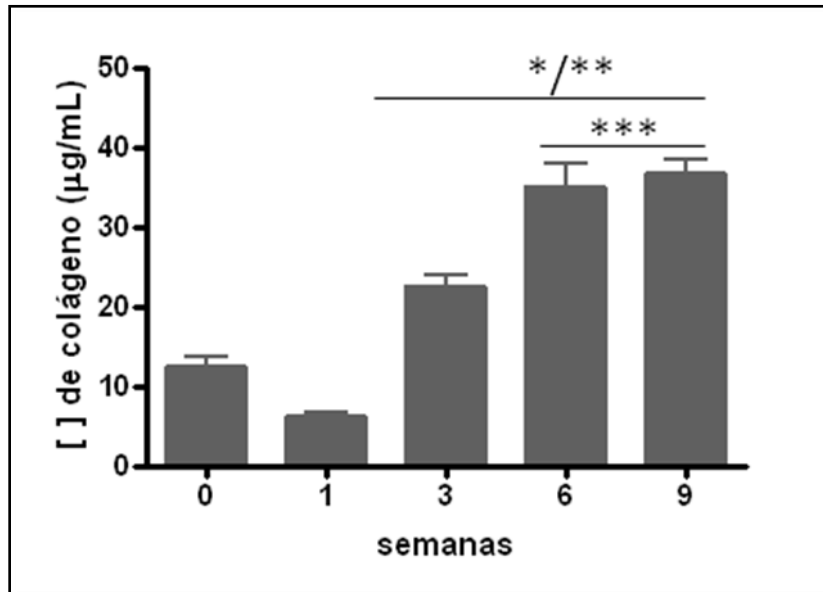


Figura 15 - Representação gráfica da avaliação da síntese de colágeno total em CTM. As avaliações foram realizadas após 72 horas de cultivo das CTM em meio basal e com 1, 3, 6 e 9 semanas de cultivo das CTM em meio indutor de condrogênese. Houve um aumento significativo da síntese de colágeno total a partir da 3ª semana em relação a 0 e 1 semana. E na 6ª semana houve um aumento significativo da síntese do colágeno total em relação à 3ª semana, bem como dos demais períodos avaliados (*/**/*** p < 0,001).

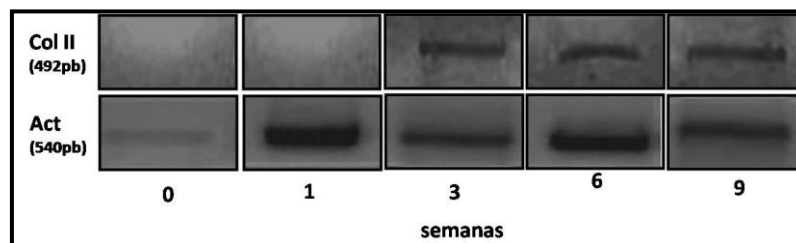


Figura 16 - Análise da síntese de colágeno do tipo II pelas CTM através da amplificação de transcritos gênicos. O período analisado foi de 0, 1, 3, 6 e 9 semanas, considerando 0 o controle da reação que consta de CTM cultivadas em meio basal por 72 horas. O período que vai da 1ª à 9ª semana as células foram cultivadas em meio indutor de colágeno. Amplificação do gene de colágeno do tipo II (Col II - 492 pb). β 1 - actina (Act - 540 pb).

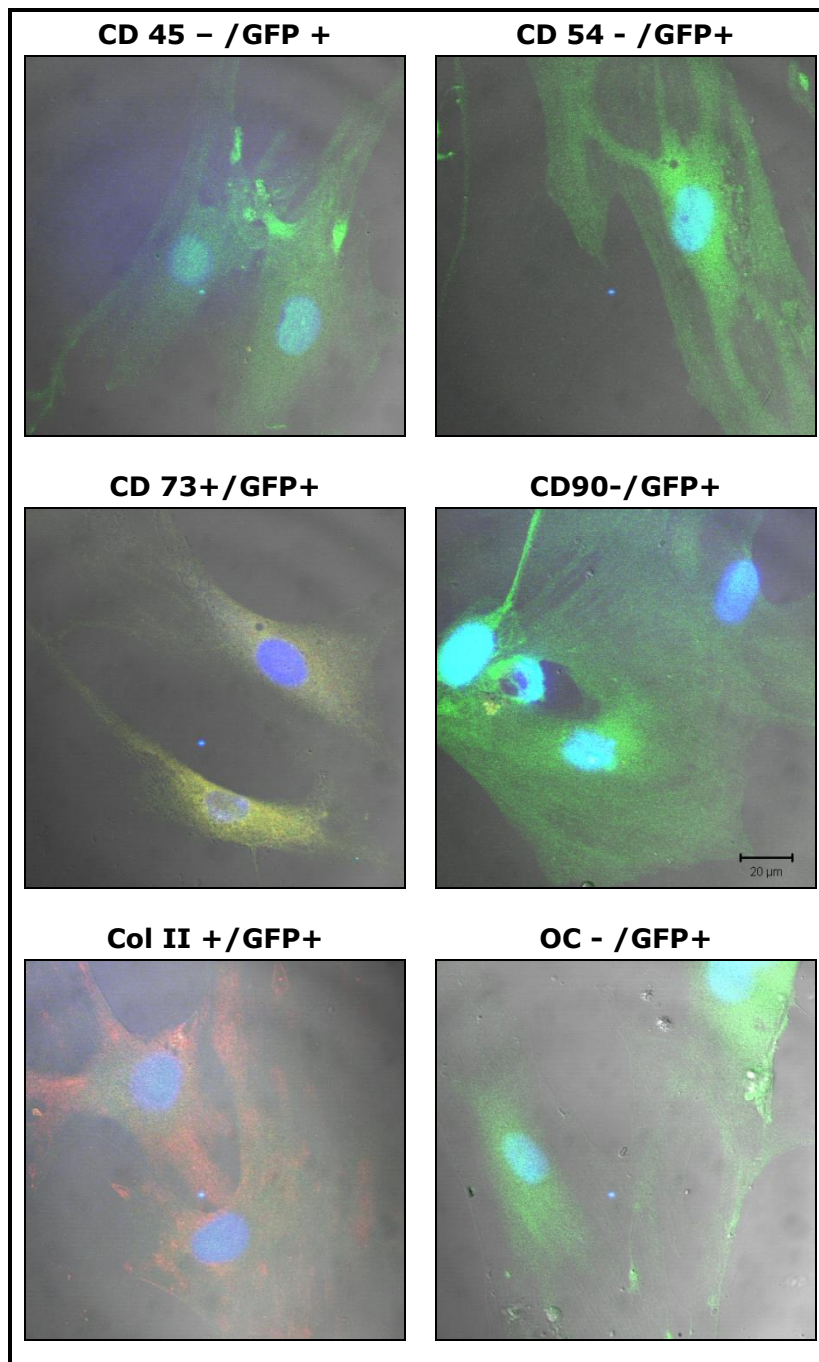


Figura 17 - Análise de imunofluorescência da diferenciação das CTM cultivadas em meio indutor de diferenciação durante 9 semanas. O resultado apresenta a não expressão de CD45, CD90, CD54 e Osteocalcina e a expressão de CD73 e Colágeno do tipo II (em vermelho) e de GFP (em verde). As imagens foram obtidas por sobreposição de filtros em microscópio confocal. A marcação em azul (Hoechst) evidenciou os núcleos. Objetiva de 63X em óleo de imersão.

2- Avaliação *in vitro* e *in vivo* das matrizes 3D

2.1 - Construção e avaliação *in vitro* das matrizes 3D através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As matrizes 3D foram analisadas *in vitro* através da MEV, a fim de qualificar a distribuição e o tamanho dos poros. Macroscopicamente, pode ser observado pela figura 18, as estruturas apresentaram-se bem definidas e de fácil reprodução (Fig 18 A e B).

Para avaliar a porosidade, as matrizes foram processadas e foi realizado um corte longitudinal com diâmetro de 10 mm e espessura de 2 mm. Observou-se que ambas as matrizes apresentaram-se porosas (em torno de 90%) e o tamanho dos poros variou de 50 e 150 μm . Verificou-se, também, que os poros apresentavam-se interconectado, um dos requisitos para a construção de matrizes porosas. Ambas as matrizes foram construídas da mesma forma e contém a mesma concentração e proporção dos reagentes (quitosana e gelatina) e dos reticulantes.

A matriz de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído (Fig 18 C) apresentou poros de tamanhos irregulares, porém com morfologia uniforme. Dessa forma, acredita-se que essa uniformidade tenha influenciado diretamente na alta deformação plástica dessa matriz quando submetidas a estresse. A matriz de quitosana e gelatina reticulada com genipina (Fig.18 D) apresentou poros de tamanhos irregulares e morfologias variadas e assim acredita-se que essa variação influenciou na baixa deformação plástica desta matriz quando submetidas a estresse. As matrizes ficaram imersas em meio de cultura por até 3 semanas e não apresentaram alterações na estrutura física.

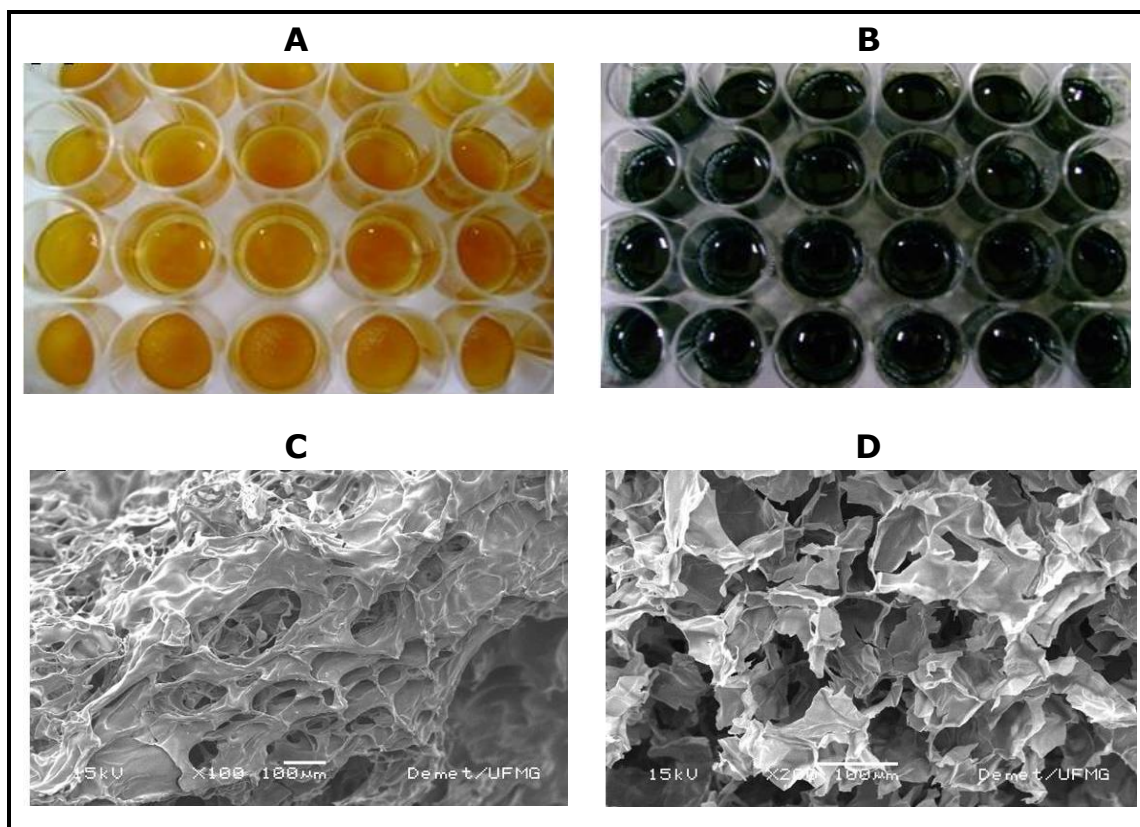


Figura 18 - Avaliações macroscópicas e microscópicas das matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído (A e C) e reticuladas com genipina (B e D). (A) matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído após a liofilização embebidas em álcool etílico 100%. (B) matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com genipin após a liofilização embebidas em álcool etílico 100%. (C) Microfotografia de matriz de Q+G reticulada com glutaraldeído (MEV). (D) Microfotografia de matriz de Q+G reticulada com genipina.

2.2– Avaliação da capacidade de metabolização do MTT em CTM cultivadas em matrizes 3D

As matrizes 3D foram colonizadas com 1×10^5 CTM e cultivadas por 3, 7, 14 e 21 dias. A fim de verificar a citotoxicidade das matrizes em relação às células, realizou-se o ensaio de metabolização do MTT. CTM cultivadas em meio basal foram utilizadas como controle positivo e as matrizes não colonizadas, como controle negativo. Os valores residuais obtidos na reação das matrizes não colonizadas foram subtraídos dos valores obtidos pela metabolização de CTM cultivadas nas duas matrizes, respectivamente. O gráfico apresentado

na figura 19 demonstra que não houve redução significativa na metabolização do MTT de CTM cultivadas nas duas matrizes quando comparado ao controle positivo (CTM). Os demais períodos não demonstrados na representação gráfica, ainda estão sendo realizados.

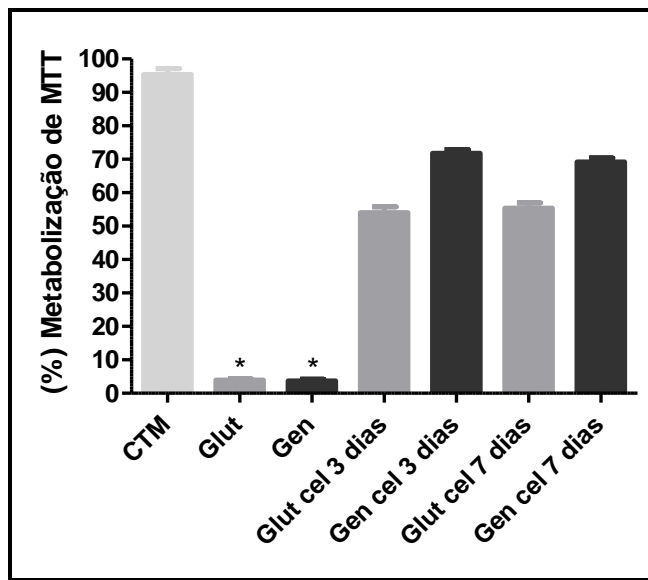


Figura 19 - Representação gráfica da metabolização do MTT das CTM cultivadas em matrizes 3D de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído ou genipina por 3 e 7 dias. CTM – células tronco mesenquimais (controle positivo), Glut – matriz de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído, Gen – matriz de quitosana e gelatina reticulada com genipina. Glut cel 3 dias/Glut cel 7 dias – período de cultivo das CTM em matriz de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído. Gen cel 3 dias/Gen cel 7 dias – período de cultivo das CTM em matriz de quitosana e gelatina reticuladas com genipina (* $p < 0,05$).

Procedimentos *in vivo*

3- Interação célula-matriz

3.1 – Descrição de cortes histológicos dos implantes subcutâneos

Ao microscópio de luz foram analisadas as lâminas contendo os cortes histológicos dos implantes corados com H&E, nas quais se observa a estrutura das matrizes 3D e a resposta tecidual em função das alterações inflamatórias, tais como proliferação angioblástica, fibroblástica e infiltrado inflamatório. É sabido que a entrada de corpos estranhos no organismo acarreta reações inflamatórias a fim de eliminar as causas da agressão. A partir da 4ª semana de acompanhamento dos animais que foram submetidos ao processo de implantação, já se observava a completa reabsorção dos fios de sutura e a reepitelização da região de inserção do implante, além do crescimento de novos pêlos, povoando a região.

Nos períodos pré-estabelecidos (1, 3, 6 e 9 semanas), os animais foram eutanasiados com *overdose* de anestésico e o implante juntamente com as regiões subjacentes foram retirados de forma cirúrgica e fixado em formaldeído 10%. Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina e realizado 3 cortes histológicos de 5 a 7 μm de cada animal e corados com Hematoxilina & Eosina, a fim de avaliar o processo inflamatório causado pela introdução subcutânea das matrizes 3D não colonizadas (figuras 21 e 30) e colonizadas por células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo indiferenciadas (figuras 24 e 33) e diferenciadas previamente *in vitro* durante 3 semanas (figuras 27 e 36).

Em todas as avaliações, não houve resposta que demonstrasse perda do controle homeostático. De forma que não se observou em nenhum dos cortes analisados presença de focos necróticos, tanto na região do implante quanto nos tecidos adjacentes. Os tecidos adjacentes se mostraram organizados durante todo o período analisado: a epiderme

apresentava-se coberta por uma fina camada de queratina, a derme, constituída de tecido conjuntivo frouxo, contendo glândulas sebáceas associadas aos folículos pilosos, a hipoderme constituída de tecido adiposo unilocular e tecido muscular liso (Figura 20). O implante foi introduzido embaixo dessas estruturas e pode ser observada uma proliferação fina camada fibroblástica em torno da matriz implantada.

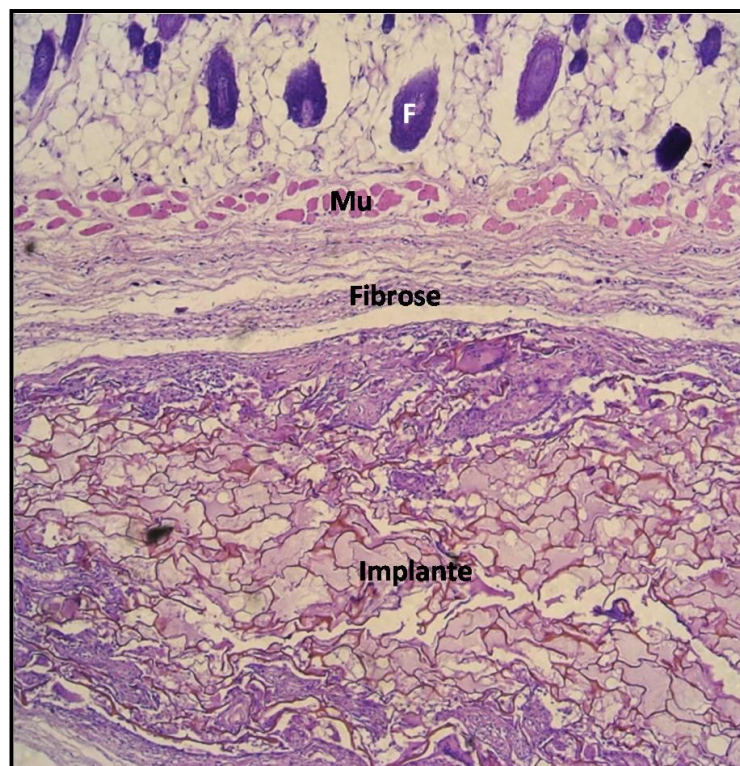


Figura 20 – Micrografia representativa das regiões adjacentes ao implante. (F) Folículo Piloso presente na derme, (Mu) Músculo presente na hipoderme e o implante circundado pela discreta camada fibrótica. (Aumento 60 X).

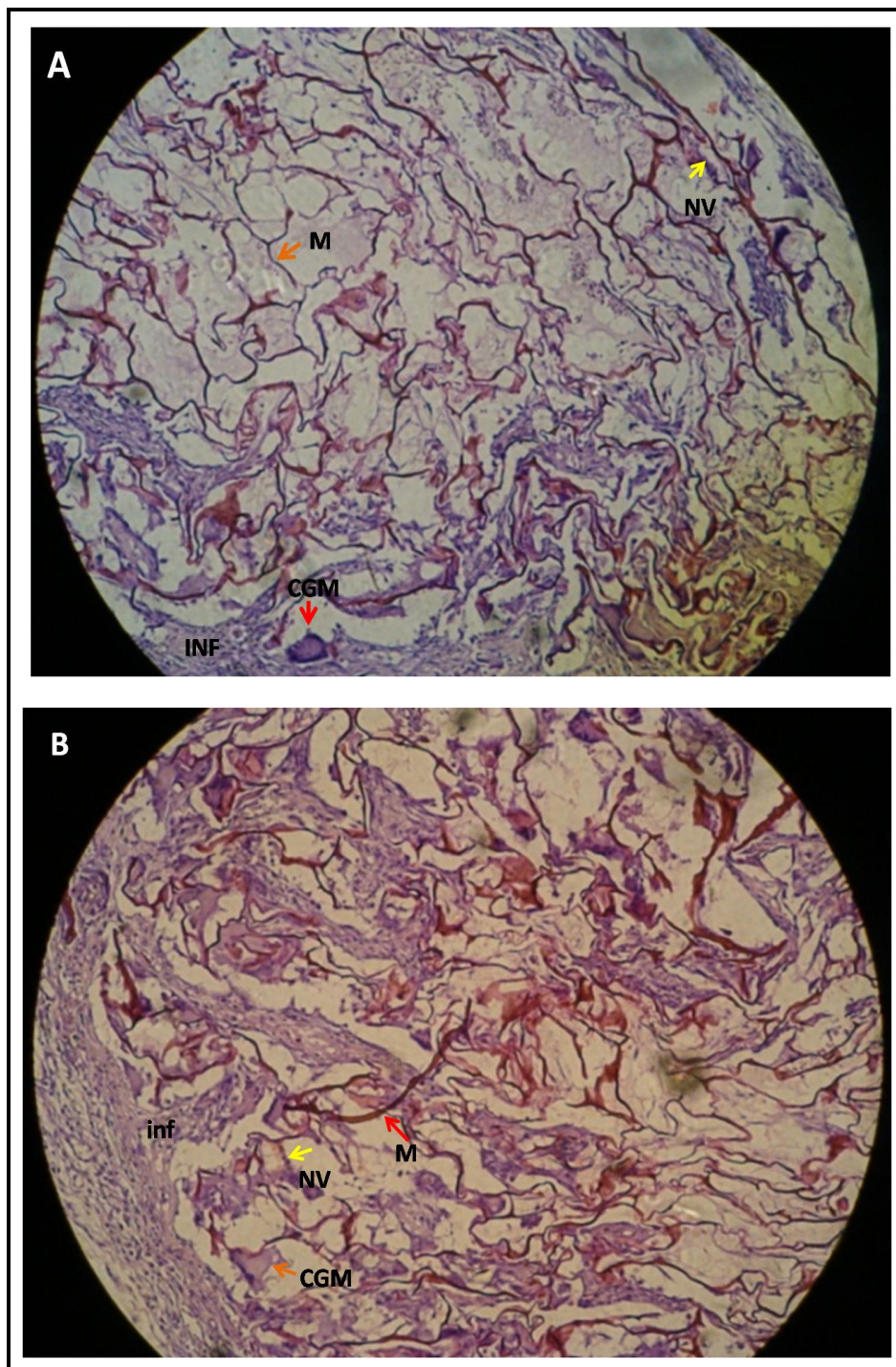
Descreveu-se a região do implante em todos os períodos e situações avaliados, em relação à resposta inflamatória, como crônica, ocorrendo formação de um tecido granuloso, com proliferação fibroblástica discreta em torno do implante, neovascularização e infiltrado celular

com predominância de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Observou-se também a presença de células gigantes tipo Langhans e/ou corpo estranho sempre associado às fibras das matrizes. Foi verificado que a resposta inflamatória pouco afetou a função dos tecidos, não comprometendo o organismo como um todo e não desorganizando a estrutura tecidual adjacente.

Figura 20 – Micrografia evidenciando a região adjacente ao implante. (A) Matriz reticulada com glutaraldeído (B) matriz reticulada com genipina. (Aumento de X).

Implantes subcutâneos de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com genipina

Matriz não colonizada por CTM



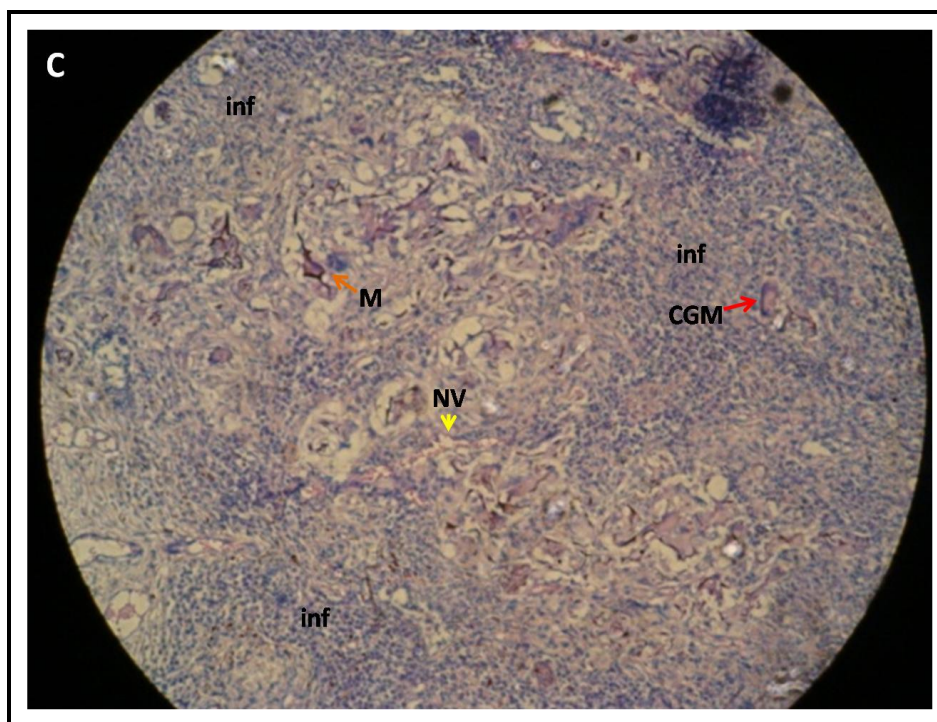


Figura 21 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com genipina não-colonizada. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado.

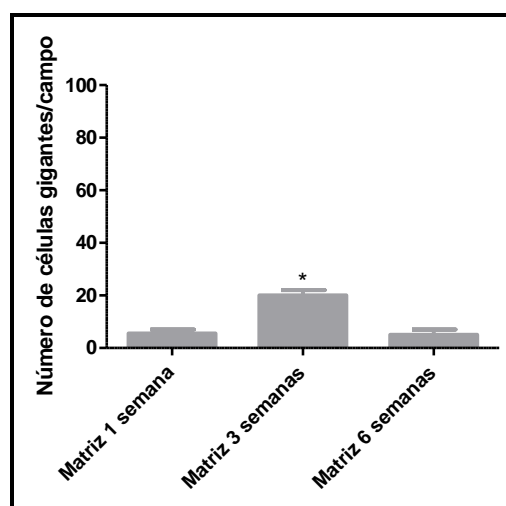


Figura 22 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes por campo em implantes de matriz reticulada com genipina não colonizada. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo na 3ª semana após o implante em relação à 1ª e a 6ª semanas após o implante. (* $p < 0,05$).

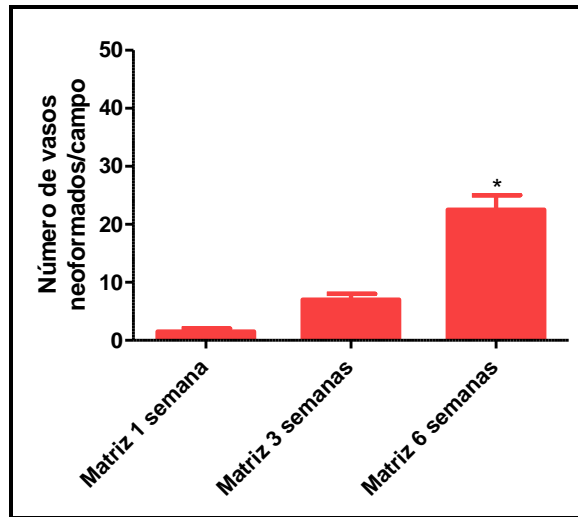
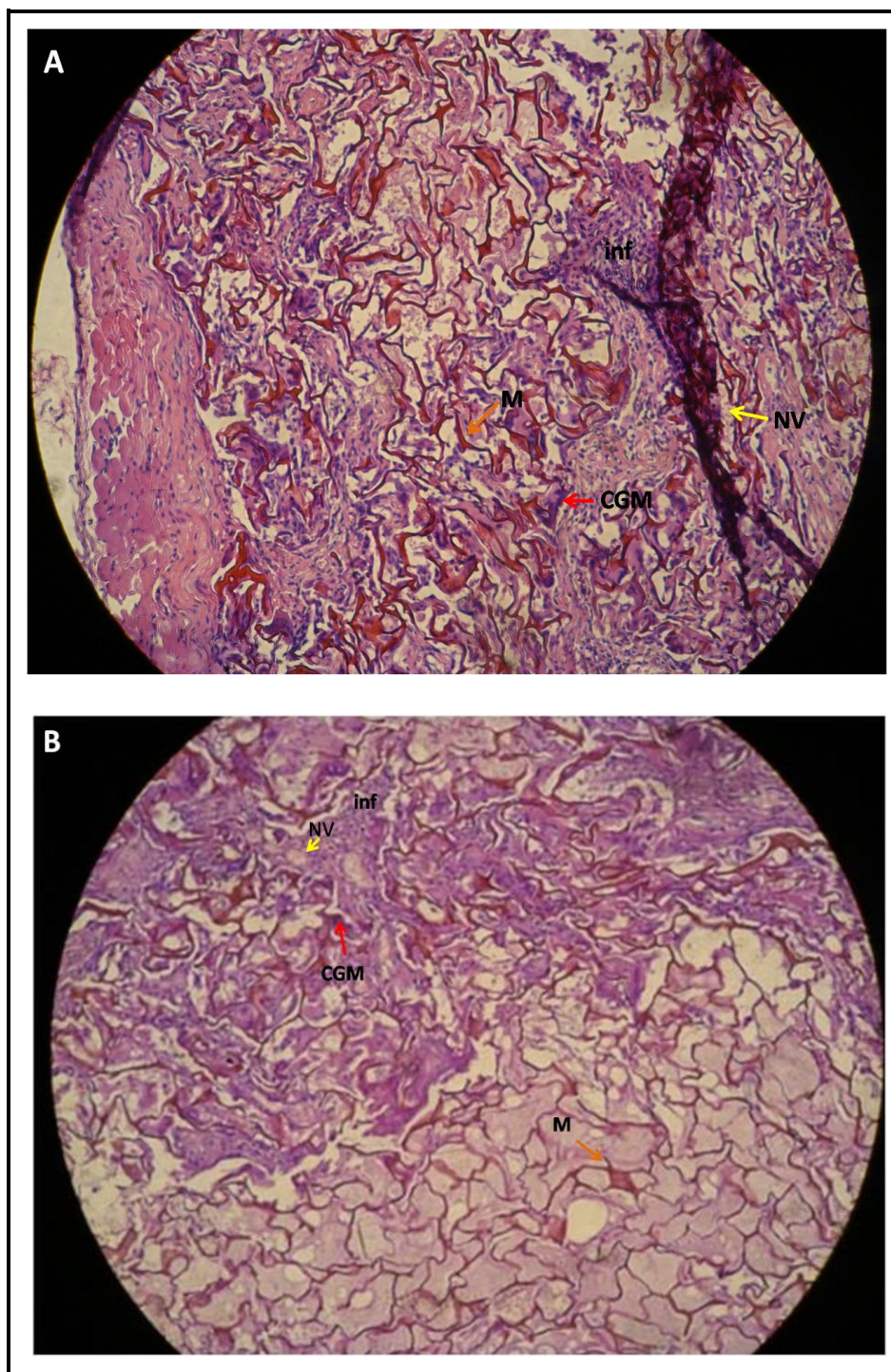


Figura 23 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de neovascularização em implantes de matriz reticulada com genipina não colonizada. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo de neovascularização na 6ª semana comparada com os demais períodos avaliados. (* $p < 0,05$).

Os dados obtidos através dos cortes histológicos avaliados ($n = 15$) demonstraram que o infiltrado inflamatório migrou da periferia para o centro do implante e aumentou de intensidade ao longo do período analisado *in vivo* (figura 21 A-C). Esse fato pode estar relacionado ao aumento crescente de neovascularização (figura 23). Assim, o surgimento de novos vasos (demonstrados pelas setas amarelas e pelas letras NV) pode ter proporcionado a migração de células inflamatórias, inclusive células gigantes (demonstradas pelas setas vermelhas e pelas letras CGM) ligadas à atividade fagocitária, responsáveis pela reabsorção da matriz. As micrografias permitiram observar a migração do infiltrado inflamatório entremeando as fibras da matriz (coradas em vermelho a rosa, geralmente translúcidas, indicadas pela seta alaranjada e a letra M). Na 6ª semana (figura 21 C) após a implantação observou-se a redução das fibras da matriz e correspondendo ao aumento no período anterior (figura 21) do número de células gigantes. De forma que esse aumento do número das células gigantes na 3ª semana após o implante (figura 22) justificaria a redução na intensidade de

fibras na 6ª semana após o implante (figura 21 C), demonstrando a estreita relação entre as células de Langhans com as fibras da matriz e o processo de reabsorção da matriz.

Matriz colonizada por CTM



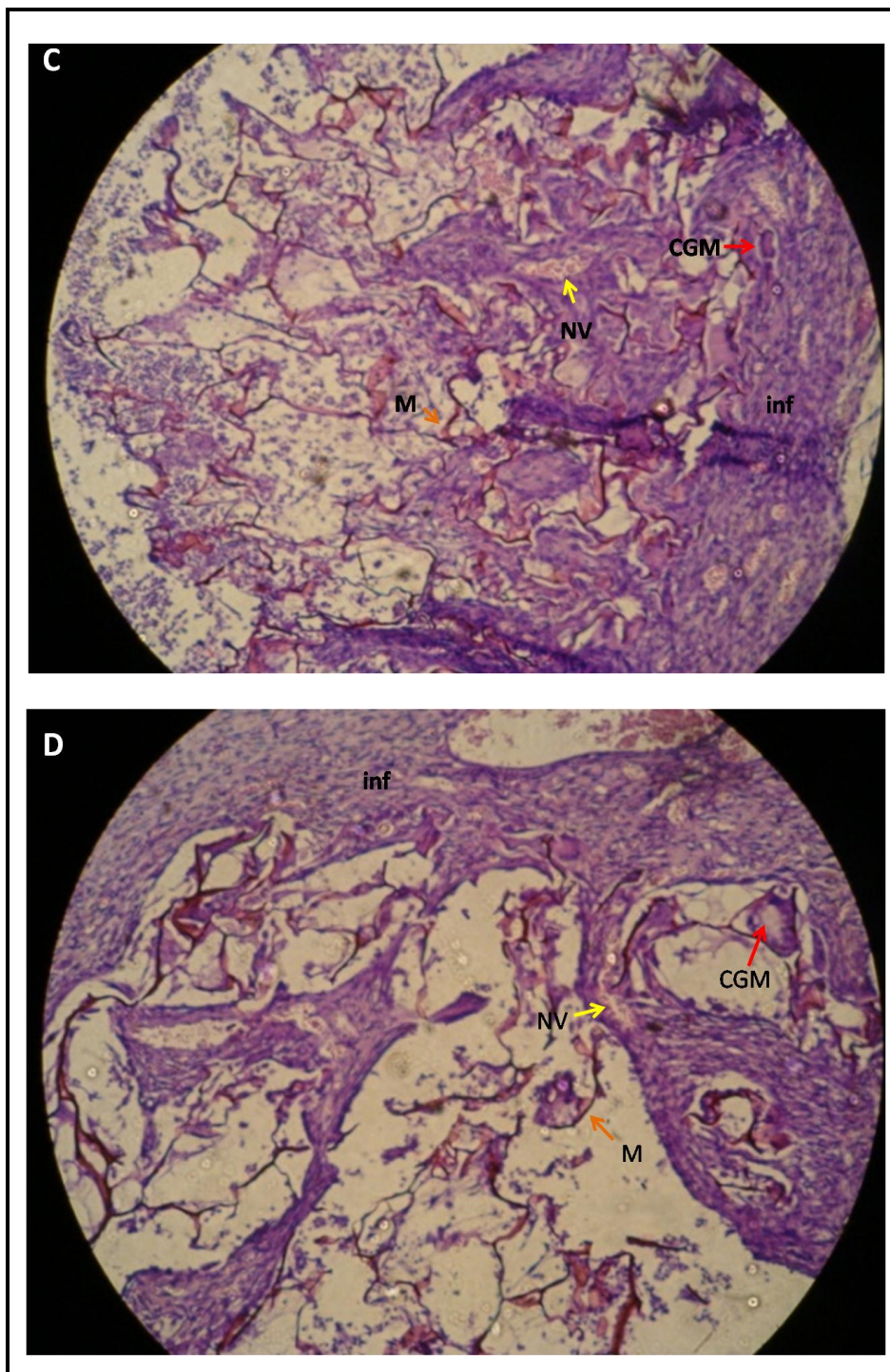


Figura 204 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com genipina colonizada por CTM. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. (D) Corte histológico referente a 9 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado inflamatório.

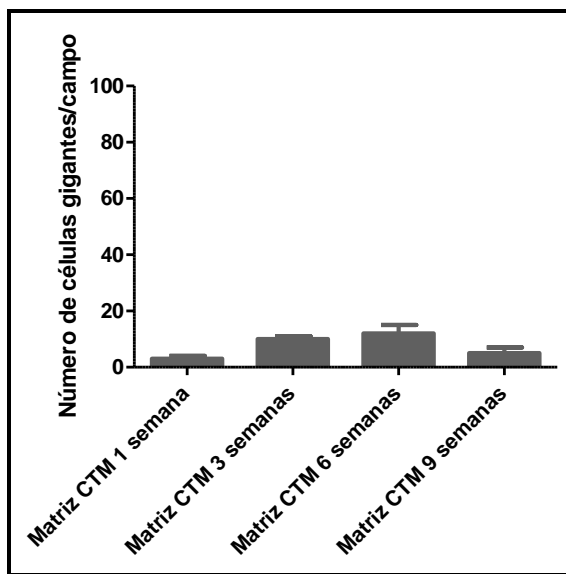


Figura 25 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes por campo em implantes de matriz reticulada com genipina colonizada por CTM. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Não foi observado diferença estatística entre os grupos. (* $p < 0,05$).

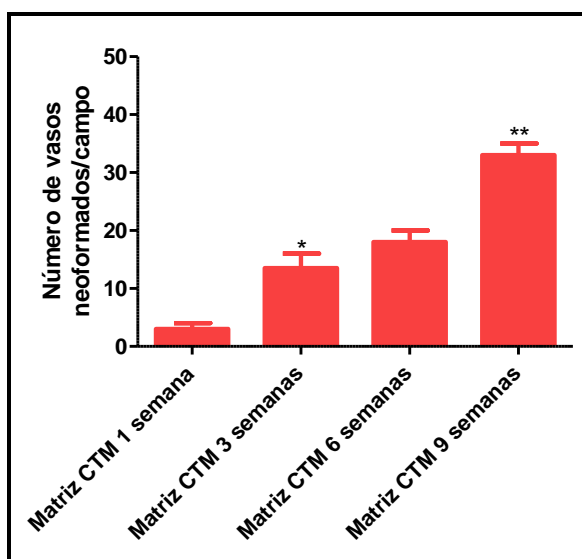
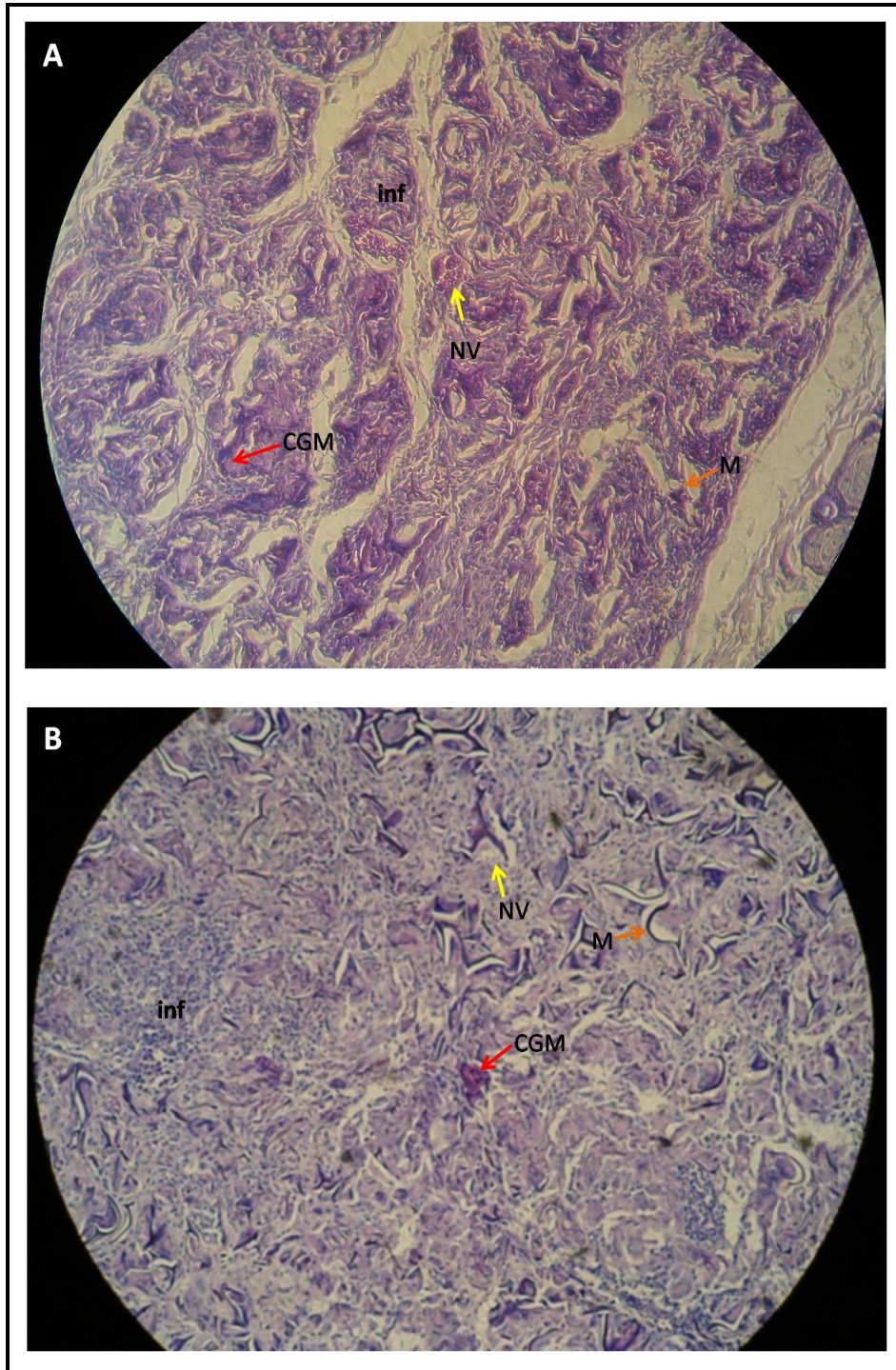


Figura 2621 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de neovascularização em implantes de matriz reticulada com genipina colonizada por CTM. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo de neovascularização na 3ª semana comparada à primeira semana. Essa quantidade se manteve na 6ª semana, aumentando significativamente na 9ª semana após o implante. (* $p < 0,05$).

A partir dos dados obtidos pelos cortes histológicos (n = 20) pode ser sugerido que a presença das CTM atrasou a reabsorção da matriz, seja pela lenta migração do infiltrado inflamatório da periferia para o centro do implante (figura 24 A-D) ou pela pequena quantidade de células gigante do tipo corpo estranho (figura 25) ao longo do período analisado. Sugere-se a partir das observações realizadas nesses ensaios, que as células-tronco alteraram o meio ambiente onde elas se encontravam.

Inicialmente, pode ser visualizada a presença de material hialino entremeando as fibras da matriz (coradas de vermelho a rosa, apresentadas pelas setas alaranjadas e pela letra M) que foi substituído pelo infiltrado inflamatório (demonstrado pelas letras inf - figura 24 A-D). De forma que devido à migração do infiltrado inflamatório para o centro do implante, na 9ª semana após o implante, ocorreu uma redução na quantidade das fibras da matriz (figura 24 D). Esse fato mostrou que a matriz colonizada com células-tronco tem o potencial de reabsorção reduzido, porém não ausente. Além desse perfil alterado, provavelmente devido a presença das CTM, a neovascularização (demonstrada pelas setas amarelas e pelas letras NV) apresentou uma alteração a partir da 3ª semanas (figura 26), dobrando a quantidade de neovasos por campo avaliado, em relação à 1ª semana. Na 9ª semana a quantidade de neovasos também se apresentou aumentada, em torno de 100% em relação à 3ª e 6ª semanas após o implante. Essas observações permitem sugerir que as CTM secretam fatores angiogênicos.

Matriz colonizada por CTM diferenciada durante 3 semanas *in vitro*



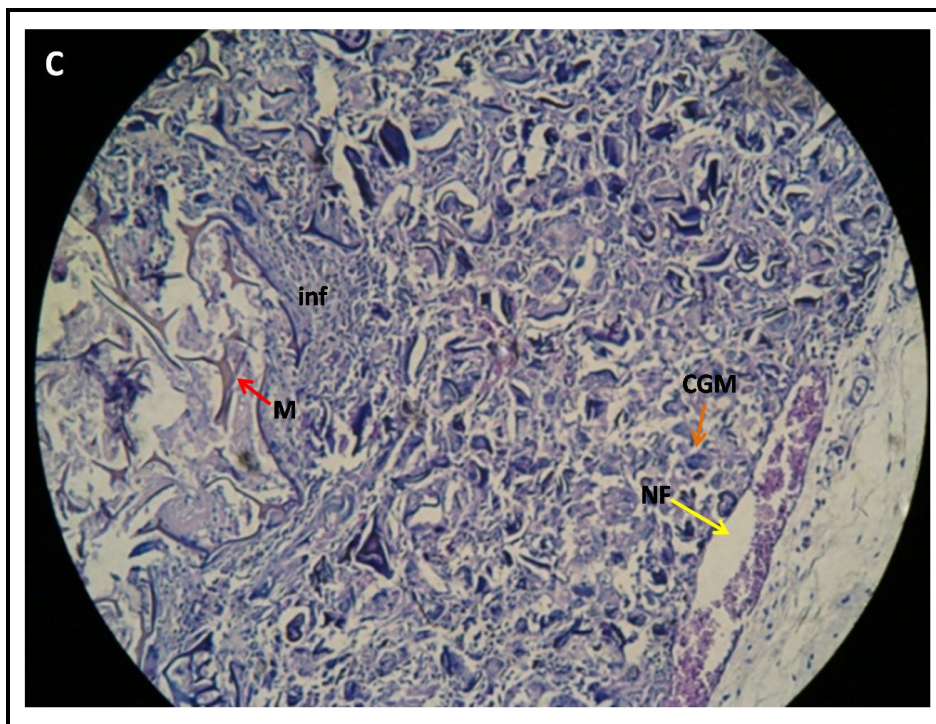


Figura 27 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com genipina colonizada por CTM diferenciadas. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado inflamatório.

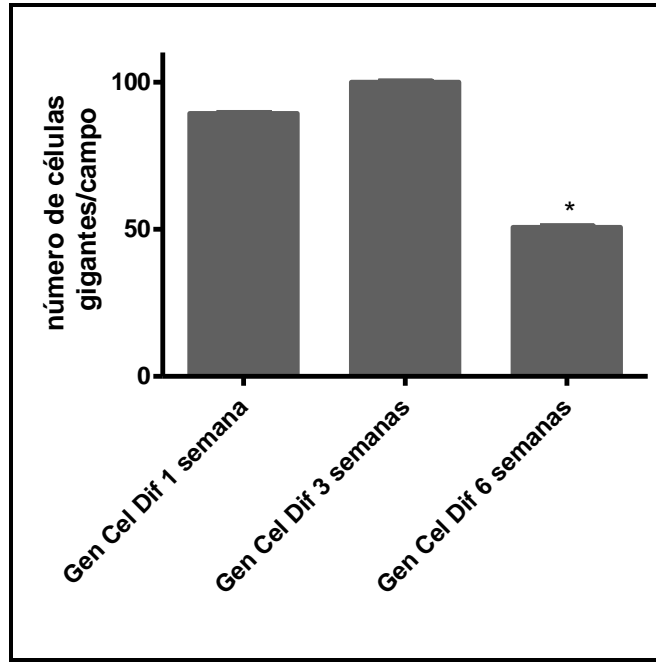


Figura 28 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes por campo em implantes de matriz reticulada com genipina colonizada por CTM diferenciadas in vitro durante 3 semanas. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Foi observado diferença estatística entre a 1ª semana e a 6ª semana após o implante. (* $p < 0,05$).

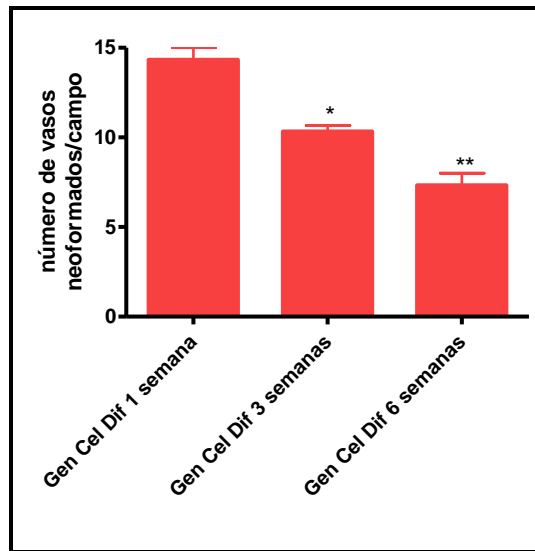


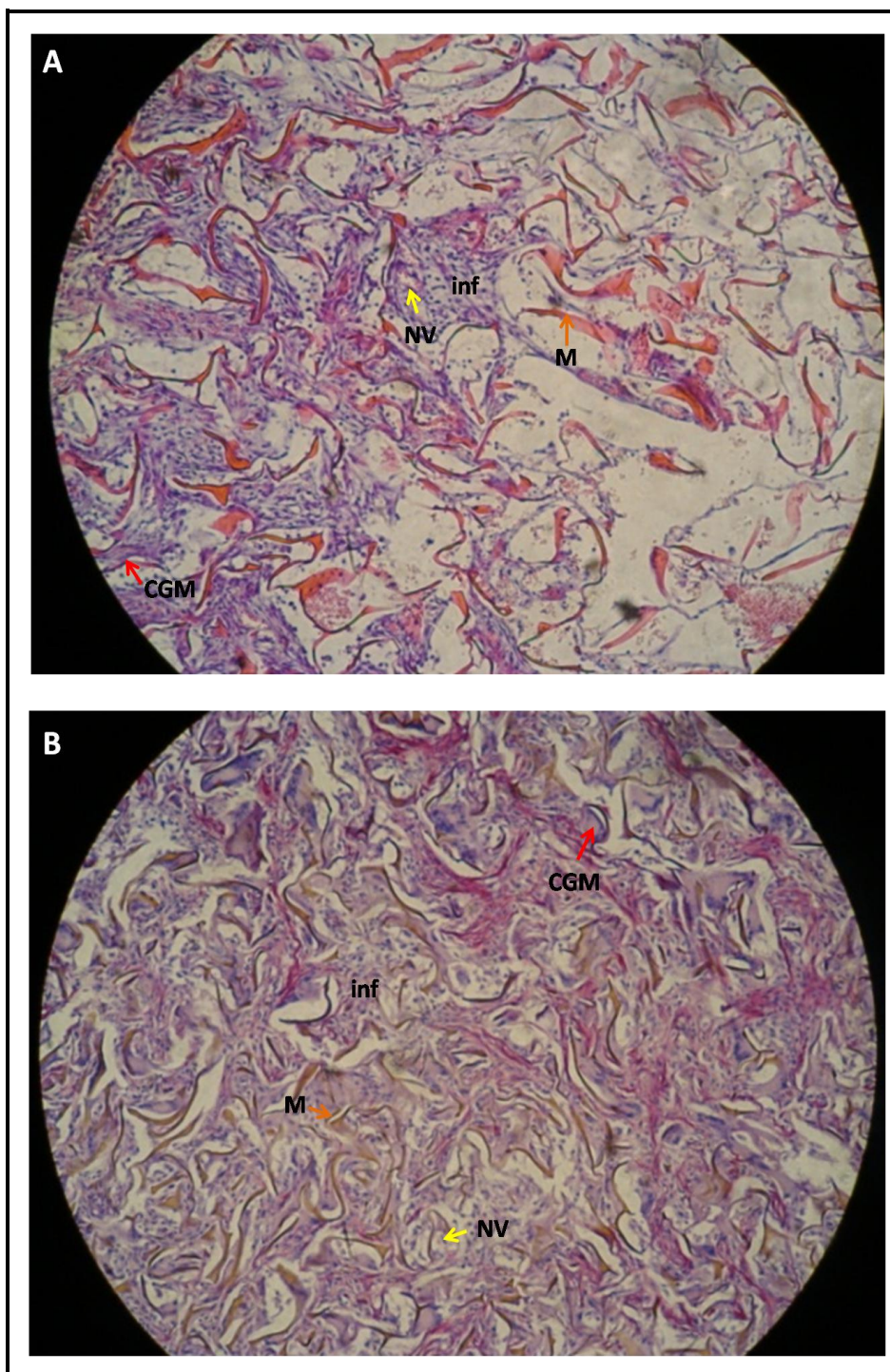
Figura 2922 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de neovascularização em implantes de matriz reticulada com genipina colonizada por CTM diferenciada in vitro durante 3 semanas. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se uma redução significativa de neovascularização na 3ª semana comparada com a 1ª semana e da 6ª semana após o implante comparada com a 1ª semana. (* $p < 0,001$).

Os dados obtidos pelas análises histológicas (n = 15) demonstram que o processo de reabsorção da matriz 3D é lenta comparada com as situações anteriores devido à reduzida quantidade de neovascularização (Figura 29). Apesar disso, o número de células gigantes distribuída pelos campos analisados é intenso (Figura 28), entretanto a intensidade da matriz ainda é alta nos períodos mais avançados. De forma que se observam nas figuras 27 A-D fragmentos menores de matriz (demonstradas pelas setas alaranjadas e pela letra M) sempre associados às células gigantes (demonstradas pelas setas vermelhas e pelas letras CGM).

Uma camada fina de fibrose circundou o implante de matriz colonizada por CTM diferenciadas a fim de isolá-lo, porém os tecidos adjacentes permaneceram na sua constituição nativa sem nenhuma alteração, mostrando que a matriz colonizada não apresentou citotoxicidade.

Implantes subcutâneos de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído

Matriz não colonizada por CTM



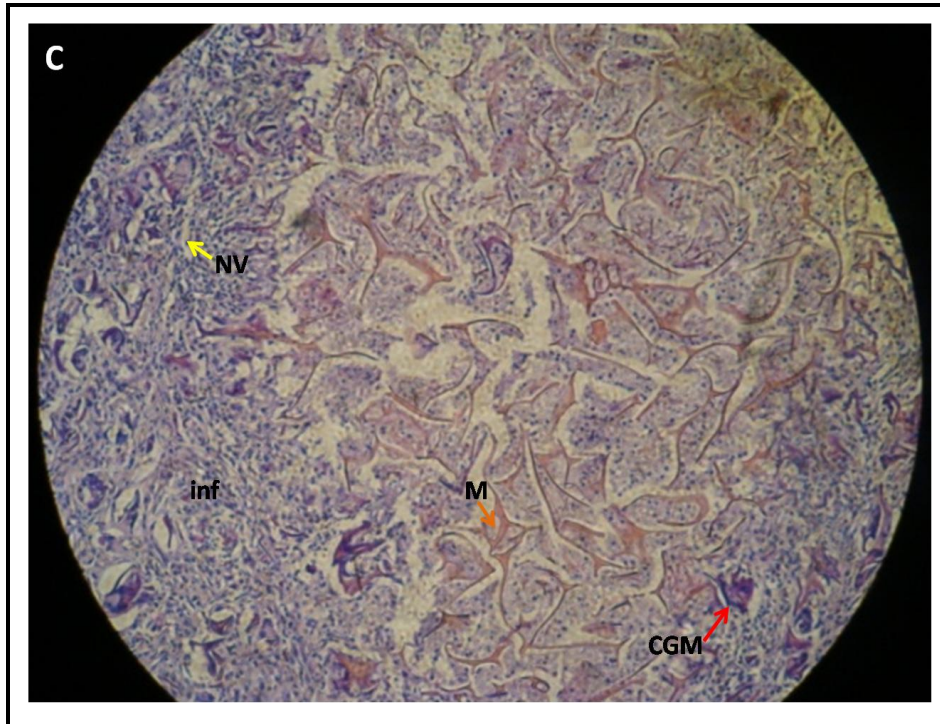


Figura 23 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído não-colonizada. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado inflamatório.

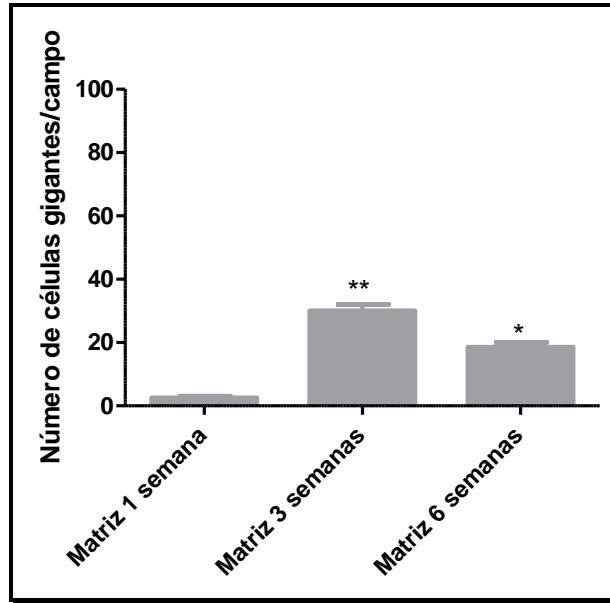


Figura 24 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes por campo em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído não colonizada. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo na 3ª semana após o implante em relação à 1ª semana e um decaimento na 6ª semana em relação à 3ª semana após o implante. (* $p < 0,05$).

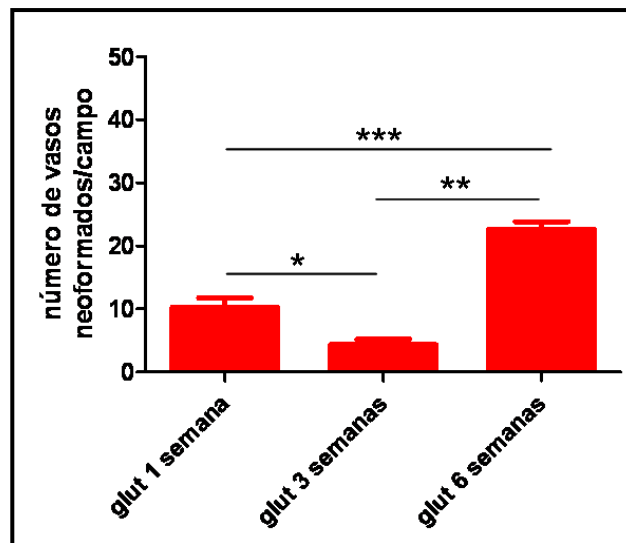


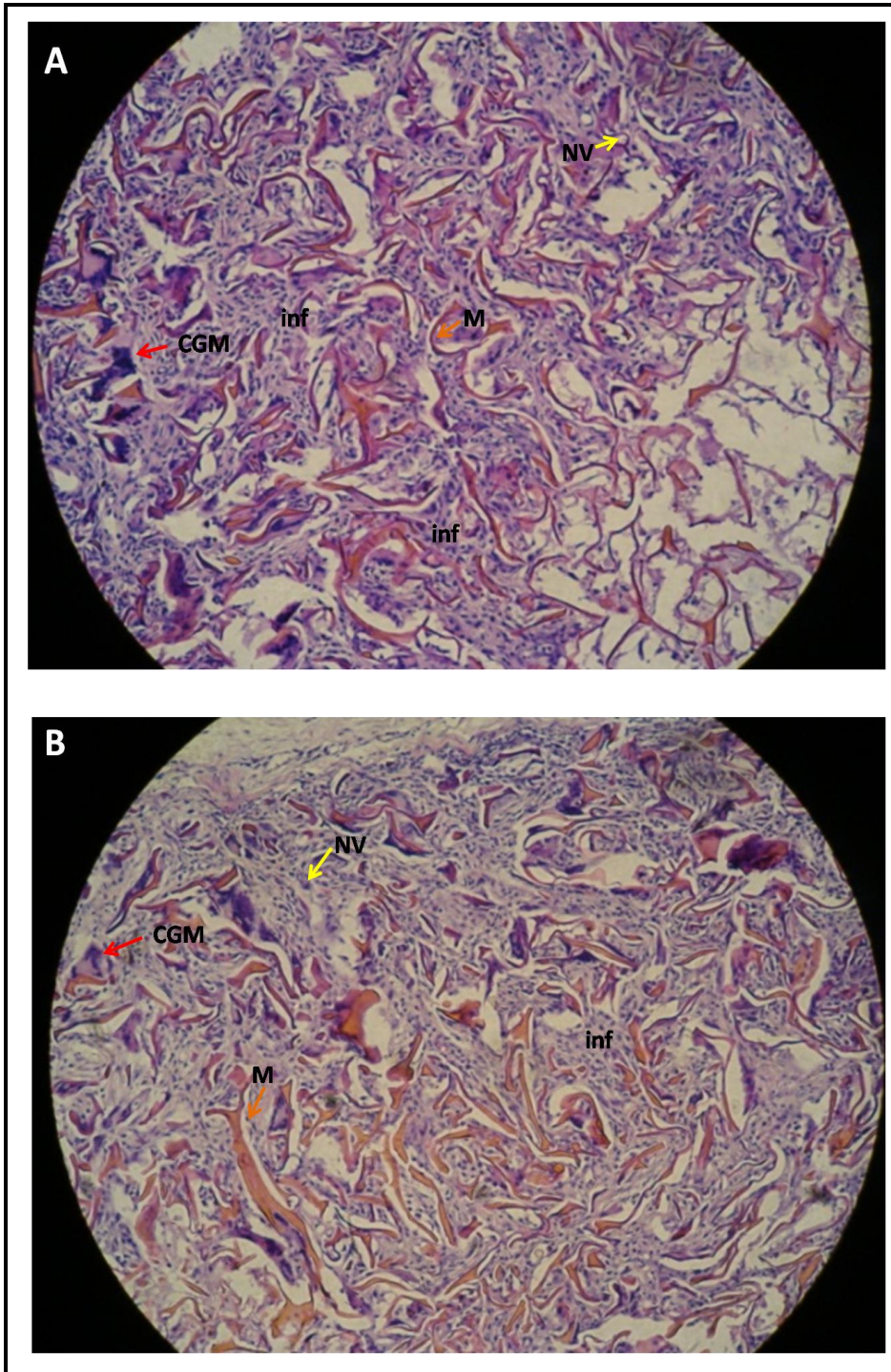
Figura 31 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de vasos neoformados por campo em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído não colonizada. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se uma redução significativa na 3ª semana após o implante em relação à 1ª semana e um aumento na 6ª semana em relação à 3ª semana e à 1ª semana após o implante. (*/**/*** $p < 0,05$).

O implante subcutâneo de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído (n = 15) apresentou um infiltrado inflamatório inicialmente discreto, migrando da periferia para o centro do implante (Figura 29 A-C). Nos períodos entre a 3ª e a 6ª semana, houve um aumento da intensidade do infiltrado inflamatório, consequentemente reduzindo a intensidade de fibras da matriz (demonstrada pela seta alaranjada e pela letra M) 3D reticulada com glutaraldeído (Figura 29 B e C). O aumento do infiltrado inflamatório se deu provavelmente pelo aumento de neoformação de vasos sanguíneos ao longo do período avaliado (Figura 31).

Com o aumento da intensidade do infiltrado inflamatório, houve também o aumento de células gigantes do tipo Langhans a partir da 3ª semana após a implantação (Figura 30). Novamente, essas células estavam associadas às fibras da matriz, evidenciada na Figura 30 A-C pela seta alaranjada e letra M. Observou que a região do implante foi circundada por uma discreta camada de fibroblastos, nessa região observou-se pequenos vasos sanguíneos que não foram considerados como neovascularização, uma vez que não havia certeza da origem dos mesmos.

O processo de reabsorção da matriz 3D reticulada com glutaraldeído foi rápido, sendo que na 9ª semana não foi possível observar vestígios de matriz e os tecidos adjacentes se reorganizaram como no estado nativo. De forma que, provavelmente o processo de reabsorção não deve liberar produtos tóxicos capazes de danificar os tecidos vizinhos.

Matriz colonizada por CTM



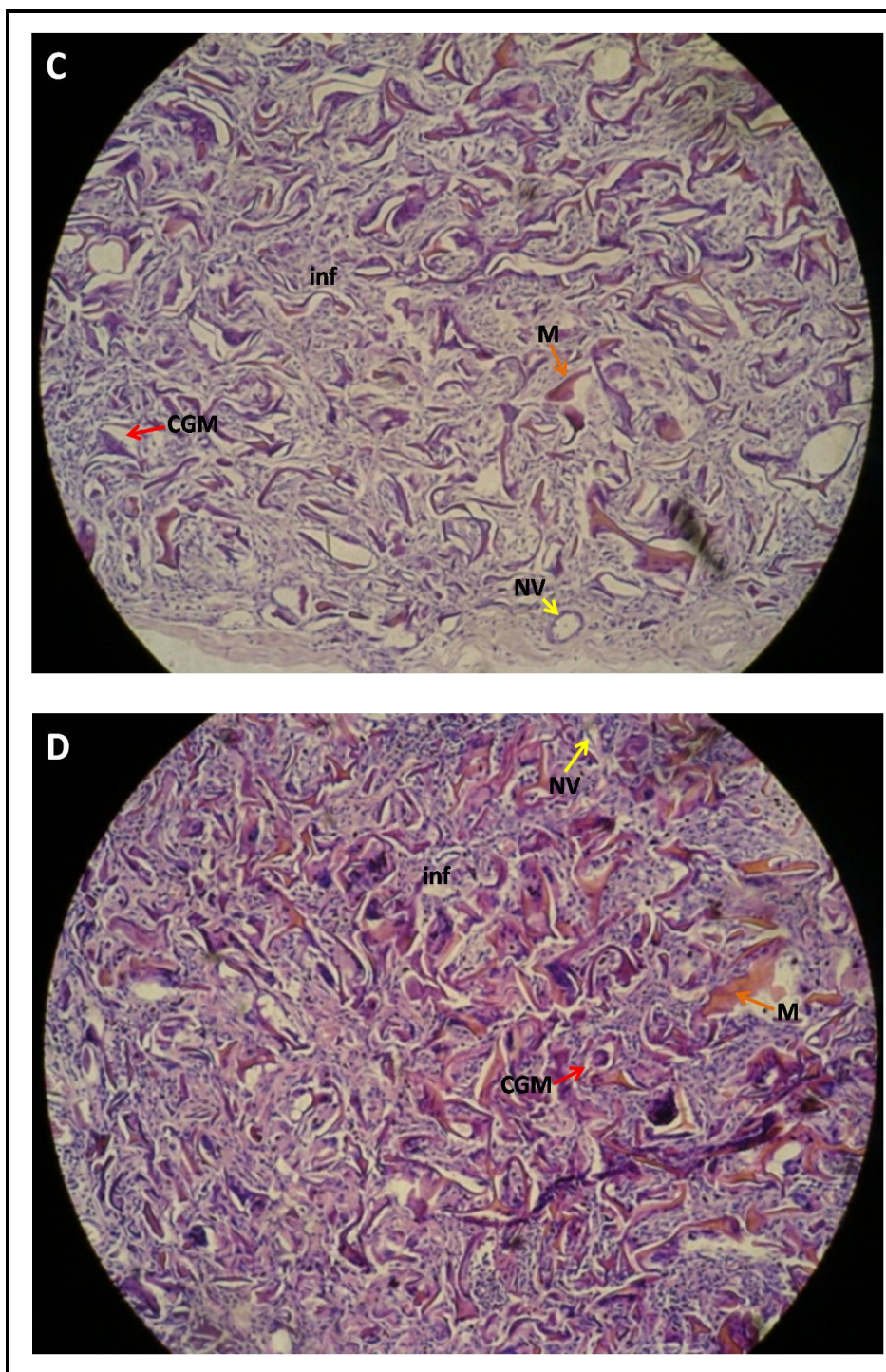


Figura 32 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. (D) Corte histológico referente a 9 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado inflamatório.

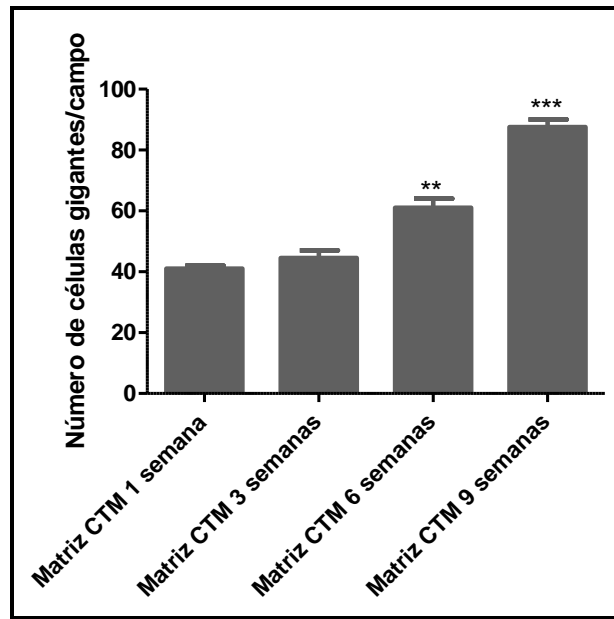


Figura 25 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes multinucleadas (CGM) por campo em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo de CGM a partir da 6ª semana. Na 9ª semana após o implante aumentou significativamente a quantidade de CGM em relação à 6ª semana. (* $p < 0,05$).

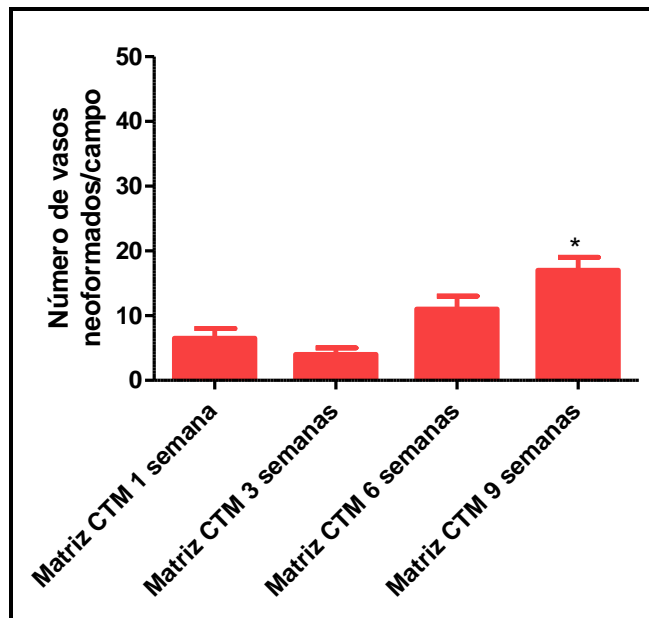
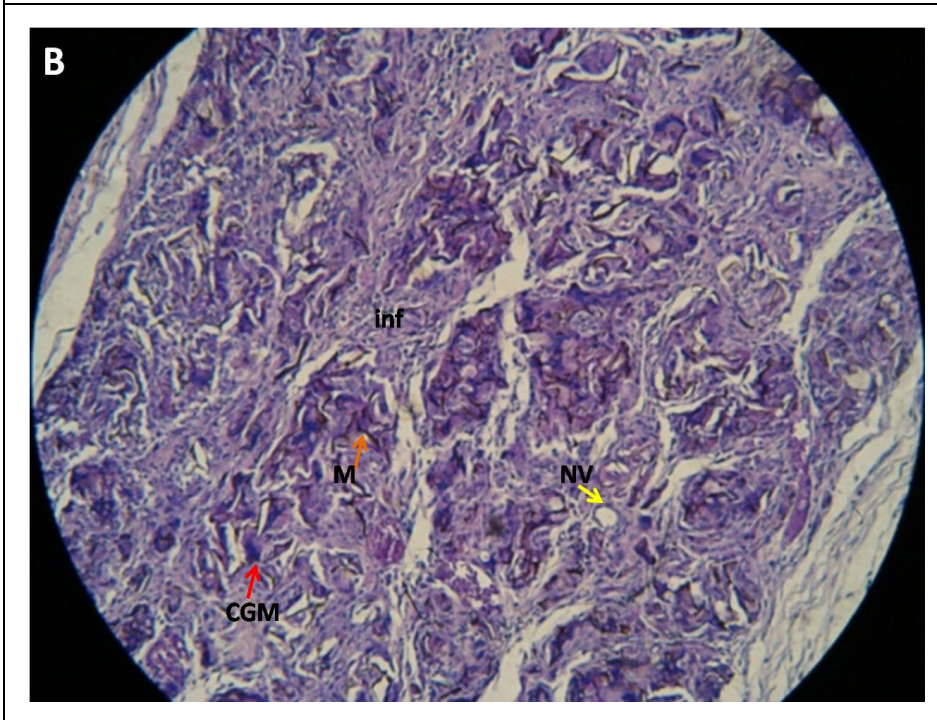
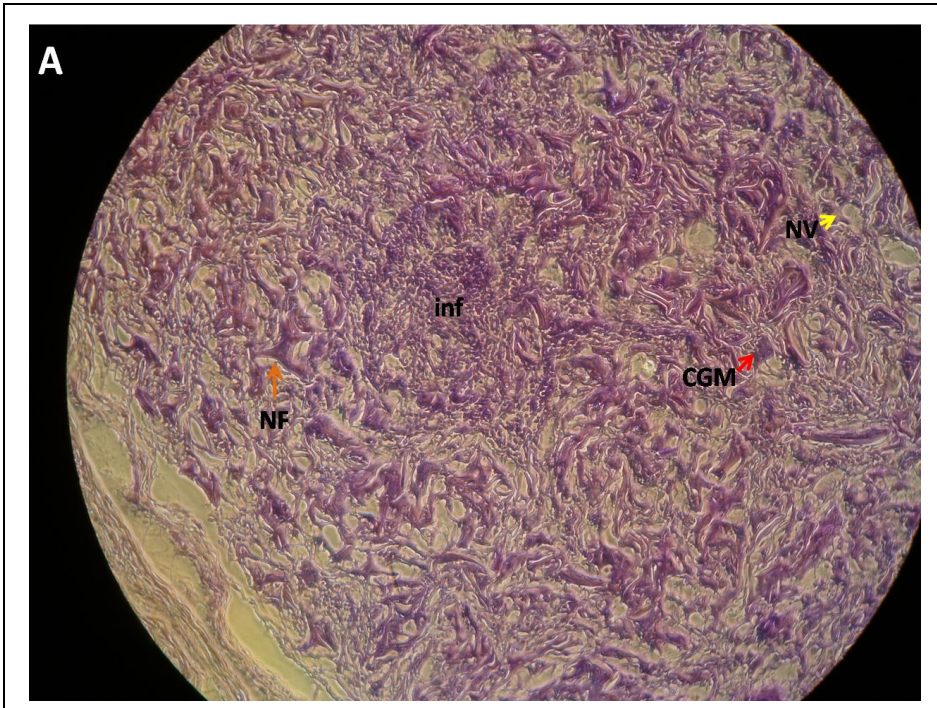


Figura 34 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de neovascularização em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se um aumento significativo de neovascularização na 9ª semana após o implante quando comparado com os demais períodos avaliados. (* $p < 0,05$).

Os dados obtidos pela análise dos cortes histológicos (n = 20) dos implantes subcutâneos das matrizes reticuladas com glutaraldeído e colonizadas por CTM demonstram que o processo de reabsorção na presença de CTM é mais lento em relação à matriz não colonizada (Figura 32 A-D). A hipótese descrita anteriormente pressupõe que as CTM alteram o meio ambiente onde elas se encontram.

Nesses cortes histológicos observou-se um infiltrado inflamatório moderado a intenso, apresentando aumento considerável de células gigantes do tipo Langhans a partir da 6ª semana após o implante (Figura 33). Nesse período, de modo interessante, apesar dos números de células gigantes e de vasos neoformados (Figura 34) se apresentarem aumentados, observou-se uma grande quantidade de fibras. A partir dessas observações, sugere-se que as fibras de matriz reticulada com glutaraldeído são reabsorvidas aos poucos, apresentando evidente redução no tamanho das fibras e não necessariamente na intensidade de fibras. Mais uma vez as CTM alteraram o meio ambiente onde elas se encontram.

Matriz colonizada por CTM diferenciada durante 3 semanas *in vitro*



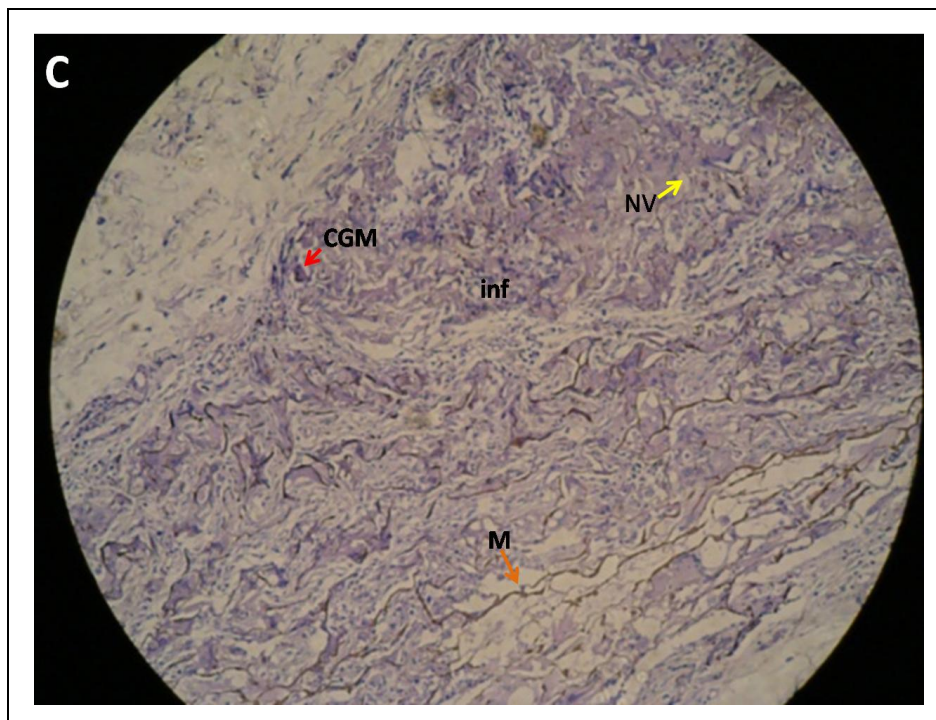


Figura 35 - Análise histológica dos implantes. Micrografias de cortes histológicos corados com H&E de implantes de matriz 3D de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM diferenciadas. (A) Corte histológico referente a 1 semana após implante. (B) Corte histológico referente a 3 semanas após o implante. (C) Corte histológico referente a 6 semanas após o implante. Legenda: CGM: Células Gigantes Multinucleadas (seta vermelha); M: Fibras da Matriz 3D (seta alaranjada) e NV: neovascularização (seta amarela); inf: infiltrado inflamatório.

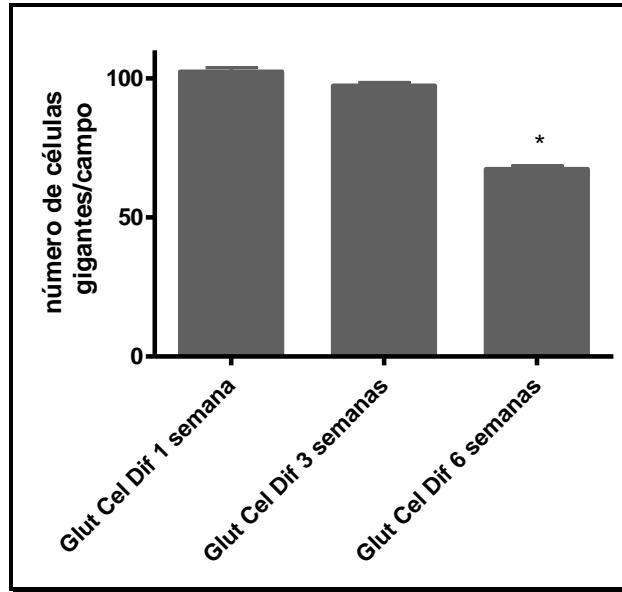


Figura 26 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de células gigantes multinucleadas (CGM) por campo em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM diferenciadas in vitro durante 3 semanas. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se uma redução significativa de CGM a partir da 6ª semana. (* $p < 0,001$).

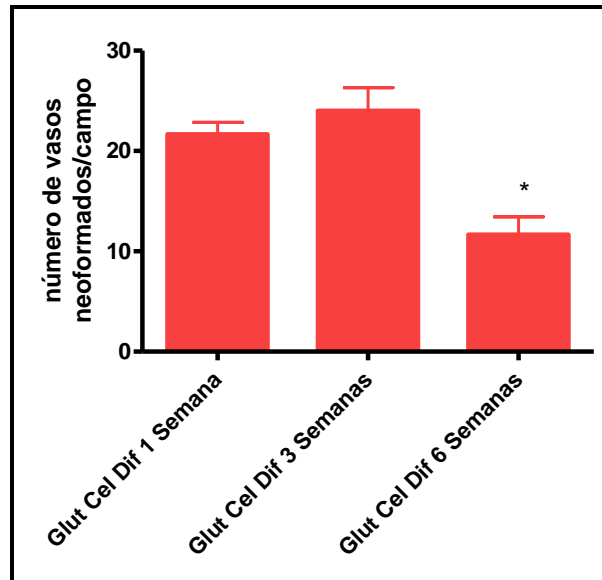


Figura 37 - Representação gráfica da avaliação quantitativa de vasos neoformados por campo em implantes de matriz reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM diferenciadas in vitro durante 3 semanas. Foram avaliados aleatoriamente 3 campos de cada grupo. Observa-se uma redução significativa de CGM a partir da 6ª semana. (* $p < 0,05$).

Nas micrografias (n = 15) observou-se uma redução no tamanho do fragmento das fibras da matriz sem alterar significativamente a quantidade da mesma (Figura 35 A-C). Notou-se uma redução de vasos neoformados a partir da 6ª semana (Figura 37), seguida da redução da quantidade de células gigantes (Figura 36).

É importante salientar que o processo de reabsorção da matriz reticulada com glutaraldeído colonizada por células diferenciadas durante 3 semanas apresenta-se tão lento quanto a reabsorção da matriz reticulada com genipina colonizada por células diferenciadas durante 3 semanas. Da mesma forma, o perfil de neovascularização e presença de células gigantes também foi bastante semelhante entre os dois grupos.

Os tecidos adjacentes se apresentaram na sua constituição nativa e o implante novamente foi circundado por uma fina camada de fibrose.

Implantes das matrizes 3D colonizadas por CTM diferenciadas por 3 semanas em meio indutor condrogênico em dorso de Ratos Wistar (Imunofluorescência)

Os resultados apresentados nesta fase foram realizados somente nos grupos que receberam implantes de matrizes colonizadas com CTM previamente diferenciadas *in vitro* durante 3 semanas. Esses implantes permaneceram no dorso desses animais (n = 6) por 6 semanas quando então, esses animais foram eutanasiados para a coleta do material. Esse ensaio teve a finalidade de verificar a manutenção do fenótipo observado *in vitro*, ou seja, a expressão de colágeno do tipo II e a possibilidade de formação do tecido cartilaginoso.

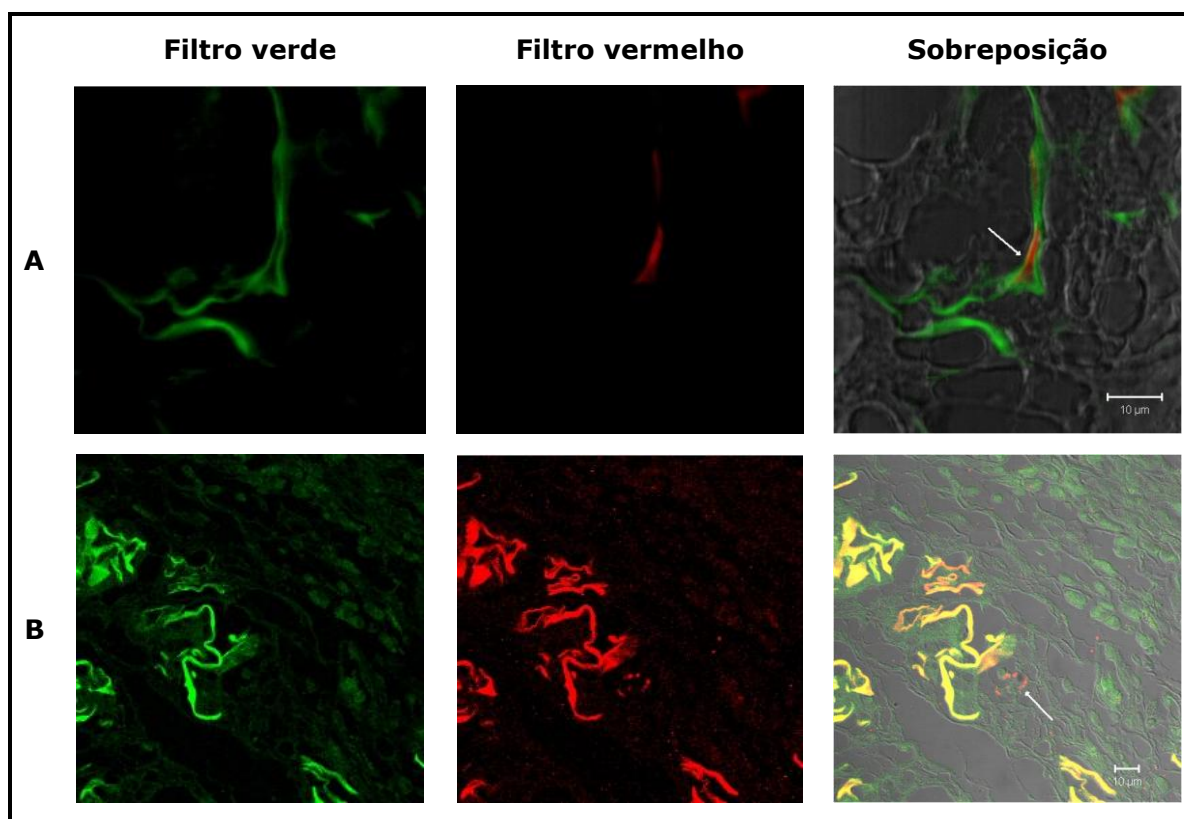


Figura 39 - Identificação de colágeno do tipo II. Implantes das matrizes colonizadas por células-tronco previamente diferenciadas. Eutanasia dos animais realizada 6 semanas após o implante. (A) Matriz reticulada com glutaraldeído. (B) Matriz reticulada com genipina. (setas) Indicam marcação de colágeno do tipo II na imagem de sobreposição.

As matrizes apresentaram auto-fluorescência em ambos os filtros de 510 a 560 nm (verde) e de 663 a 738 (vermelho) (Figura 39 A e B). Na imagem de sobreposição é que se

pode certificar a presença da expressão de colágeno do tipo II (Alexa 555) em vermelho e indicado pelas setas.

Através da imunofluorescência pode ser observado que as células mantiveram o fenótipo diferenciado, uma vez que em ambos os implantes (matrizes reticuladas com glutaraldeído – Fig 39 A e com genipina – Fig 39 B) houve expressão de colágeno do tipo II (vermelho), visualizada pela imagem de sobreposição e indicada pelas setas. Este resultado demonstrou a capacidade das células de manter o fenótipo obtido *in vitro*, mesmo por um longo período *in vivo*, além da capacidade das matrizes em mimetizar a MEC nativa.

Discussão

O objetivo da Engenharia de Tecido se baseia na colonização de matriz 3D pelas células, sendo estas as responsáveis pela síntese da MEC do novo tecido e, portanto, a escolha adequada dessas células garante o sucesso dessa tecnologia (Ikada et al., 2006). Diante do leque de possibilidade de células a serem utilizadas nessa técnica, as células-tronco adultas tem chamado maior atenção dos pesquisadores devido ao potencial clínico dessas células que incluem a capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares, além da sua capacidade de auto-renovação. A partir dessas características, inúmeras possibilidades de utilização dessas células tem sido demonstradas tais como: em terapia celular, terapia gênica e Engenharia de Tecido. Pelo enorme potencial dessas células, estudos se nortearam na busca de fontes alternativas de células-tronco.

Em 2001, de forma pioneira, Patricia Zuk e colaboradores descreveram uma população de células derivadas do tecido adiposo humano com características semelhantes às células-tronco extraídas da medula óssea humana, até então uma das únicas fontes dessas células. Além disso, esses pesquisadores demonstraram vantagens em obter uma quantidade superior dessas células comparada à medula óssea, além da facilidade de acesso ao tecido, mantendo, entretanto, a facilidade de manipulação das células *in vitro*.

Diante desse estudo e de outros que dele se advieram e diante do leque de possibilidades que as células-tronco apresentam, optou-se no presente trabalho estudar as células-tronco derivadas de tecido adiposo de ratos como fonte alternativa de célula para o tratamento de lesão condrocitária via Engenharia de Tecido cartilaginosa. De forma que, buscou salientar a capacidade de diferenciação dessas células *in vitro* e a capacidade das mesmas em colonizar matrizes 3D compostas de quitosana e gelatina. Além de destacar a

construção dessas matrizes 3D e da capacidade das mesmas em reproduzir a matriz extracelular (MEC) de tecido cartilaginoso, *in vivo*. De forma que essa mimetização visou manter o fenótipo adquirido por período prolongado *in vivo*. Tais idéias se basearam na premissa de que o sucesso do tratamento da lesão condrocitária através da Engenharia de Tecido leva em consideração tanto a diferenciação das células-tronco *in vitro* e o potencial dessas células em colonizar matrizes, como a manutenção do fenótipo diferenciado e a resistência do novo tecido em formar vascularização e de entrar no processo de ossificação endocondral *in vivo* (De Bari et al., 2004).

Inicialmente, foram avaliadas as características primárias das células-tronco em cultivo tais como morfologia fusiforme e semelhante a fibroblasto, a capacidade de aderência à superfície plástica da placa de cultivo e a capacidade proliferativa. De forma que os resultados obtidos nesse trabalho concordam com os obtidos por Zuk e cols (2001), em que foi descrito que as células cultivadas possuem morfologia fusiforme, além de se apresentarem aderentes, organizadas em colônias e com alta capacidade proliferativa em cultivo.

Segundo essa mesma autora, a proliferação dessas células, *in vitro*, se deve à presença de soro fetal. Em meio de cultura basal (DMEM + 10% de soro fetal bovino) essas células foram capazes de se proliferar de forma a permitir a expansão da cultura, sendo mantidas em cultivo até no máximo a 6ª passagem sem apresentar sinais de senescência celular. Entretanto, notou-se uma redução da capacidade proliferativa quando as células foram cultivadas em meio indutor condrogênico com baixa concentração de soro fetal, concordando com a autora supracitada.

Diante dos critérios estabelecidos por Zuk e cols (2001 e 2002) e atualmente os critérios padronizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular realizou-se a

caracterização fenotípica quanto à expressão de moléculas de superfície (CD). Essa caracterização se baseia na combinação de expressão e não expressão de moléculas de superfície nas células-tronco. Foram utilizados neste trabalho anticorpos anti-CD54, anti-CD90 e anti-CD73 considerados marcadores fenotípicos de células-tronco mesenquimais, dos quais a maioria das células estudadas apresentou a expressão, além do anticorpo anti-CD45 considerado marcador fenotípico de células-tronco hematopoiéticas, que dentre as células estudadas poucas apresentaram a expressão deste marcador. Os resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência confirmaram o proposto por esta autora. A população estudada apresentou predominância de células-tronco mesenquimais capazes de se diferenciar em várias linhagens celulares e de auto-renovação.

No laboratório onde esse trabalho foi desenvolvido foi demonstrada a capacidade de diferenciação das células-tronco em linhagem osteogênica (Carvalho et al., 2008 – não publicado), cardiomiogênica (Carvalho et al., 2008 – não publicado) e condrogênica (Breyner et al., 2009). A capacidade das células-tronco de se diferenciar em distintas linhagens celulares é um dos requisitos básicos de caracterização das células-tronco mesenquimais, segundo De Ugarte e cols (2003), Anjos-Afonso e cols (2004) e Zuk e cols (2001 e 2002).

No presente trabalho, realizou-se a diferenciação das células-tronco em meio indutor condrogênico e os resultados da diferenciação celular foram demonstrados através da redução da capacidade de proliferação celular (metabolização do MTT) e da atividade da enzima fosfatase alcalina ao mesmo tempo em que houve aumento da síntese de colágeno total. Observou-se, também, a expressão de colágeno do tipo II, a partir da 3ª semana de cultivo celular em meio indutor de diferenciação. Além disso, outras alterações foram demonstradas pela ausência de expressão dos marcadores de superfície CD54 e CD90, mantendo apenas a expressão de CD73.

Segundo Mountfourd e cols (2008), as células-tronco são capazes tanto de se diferenciar como de proliferar ou auto-renovar. Entretanto, segundo esse mesmo autor, quanto mais comprometida com a diferenciação, menor é a capacidade proliferativa das células, fato que corrobora com a redução da metabolização do MTT, demonstrando a diminuição da capacidade de proliferação celular. Assim, esse autor ainda explica que, essa redução da capacidade proliferativa é apenas um estágio intermediário na maioria dos tecidos, ou seja, um balanço entre a diferenciação e a proliferação celular. Esse estágio garante a não formação de tumores derivados de proliferação exagerada das células. Assim, esse autor reafirma que essa capacidade de auto-renovação é única nas células-tronco e é perdida nas células comprometidas com a diferenciação. Além disso, considerando o fato de que o meio indutor condrogênico utilizado neste trabalho apresentava baixa concentração de soro fetal e atentando à proposta de Zuk e cols (2001) de que o soro fetal influencia na proliferação celular, acredita-se que a redução da concentração de soro fetal no meio de diferenciação também inibiu a proliferação das células. Porém, os outros componentes presentes nesse mesmo meio, tais como TGF- β e dexametasona, estimularam a diferenciação celular.

Junto com a redução da capacidade de proliferação das células-tronco cultivadas em meio indutor condrogênico, ocorreu redução na atividade da enzima fosfatase alcalina e aumento da síntese de colágeno total. A enzima fosfatase alcalina está expressa em células-tronco e também participa do processo de mineralização de tecido ósseo em formação (Machado et al., 2007 e Hung et al., 2002). Portanto, a redução da atividade desta enzima é um indicativo da alteração fenotípica sofrida pelas células quando cultivadas em meio indutor condrogênico. Além dessa alteração, a quantidade de colágeno produzida por essas células cultivadas no meio de diferenciação aumentou ao longo do período analisado e é sabido que a matriz extracelular de tecido cartilaginoso é composta principalmente de colágeno (Melrose et

al., 2008; Mueller et al., 2008; James et al., 2007; Betre et al., 2006 e Raghunath et al., 2005). Dessa forma, a redução na atividade da enzima fosfatase alcalina ao mesmo tempo em que houve o aumento da síntese de colágeno total e a redução da proliferação celular, pode ser um indicativo de que as células-tronco cultivadas em meio indutor condrogênico se comprometeram com a diferenciação celular.

A fim de confirmar essa sugestão, realizou-se a reação de ampliação de transcritos gênicos para colágeno do tipo II, osteopontina e β -1 actina nos diferentes períodos de cultura das células-tronco em meio indutor condrogênico (0, 1, 3, 6 e 9 semanas). Esse resultado apresentou a expressão de colágeno do tipo II a partir da 3ª semana de cultivo e manteve a expressão até a 9ª semana de cultivo. De acordo com Melrose e cols (2008); Mueller e cols (2008); James e cols (2007); Betre e cols (2006) e Raghunath e cols (2005), a síntese de colágeno do tipo II é uma inferência à formação de condrocitos. A expressão de colágeno do tipo II pode ser devido à presença de TGF- β (Melrose et al., 2008; Betre et al., 2006 e Raghunath et al., 2005) e de dexametasona (Mueller et al., 2008). De acordo com James e cols (2007), o papel da dexametasona é importante na condrogênese, todavia esse papel ainda não é completamente entendido. Diante dessa observação, Mueller e cols (2008) sugeriu que a dexametasona pode estimular a hipertrofia condrocitária e, conseqüentemente a ossificação endocondral. Este mesmo autor afirmou ainda que hipertrofia condrocitária geraria um aumento da atividade da enzima fosfatase alcalina, o que foi contradito pelos resultados obtidos no presente trabalho. Portanto, as evidências apresentadas pelos resultados obtidos, indicaram que as células-tronco mesequimais derivadas de tecido adiposo de rato cultivadas em meio indutor condrogênico comprometeram-se com a diferenciação condrocitária sem, entretanto, favorecer a ossificação endocondral, contrariando o que foi sugerido por Mueller e cols (2008) e corroborando com a inferência feita por James e cols (2007).

Além dessas evidências, outros resultados obtidos neste trabalho também confirmaram a hipótese de que as células-tronco se diferenciaram em condrócitos. Células-tronco mesenquimais transgênicas (eGFP) foram cultivadas por 9 semanas em meio indutor condrogênico e, então, avaliadas quanto a presença de alguns marcadores de superfície. Foram utilizados os mesmos anticorpos anti-marcadores de superfície utilizados para a caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais, CD90, CD54, CD45 e CD73, além de osteocalcina e colágeno do tipo II. Após as 9 semanas de cultivo dessas células-tronco em meio indutor condrogênico verificaram-se algumas alterações de expressão, confirmando a diferenciação das células-tronco em condrócitos. Notou-se que houve a perda da expressão de CD90 e CD54 e a manutenção da expressão de CD73. Além da expressão de colágeno do tipo II e da não expressão de osteocalcina.

Osteocalcina, segundo Machado e cols (2007), é um marcador de tecido ósseo e foi utilizado neste trabalho como um controle negativo da diferenciação condrocitária. Em relação ao CD 90, sabe-se que este marcador é expresso em tímócitos, neurônios, células-tronco mesenquimais, células-tronco hematopoiéticas, células *Natural Killer*, células endoteliais, células dos glomérulos renais, células circulantes de melanoma metastático, células dendríticas foliculares, alguns fibroblastos e mioblastos. Além disto, também é sabido que a expressão de CD90 é mantida quando as células-tronco se comprometem com a diferenciação endotelial, sendo estas células nesta situação capazes de formar estruturas semelhantes a capilares (De Francesco et al., 2009). Também, segundo Pluskota e cols (2000) e De Francesco e cols (2009), a expressão de CD54 (ICAM-1) além de regular a sobrevivência de células endoteliais, está relacionado diretamente com o processo de adesão das células sanguíneas ao endotélio. CD54 também é uma molécula envolvida na aderência das células-tronco ao substrato de cultivo. Durante o processo de diferenciação notou-se

alteração morfológica das células-tronco para a forma arredondada e a redução da capacidade de adesão das células, provavelmente devido à perda da expressão de CD54. Portanto, a perda da expressão desses dois marcadores, CD90 e CD54, se justifica pelo comprometimento das células-tronco na diferenciação condrogênica, pois a ausência dessas moléculas de superfície indica uma resistência à diferenciação das células-tronco em células endoteliais e assim concorda com uma das características mais relevantes do tecido cartilaginoso, a ausência de vascularização (De Bari et al., 2004 e Guo et al., 2006).

A expressão de colágeno do tipo II é uma inferência direta da diferenciação das células-tronco em condrócitos e da resistência dessas células em seguirem o caminho da ossificação endocondral, segundo De Bari e cols (2004), Raghunath e cols (2005), Betre e cols (2006), James e cols (2007), Melrose e cols (2008) e Mueller e cols (2008). De modo interessante, a permanência da expressão de CD73 corrobora com os resultados obtidos e confirma a diferenciação condrogênica. Uma vez que, segundo Colgan e cols (2006), a expressão de CD73 influencia diretamente no transporte de íons em tecidos intactos, responsável pela nutrição celular, além de estar relacionado diretamente com a resposta adaptativa das células a situações de hipóxia. Como o tecido cartilaginoso não possui vascularização, o processo de nutrição das células é por difusão de nutrientes, demonstrando a importância da expressão de CD73 nas células diferenciadas. Portanto, esses resultados estão de acordo com De Bari e cols (2004), Guo e cols (2006), Colgan e cols (2006) e com as descrições revisadas por Benedek e cols (2006) que afirmaram que o tecido cartilaginoso não apresenta vascularização além de resistente à invasão vascular. Assim, a ausência de expressão de CD90 e CD54 e a permanência da expressão de CD73 demonstraram de maneira elegante uma das formas de adaptação dessas células diferenciadas em sobreviver em situações de hipóxia, manter-se nutrida e ainda não formar regiões de necrose. Portanto,

diante dos resultados obtidos pode-se concluir que as células-tronco mesenquimais a partir da 3ª semana de cultivo em meio indutor condrogênico demonstraram a capacidade de diferenciação em condrócito.

A ausência de vascularização no tecido cartilaginoso vem atraindo a atenção de estudiosos da área de Engenharia de Tecido. Essa peculiaridade faz com que qualquer lesão no tecido cartilaginoso seja progressivamente aumentada e, conseqüentemente acarretando em degeneração do tecido e afetando de modo severo o movimento. A cartilagem articular tem ainda baixa capacidade de auto-reparo, relacionado diretamente com a ausência de vascularização e em decorrência disso, apresenta deficiente migração de células reparadoras para o local da lesão (He et al., 2009 e Alves da Silva et al., 2009).

Atualmente, não há metodologia adequada para restauração completa da cartilagem danificada. As terapias atuais incluem artroplastia, que consiste na substituição da articulação por prótese e, ultimamente, tem sido bastante utilizado o transplante de condrócitos autólogos (Alves da Silva et al., 2009). Entretanto, o uso de condrócitos autólogos acarreta em um segundo foco de lesão condrocitária e, além disso, é necessário expandir a cultura celular para obter um número suficiente de células para implantes. Segundo De Bari e cols (2004), a expansão *in vitro* de condrócitos articulares possui alguns desafios, um deles a senescência celular. Além disso, a expansão dessas células em cultura de monocamada resulta em dediferenciação, ou seja, perda da capacidade de formar cartilagem hialina estável *in vivo*, que seja resistente à invasão vascular e à ossificação endocondral. A fim de evitar esses problemas, as células-tronco tem sido propostas como as principais substitutas dos condrócitos autólogos. Agregado a essa alternativa, a Engenharia de Tecido também é uma estratégia promissora para reparar defeitos cartilaginosos e restaurar as funções articulares. Porém até hoje não se obteve uma matriz tridimensional (3D) porosa ideal para este objetivo.

A Engenharia de Tecido é uma nova e atraente tecnologia que cria tecidos funcionais usando células combinadas com matrizes 3D ou dispositivos que facilitem o crescimento, a organização e a diferenciação celular. A interação entre MEC e células na cartilagem é o fator chave para manter a integridade e a funcionalidade da cartilagem nativa. A MEC de tecido cartilaginoso é composta de fibras colágenas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e elastina que interagem diretamente com condrócitos. Essa complexa organização e interação entre as células e a MEC é dependente do meio ambiente 3D em que elas estão organizadas. Assim, a importância da MEC na organização tecidual, levou o desenvolvimento de diferentes tipos de matrizes. Nesse contexto, apresentam-se tanto as matrizes compostas por polímeros naturais como por polímeros sintéticos ou por cerâmicas. Alguns pesquisadores tem desenvolvido diferentes modelos de cartilagem (*in vitro* e *in vivo*) usando biomateriais em associação com diferentes tipos de células. A maioria desses estudos se objetiva em resolver problemas clínicos e, portanto, é necessária a avaliação prévia em modelos animais *in vivo* (Tortelli & Cancedda, 2009).

Sabe-se que as matrizes 3D porosas podem ser utilizadas para recrutar células reparadoras de uma maneira organizada e guiada a fim de reconstruir a cartilagem perdida, oferecendo dessa forma uma promissora estratégia de reparo (Hoffmann et al., 2009). Segundo He e cols (2009), uma matriz ideal para Engenharia de Tecido cartilaginoso deve ter uma rede de poros interconectados, necessários para adesão celular, de forma a facilitar o crescimento tecidual (Tuan et al., 2002). No presente trabalho, as matrizes 3D foram construídas a base de quitosana e gelatina e a diferença entre elas foi o tipo de reticulante, em uma utilizou-se glutaraldeído e na outra, genipina. Entretanto, ambas apresentaram redes de poros interconectados, obtidos a partir dos processos de congelamento e liofilização dos dois grupos de matrizes 3D construídas. Durante o congelamento, cristais de gelo foram formados

e através da liofilização esses cristais foram removidos, dando origem ao material poroso e com interconexões. Essa característica das matrizes obtidas demonstrou que processo de liofilização apresentou-se adequado, uma vez que garantiu a integridade estrutural dos poros (Choi et al., 2009). Choi e cols (2009) e Hoffmann e cols (2009) afirmam ainda que tanto a uniformidade dos poros, quanto o tamanho até 150 μ m favorecem o crescimento e adesão de células do tamanho de fibroblastos e condrócitos, e que essas características devem ser priorizadas. Além de favorecer a dispersão de nutrientes e metabólitos, os poros de tamanho adequados permitem a formação de neovascularização *in vivo*, segundo esses autores, fato importante para evitar necrose no interior da matriz implantada. Os resultados obtidos neste trabalho se adéquam ao afirmado pelos autores supracitados, o tamanho dos poros nas diferentes matrizes variou de 50 a 150 μ m, favorecendo a adesão das células-tronco, além da difusão de nutrientes e de metabólitos e evitou a formação de necrose *in vitro*. Entretanto, a diferença *in vitro* entre uma matriz e outra foi em relação à arquitetura dos poros e à resistência mecânica. Os poros da matriz de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído apresentaram-se prevalentemente arredondados, enquanto que os da matriz de quitosana e gelatina reticulada com genipina apresentaram uma arquitetura irregular.

Segundo Englert e cols (2007), glutaraldeído é o reticulante mais utilizado na engenharia de tecidos, reage com grupos amina de proteínas, principalmente resíduos de lisina presente em colágeno, formando uma Base de Schiff. Entretanto, vem sido descrito efeitos citotóxicos deste reticulante, além de apresentar reduzido potencial de reação com substâncias acetiladas. Em contrapartida, genipina é de origem natural e descrita como biocompatível e menos citotóxica quando comparada com glutaraldeído, portanto bem tolerada.

Segundo Hoffmann e cols (2009), o tipo de ligação realizada pela genipina é a mesma realizada pelo glutaraldeído, com grupos aminas e por ligação covalente. Porém, segundo

Englert e cols (2007), o glutaraldeído é bifuncional, ou seja, as duas extremidades da mesma molécula de glutaraldeído são capazes de reagir com duas moléculas diferentes de colágeno, por exemplo. Enquanto que, a genipina reage de forma diferente, uma molécula de genipina reage com apenas uma molécula de colágeno. Entretanto, a ligação cruzada, função esperada de um reticulante, ocorre quando duas moléculas de genipina se ligam, como demonstrado na figura 39.

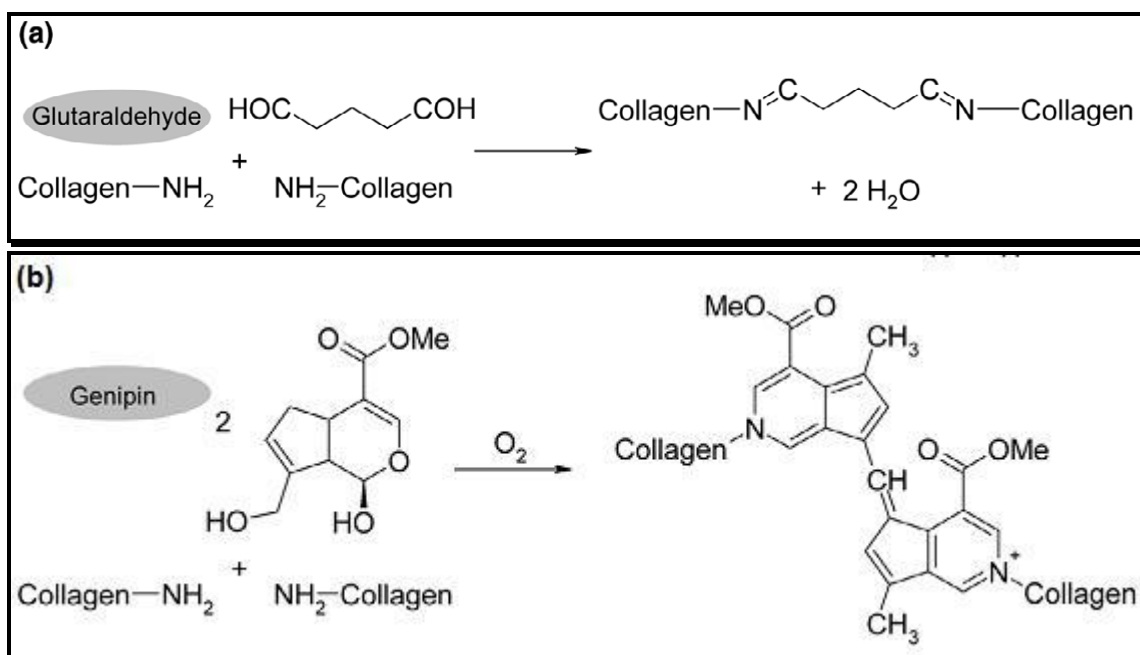


Figura 27 - Reticulação esquemática de colágeno. (a) Glutaraldeído foi utilizado como reticulante. (b) genipina foi utilizada como reticulante.

Os resultados *in vitro* obtidos neste trabalho mostraram que a qualidade da arquitetura dos poros da matriz reticulada com genipina foi inferior à arquitetura dos poros da matriz reticulada com glutaraldeído. Essas observações são um indício de que o tipo de ligação realizada pelo reticulante influencia não somente na arquitetura desses poros, mas possivelmente nas propriedades mecânicas dessas matrizes. Uma vez que, *in vitro*, a matriz reticulada com glutaraldeído apresentou maior deformação plástica que a matriz reticulada com genipina, concordando com Picker-Freyer e cols (2006).

Em relação à citotoxicidade, Englert e cols (2007) verificou que tanto glutaraldeído como genipina reduziram a atividade metabólica das células na mesma proporção, *in vitro*. Esses dados concordam com o resultado obtido, no qual a representação gráfica demonstrou que não houve diferença significativa na metabolização do MTT pelas células cultivadas em matrizes de quitosana e gelatina reticuladas com glutaraldeído e com genipina. Esse resultado permite inferir que o tipo de reticulante não influenciou na viabilidade dessas células *in vitro*.

A capacidade de colonização das matrizes 3D pelas células-tronco mesenquimais foi avaliada pela metabolização do MTT, discutido acima e através de microscopia eletrônica de varredura. Segundo Alves da Silva e cols (2009), a porosidade influencia não só nas características mecânicas da matriz, mas também na capacidade de diferenciação e manutenção do fenótipo celular. Ainda de acordo com este autor, as matrizes apesar das suas diferenças estruturais não apresentaram diferença em promover adesão celular, sendo, portanto consideradas adequadas ao cultivo de células-tronco mesenquimais.

Ainda de acordo com Thei Han e cols (2009), um dos principais desafios da engenharia de tecido é conciliar as propriedades físico-químicas da matriz 3D com o comportamento biológico das células, visando que estas obtenham uma função desejada no neotecido. Estudos demonstraram que quitosana limita a proliferação celular, apesar da biocompatibilidade, enquanto que a união de quitosana com gelatina aumenta significativamente a afinidade celular e favorece a adesão, proliferação e diferenciação das células. Ainda segundo esse mesmo estudo, a quitosana exibe várias atividades biológicas, devido à sua semelhança com glicosaminoglicanos e seus derivados (Thei Han et al., 2009). Assim, o desenvolvimento de dois sistemas de cultura 3D construídos nesse trabalho foi avaliado *in vivo* com a função de responder se essas matrizes eram biocompatíveis, bioreabsorvíveis e capazes de manter o fenótipo diferenciado das células *in vivo*.

Os resultados obtidos mostraram que as matrizes 3D não colonizadas e colonizadas pelas CTM e pelas células diferenciadas implantadas no subcutâneo da região dorsal dos ratos não apresentaram processo de rejeição e nem foco necrótico. As camadas da pele apresentaram intactas, e o implante foi circundado com discreta fibrose. A bioreabsorção foi avaliada pela presença de células-gigantes associadas às matrizes, observou-se que quanto maior o número de células gigantes em um período, no período seguinte avaliado a intensidade das fibras reduzia, concordando com Picker Freyer e cols (2006) que afirmam que a quitosana é biorreabsorvível e biocompatível.

Os resultados obtidos *in vitro* nesse trabalho sugeriram, anteriormente, que a qualidade dos poros da matriz reticulada com glutaraldeído foi melhor que da matriz reticulada com genipin, assim como em relação à deformação plástica. Porém, *in vivo* ambas as matrizes, sejam não colonizadas ou colonizadas pelas CTM, apresentaram semelhança na biocompatibilidade e no processo de reabsorção. Em ambas as implantações de matrizes 3D pode ser evidenciado a presença de infiltrado inflamatório, células gigantes próximas às fibras das matrizes e neovascularização aumentados ao longo do período analisado. Tais resultados concordam com Choi e cols (2009) e Hoffmann e cols (2009) que afirmam que a porosidade é o fator influenciador de neovascularização. Porém, a neovascularização apresentou redução ao longo do período avaliado somente em matrizes colonizadas com células diferenciadas, segundo De Bari e cols (2004), o tecido cartilaginoso apresenta-se resistente à formação de vasos sanguíneos, concordando com os resultados obtidos.

A avaliação dos implantes de matrizes 3D colonizadas com células-tronco mesenquimais apresentou um perfil semelhante, porém diferenciado da avaliação dos implantes das matrizes não colonizadas. Essa diferença se dá na proporção de células gigantes e neovascularização, em matrizes reticuladas com genipina e colonizadas pelas CTM, o

número de células gigantes não variou significativamente ao longo do período analisado. Porém, a formação de novos vasos aumentou consideravelmente, ou seja, dobrou em relação à matriz não colonizada. Já a matriz reticulada com glutaraldeído e colonizada pelas CTM, apresentou tanto aumento das células gigantes, em torno de três vezes mais em relação à matriz com o mesmo reticulante, porém não colonizada, quanto aumento de neovascularização.

Segundo Ucelli e cols (2008), as células-tronco mesenquimais podem interagir com ambos componentes dos sistemas imunes inato e adaptativo, levando a modulação de várias funções efetoras. Uma delas, a resposta inflamatória, que em relação às matrizes colonizadas pelas CTM apresentou-se reduzida, quando comparadas às matrizes não colonizadas. A presença de células-tronco mesenquimais alterou também o perfil de formação de novos vasos. Em ambos os implantes de matrizes, seja com glutaraldeído, seja com genipina houve um aumento significativo na quantidade de vasos sanguíneos neoformados. Esse fenômeno concorda com o que Moioli e cols (2008) afirmou, as células-tronco secretam fatores angiogênicos, favorecendo a regeneração tecidual. Além disso, os vasos sanguíneos são responsáveis pelo suprimento de oxigênio, inibindo a formação de necrose e perda do enxerto, além de favorecer a nutrição das células no interior do enxerto e a dispersão de restos metabólicos para fora do enxerto. Segundo, Choi e cols (2006) uma matriz 3D porosa é uma estrutura adequada não só para adesão celular, como para difusão de nutrientes e metabólitos, além de promover *in vivo* neovascularização.

Em relação às matrizes não colonizadas e colonizadas por CTM, observou-se, portanto, que a presença das CTM alterou o meio ambiente do enxerto, de forma que aumentou a formação de novos vasos, concordando com Moioli e cols (2008). Em relação à presença de células gigantes, pode ser observado que em matriz reticulada com glutaraldeído

e colonizada por CTM não apresentou alteração ao longo do período, demonstrando um potencial reduzido de reabsorção da matriz. Entretanto, a matriz reticulada com genipina e colonizada por CTM apresentou um aumento do número de células gigantes de aproximadamente três vezes em relação à matriz reticulada da mesma forma, porém não colonizada. Finalmente, o que se observou foi que a intensidade da matriz reduziu ao longo do período, mas a sua reabsorção apresentou-se tão lenta quanto a matriz reticulada com glutaraldeído colonizada por CTM.

Quando as matrizes colonizadas com células-tronco diferenciadas foram avaliadas, percebeu-se em ambas as matrizes uma redução do número de células gigantes a partir da 6ª semana, coincidindo com a redução de vasos neoformados. A redução do número de vasos neoformados *in vivo*, relacionados com ausência de expressão de CD54 e CD90 e a manutenção de CD 73 em células diferenciadas por 9 semanas *in vitro*, confirmam a diferenciação condrogênica e a provável formação de um neotecido cartilaginoso. Esses dados concordam com o que descreveram De Bari e cols em 2004, o tecido cartilaginoso apresenta resistência em desenvolver vasos sanguíneos.

Diante dos dados obtidos e dos estudos prévios realizados por diversos pesquisadores , pode-se observar que o grande avanço da engenharia de tecido cartilaginoso se dá pela utilização de modelo de matrizes poliméricas. A importância da semelhança da matriz 3D com o ambiente nativo da cartilagem no desenvolvimento de modelos deste tecido tem sido confirmada pela expressão de colágeno do tipo II, sugerindo o papel ativo da matriz na manutenção do fenótipo diferenciado das células (Tortelli & Cancedda, 2009). Dessa forma, foram avaliadas em matrizes implantadas em dorso de rato, na região subcutânea, a capacidade das células diferenciadas em manter o fenótipo diferenciado. O que se pode observar é que ambas as matrizes foram capazes de mimetizar adequadamente a MEC nativa,

uma vez que as células previamente diferenciadas mantiveram a expressão de colágeno do tipo II *in vivo* após longo período implantado em dorso de animal. Segundo De Bari e cols (2004) um dos maiores problemas no cultivo de condrócitos é a dediferenciação e a senescência celular. De forma a solucionar esse problema este trabalho apresentou, novamente, de acordo com Melrose e cols (2008); Mueller e cols (2008); James e cols (2007); Betre e cols (2006), Raghunath e cols (2005) e De Bari e cols (2004) que as células-tronco são capazes de se diferenciar em condrócitos *in vitro* e mesmo após 6 semanas após implantadas colonizando matrizes 3D essas células mantêm-se diferenciadas. Ainda, segundo Alves da Silva e cols (2009), a porosidade das matrizes influencia não somente nas propriedades mecânicas dessas matrizes, mas também influencia de forma significativa na capacidade de diferenciação e manutenção do fenótipo celular.

A união dos dados obtidos por esse estudo permite concluir que as células-tronco mesenquimais cultivadas em meio indutor condrogênico se diferenciaram em condrócitos *in vitro*, mantendo essa diferenciação *in vivo* após longo período de implante quando estas colonizavam matrizes 3D capazes de mimetizar a MEC de tecido cartilaginoso de modo satisfatório. Conclui-se que as matrizes 3D a base de quitosana e gelatina apresentaram um grande potencial de aplicação, uma vez que mantêm o fenótipo diferenciado das células por um período prolongado *in vivo* e portanto não apresentaram dediferenciação celular.

Conclusão

Conclusão

Conclui-se com os dados obtidos neste trabalho que as células-tronco derivadas de tecido adiposo de rato foram capazes de responder aos estímulos fornecidos *in vitro* e expressar marcador específico de condrócito, o colágeno do tipo II e que as matrizes além de serem biocompatíveis e bioreabsorvíveis *in vivo* foram capazes de mimetizar a MEC do tecido nativo, favorecendo a manutenção do fenótipo diferenciado das células-tronco por longo período de tempo após o implante.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Al-Ammar A; Drummond JL; Bedran-Russo AKB. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91, p.419-24, 2009.
- Alves da Silva ML; Crawford A; Mundy JM; Correlo VM; Sol P; Bhattacharya M; Hatton PV; Reis RL; Neves NM. Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: Assessment of extracellular matrix formation. *Acta Biomaterialia* 6, p.1149-1157, 2010.
- Anjos-Afonso F; Siapati EK; Bonnet D. *In vivo* contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell types under minimal damage conditions. *JCS*, 117, p. 5655-64, 2004.
- Awad HA; Wickham MQ; Leddy HA; Gimble MJ; Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25, p.3211-222, 2004.
- Bacakova L; Filova E; Rypacek; Svorcik V; Stary V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res*, 53, p.35-45, 2004.
- Benedeck TG. A history of the understanding of cartilage. *OsteoArthritis and Cartilage*,14, p.203-09, 2006.
- Betre H; Ong SR; Guilak F; Chilkoti A; Fermor B; Setton LA. Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials*,27, p.91-99, 2006..
- Beier JP; Klumpp D; Rudisile M; Dersh R; Wendorff JH; Bleiziffer O; Arkudas A; Polykandriotis E; Horch RE; Kneser U. Collagen matrices from sponge to nano: new perspective for tissue engineering of skeletal muscle. *BMC Biotechnology*, 9, p.1-14,2009.
- Bonfield W. Designing porous scaffold for tissue engineering. *Phil Trans R Soc A*, 364, p.227-232, 2006.
- Breyner NM; Hell RC, Carvalho LR, Machado CB, Peixoto Filho IN; Valerio P; Pereira MM, Goes AM. Effect of three dimensional chitosan porous scaffold on the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *CTO*,191, p.119-28, 2010.
- Buyn KH; Kim SW. Is stem cell-based therapy going on or out for cardiac disease? *Korean Circ J*. 39, p.87-92, 2009.
- Caplan AI & Buder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*, 7, p.259-64, 2001.

Cheng YH; Lin FH; Yank KC. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerolphosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration: an in vitro study. *Tissue Eng Part A*, 2009 (Epub ahead of print).

Chiang H & Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc*, 108, p.87-102, 2009.

Choi SW; Xie J & Xia, Y. Chitosan-based inverse opals: three dimensional scaffolds with uniform pore structures for cell culture. *Adv Mater Deerfield*, 29, p. 2997-3001, 2009.

Ciardelli G and Chiono V. Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci* (2006) 6 (1): 13-26.

Colgan SP; Eltzschig HK; Eckle T & Thompson LF. Physiological roles for ecto 5-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling* (2006) 2: 351-60.

Conrad C & Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *Journal of Surgical Research* (2004) 124:201 – 208.

Coutinho DF; Peshkuleva IH; Alves CM; Marques AP; Neves NM and Reis RL. The effect of chitosan on the *in vitro* biological performance of chitosan-poly (butylenes succinate) blends. *Biomacromolecules* (2008) 9: 1139-1145.

Davila JC; Cezar G; Thiede M; Strom S; Miki T; Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicological Science* (2004) 79: 214-223.

De Bari C; Dell'Accio F and Luyten FP. Failure of *in vitro*-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage *in vivo*. *Arthritis & Rheumatism* (2004) 50:142-150.

De Francesco F; Tirino V; Desidero V; Ferraro G; D'Andrea F; Giuliano M; Libondi G; Pirozzi G; De Rosa A; Papaccio G. Human CD34⁺/CD90⁺ ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLOS one* (2009) 4:1-13.

De Ugarte DA; Morizono K; Elbarbary A; Alfonso Z; Zuk PA; Zhu M; Dragoo JL; Ashjian P; Thomas B; Benhaim P; Chen I; Fraser J; Hedrick MH. Comparisons of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissue Organs* (2003) 174: 101 – 109.

Duarte ARC; Mano JF; Reis RL. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethosone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *European Polymer Journal* (2009) 45: 141-148.

Englert C; Blunk T; Müller, R; von Glasser SS; Baumer J; Fierlbeck J; Heid IM; Nerlich M and Hammer J. Bonding of articular cartilage using a combination of biomechanical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Research & Therapy* (2007) 9:1-11.

- Eser Elçin A; Elçin YM; Pappas GD. Neural tissue engineering: adrenal chromaffin cell attachment and viability on chitosan scaffold. *Neurol Res.* (1998) 20 (7): 648-54.
- Evans MJ & Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* (1981) 292:154-56.
- Friedenstein AJ; Shapiro IIP & Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol exp Morph.* (1966) 16: 581-590.
- Friedenstein AJ; Gorskaja JF; Kalugina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematol* (1976) 4:267-274.
- Gao X; Liu W; Han B; Wei X. Preparation and cytocompatibility of chitosan based carriers of corneal cells. *Sheng Wu Gong Cheng Xu Bao* (2008) 8: 1381-6 (Chinese)
- Gomes S; Boulon ME; Oliveira AL; Leonor IB; Mano JF & Reis RL. Mineralization of chitosan membrane using a double diffusion system for bone related applications. *Materials Science Forum* (2008) 587-588: 77-81.
- Gregory CA; Prockop DJ; Spees J L. Non hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Experimental Cell Research* (2005)306: 330 – 335.
- Guo T; Zhao J; Chang J; Ding Z; Hong H; Chen J; Zhang J. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor- β 1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials* (2006) 27: 1095-1103.
- He L; Liu B; Xipeng G; Xie G; Liao S; Quan D; Cai D; Lu J and Ramakrishna. Microstructure and properties of nano-fibrous PCL-b-PLLA scaffolds for cartilage tissue engineering. *European Cells and Materials* (2009) 18: 63-74.
- Hildner F; Concaro S; Peterbauer A; Wolbank S; Danzer M; Londahl A; Gatenholm P; Redl H; van Griensven M. Human adipose derived stem cells contribute to chondrogenesis in co-culture with human articular chondrocytes. *Tissue Engineering Part A* (2009) 1-25.
- Hoffmann B; Seitz D; Mencke A; Kokott A; Ziegler G. Glutaraldehyde and oxidized dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffold for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med* (2009) 1-9.
- Hung SC; Chen NJ; Hsieh SL; Li H; Ma HL; Lo WH. Isolation and characterization of size sieved stem cells from human bone marrow. *Stem cells* (2002) 20:249-258.
- Hwang NS; Kim MS; Sampattavanich S; Baek JH; Zhang Z; Elisseeff J. Effects of three dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem cells* (2006) 24: 284-291.
- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J.R.Soc Interface* (2006) 3:589-601.

- James CG; Ulici V; Tuckermann J; Underhill TM; Beier F. Expression profiling of dexamethosone-treated primary chondrocytes identifies targets of glucocorticoid signaling in endochondral bone development. *BMC Genomics* (2007) 8: 1-27.
- Janune DDJ; Cestari TM; De Oliveira RC; Taga EM; Taga R e Granjeiro JM. Avaliação da resposta tecidual ao implante de osso bovino misto medular em subcutâneo de ratos. *Innovations implant journal*. (2006) 2: 21-28.
- Jiankang H; Dichen L; Yaxiong L; Bo Y; Hanxiang Z; Qin L; Bingheng L; Yi Lv. Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering (2009) 5: 453-461.
- Johnstone B; Huing TM; Caplan AI; Goldberg VM and Yoo JU. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* (1998) 238:265-72.
- Jung Y; Park MS; Lee JW; Kim YH; Kim SH. Cartilage regeneration with highly-elastic three dimensional scaffold prepared from biodegradable poly (L-lactide-co-ε-prolactone). *Biomaterials* (2008) 29: 4630-36.
- Koay EJ; Hoben GMB; Athanasiou KA. Tissue engineering with chondrogenically differentiated human embryonic stem cells. *Stem cells* (2007) 25: 2183-2190.
- Langer R & Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science* (1993) 260: 920-926.
- Lee JW; Kim YH; Kim SH; Han SH; Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Medical Journal* (2004) 45:41-47.
- Machado CB; Ventura JM; Lemos AF; Ferreira JM; Leite MF, Goes AM. 3D chitosan-gelatin-chondroitin porous scaffold improve osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater* (2007) 2: 124-31.
- Mao DS; Zhao LG; Yao KD. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. *J. Biomed Mater Res*. (2003) 641 (2): 301-8.
- Martin GR. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* (1981) 209:768-776.
- Martins AM; Santos MI; Azevedo HS; Malafaya PB; Reis RL. Natural origin scaffolds with *in situ* pore forming capability for bone tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* (2008) 4: 1637-1645.
- Medrado GC; Machado CB; Valerio P; Sanches MD; Goes AM. The effect of a chitosan-gelatin matrix and dexamethasone on the behavior of rabbit mesenchyma stem cells. *Biomed Mater* (2006) 13: 155-161.
- Melrose J; Chuang C; Whitelock J. Tissue engineering of cartilages using biomatrices. *J Chem Technol Biotechnol* (2008) 83: 444-63.

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* (1983) 65: 55-63.
- Mountford JC. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine* (2008)18: 1-12.
- Mueller MB & Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis & Rheumatism* (2008) 58:1377-88.
- Nardi NB & da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *HEP* (2006) 174: 249-82.
- Ocarino NM; Serakides R; Bozzi A; Pereira RDO; Breyner NM; Goes AM. Behavior of stem cell stained by 4,6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) in culture. *Cell Biology and Toxicology* (2008) 32 (2): 175-83.
- Ogawa R; Mizuno H; Hyakosuko H; Watanabe A; Migita M; Shimada T. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nippon Med Sch* (2004) 71 (4): 240-1.
- Otto WR and Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cell and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* (2004) 37: 97-110.
- Owen M & Friedenstein JA. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* (1988) 126: 42-60.
- Picker-Freyer KM and Brink D. Evaluation of powder and tableting properties of chitosan. *AAPS PharmSciTech* (2006) 7 (3): E1-E10.
- Pluskota E and D'Souza SE. Fibrinogen interactions with ICAM-1 (CD54) regulate endothelial cell survival. *Eur Biochem* (2000) 267: 4693-4704.
- Rada T; Reis RL; Gomes ME. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue engineering: Part B*. (2009) 15: 1-14.
- Raghunath J; Salacinsky HJ; Sales KM; Butler PE and Seifalian AM. Advanced cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Current opinion in biotechnology* (2005) 16:503-509.
- Risere M; Endres M; Ringe J; Bhondi R; Settinger M. Biocompatible hydrogels supports the growth of respiratory epithelial cells: possibilities in tracheal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* (2001) 56: 120-7.
- Rodriguez AM; Elabd C; Amri EZ; Ailhaud G; Dani C. The human adipose tissue is a source of a multipont stem cells. *Biochimie* (2005) 87:125-128.

- Roughley P; Hoemann C; DesRosiers E; Mwale F; Antoniou F; Alini M. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation. *Biomaterials* (2006) 27 (3): 388-96.
- Siu H; Yin Y; Yao K. Construction of chitosan-gelatin-hyaluronic acid artificial skin in vitro. *J Biomater Appl* (2007) 21 (4): 413-30.
- Strem BM; Hicok KC; Zhu M; Wulur I; Alfonso Z; Schreiber RE; Fraser JK; Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue derived stem cells. *Keio J Med* (2005) 54 (3): 132-41.
- Soliman EM; Rodrigues MA, Gomes DA; Sheung N; Yu J; Amaya MJ, Nathanson MH, Dranoff JA. Intracellular calcium signals regulate growth of hepatic stellate cell via specific effects in cell cycle progression. *Cell calcium* (2009) 68: 284-92.
- Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J. R. Soc. Interface* (2006) 6: S311-S324.
- Takahashi K & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* (2006) 126: 663-76.
- Thein-Han WW; Saikhun J; Pholpramoo C; Mirsa RDK; Kitiyanant Y. Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP- buffalo embryonic stem cells. *Acta biomaterialia* (2009).
- Thomson JA; Eldor JI; Shapiro SS; Waknitz MA; Swiergiel JJ; Marshall VS; Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (1998) 282: 1145-1147.
- Tortelli F & Cancedda R. Three dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: a tissue engineering approach to mimic bone and cartilage *in vitro*. *Eur Cells and Materials* (2009) 17:1-14.
- Tuan RS; Boland G and Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy* (2002) 5 (1): 32-46.
- Ucelli A; Moretta L and Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature* (2008) 8:726-37.
- Valerio P; Guimarães MHR; Pereira MM; Leite MF; Goes AM. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foam. *Journal of Material Science: Material in Medicine* (2005) 16:851-56.
- Vinatier C; Mrugalia D; Jorgensen C; Guicheux J; Noël D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Cell Press: Trends in biotechnology* (2009) 27 (5): 307-15.

- Wang L; Menendez P; Cerdan C; Bhatia M. Hematopoietic development from human embryonic stem cell lines. *Exp Hem* (2005) 33: 987-996.
- Watanabe N; Akasaka T; Fujimoto K; Kajita T; Shigeto F; Neishi Y; Ogasawara Y; Yoshida K. Effect of nicorandil, a K⁺ ATP-Channel Opener, on coronary capillary architecture and volume after early myocardial ischemia-reperfusion. *Circ J* (2004) 68: 1210-1214.
- Williams DF. To engineering is to create: the link between engineering and regeneration. *Trends in Biotechnol* (2006) 24 (1): 4-8.
- Wilmut I; Schnieke AE; McWhir J; Kind AJ and Campbel KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* (1997) 385: 810-813.
- Yang KC; Wu CC; Lin FH; Qi Z; Kuo TF; Cheng YH; Chen MP; Sumi S. Chitosan/gelatin hydrogel as immunoisulative matrix for injectable bioartificial pancreas. *Xenotransplantation* (2008) 6: 407-16.
- Yamanaka S. Elite and stochastic model for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* (2009) 460: 49-52.
- Yamane S; Iwasaki N; Majima T; Funakoshi T; Masuko T; Harada K; Minami A; Monde K; Nishimura S. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue. *Biomaterials* (2005) 26: 611-19.
- Yu J and Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes and dev* (2008) 22: 1987-97.
- Zhang L; Ao Q; Wang A; Lu G; Kong L Gong Y; Zhao N; Zhang X. A sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. *J Biomed Mater Res* (2006) 77 (2): 277-84.
- Zuk PA; Zhu M; Mizuno H; Huang J; Futrell JW; Katz AJ; Benhaim P; Lorenz PH; Hederick MH. Multilineage cells from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* (2001) 7 (2): 211-29.
- Zuk PA; Zhu M; Ashjian P; De Ugarte DA; Huang JI; Mizuno H; Alfonso ZC; Fraser JK; Benhaim P; Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* (2002) 13: 4279-95.

