



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**CARACTERIZAÇÃO DE CONDRÓCITOS ARTICULARES CULTIVADOS EM
SISTEMA TRIDIMENSIONAL *IN VITRO***

Gabriel Corrêa de Farias

Rio de Janeiro
2016



GABRIEL CORRÊA DE FARIAS

Caracterização de condrócitos articulares cultivados em sistema
tridimensional *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar

Rio de Janeiro
Novembro/2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

- F224c Farias, Gabriel Corrêa de.
Caracterização de condrócitos articulares cultivados em
sistema tridimensional *in vitro* / Gabriel Corrêa de Farias. — 2016.
73f.
- Orientador: Diego Pinheiro Aguiar
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema
Musculoesquelético) – Instituto Nacional de Traumatologia e
Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2016.
1. Condrócitos. 2. Cartilagem hialina. 3. Osteoartrite. 4. Alginato
de Sódio. 5. Materiais Biocompatíveis. 6. Ortopedia. I. Aguiar, Diego
Pinheiro, orient. II. Título.

NLM WE 348



GABRIEL CORRÊA DE FARIAS

Caracterização de condrócitos articulares cultivados em sistema tridimensional *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Priscila Britto Campos Villanova – Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia

Prof. Dr. Felipe Soares Figueiredo – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

Prof. Dr. Fabio de Almeida Mendes – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
Novembro/2016

À minha família e meus amigos, cuja presença e companhia foram essenciais para essa caminhada. Jamais teria chegado tão longe sem o apoio de vocês! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Diego Aguiar, por ter tido a sabedoria e paciência de guiar esse barco até o seu porto. Foi uma experiência incrível de aprendizado e amadurecimento que levarei comigo para sempre. Obrigado pelos conselhos, pelos congressos, pelo conhecimento e pela oportunidade.

Agradeço à professora Maria Eugênia, por ter aberto às portas para mim e permitido que eu pudesse usar todos os recursos que estivessem à disposição para aprender. Seria impossível ter iniciado essa jornada sem você.

Agradeço à professora Rafaela Sartore, por sempre conseguir um tempo para transmitir seu conhecimento e esclarecer dúvidas. Sua contribuição nesta empreitada foi muito valiosa.

Agradeço aos médicos/pesquisadores Eduardo Branco e Phelippe Maia, por terem me ajudado a concretizar este trabalho.

Agradeço aos pesquisadores Nathan Bessa e Bruno Pontes, por terem contribuído com os experimentos e por terem tido a paciência de me orientar nesta fase.

Agradeço aos amigos que estiveram mais próximos de mim nessa caminhada, que elevaram o nível das discussões acadêmicas, que me apoiaram nos momentos mais complicados, e que dividem comigo o gosto por caféina. Ao amigo Vinicius Magno, por ter me dado somente oportunidades, bons exemplos e por ter me dado esperança. Obrigado pelo encontro e por ter sido luz em muitos momentos. Ao amigo Luiz Cláudio, por ter sido um jarro de sabedoria e por nunca hesitar em ajudar os amigos. Obrigado pela fraternidade. À amiga Carla Ormundo, por ter trazido compreensão e candura para os dias mais cansativos. Obrigado pela sua companhia.

Agradeço ao amigo Ramon Aguiar, por ter tido fé em mim e em minha capacidade. Agradeço pelos conselhos, pelas conversas, pelos incentivos e pelas discussões. Sua amizade é muito valiosa.

Agradeço à amiga Beatriz Fernandes, por ter iluminado minhas decisões e ter contribuído para a minha evolução pessoal. Agradeço pela presença e companhia nessa jornada.

Agradeço aos meus pais, Max Paiva e Kátia Sasso, por terem se esforçado e se sacrificado para me tornar um ser humano melhor através da educação. Eu sei que vocês sempre deram o seu melhor e estiveram ao meu lado, me amparando e levando para o alto. O apoio e incentivo de vocês foram essenciais para que eu andasse com meus próprios pés. Obrigado pela dignidade.

Agradeço aos meus avós, Antônio de Farias e Sônia Paiva de Farias, por serem a morada da sabedoria, do amor e da simplicidade. Agradeço por nunca me abandonarem e por me mostrarem que inundar o coração de amor e compreensão é a melhor iniciativa para lidar com qualquer situação. Saibam que eu não teria chegado até aqui sem vocês.

Agradeço ao meu tio e padrinho, Magno Paiva, por ter me conduzido no caminho do bem, por ter me acalmado e orientado em momentos difíceis dessa trajetória. Agradeço por ter tido paciência nos momentos certos e por ter ficado ao meu lado quando eu precisei. Concluir essa etapa não seria possível sem você e eu agradeço por você ter sido a melhor pessoa que você poderia ser. Obrigado, *mo cuishle!*

Agradeço à minha namorada, Aline Beatriz, por ter vivido e compartilhado essa história junto comigo, por ter andado ao meu lado nessa caminhada, por ter sido minha fortaleza nos momentos mais complicados e por estar sempre presente em qualquer momento e situação. Agradeço pelo carinho, pelo companheirismo e por ter mantido minha cabeça erguida, me incentivando a continuar em frente. Agradeço por você estar na minha vida e ser grande responsável pela minha felicidade. Amo você!

Agradeço à todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e que me ajudaram de alguma forma a continuar.

*“Os grandes momentos da nossa vida
chegam quando juntamos a coragem
de transformar nossas fraquezas no
melhor de nós mesmos”*

Friedrich Nietzsche

Resumo

Farias GC. Caracterização de condrócitos articulares cultivados em sistema tridimensional *in vitro*. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2016.

A osteoartrite é uma doença degenerativa da cartilagem articular que afeta, principalmente, idosos a partir dos 60 anos de idade. Sua degeneração é lenta e progressiva, causando dor e decréscimo da qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença. Atualmente, o tratamento da doença é de caráter meramente paliativo, resultando em cirurgia para completa remoção da cápsula articular do joelho e a substituindo por uma prótese. Este estudo avaliou as características dos condrócitos encapsulados por um hidrogel de alginato de sódio, que simula o microambiente original dessas células. Avaliamos a viabilidade dos condrócitos cultivados por 28 dias nesse modelo de cultivo, bem como a presença de proteoglicanos durante análise histológica. Através de microscopia eletrônica de varredura, observamos diferença significativa no microambiente interno do hidrogel e na disposição dos condrócitos, quando cultivados por até 28 dias na gota de alginato de sódio. Analisamos, ainda, a capacidade de deformação da gota de alginato de sódio quando pressionada, à fim de observar o quanto ela suporta até se romper. Nossos dados indicam que o hidrogel de alginato de sódio é um modelo eficaz para o cultivo de condrócitos e nos permite estudar suas características morfohistológicas. Além do mais, observamos o quão promissor é o uso desse biomaterial para a bioengenharia de tecido.

Palavras-chave: Condrócitos, Cartilagem hialina, Osteoartrite, Alginato de Sódio, Biomaterial.

Abstract

Farias GC. Characterization of articular chondrocytes cultured in three-dimensional system *in vitro*. Master Thesis (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopaedics, Ministry of Health, 2016.

Osteoarthritis is a degenerative disease of the articular cartilage that affects mainly elder people from 60 years old. Its degeneration is slow and progressive, causing pain and decreasing quality of life of patients affected by the disease. Currently, the treatment of the disease is merely palliative resulting in surgery for complete removal of the knee articular capsule and substituting it for a prosthesis. This study evaluated the characteristics of chondrocytes encapsulated by a sodium alginate hydrogel, which simulates a unique microenvironment of these cells. We evaluated the viability of chondrocytes cultured for 28 days in this model, as well as the presence of proteoglycan for histological analysis. Through scanning electron microscopy, we observed significant differences in the internal microenvironment of the hydrogel and chondrocytes disposition when cultured for up to 28 days in sodium alginate drop. We also analyzed the deformability of sodium alginate bead when pressed in order to observe how much it supports until it breaks. Our data indicate that sodium alginate hydrogel is an effective model to culture chondrocytes and allows us to study its morpho-histological characteristics. Moreover, we observed that this biomaterial can be very promising for tissue bioengineering.

Keywords: Chondrocytes, Hyaline Cartilage, Osteoarthritis, Sodium Alginate, Biomaterial.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes estruturais da matriz extracelular da cartilagem articular....	18
Figura 2. Modelo estrutural de um complexo proteoglicano.....	19
Figura 3. Estratificação da cartilagem articular.....	20
Figura 4. Placas de crescimento e desenvolvimento da cartilagem articular.....	22
Figura 5. Esquema representativo do processo inflamatório durante a OA.....	24
Figura 6. Esquema representando a base da bioengenharia de tecidos.....	25
Figura 7. Foto ilustrativa de uma artroplastia total de joelho realizada em paciente com osteoartrite.....	33
Figura 8. Inclusão dos condrócitos em alginato de sódio e gelificação do biomaterial.....	36
Figura 9. Definição do módulo de Young.....	39
Figura 10. Aparato experimental proposto para medida do módulo de Young do hidrogel de alginato de sódio.....	40
Figura 11. Fotomicrografia de condrócitos aderidos ao poliestireno.....	42
Figura 12. Foromicrografia da gota de alginato de sódio contendo condrócitos encapsulados.....	43
Figura 13. Ensaio de viabilidade celular por <i>Live and Dead</i>	44
Figura 14. Análise histológica de uma cartilagem hialina e alginato de sódio.....	45
Figura 15. Análise por microscopia eletrônica de varredura das gotas de alginato de sódio com 1 dia de cultivo.....	46
Figura 16. Análise por microscopia eletrônica de varredura das gotas de alginato de sódio com 28 dias de cultivo.....	47
Figura 17. Dimensões das gotas de alginato de sódio até 28 dias de cultivo celular.....	48
Figura 18. Ensaio de elasticidade.....	49
Figura 19. Análise do ensaio de elasticidade.....	50
Figura 20. Módulo de elasticidade das gotas de alginato de sódio.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
AINE	Anti-inflamatório não-esteróide
BMP	do inglês, <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>
cm ²	Centímetro quadrado
CNCDO	Central de notificação, captação e doação de Órgãos
COMP	do inglês, <i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
CPD	do inglês, <i>critical point dryer</i>
CTM	Célula tronco mesenquimal
DAB	Diaminobenzidina
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EGF	do inglês, <i>Epidermal Growth Factor</i>
HIV	do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Ihh	do inglês, <i>Indian Hedgehog</i>
IMDM	do inglês, <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
iPS	do inglês, <i>Induced pluripotent stem cell</i>
kDa	Quilodalton
kV	Quilovolt
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MMP	do inglês, <i>Matrix Metalloproteinase</i>
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetil-Tiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazólio
NFS	do inglês, <i>National Foundation of Science</i>
nm	Nanômetro
OA	Osteoartrite
OSTERIX	do inglês, <i>Osteoblast-Specific Transcription Factor</i>
PBS	do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>

pH	Potencial Hidrogeniônico
PTH-RP	do inglês, <i>Parathyroid Hormone-Related Protein</i>
PTH-RPr	do inglês, <i>Parathyroid Hormone-Related Protein receptor</i>
RGD	do inglês, <i>Arginylglycylaspartic acid</i>
RNA	do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i>
Rpm	Rotação por minuto
RUNX2	do inglês, <i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>
SFB	Soro fetal bovino
SOX	do inglês, <i>SRY-related HMG Box</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	do inglês, <i>Transforming Growth Factor-beta</i>
VEGF	do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
1. Introdução.....	17
1.1. Aspectos histológicos do tecido cartilaginoso.....	17
1.2. Aspectos morfofisiológicos da cartilagem articular.....	18
1.3. Moléculas reguladoras da condrogênese.....	20
1.4. Degeneração articular e o desenvolvimento da osteoartrite.....	22
1.5. Fundamentos da bioengenharia de tecido.....	24
1.6. Bioengenharia de cartilagem.....	26
1.7. Alginato de sódio na bioengenharia.....	28
2. Objetivos.....	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. Materiais e métodos.....	33
3.1. Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes.....	33
3.2. Cultivo bidimensional de condrócitos.....	33
3.3. Preparação do alginato de sódio 2%.....	34
3.4. Confeccção do modelo de cultivo 3D em alginato de sódio.....	35
3.5. Preparo das amostras para Histologia.....	36
3.5.1. Fixação e Parafinização.....	36
3.5.2. Desparafinização.....	37
3.6. Coloração das lâminas com safranina-O.....	37
3.7. Viabilidade e morte celular por ensaio de Live and Dead.....	37
3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	38

3.9. Avaliação da resistência do biomaterial.....	38
3.10. Análise estatística.....	41
4. Resultados.....	42
4.1. Isolamento de condrócitos <i>in vitro</i> e encapsulamento em alginato de sódio.....	42
4.2. Avaliação da viabilidade dos condrócitos cultivados em monocamada e em alginato de sódio.....	43
4.3. Avaliação histológica das gotas de alginato de sódio.....	45
4.4. Avaliação morfológica e estrutural das gotas de alginato de sódio.....	46
4.5. Análise da elasticidade das gotas de alginato de sódio.....	48
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXO I.....	72

INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos histológicos do tecido cartilaginoso

O tecido cartilaginoso é um tipo de tecido conjuntivo especializado, mais rígido do que o tecido conjuntivo denso, que desempenha funções específicas. Dentre as funções desempenhadas pelo tecido cartilaginoso estão o suporte de tecidos moles, revestimento de superfícies articulares com a finalidade de absorver choques, facilitar o deslizamento, bem como participar da formação e crescimento dos ossos longos. Existem três tipos de tecidos cartilagosos: Fibroso, Elástico e Hialina e as funções desempenhadas por cada tipo dependem da constituição da sua matriz extracelular, pois ela é responsável pela flexibilidade e dureza da cartilagem (Adams e Watt, 1993). O condrócito é o único tipo celular da cartilagem articular e é derivado de células mesodermas que iniciam sua diferenciação durante o desenvolvimento embrionário (Hall, 1987). O mesênquima é um tecido embrionário derivado do mesoderma e a partir dele se forma a maior parte dos tecidos conjuntivos. No tecido cartilaginoso, as células indiferenciadas apresentam um citoplasma basófilo, e são chamadas de condroblastos. Após a maturação, estas células passam a se chamar condrocitos (Kronenberg, 2003). A cartilagem é caracterizada, ainda, por possuir uma grande quantidade de condrocitos embebidos em uma matriz extracelular densamente hidratada composta principalmente por colágeno e proteoglicanos (Furman *et al.*, 2006). A matriz extracelular se caracteriza por ser basófila, com aspecto hialino e não homogênea. A região mais próxima dos condrocitos é chamada de matriz territorial e a região mais distante dos condrocitos é chamada de matriz interterritorial (Junqueira e Carneiro, 2013).

A nutrição da cartilagem é feita através do pericôndrio, uma bainha de tecido conjuntivo denso que possui vasos sanguíneos, linfáticos e nervos que reveste a cartilagem. Apesar de a cartilagem depender do pericôndrio, por não possuir vascularização, a cartilagem hialina presente nas articulações e a cartilagem fibrosa não possuem pericôndrio, tendo seus nutrientes e metabólitos difundidos pela sinóvia (Junqueira e Carneiro, 2013).

1.2 Aspectos morfofisiológicos da cartilagem articular

A cartilagem hialina constitui o tecido predominante nas articulações sinoviais e tem como principal função diminuir o atrito durante o movimento, além de resistir às forças de tensão e compressão (Fox *et al.*, 2009). Ela é um tecido avascular, sendo o condrócito nutrido pela difusão dos nutrientes presentes no líquido sinovial, já que esta célula é totalmente circundada por matriz extracelular (Rudraiah *et al.*, 1991). Cerca de 90% da cartilagem é composta de matriz extracelular e sua estruturação consiste em fluído e macromoléculas, na qual a principal função é de resistir e distribuir as forças de cisalhamento, tensão e compressão através da alternância da pressão hidrostática e da distribuição da matriz extracelular (Szczydry *et al.*, 2009). Esta matriz extracelular é composta por 20% de colágeno, 5% de proteoglicanos, 1% de glicoproteínas e o restante constitui-se de água (Furman *et al.*, 2006) (**Figura 1**).

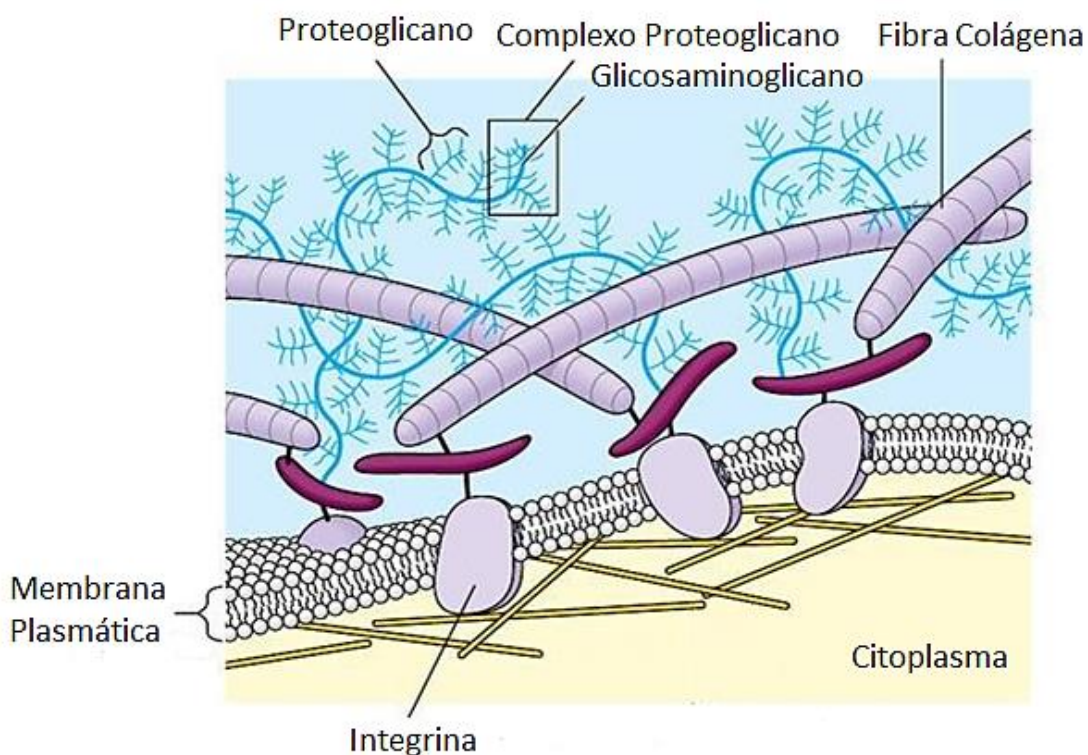


Figura 1. Componentes estruturais da matriz extracelular da cartilagem articular. A organização das fibras colágenas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos reforça a resistência da cartilagem (Modificado de Pearson Education, 1999)

A cartilagem articular contém diversos tipos de colágeno, sendo o tipo II o tipo predominante. O colágeno tipo II promove a integridade articular e capacidade de

resistir às forças de tensão, sendo formado por três cadeias alfa que se interconectam em um formato de tripla hélice, e dão à fibra colágena todas as suas características (Gudas *et al.*, 2005). O proteoglicano mais abundante da cartilagem articular é a agrecana, que possui várias cadeias de condroitina e queratina e se associa ao ácido hialurônico, um glicosaminoglicano não sulfatado (Wong *et al.*, 2003) (**Figura 2**).

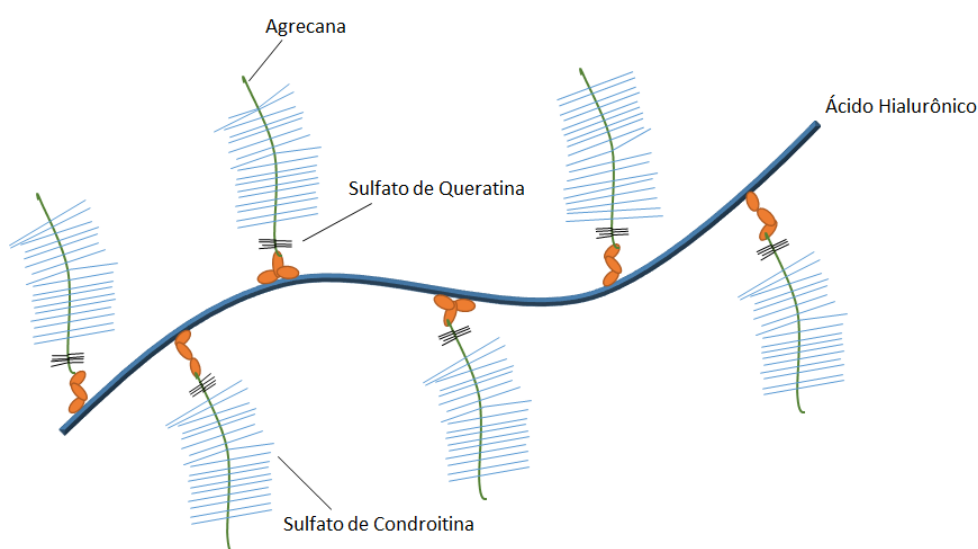


Figura 2. Modelo estrutural de um complexo proteoglicano. Moléculas de agrecana conectadas a uma cadeia central de ácido hialurônico formam um complexo com massa molecular de cerca de 3000 KDa.

A cartilagem articular possui zonas estruturais com composição, organização, e propriedades mecânicas diferentes. Essas propriedades variam principalmente de acordo com a profundidade do tecido. Quatro zonas são identificadas da superfície até o osso subcondral, são elas: zona superficial, zona de transição, zona profunda e zona calcificada (Kraus *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013) (**Figura 3**). A zona superficial é a menor (corresponde de 10% a 20% da cartilagem) e contém duas camadas: superior e inferior. A camada superior consiste em uma fina película que não contém células, somente polissacarídeos e fibras colágenas. A camada inferior consiste em uma densa sobreposição horizontal de condrócitos que sintetizam a matriz com alta densidade de colágeno tipo II e poucos proteoglicanos (Guilak *et al.*, 1994; Flannery *et al.*, 1999). A alta concentração de água nessa zona promove a lubrificação e confere resistência à compressão (Furman *et al.*, 2006). A zona de

transição é mais larga (corresponde de 40% a 60% da cartilagem) e tem como função resistir às forças de compressão e cisalhamento provocadas pela utilização da articulação. A orientação das fibras colágenas tipo II, nesta zona, é oblíqua e a grande quantidade de proteoglicanos, junto com a pouca quantidade de água, permitem que esta região tenha uma maior distribuição do peso durante o impacto (Glasson *et al.*, 2005). A zona profunda e a zona calcificada compreendem de 20% a 50% da cartilagem, sendo a zona profunda caracterizada por condrócitos e fibras de colágeno dispostos perpendicularmente ao osso subcondral (Teeple *et al.*, 2007). As fibras colágenas são mais largas em diâmetro, e também estão dispostas de forma vertical, o que atribui uma maior resistência à compressão e promove maior enrijecimento do tecido (Eyre e Wu, 1995).

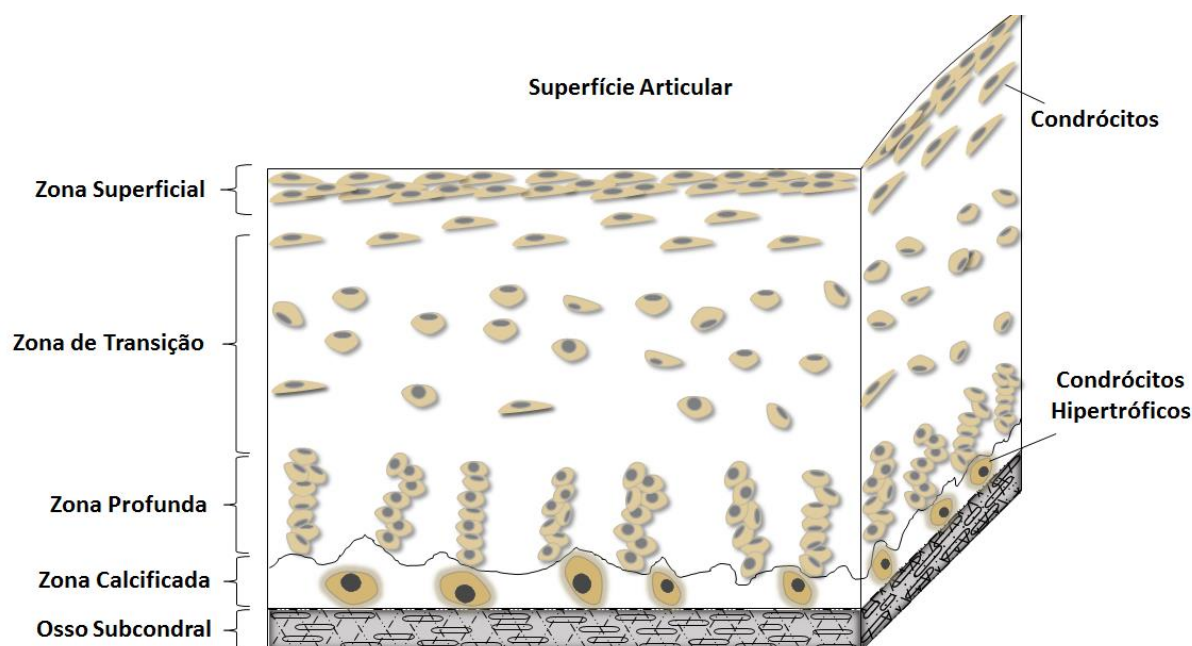


Figura 3. Estratificação da cartilagem articular. Esquema representativo das camadas que setorizam a cartilagem articular. Células mais achatadas na zona superficial e mais esferoidais nas zonas de transição e profunda.

1.3 Moléculas reguladoras da condrogênese

A condrogênese ocorre através de um processo de ativação e bloqueio dos membros da família do fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Estão entre os membros desta família, a activina-A, o TGF- β e as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) (De Kroon *et al.*, 2015). Estes fatores, uma vez reconhecidos pelos

seus receptores, ativam mensageiros secundários específicos que, quando ativados, se direcionam até o núcleo da célula e promovem ativação transcricional de diversos genes alvos (Heldin *et al.*, 1997). Tem sido mostrado que a atividade da via da activina-A suprime a transcrição dos genes SOX9, RUNX2 e OSTERIX, além de impedir o acúmulo de glicosaminoglicanos sulfatados. Esta supressão culmina na inibição da condrogênese (Mitsugi *et al.*, 2012). Por outro lado, o TGF- β estimula a atividade da via de sinalização BMP, bem como de sua própria via, durante a diferenciação e manutenção condrocítica (Shintani *et al.*, 2013). Sendo assim a grande família de TGF- β , e os fatores de transcrição envolvidos na sua ativação, são fundamentais para o monitoramento do comprometimento e diferenciação condrocítica. Tem sido descrito um intrincado controle do desenvolvimento da cartilagem articular, realizado pelo Indian Hedgehog (Ihh) e pela proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTH-RP) e seu receptor (PTH-RPr) (Mak *et al.*, 2006). No primeiro momento, o Ihh é produzido pelos condrócitos presentes na zona proliferativa, levando ao aumento da expressão gênica do PTH-RP nas células do pericôndrio (Chen *et al.*, 2006). O Ihh possui duas funções: a primeira, regular a formação do colar ósseo; e a segunda, estimular a secreção de PTH-RP. O PTH-RP livre no espaço extracelular vai até a zona de reserva, onde estimula a proliferação dos condrócitos. Além disso, o PTH-RP inibe a hipertrofia dos condrócitos (Kronenberg, 2006) (**Figura 4**). Deste modo, é possível imaginar que a diminuição ou até mesmo a ausência deste hormônio, podem alterar a viabilidade dos condrócitos e então levar a uma degeneração articular e ao estabelecimento de um quadro clínico de artrose.

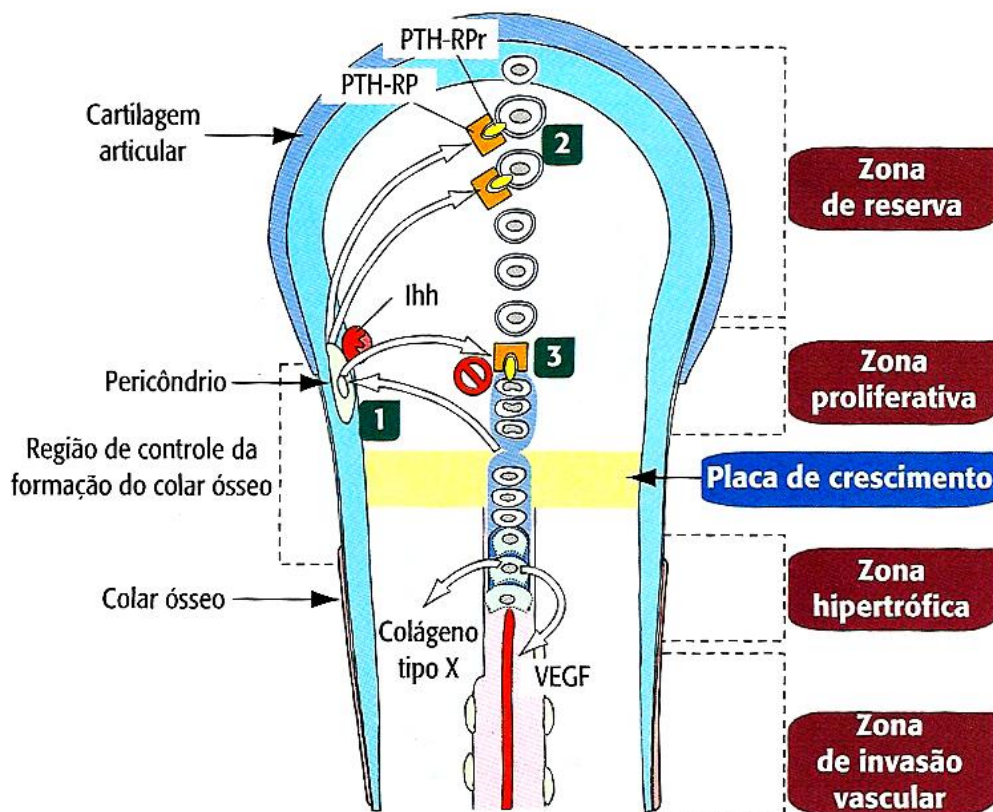


Figura 4. Placas de crescimento e desenvolvimento da cartilagem articular. A proteína IHH, secretada pelos condrócitos proliferativos, ativa a transcrição de PTH-RP nas células do pericôndrio (1). O PTH-RP se liga ao seu receptor PTH-RPr presente nas células da zona de reserva e estimula a proliferação e sobrevivência celular (2). O PTH-RP também se liga aos condrócitos da zona proliferativa para inibir sua hipertrofia (3). (Modificado de Kierszenbaum, 2002).

1.4 Degeneração articular e o desenvolvimento da osteoartrite

A degeneração articular ocorre através de uma série de eventos bioquímicos e biomecânicos que culminam na osteoartrite (OA). Esse desgaste não ocorre somente na cartilagem hialina, mas acomete também a sinóvia e o osso subcondral (Scanzello e Goldring, 2012). A OA tem a sua incidência e prevalência aumentada com a idade. Estima-se que 9,6% dos homens e 18% das mulheres acima de 60 anos, da população mundial, sofrem de artrose sintomática (Van der Kraan *et al.*, 2008). A OA do joelho afeta pelo menos 30% da população com idade acima de 50 anos e 80% dos acima de 75 anos (Li *et al.*, 2008), principalmente as mulheres. A articulação com maior prevalência é a da mão (70%), seguida do pé (40%) e do

joelho (30%) (*European Commission, Indicators for Monitoring Musculoskeletal Conditions Project. Cited 3 Sept 2009*).

A OA se caracteriza pela ruptura da matriz extracelular, causada pela presença exacerbada de metaloproteinases da matriz (MMP), que digerem o colágeno e promovem aumento das moléculas reguladoras do processo inflamatório (Sandy 2006). Quando a OA está instalada, os condrócitos se ligam aos fragmentos de colágeno tipo II e uma vez ativados, sinalizam positivamente para a produção de MMP, que acentuam a degradação articular. Um bom exemplo deste mecanismo é a MMP-13 (colagenase), que é encontrada em altos níveis na OA (Wang *et al.*, 2013).

Os condrócitos localizados próximos à superfície articular, assumem uma característica mais catabólica na OA, diferente da célula mais profunda, com fenótipo mais regenerativo (Guilak *et al.*, 2000). O processo de degradação durante a OA fica também evidenciado pelo aparecimento de agreganases e proteinases. Essas glicoproteinases não são só encontradas nas articulações, mas também na corrente sanguínea (Jones *et al.*, 2009), como por exemplo, a trombospondina 5 (COMP 5), que circula em altos níveis séricos e está diretamente ligada a progressão da OA (Vilim *et al.*, 2002). Os produtos de degradação da cartilagem que são liberados no líquido sinovial são fagocitados pelas células sinoviais, aumentando a inflamação na sinóvia. Por sua vez, os sinoviócitos que estão presentes na sinóvia inflamada produzem mediadores catabólicos e pró-inflamatórias que levam à produção excessiva de enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da cartilagem, criando um ciclo de feedback positivo (Sellam e Berenbaum, 2010). A resposta inflamatória é aumentada, ainda, por linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Além disso, a sinóvia inflamada contribui para a formação de osteófitos através do BMP. À fim de combater esta resposta inflamatória, a sinóvia e a cartilagem pode produzir citocinas anti-inflamatórias. (**Figura 5**). Dentre as mais diversas estratégias para estudar e entender o comportamento dos condrócitos, destacamos o papel relevante da bioengenharia de tecidos.

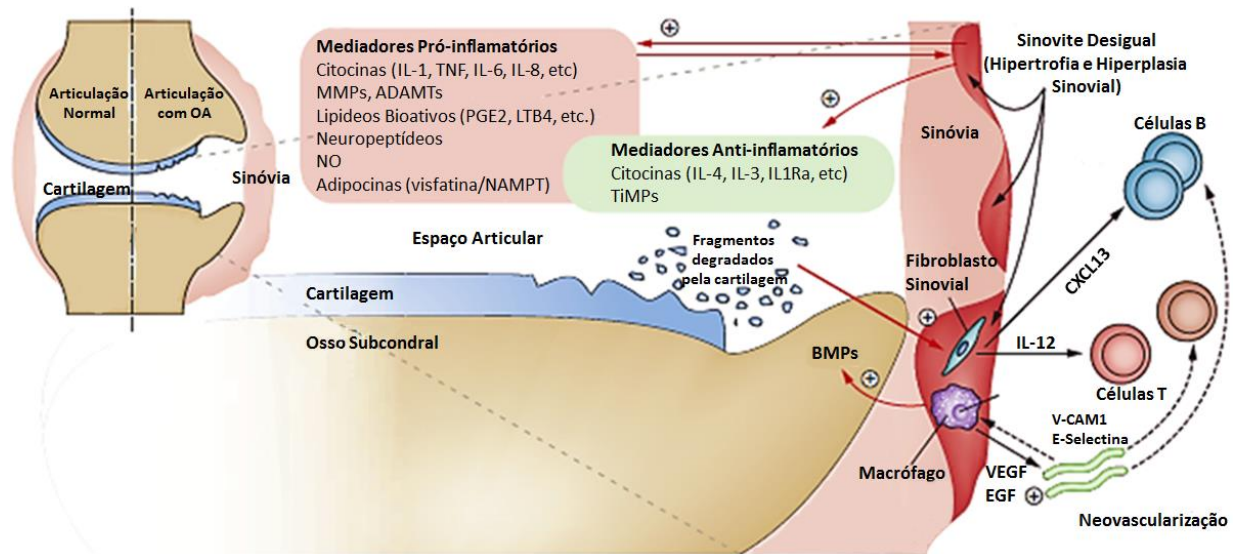


Figura 5. Esquema representativo do processo inflamatório durante a OA. A degeneração da cartilagem provoca um processo inflamatório na sinóvia, que estimula a expressão de VEGF e EGF, entre outros fatores responsáveis por acelerar o desenvolvimento da osteoartrite (Modificado de Sellam e Berenbaum, 2010).

1.5 Fundamentos da bioengenharia de tecido

Durante os últimos 30 anos, os estudos envolvendo células tronco evoluíram tanto que o campo da medicina regenerativa se tornou consistente, colaborando assim para o desenvolvimento de um outro campo paralelo a este, a bioengenharia de tecidos (Langer e Vacanti, 1993).

O termo “Engenharia de Tecido” foi postulado em 1987, em um workshop realizado pela Fundação Nacional de Ciência (NFS), nos Estados Unidos da América. A bioengenharia de tecido é uma área da ciência que junta componentes biológicos com componentes desenvolvidos, a fim de reproduzir, *in vitro*, as condições fisiológicas encontradas *in vivo*. A técnica se baseia, fundamentalmente, na combinação de um material de suporte, células e fatores de crescimento (Fell, 1972) (**Figura 6**).

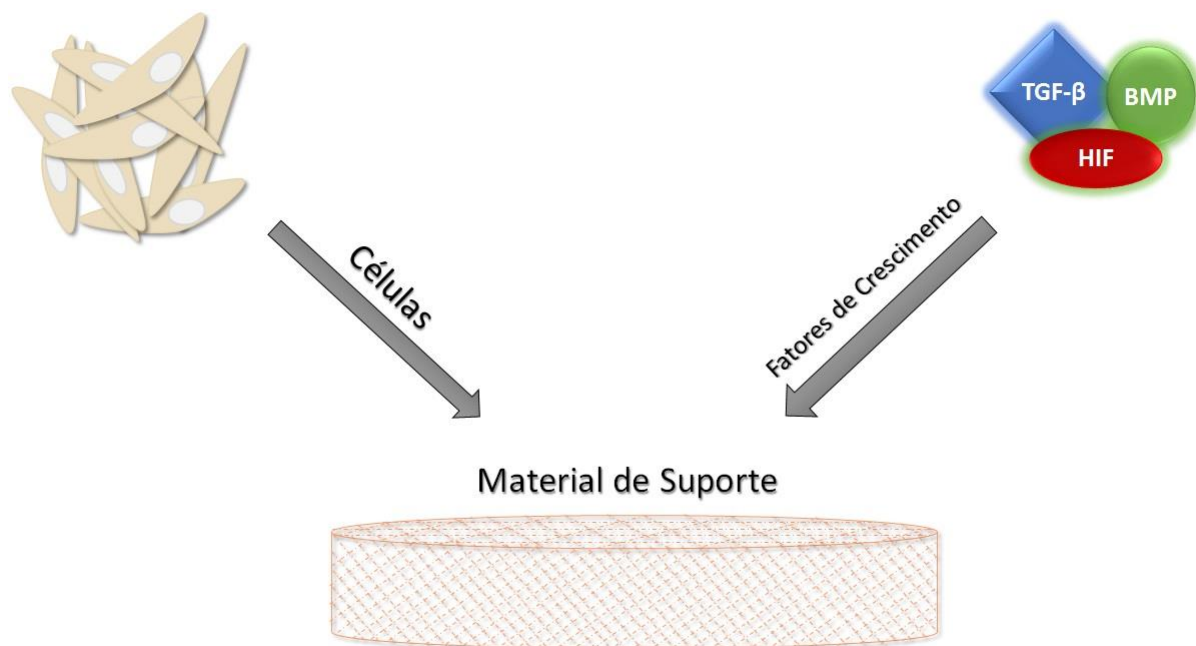


Figura 6. Esquema representando a base da bioengenharia de tecidos. Tríade composta por um material de suporte, células e fatores de crescimento. Estrutura primária para se desenvolver um tecido.

O transplante convencional de tecidos e órgãos, que ocorre de um indivíduo para outro, embora muito bem-sucedido e resolutivo, tem severas restrições (Vacanti e Langer, 1999). O maior problema encontrado está na demanda de tecidos e órgãos disponíveis para todos os pacientes que necessitam de transplante. Segundo dados das Centrais de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos e Tecidos (CNCDO), em Maio de 2016, no Brasil, a fila de espera para receber um órgão ou tecido chegava a 42.553 indivíduos (Brasil, 2016). Provavelmente, muitos desta lista não conseguirão esperar pela disponibilidade de um órgão e/ou tecido. Além disso, existe ainda a possibilidade de rejeição destes transplantes pelo sistema imune do receptor e consequente perda do tecido ao longo do tempo (Franz *et al.*, 2011). Para evitar a rejeição do transplante, é necessário controlar a resposta do sistema imune através de drogas imunossupressoras e isso pode levar a formação de tumores (Gallagher *et al.*, 2010). É dentro deste contexto que o campo da engenharia de tecidos tem se apoiado e ganhado evidência.

Em essência, um tecido novo e funcional é fabricado utilizando células vivas, que são geralmente associadas a uma matriz ou materiais de suporte para orientar o desenvolvimento do tecido (Marler *et al.*, 1998). Novas fontes de células, incluindo diversos tipos de células-tronco, foram identificados nos últimos anos, acendendo

novo interesse no campo (Vacanti, 2006). O progresso nesta área tem caminhado tão rapidamente, que o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina de 2012 foi atribuído aos pesquisadores John Gurdon e Shinya Yamanaka por suas descobertas na área de reprogramação celular e de produção de células-tronco pluripotentes induzidas (células iPS) (Takahashi e Yamanaka, 2006; Gurdon e Murdoch 2008).

Os materiais de suporte usados na bioengenharia de tecidos podem ser de origem natural, sintéticos e pela combinação de ambos (Nair e Laurencin, 2007). Um dos maiores avanços na fabricação dos materiais de suporte foi a descelularização de tecidos, mantendo apenas a estrutura matricial para posterior perfusão com células. Pneumócitos tipo II foram cultivados em um pulmão murino descelularizado e foram capazes de criar um tecido similar a um pulmão normal (Balestrini *et al.*, 2015). Os protocolos de descelularização e recelularização de tecidos vem sendo empregado, na maior parte, em coração, fígado e pulmão, apresentando resultados promissores (Spector, 2016). No entanto, essa técnica depende inicialmente de um órgão e isso acaba reduzindo a viabilidade do processo.

Inúmeras formas de se desenvolver tecidos foram criadas. Uma delas é com o auxílio de um biorreator, sistema que permite reproduzir um ambiente controlado, que possibilitou criar um ambiente propício para o desenvolvimento de um tecido cardíaco com pulsos elétricos ritmados a partir de cardiomiócitos (Canizzaro *et al.*, 2007; Tandon *et al.*, 2009). Uma outra metodologia quem vem sendo utilizada é a impressão de molde de fragmentos ósseos, que atua como material de suporte e é usado para cultivar células de um paciente (Cox *et al.*, 2015).

1.6 Terapia regenerativa na osteoartrite

O tratamento da OA e das lesões na cartilagem enfrentam muitos obstáculos. A renovação das proteínas presentes na matriz é relativamente baixa, mesmo em tecido saudável, visto que a meia-vida do colágeno e dos proteoglicanos são de aproximadamente 100 e 3-24 anos, respectivamente (Vinatier *et al.*, 2009). A medicação dada aos pacientes com OA pode aliviar a dor, mas ela não age interrompendo o ciclo de erosão do tecido (Jackson *et al.*, 2001). E já foi demonstrado que o uso de alguns medicamentos para a dor, como os anti-

inflamatórios não esteroides (AINEs), podem atrapalhar a produção de matriz (Brooks *et al.*, 1999).

As formas de tratamento farmacológico vigentes são paliativas e a cirurgia se apresenta como a última opção (Sgaglione, 2002). No entanto, um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de OA é a presença de defeitos da cartilagem (Cooper *et al.*, 2000). Se fosse possível tratar esses defeitos precocemente, com o auxílio de terapias regenerativas, o início da doença poderia ser retardado. Técnicas regenerativas e de reposição podem ser subdivididos em três grupos: técnicas de estimulação da medula óssea, transferência osteocondral ou enxertos e terapia celular (Clouet *et al.*, 2009; Clair *et al.*, 2009).

O procedimento mais comum de estimulação da medula óssea é a micro fratura. Esta técnica consiste em uma micro penetração na placa do osso subcondral, até a zona vascularizada do osso, para que as células progenitoras neste local possam preencher o defeito da cartilagem e estimular a regeneração da mesma (Steinwachs *et al.*, 2008). O resultado é um tecido fibrocartilaginoso contendo quantidades variáveis de colágeno tipo II. Esta técnica possui várias vantagens e desvantagens (Steinwachs *et al.*, 2008). As vantagens incluem baixo poder invasivo, baixa morbidade do tecido, tempo de recuperação curto, e boa relação custo-benefício. Os pacientes jovens e atléticos que passaram pela intervenção logo no início da OA tiveram um nível maior de sucesso. As desvantagens incluem a formação deficiente de estrutura e função de uma cartilagem saudável (Cancedda *et al.*, 2003). A camada de fibrocartilagem fornece capacidade de carga limitada, sendo geralmente muito mais fina do que o tecido original, não integra plenamente com o tecido circundante e pode causar o crescimento excessivo do osso subcondral (Oussedik *et al.*, 2015). Uma técnica denominada de microfratura melhorada tenta solucionar estes problemas através da inclusão de fatores de crescimento, como TGF- β 3 e BMP-7, que induzem a condrogênese das populações de células tronco mesenquimais (CTMs) (Clouet *et al.*, 2009; Clair *et al.*, 2009; Richter, 2009).

A transferência osteocondral inclui enxertos autólogos e homólogos (Marcacci *et al.*, 2013). Enxertos autólogos são retirados de áreas com baixa carga da cartilagem, como a do côndilo femoral, e transplantados para o local do defeito, onde existe um grande emprego de carga (Hangody *et al.*, 2004). São várias as

desvantagens deste procedimento, incluindo a dificuldade em restaurar a arquitetura das articulações, aumento de pressão devido à incongruência de superfícies restauradas, dano no local doador do tecido, falta de integração do tecido enxertado, aspectos mecânicos e capacidade de suportar carga alterados (Rose *et al.*, 2005). Enxertos homólogos, provenientes de material externo, tem a vantagem de não morbidade do local doador, no entanto, esse procedimento tem todas as desvantagens do enxerto autólogo, além de uma potencial resposta imune e possibilidade de transmissão de doenças (Torun Kose and Hasirci, 2004). A forma mais moderna do enxerto osteocondral é a mosaicoplastia. Este procedimento usa pequenos enxertos, retirados de uma zona da cartilagem que não sofre atrito, para preencher um único defeito. A mosaicoplastia é mais bem-sucedida em pacientes com menos de 50 anos, sem desalinhamento articular (Cancedda *et al.*, 2003; Clair *et al.*, 2009).

A primeira terapia celular desenvolvida para o tratamento da OA foi o implante de condrócitos autólogos, em 1994 (Brittberg *et al.*, 1994). Este procedimento tem sido usado desde então com um sucesso relativamente considerável (Akimau *et al.*, 2004; Giannini *et al.*, 2001; Koulalis *et al.*, 2004). O procedimento consiste em dois passos. Em primeiro lugar, os condrócitos são isolados a partir do paciente e expandidos *in vitro*. Em seguida, a população de células expandidas é injetada em um defeito condral. Apesar dos resultados cirúrgicos positivos, o procedimento tem muitas desvantagens, como lesão do local doador, a necessidade de uma segunda operação, o deslocamento de células implantadas, recuperação prolongada, perda de fenótipo condrocítico e formação de tecidos fibrosos (Cancedda *et al.*, 2003; Vinatier *et al.*, 2009; Clouet *et al.*, 2009; Clair *et al.*, 2009; Richter, 2009). Uma forma mais avançada desta técnica, o implante de condrócitos caracterizados, utiliza o mesmo procedimento, mas as células usadas no implante são previamente identificadas quanto a sua capacidade de produzir colágeno tipo II, que é um indicador de níveis elevados de produção da matriz (Saris *et al.*, 2008).

1.7. Alginato de sódio na bioengenharia

O alginato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) é o sal gerado a partir do ácido algínico, composto encontrado na parede celular de algas marrons como, *Laminaria*

hyperborea, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (Smidsrøde Skjak-Bræk, 1990). Este sal é amplamente usado em diversos setores da indústria e foi aplicado, inicialmente, no desenvolvimento bromatológico. Posteriormente, foi estudado e passou a ser utilizado na área biomédica com diferentes finalidades, devido a sua baixa toxicidade, biocompatibilidade, baixo custo relativo e geleificação instantânea quando entra em contato com cátions bivalentes como o Ca^{2+} e Mg^{2+} (Gombotz e Wee, 1998). Algumas formas farmacêuticas carregam o alginato em suas formulações, podendo servir como espessante, formador de gel, agente estabilizante e como mecanismo de liberação controlada para determinados fármacos (Tonnesen *et al.*, 2002). A via de administração mais comum para as formulações contendo alginato é a oral, mas sua forma geleificada vem sendo usada para entrega localizada de drogas em tecidos específicos (Lee e Lee, 2009). Seu uso como hidrogel se deve ao fato de que sua geleificação pode ocorrer de forma iônica, sendo reversível em condições específicas e dificilmente degradado por temperatura (LeRoux *et al.*, 1999). A estrutura do gel de alginato tem sido estudada a fim de se melhorar sua eficácia na liberação de drogas com baixo peso molecular. A ligação das moléculas com o alginato poderia influenciar na cinética de liberação da droga, que também precisa passar pelo poro de aproximadamente 5 nm do gel (Boonthuekul *et al.*, 2005).

O uso do alginato na medicina é tão amplo que ele vem sendo comercializado em forma de curativos, gel e pomada para ferimentos, como o *Curatec*[™] (LM Farma). Sua eficácia como curativo já ultrapassa a da gaze e foi observado também que ele acelera a cicatrização do local, fornecendo um ambiente úmido e levemente oclusivo para a ferida (Queen *et al.*, 2004).

Na cultura de células, o alginato vem sendo usado conjugado com outros fatores de adesão ou sozinho e é empregado para cultivar células em três dimensões (3D). O gel de alginato modificado com peptídeo RGD, um tripeptídeo presente em muitas moléculas adesivas e que interage com integrina, permite controlar a característica de interação com mioblastos (Rowley *et al.*, 2002), condrócitos (Jeon *et al.*, 2010; Degala *et al.*, 2011), osteoblastos (Evangelista *et al.*, 2007), folículos ovarianos, bem como células estromais da medula óssea (Wang *et al.*, 2003; Hsiong *et al.*, 2008; Bidarra *et al.*, 2010).

Após o alginato ter sido amplamente usado em diversas aplicações biomédicas, foi uma questão de tempo até que ele fosse direcionado à bioengenharia e regeneração de vários órgãos e tecidos (Wan *et al.*, 2003). Sendo assim, é possível manipular o gel de alginato para alterar suas propriedades físicas, adesão celular e o comportamento de degradação (Williams, 2009). Apesar de possuir poros de aproximadamente 5 nm (Boontheeikul *et al.*, 2005), ainda é possível carrear e liberar moléculas grandes demais para serem liberadas por difusão, caso haja degradação do gel. Muitas proteínas passam pelo alginato por difusão sem que haja degradação, apesar dessa deterioração poder acelerar a liberação destas proteínas (Silva e Mooney, 2010). Aparentemente, as células conseguem migrar para fora do gel, passando pelos nano poros e sem que ele se degrade, como foi visto por Hashimoto e colaboradores, em 2002.

O alginato possui vantagens de uso tanto nos ossos, quanto na cartilagem, se comparados com os outros biomateriais da mesma finalidade (Lin e Yeh, 2004). Nos ossos, o alginato de sódio misturado com quitosana demonstrou potencial para terapia regenerativa quando carregado com fatores osteoindutores, células formadoras de osso ou os dois combinados (Park *et al.*, 2005). É possível introduzi-lo no corpo de uma maneira minimamente invasiva, fazê-lo preencher irregularidades e provocar a liberação controlada de fatores de crescimento, como BMP e TGF- β (Kolambkar *et al.*, 2011; Awad *et al.*, 2004). No entanto, o gel de alginato não possui propriedades mecânicas suficientes para suportar carga sem a necessidade de fixação nos momentos iniciais da regeneração (Weng *et al.*, 2006). Em uma outra abordagem, células encapsuladas pelo gel de alginato foram introduzidas em cimento de fosfato de cálcio e demonstraram potencial para a bioengenharia de osso, sob condições de tensão e suporte moderados (Weir *et al.*, 2006). Além disso, géis de alginato contendo colágeno tipo I e beta-tricálcio fosfato aumentaram a adesão e proliferação de células estromais da medula óssea humana em comparação aos géis de alginato sem tais moléculas (Lawson *et al.*, 2004).

No caso da cartilagem, o alginato se mostrou bastante eficiente no encapsulamento de condrócitos para posterior enxerto da cartilagem danificada em modelo animal (Igarashi *et al.*, 2010). Estudos foram realizados utilizando uma suspensão de condrócitos em uma solução de alginato misturado com sulfeto de cálcio, que foi injetado em moldes de implantes faciais, com o objetivo de produzir

uma cartilagem pré-formada. A pesquisa mostrou que após 30 semanas, esses implantes subcutâneos, aplicados em camundongos e ovelhas, possibilitaram observar a presença de proteoglicano e colágeno, bem como características elásticas, equivalente a 80% do encontrado em uma cartilagem normal (Chang *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2003) demonstrando a eficácia do alginato. Outro fator que torna o gel de alginato valioso para a bioengenharia de cartilagem é sua capacidade de desenvolver uma memória estrutural. Em 2004, Thornton e colaboradores diminuíram o tamanho de um gel de alginato, usando técnica de desidratação, para que ele pudesse ser inserido em um camundongo através de um pequeno cateter (Thornton *et al.*, 2004). Após terem guiado o alginato para o local correto, os pesquisadores reidrataram o gel com uma solução contendo condrócitos articulares bovinos e observaram sua volta ao tamanho inicial após 1 hora, permitindo que houvesse a formação de cartilagem com geometria desejada, em camundongo.

Devido à dificuldade em se obter condrócitos primários dos tecidos, opta-se por usar células tronco na regeneração da cartilagem (Dragoo *et al.*, 2013). Usando o alginato para encapsular as células tronco é possível regular sua diferenciação e a condrogênese pode ser melhorada controlando-se os fatores de crescimento e os aspectos biofísicos no sistema de cultura em 3D (Guilak *et al.*, 2009). Além do mais, foi suposto que a condrogênese em células tronco está relacionada à morfologia das células encapsuladas (Dashtdar *et al.*, 2011) e o gel de alginato apresenta uma morfologia arredondada que pode promover o processo de diferenciação celular (Tuan *et al.*, 2003).

Todas as características que descrevem o alginato e as diversas possibilidades de manipulação do mesmo, fazem com que ele seja o modelo ideal para o cultivo de condrócitos *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é caracterizar condrócitos cultivados em modelo de cultivo celular em 3 dimensões para a realização de ensaios pré-clínicos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Isolar e cultivar condrócitos *in vitro*;

2.2.2. Estabelecer um protocolo *in vitro* de cultivo de condrócitos em alginato de sódio;

2.2.3. Avaliar a viabilidade dos condrócitos cultivados em sistema tridimensional com alginato de sódio;

2.2.4. Avaliar histologicamente o sistema de cultivo celular tridimensional com alginato de sódio;

2.2.5. Avaliar a morfologia do sistema de cultivo celular tridimensional com alginato de sódio;

2.2.6. Avaliar a resistência e elasticidade do sistema de cultivo de condrócitos em hidrogel de alginato de sódio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes

Para o presente estudo, foi utilizada a cartilagem advinda de fragmentos osteocondrais retirados de 12 pacientes com OA, que foram submetidos à artroplastia total de joelho no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad. Todos os pacientes que concordaram em doar os fragmentos para o nosso estudo assinaram um Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo I**), que foi submetido para apreciação e aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto, gerando o CAE 08663912.3.0000.5273. Todos os pacientes incluídos no estudo foram diagnosticados com grau 4 de OA, segundo classificação de Kellgren e Lawrence, aonde o grau 0 é normal e o grau 4 é grave (Kellgren, 1979). Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentavam doenças infectocontagiosas, portadores de hepatite (A, B, C, D e E), HIV e tumores.

3.2 Cultivo bidimensional de condrócitos

Os condrócitos foram isolados a partir da cartilagem articular, extraída da artroplastia total de joelho (**Figura 7**).

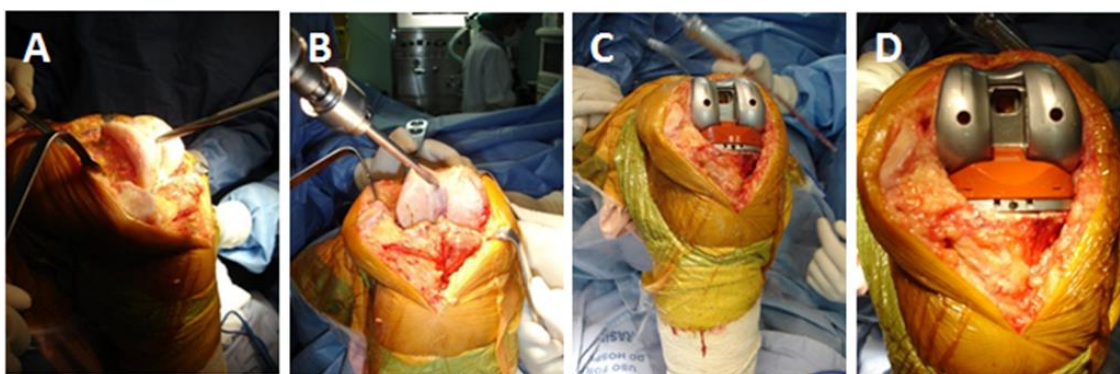


Figura 7. Foto ilustrativa de uma artroplastia total de joelho realizada em paciente com osteoartrite. Foto da articulação do joelho direito a ser substituído pela prótese (A e B). Substituição da articulação do joelho pela prótese (C e D). Foto: Eduardo Branco, Médico Ortopedista, arquivo pessoal.

A cartilagem foi separada do osso subcondral, com o auxílio de um bisturi, seguida por trituração mecânica até que atingisse uma dimensão de, aproximadamente, 0,2 cm². Esses fragmentos foram depositados em um tubo de polipropileno de 50 ml (*Sarstedt*TM), imersos em colagenase tipo II (*Sigma-Aldrich*®) a 0,5% e deixados por 18 horas em estufa umidificada à 37°C em 5% de CO₂. Após esse período, os fragmentos foram triturados novamente com auxílio de uma tesoura. A amostra passou por um filtro de 70 µm e o resultado da filtração foi centrifugado por 5 minutos, a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e o pellet homogeneizado com 1 ml de meio de cultivo IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium) (*Thermo Fisher Scientific*®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (*Sigma-Aldrich*®) e 1% de Penicilina-Streptomicina (*Gibco*TM). Dez microlitros dessa solução contendo células foram aplicadas em uma câmara de Neubauer, para a realização da contagem e determinação da concentração celular. Em uma garrafa de 25 cm², foram plaqueadas uma concentração de 1 x 10⁵ células. Em garrafa de 75 cm², foram plaqueadas 2 x 10⁶ células. Em garrafa de 175 cm², 3 x 10⁶ células. Após o plaqueamento das células, foram adicionados 5 ml de meio de cultivo IMDM suplementado nas garrafas de 25 cm², 12 ml nas garrafas de 75 cm² e 25 ml nas garrafas de 125 cm². A garrafa foi armazenada em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ e após 24 horas foi avaliada a evolução da aderência celular. Os condrócitos usados no estudo foram de 1ª e 2ª passagem.

3.3 Preparação do alginato de sódio 2%

Um bécher de 100 ml foi posicionado no centro de um agitador magnético com aquecimento e preenchido com 60 ml de solução fisiológica. O pó de alginato de sódio (*Sigma-Aldrich*®) foi vertido, vagarosamente para o bécher enquanto a solução fisiológica estava em constante agitação e aquecimento. Após total solubilização, foi usado um balão volumétrico para avolumar a solução até que esta atingisse o volume final de 100 ml. A solução foi transferida do balão volumétrico para uma garrafa de vidro estéril. A garrafa foi fechada e deixada em banho maria à 100°C, por 30 minutos, para esterilização. Finalmente, a garrafa foi retirada do banho maria e deixada em temperatura ambiente, até que a solução de alginato de sódio atingisse a temperatura de 37°C.

3.4 Confeção do modelo de cultivo 3D em alginato de sódio

Após o 7º dia de cultivo, os condrócitos foram desprendidos da garrafa com auxílio de tripsina (*Sigma-Aldrich*®) a 0,5%. Após adicionar a tripsina, a garrafa foi deixada por 5 minutos em estufa umidificada à 37°C em 5% de CO₂. **(Figura 8A)**

Após o desprendimento das células, foi adicionado meio de cultivo IMDM na mesma proporção que a tripsina, para inativá-la. Com uma pipeta de 10 ml, a mistura foi coletada, depositada em um tubo de polipropileno de 15 ml (*Sarstedt*™) e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 ml de solução de alginato de sódio a 2% **(Figura 8B)**, para uma concentração celular final de 2×10^6 células/ml. Com uma pipeta de precisão de 1000 µl, a solução contendo alginato de sódio e células foi transferida para uma seringa ultrafina (BD™) de 1 ml. Um agitador magnético foi posicionado dentro do fluxo laminar classe II e um Bécher com volume de 100 ml foi colocado no centro da placa de agitação. O Bécher foi preenchido com 80 ml de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,102 M e deixado sobre leve agitação, enquanto a solução de alginato de sódio contendo célula foi gotejada sobre a solução de CaCl₂. O gotejamento foi feito utilizando uma agulha 22G que foi encaixada em uma seringa contendo solução de alginato de sódio e célula. Este conjunto foi posicionado a uma altura de 5 cm do vórtex, dentro do Bécher, e o conteúdo da seringa foi gotejado continuamente na solução de CaCl₂, para gelificar o alginato de sódio **(Figura 8C)**. Após todo o conteúdo da seringa ter sido gotejado, as gotas de alginato foram deixadas em agitação branda por 30 segundos. A ponta de uma pipeta Pasteur estéril foi cortada para auxiliar na coleta das gotas de alginato imersas na solução de CaCl₂ e estas foram transferidas para uma placa de Petri **(Figura 8D)**. As gotas de alginato foram lavadas por 3 vezes com solução fisiológica de NaCl à 0,9%. Após retirar a solução fisiológica, foi adicionado meio de cultivo IMDM suplementado e as gotas foram distribuídas nos poços de uma placa de 6 poços. As gotas foram deixadas imersas em 3 ml de meio de cultivo IMDM suplementado por 24 horas.

Após as 24 horas, o meio de cultivo IMDM foi substituído por meio de manutenção condrocítica, contendo transferrina 6,25µg/ml, insulina 6,25µg/ml e ácido ascórbico 50µg/ml. A troca do meio foi realizada com intervalo de um dia e as gotas de alginato foram cultivadas por até 28 dias.

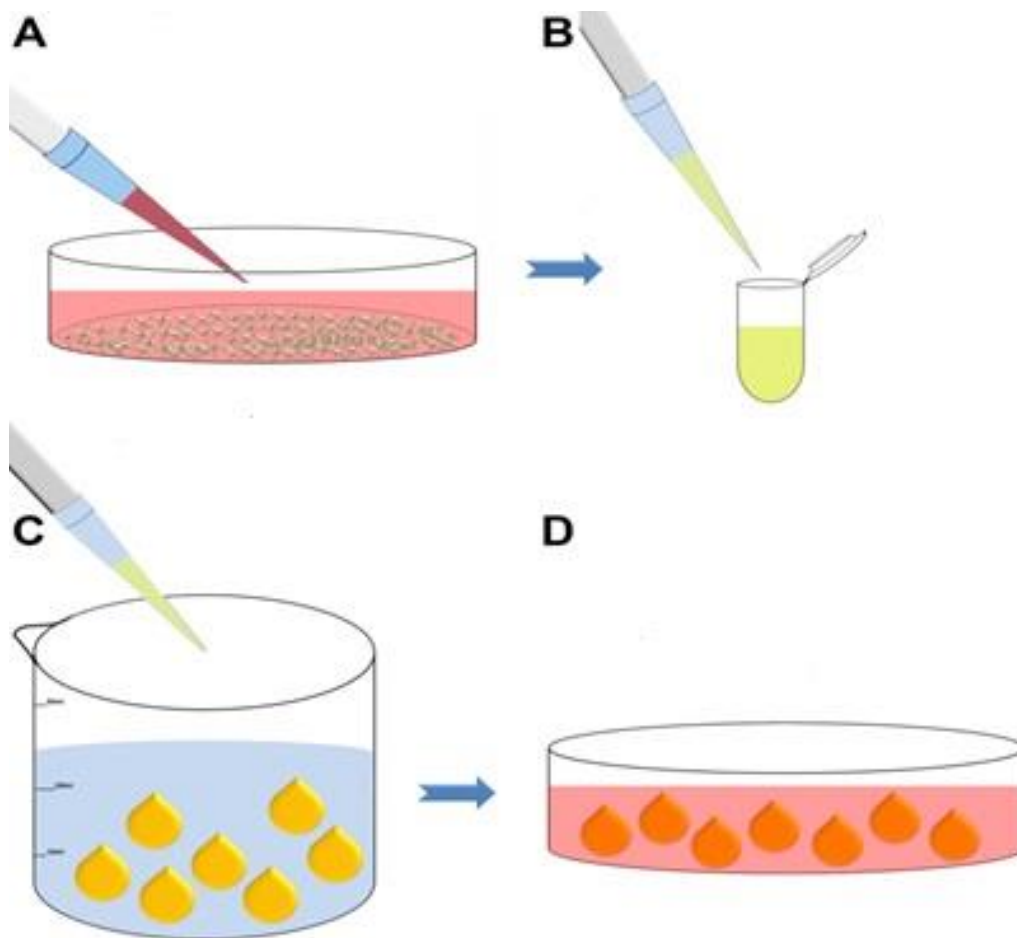


Figura 8. Inclusão dos condrócitos em alginato de sódio e gelificação do biomaterial: Após tripsinização das células (A), o pellet celular foi ressuspendido em solução de alginato de sódio (B) e gotejado em CaCl_2 (C). As gotas foram cultivadas em meio de manutenção condrocítica (D).

3.5 Preparo da amostra para histologia

3.5.1 Fixação e Parafinização

Para cada análise foram coletadas 5 gotas de alginato do 1º, 14º e 28º dias de cultivo e fixadas com formol 10% por 24 horas. As amostras passaram por desidratação seriada, com banhos de 5 minutos em etanol 70%, 80% e 90% e, por fim, foram banhadas em xilol absoluto, por 5 minutos. Após a desidratação, elas foram embrulhadas, cuidadosamente, em um papel filtro e colocadas em um cassete histológico tradicional, onde passaram por 2 banhos de 30 minutos em parafina líquida para que o excesso de xilol fosse removido das amostras. As gotas foram

retiradas do papel filtro, posicionadas em um molde de parafina de 15x15x5 mm e parafinizadas até formarem um bloco. O bloco de parafina foi cortado em micrótomo, em fitas de espessura de 4 µm e, subsequentemente, sobrepostos em lâmina histológica.

3.5.2. Desparafinização

As lâminas foram deixadas em estufa pré-aquecida, à uma temperatura de 50°C, por 25 a 30 minutos, para que a parafina se liquefizesse e fosse substituída do tecido com maior facilidade. Após o aquecimento, as lâminas passaram por dois banhos em xilol absoluto e quatro banhos em etanol absoluto. Em cada banho, as lâminas foram mergulhadas nos recipientes com xilol e etanol por 5 vezes. As lâminas foram transferidas para outro recipiente contendo água em fluxo contínuo e deixadas por 5 minutos.

3.6 Coloração das lâminas com Safranina-O

Após a desparafinização e hidratação, os cortes passaram pela bateria de coloração em Safranina-O 1% para marcação de proteoglicanos (Camplejohn e Allard, 1988), onde cada lâmina foi exposta ao corante por 5 a 10 segundos, lavadas em água corrente até que fosse retirado o excesso e, por fim, montadas com bálsamo do Canadá.

3.7 Viabilidade e morte celular por ensaio de Live and Dead

Dezessete gotas de alginato de sódio contendo condrócitos, foram coletadas no 28º dia e acondicionadas em um tubo de polipropileno de 50 ml (*Sarstedt*TM). Estas foram lavadas com PBS 1% em 3 ciclos de 30 segundo e depois deixadas imersas em 500 µl da mesma solução. Imediatamente, foi adicionado à solução 1 µl de homodímero de etídio e 0,5 µl de calceína AM (*Molecular Probes*[®]). O tubo de polipropileno foi levemente agitado para homogeneizar os reagentes e deixado em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as imagens das

gotas foram adquiridas por um microscópio estereoscópico de fluorescência (©Leica Microsystems).

3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram coletadas 8 gotas de alginato de sódio do 1º e do 28º dias de cultivo. As gotas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), por 1 hora. Após 1 hora de fixação, as amostras foram lavadas com o mesmo tampão e então pós fixadas com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato, por 40 minutos. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol 70%, 80% e 90%. As gotas secaram através do método do ponto crítico do CO₂ (Balzers/Union CPD 030), depositadas sobre uma fita condutiva de carbono aderida a suportes de alumínio (“stubs”) e metalizadas com uma fina camada de ouro de aproximadamente 20nm (BalTec SCD 050). As amostras foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL SEM 5310, operado a 15 ou 20 KV. Foi utilizada a distância de trabalho de 10 mm para a aquisição das imagens (resolução de 1024 x 768 pixels) em modo de varredura lenta (“slow scan mode”).

3.9 Avaliação de elasticidade do biomaterial

A elasticidade de um dado material sólido é caracterizada pela determinação do módulo de Young do mesmo (E). O módulo de Young corresponde à constante de proporcionalidade entre a tensão de tração aplicada no material e a deformação relativa produzida pela mesma.

Um material em forma de paralelepípedo, com comprimento L_0 e área da seção transversal dada por A , submetido a um par de forças de mesmo módulo F , mas com sentidos contrários, sofre uma deformação $\Delta L = L - L_0$ (**Figura 9**).

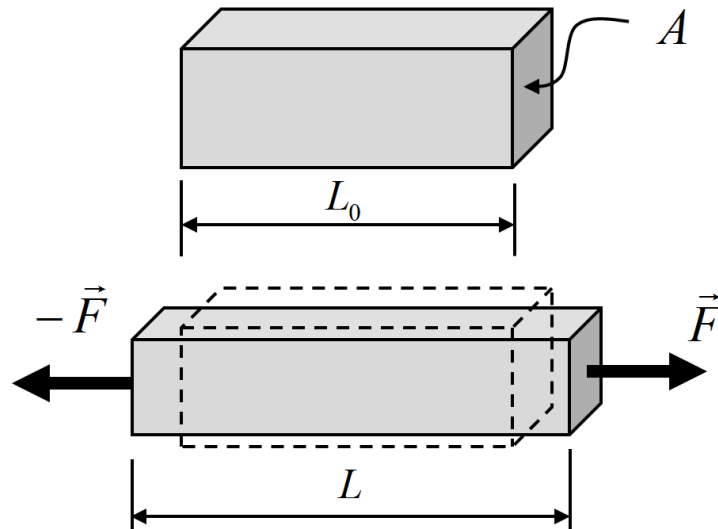


Figura 9. Definição do módulo de Young.

O módulo de Young é definido por:

$$\frac{F}{A} = E \frac{\Delta L}{L}, \quad (1)$$

onde F/L é a tensão aplicada no material e $\Delta L/L$ é a deformação relativa, deformação sofrida por unidade de comprimento do material. A unidade do módulo de Young é o pascal (Pa), mesma unidade de pressão. O módulo de Young de um material dá uma ideia da facilidade em deformá-lo quando submetido a algum tipo de tensão de tração. O módulo de Young do aço é da ordem $210 \times 10^9 Pa$, do vidro $50 \times 10^9 Pa$, da borracha $10 \times 10^6 Pa$, do citoesqueleto é da ordem de dezenas a centenas de Pa (Ayala *et al.*, 2016). O hidrogel, devido a suas características de material mole, possui módulo de Young entre a ordem de dezenas a centenas de milhares de Pa .

Para avaliar o módulo de Young, ou módulo de elasticidade de um material, é preciso utilizar um instrumento adequado para exercer forças e medir as deformações sofridas pelo material. Devido ao formato esferoidal da gota do hidrogel de alginato e à elasticidade do mesmo (pode ser deformado com as mãos), foi proposto um aparato baseado em uma balança digital (para medir forças), um deslocador micrométrico para aplicar deformações e um bastão de vidro para aplicar a força (**Figura 10**).

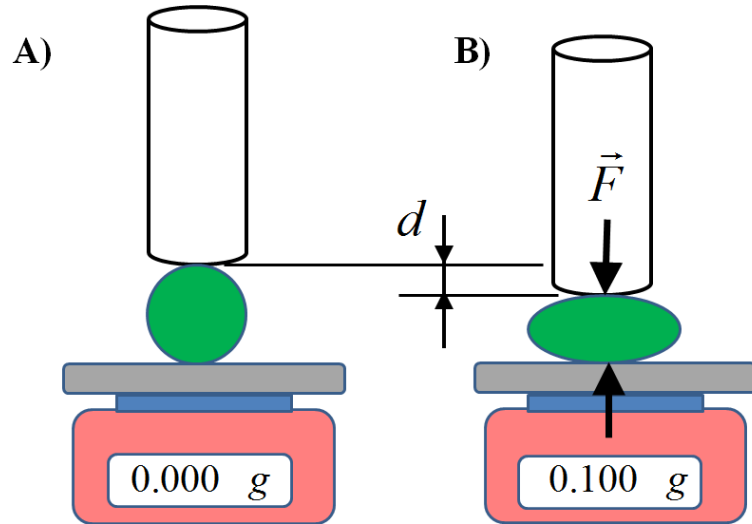


Figura 10. Aparato experimental proposto para medida do módulo de Young do hidrogel de alginato de sódio.

No painel A da Figura 10 é apresentada a situação em que o bastão de vidro está em contato com a gota de hidrogel, mas sem pressiona-la. Nessa situação, a balança é “zerada” e, por conseguinte, a leitura por ela feita é nula. Após deslocar o bastão de vidro contra a gota de hidrogel por uma distância d , a gota se deforma pelo mesmo valor do deslocamento do bastão de vidro, pois o módulo de elasticidade do bastão é cerca de um bilhão de vezes maior que o do gel, e por isso sua deformação pode ser desprezada. O deslocamento é feito com um micrômetro, que não foi representado na Figura 10. Ao ser deformada, a gota de hidrogel sofre uma força do bastão, de módulo F , que é transferida para a balança que passa a exercer também sobre o hidrogel uma força de mesmo módulo, mas em sentido contrário. A leitura da massa da balança Δm , multiplicada pela aceleração da gravidade fornece a intensidade da força usada para deformar o hidrogel, $F = g\Delta m$.

A dependência da intensidade da força F com a deformação aplicada d é dada por (Landau e Lifshitz, 1986):

$$F = \frac{16}{9} E \sqrt{R} d^{3/2}, \quad (2)$$

onde R é o raio aproximado da gota de hidrogel. Usando as medidas de força por deformação da gota de hidrogel e também os valores medidos para seu raio em cada condição estudada, o módulo de Young é determinado.

3.10 Análise Estatística

A comparação das dimensões (altura e diâmetro) observadas nas gotas de alginato, foi representada como a média para os dias 0, 1, 14 e 28 do experimento. Para cada dia, 10 gotas ($N_{\text{gota}} = 10$) foram medidas. Ao final, foram calculadas as médias (medida de posição dentro da concentração de dados de uma distribuição) e os desvios padrão (medida de dispersão estatística).

Para tanto, o software estatístico R (Team R, 2014) (Versão 3.3.1 para Windows) foi utilizado e seus respectivos pacotes ggplot2 (Wickham, 2009) para a formulação dos gráficos.

Para formulação dos gráficos usados no experimento do módulo de Young, foi usado o software GraphPad Prism (Versão 7 para Windows).

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento de condrócitos *in vitro* e encapsulamento em alginato de sódio

Com o intuito de estabelecer o cultivo dos condrócitos *in vitro*, fragmentos osteocondrais obtidos de descartes cirúrgicos de artroplastia total de joelho foram coletados e levados ao laboratório. Os condrócitos isolados foram plaqueados em garrafas de 75 cm² para o cultivo e expansão até sua confluência (**Figura 11**). Após a confluência, os condrócitos foram tripsinizados e embebidos em solução de alginato de sódio a 2%. O processo de gelificação do alginato de sódio é instantâneo e gera uma estrutura em formato de gota (**Figura 12**).

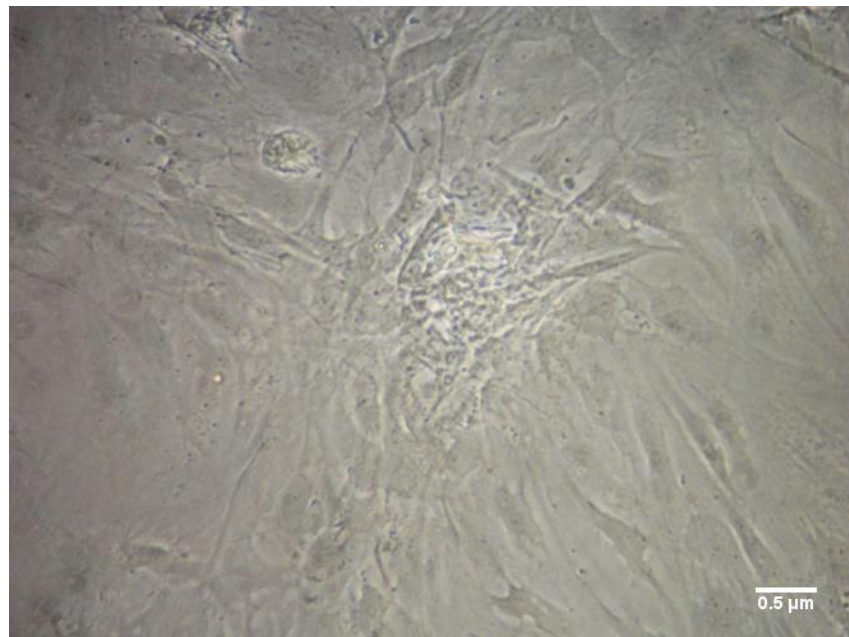


Figura 11. Fotomicrografia de condrócitos aderidos ao poliestireno. Condrócitos confluentes na garrafa de cultivo celular de 75 cm², após 7 dias de isolamento do tecido.



Figura 12. Fotomicrografia da gota de alginato de sódio contendo condrócitos encapsulados. Morfologia da gota de alginato de sódio gelificada, após entrar em contato com cloreto de cálcio.

4.2 Avaliação da viabilidade dos condrócitos cultivados em monocamada e em alginato de sódio

A mensuração da viabilidade celular é importante para que seja avaliada a adaptação dos condrócitos ao hidrogel. Para tal, usamos o ensaio por *Live and Dead*® para monitoramento da população celular. Este ensaio combina reagentes fluorescentes para se obter duas colorações: células vivas em cor verde e células mortas, ou seja, com permeabilidade da membrana plasmática alterada, em cor vermelha.

Na avaliação dos condrócitos cultivados em modelo de alginato de sódio, as células vivas são identificadas em virtude da atividade de enzimas intracelulares que catalisam a reação de hidrólise das ligações éster, as esterases, gerando assim a fluorescência verde e a exclusão do corante vermelho. Já as células mortas são diferenciadas por duas maneiras *i.* pela ausência da atividade da esterase e *ii.* devido a alteração da integridade da membrana plasmática pela morte celular, que permitirá a passagem da substância e acarretará na emissão da coloração vermelha (Figura 13).

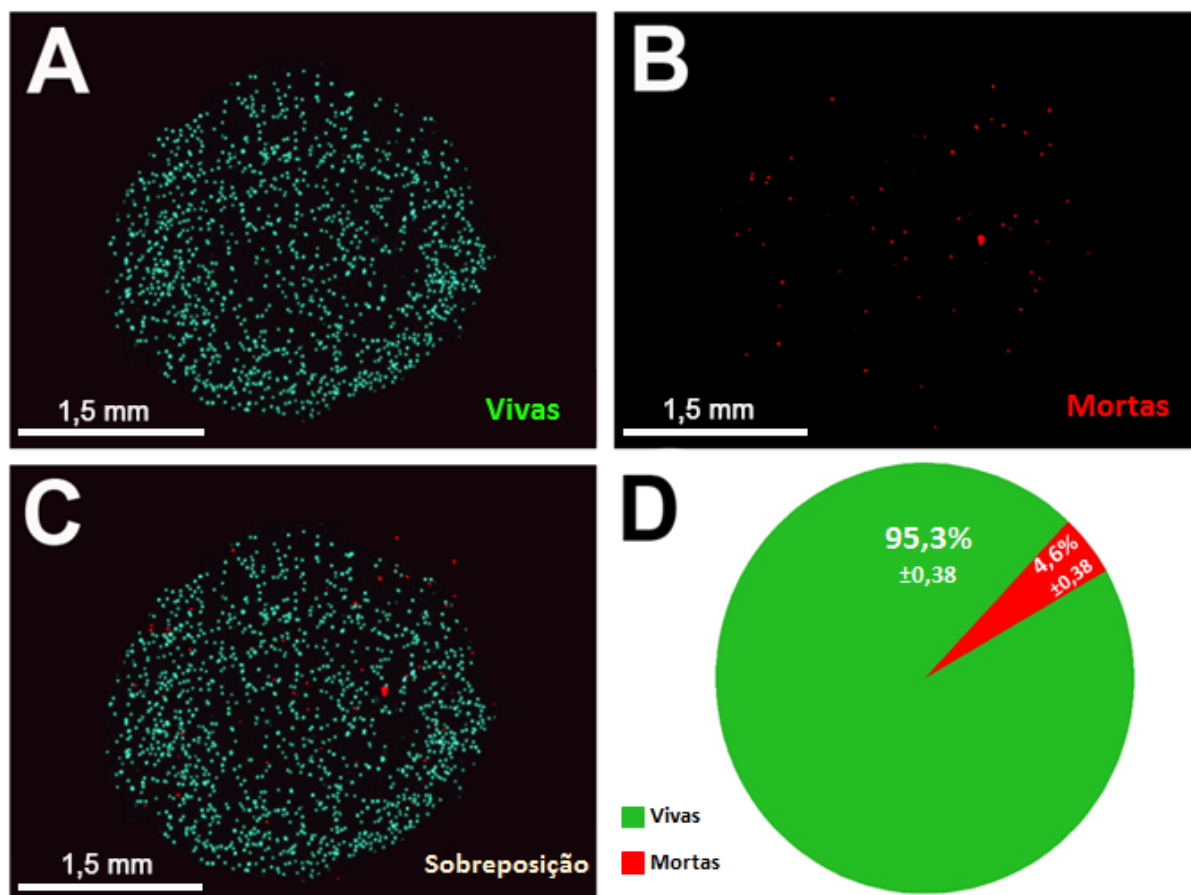


Figura 13. Ensaio de viabilidade celular por *Live and Dead*. Imagem representativa da população de células vivas, cultivadas em alginato de sódio até o 28º dia (A). População de células mortas, cultivadas em alginato de sódio até o 28º dia (B). Sobreposição das imagens A e B (C). Gráfico demonstrativo da porcentagem de células vivas e mortas, demonstrando a quantidade superior de células vivas em relação às mortas (D). $n = 17$.

Com este ensaio, notamos uma predominância da marcação verde nas células presentes nas culturas em alginato por 28 dias, em relação às células marcadas em vermelho, indicando que nestas culturas há mais células viáveis do que células mortas. A quantificação desta marcação indicou que $95,3 \pm 0,38\%$ das células eram viáveis, enquanto apenas $4,6 \pm 0,38\%$ do total de células eram células mortas.

4.3 Avaliação histológica das gotas de alginato de sódio

Uma vez constatado que os condrócitos apresentavam alta viabilidade quando cultivados em alginato de sódio, e que o biomaterial estava íntegro, analisamos histologicamente as gotas de alginato de sódio.

Através da análise dos cortes, após coloração com hematoxilina e eosina, foi possível observar um tecido com aspecto amorfo, bem semelhante ao da cartilagem hialina, com células bem compartimentalizadas em lacunas envolvidas por matriz extracelular (**Figura 14 A e B**).

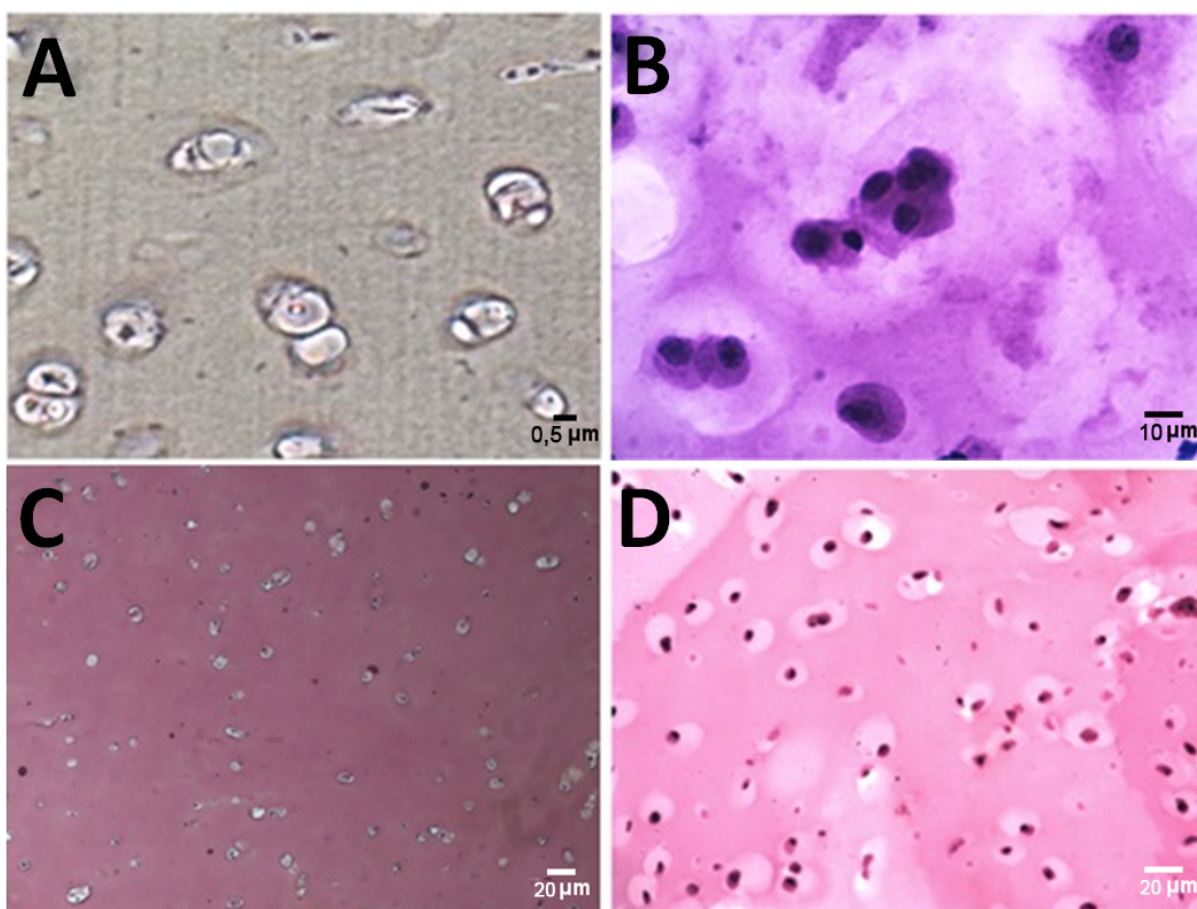


Figura 14. Análise histológica de uma cartilagem hialina e alginato de sódio. Coloração com hematoxilina e eosina da zona proliferativa da cartilagem (A) e da gota de alginato de sódio (B). Coloração com safranina-O da zona proliferativa da cartilagem (C) e da gota de alginato de sódio. Aumento de 20x (A e B) e 40x (C e D).

Além disso, observamos que a matriz extracelular expressa pelos condrócitos encapsulados pelo hidrogel de alginato de sódio é rica em proteoglicano, como evidenciado pela coloração com safranina-O (**Figura 14 C e D**).

4.4. Avaliação morfológica e estrutural das gotas de alginato de sódio

Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura em 8 gotas do 1º dia de cultivo e do 28º dia de cultivo, para observarmos a célula, o tecido e a influência que ambos exerceram ao outro durante essa janela de tempo. Na figura 15 A, observamos a morfologia da gota de alginato de sódio desidratada, que havia sido cultivada por apenas 24 horas. Foi observada uma alteração expressiva nas dimensões da gota quando esta foi desidratada e sua superfície externa apresentou um aspecto mais uniforme e regular. Na figura 15 B, C e D, rompemos uma gota de alginato de sódio para expor seu interior e pudemos observar os condrócitos ancorados à estrutura matricial do hidrogel. As células apresentavam morfologia arredondada e formato regular, e se encontravam dispersas na matriz do hidrogel. Foi possível observar, ainda, poucos componentes na superfície das células.

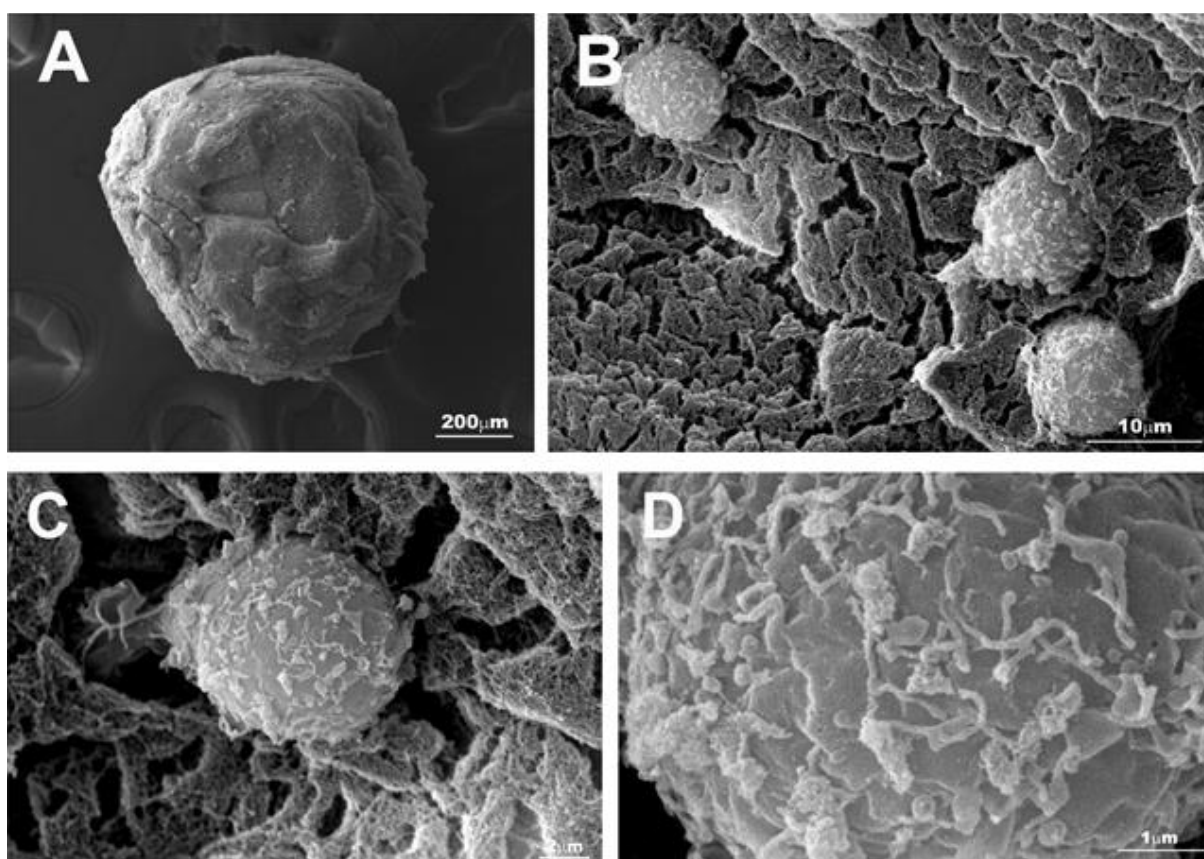


Figura 15. Análise por microscopia eletrônica de varredura das gotas de alginato de sódio com um dia de cultivo. Gota de alginato de sódio desidratada, com 1 dia de cultivo (A). Condrócitos ancorados na matriz interna do hidrogel (B e C). Condrócito apresentado pouca expressão de matriz extracelular (D).

Na microscopia eletrônica de varredura realizada nas gotas cultivadas por 28 dias, observamos uma morfologia diferente da observada no 1º dia de cultivo. A gota apresentava característica irregular em seu exterior (**Figura 16 E**). Rompemos uma gota de alginato de sódio para expor seu interior e pudemos observar que os condrócitos estavam completamente circundados por componentes filamentosos e já não era possível visualizar a célula. Os componentes filamentosos no exterior das células se conectavam à estrutura do alginato e pareciam produzir um efeito de ancoragem (**Figura 16 F, G e H**).

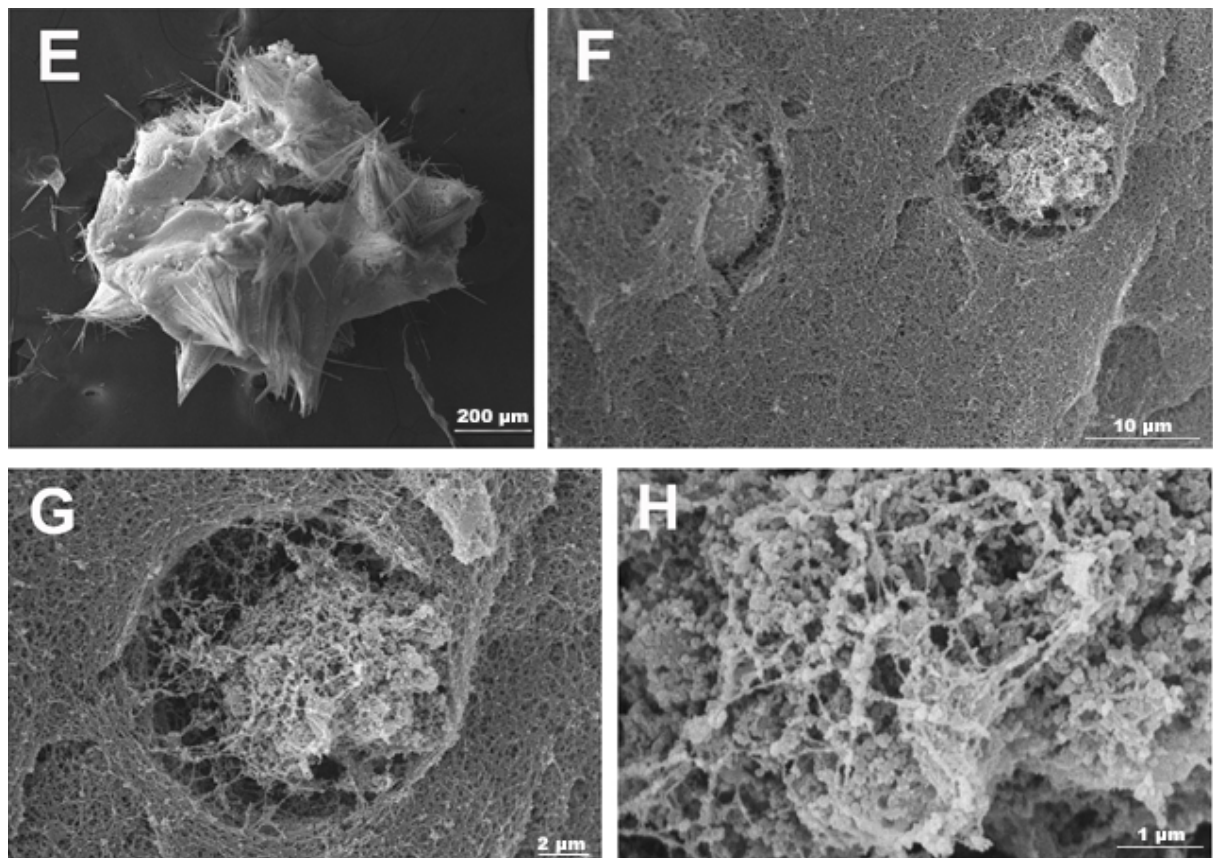


Figura 16. Análise por microscopia eletrônica de varredura das gotas de alginato de sódio com 28 dias de cultivo. Gota de alginato de sódio desidratada, com 28 dias de cultivo (E). Condrócitos embebidos na matriz interna do hidrogel (F e G). Condrócito apresentado intensa expressão de matriz extracelular (H).

4.5. Análise da elasticidade das gotas de alginato de sódio

As análises para caracterização da forma das gotas do hidrogel de alginato tiveram início imediatamente após a confecção dessas, medindo suas dimensões ao longo do tempo para que fosse possível avaliar possíveis alterações ao longo do período de cultivo (**Figura 17**).

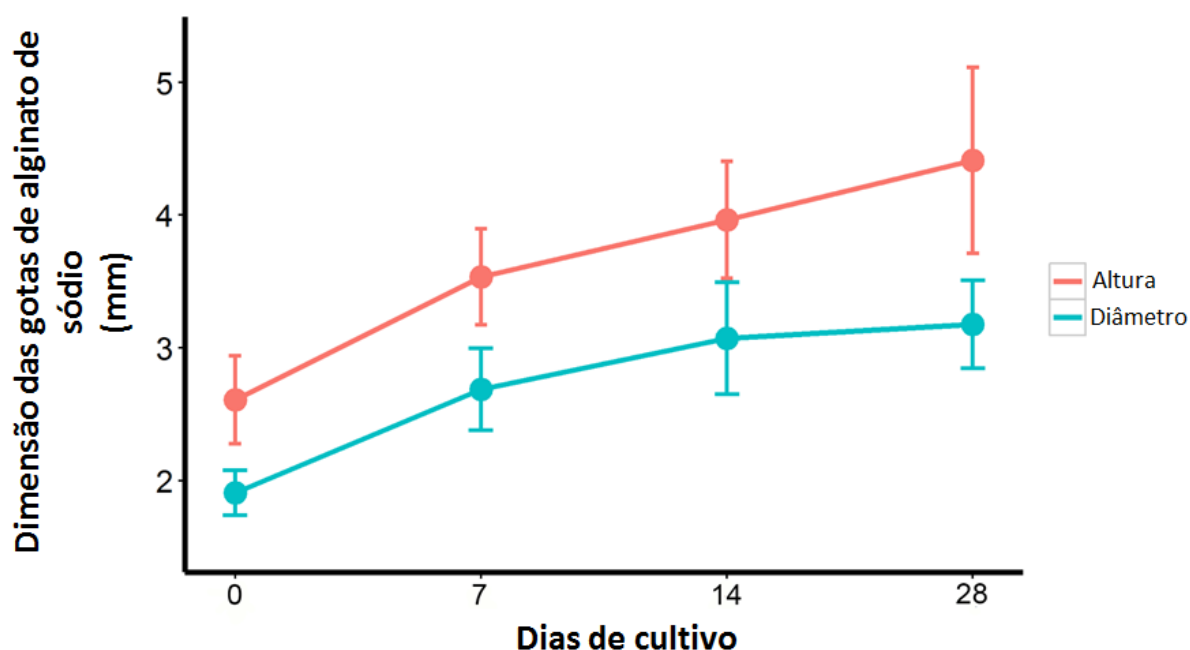


Figura 17. Dimensões das gotas de alginato de sódio até 28 dias de cultivo celular. É possível observar um aumento na dimensão das gotas, comparando o dia de confecção do hidrogel (0) até o último dia de análise (28). n=10

Foi possível observar um aumento nas dimensões das gotas, comparando o dia de confecção do hidrogel (0) até o último dia de análise (28). As gotas tiveram seu volume aumentado com o tempo em cultura.

Para avaliarmos se houve variação na elasticidade do biomaterial ao longo do tempo, desenvolvemos uma metodologia para medir o módulo de elasticidade das gotas, denominado módulo de Young.

Propusemos um ensaio de elasticidade baseado na aplicação de uma deformação à gota de hidrogel e na medida do módulo da força necessária para produzir essa deformação (ver Materiais e Métodos). Um resultado do ensaio de

elasticidade obtido para uma gota de hidrogel com um dia de cultura é apresentado na Figura 18.

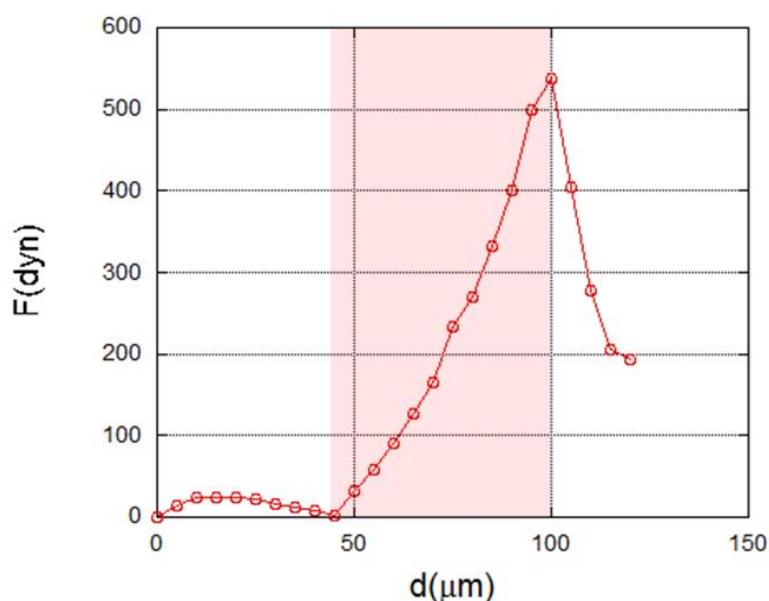


Figura 18. Ensaio de elasticidade. Gráfico de força por deformação para uma gota de alginato com um dia de cultivo. Região sombreada corresponde à região de análise para determinação do módulo de elasticidade.

Três regiões podem ser distinguidas na curva de força do ensaio de elasticidade. Na primeira delas, à esquerda da região sombreada na Figura 18, o aumento e diminuição da força são interpretados pela interação da gota de hidrogel de alginato com o excesso de água do meio no qual ela foi embebida. A partir de deslocamentos maiores que $50 \mu m$ a gota começa a se deformar e a força aumenta com a deformação até que seja atingido um valor máximo (região sombreada na Figura 18). Após atingido um máximo a força passa a diminuir com a deformação, efeito que foi identificado com o aparecimento de fraturas na gota. A gota, a partir desse ponto, perde a integridade (região à direita da área sombreada).

A análise da região sombreada é mostrada na Figura 19. O módulo de Young E é obtido a partir de um ajuste não linear dos resultados experimentais ao modelo descrito pela Equação 2 utilizando o programa Kaleidagraph. O valor do módulo de Young encontrado para o caso descrito na Figura 19 foi de $E = (246 \pm 3) kPa$.

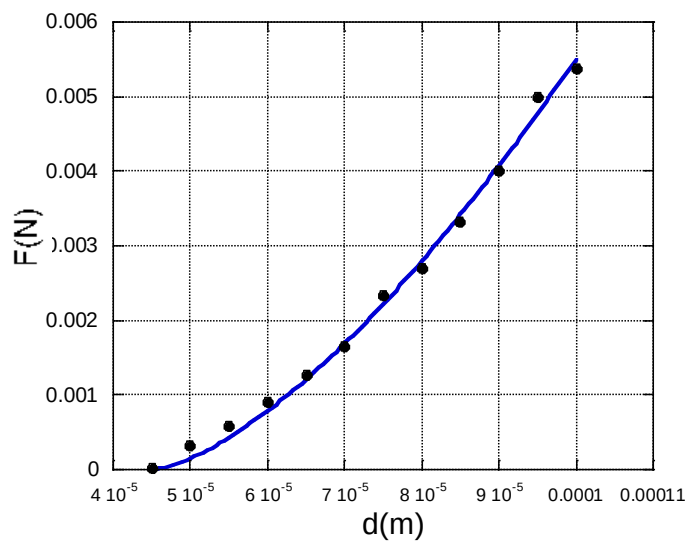


Figura 19. Análise do ensaio de elasticidade. Para esta situação, correspondendo ao primeiro dia de cultura, foi encontrado um módulo de Young $E = (246 \pm 3) \text{ kPa}$.

Ensaio de elasticidade foram realizados para gotas de hidrogel no primeiro dia de cultivo e também para gotas no vigésimo oitavo dia. Os resultados podem ser vistos no gráfico apresentado na Figura 20.

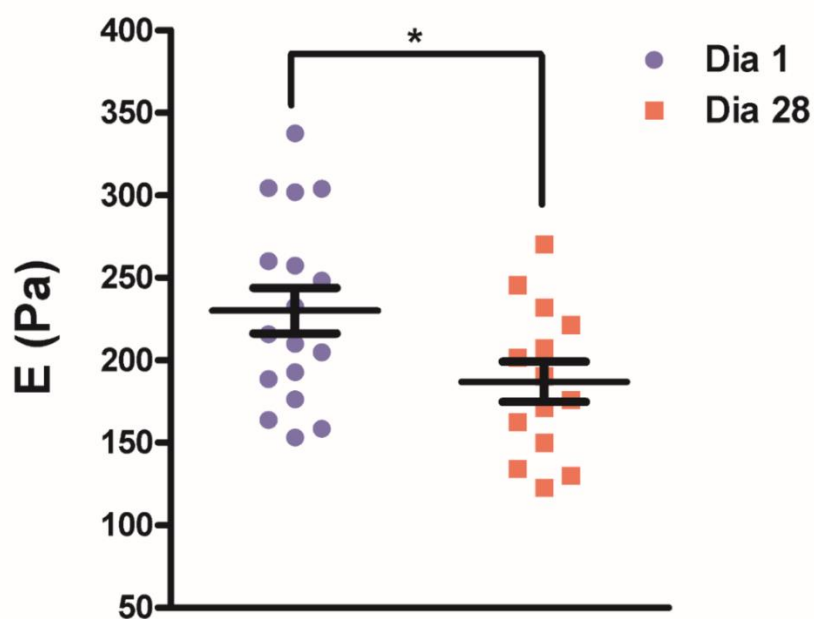


Figura 20. Módulo de elasticidade das gotas de hidrogel de alginato de sódio. As gotas de alginato apresentam-se menos rígidas após 28 dias de cultivo $p < 0,05$ (Test t-Student). Barras de erro correspondem ao erro padrão da média. N = 17.

Para as gotas de hidrogel de alginato, após 28 dias com as células em cultura, encontramos $E_{28 \text{ dias}} = (181 \pm 11) \text{ kPa}$. Para as gotas de hidrogel de alginato, após um dia de cultura encontramos $E_{1 \text{ dia}} = (230 \pm 14) \text{ kPa}$. Após 28 dias, as gotas se apresentam levemente menos rígidas que no primeiro dia. Os resultados são estatisticamente diferentes com $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO

O conjunto de dados obtidos neste trabalho nos permitiu avaliar o encapsulamento de condrócitos por um hidrogel gerado a partir do alginato de sódio. Este sistema possibilita o desenvolvimento e a manutenção dos condrócitos *in vitro*, representando, assim, um modelo de cultivo eficaz para estas células.

Cultivar células em sistema tridimensional fornece um bom modelo para investigar a atividade do metabolismo celular frente aos diferentes tratamentos existentes (Weigelt *et al.*, 2010; Vinci *et al.*, 2012). Alguns estudos têm demonstrado a importância de se cultivar células em um ambiente tridimensional. Erickson e colaboradores, em 2009, avaliaram a diferenciação de células tronco mesenquimais em condrócitos, usando um hidrogel de ácido hialurônico. Neste sistema, eles observaram que os receptores das células poderiam interagir melhor com o ácido hialurônico e influenciar a diferenciação celular. Além disso, outros fatores foram responsáveis por acentuar a condrogênese, como as propriedades mecânicas, a química do material, um microambiente biologicamente funcional e interações celulares (Erickson *et al.*, 2009).

A viabilidade celular é um dos principais parâmetros para se desenvolver um modelo *in vitro* para cultivo de células (Shih-Feng *et al.*, 2010). Como demonstrado por Hoshikawa e colaboradores, em 2006, cada tipo de hidrogel exerce uma influência na manutenção da viabilidade condrocítica. Ao analisarem e compararem os condrócitos encapsulados por gel de colágeno e condrócitos encapsulados por gelatina, os pesquisadores observaram que o gel de colágeno havia encolhido um dia após o encapsulamento dos condrócitos (Hoshikawa *et al.*, 2006). No entanto, apesar da mudança no tamanho do gel de colágeno, o número de células viáveis foi maior neste modelo de cultivo do que no sistema de cultivo com gelatina. Em nosso modelo, através do ensaio por *Live and Dead*, conseguimos quantificar a viabilidade das células presentes nas gotas de alginato de sódio cultivadas por 28 dias. Como resultado, observamos que o número médio de células que permaneceram vivas foi significativamente maior do que o número médio de células mortas. Sendo assim, nossos resultados demonstram que, como observado nos outros tipos de hidrogéis, é possível cultivar condrócitos em alginato de sódio por um longo período de tempo, mantendo níveis elevados de viabilidade celular.

A capacidade da cartilagem articular de resistir aos esforços altamente repetitivos, provocados pelo movimento, depende da estrutura e composição de sua matriz extracelular (Whitesides, 2001). Os condrócitos sintetizam os componentes da matriz e a atividade metabólica dos condrócitos é regulada pela carga mecânica ao qual tecido é submetido (O'Connor *et al.*, 2013). Os proteoglicanos são monômeros proteicos altamente glicosilados e, na cartilagem articular, representam o segundo maior grupo de macromoléculas presentes na matriz extracelular, representando de 10% à 15% do seu peso (Heinegard e Sommarin, 1987). A cartilagem articular possui uma variedade de proteoglicanos que são essenciais para a homeostasia do tecido, incluindo a agrecana, decorina, biglicana e fibromodulina (Hsueh *et al.*, 2016). O maior em tamanho e mais abundante em peso, é a agrecana, um proteoglicano que possui mais de 100 cadeias de sulfato de condroitina e de sulfato de queratina (Bernhard e Panitch, 2012). Os proteoglicanos são caracterizados pela não agregação e por sua capacidade de interagir com o colágeno, formando uma cito arquitetura fundamental para alicerçar a cartilagem articular (Roughley, 2006).

A estrutura do alginato de sódio apresenta características morfológicas semelhantes à matriz presente na cartilagem hialina articular, sendo esta homogênea e amorfa. A coloração com safranina nos permitiu avaliar a presença de proteoglicanos na matriz extracelular nas gotas de alginato de sódio, pois este é um dos componentes de maior predominância da matriz extracelular dos condrócitos articulares. Andrade e colaboradores, em 2011, demonstraram que as moléculas de glicosaminoglicanos não têm afinidade pela matriz interna do alginato de sódio e, por isso, se concentram no exterior da gota (Andrade *et al.*, 2011). Esse fato nos impediu de realizar uma coloração com azul de alcian, um corante específico para marcação dos glicosaminoglicanos. Os autores consideraram este um ponto positivo para acelerar a neoformação de tecido no local em que as gotas fossem possivelmente enxertadas, pois o hidrogel de alginato de sódio estaria liberando macromoléculas e componentes fundamentais para o desenvolvimento tecidual (Zhanpeng *et al.*, 2013; Amini *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2008).

No sistema de cultivo em alginato de sódio, também foi possível observar condrócitos agregados e células bem dispersadas pelo tecido, característica típica dos condrócitos presentes na zona de transição da cartilagem hialina articular. Além

disso, as células se alocaram em suas lacunas, os condroplastos, constituídas no interior da matriz extracelular.

O encapsulamento de células usando o alginato de sódio é usado para outros tipos celulares, além dos condrócitos (Hunt e Grover, 2010). Isso porque o gel criado a partir do alginato apresenta uma série de características favoráveis e manipuláveis que possibilitam o cultivo de, por exemplo, queratinócitos e fibroblastos (Hunt et al., 2009). Hunt e colaboradores observaram que houve degradação do gel de alginato, mas não por mecanismo celular, visto que células de mamíferos não possuem alginase (Shoichet et al., 1996). Os pesquisadores relacionaram esse fato à possível troca entre os íons de cálcio, responsável pela gelificação, com íons monovalentes, presentes na solução do meio de cultivo. No entanto, os pesquisadores concordaram que esse processo de desintegração seria positivo, uma vez que seria possível dar lugar aos componentes celulares com a saída do biomaterial. Em nosso estudo, não observamos degradação espontânea da gota de alginato de sódio.

Outro tipo celular que apresentou resultados satisfatórios ao ser encapsulado pelo gel de alginato foi o hepatócito, como demonstrado por Khattak e colaboradores (Khattak et al., 2007). Além de ter demonstrado a eficiência do alginato em hospedar células do fígado, os pesquisadores demonstraram a facilidade em incorporar adjuvantes técnicos, como uma emulsão de perfluorcarbono, que é um composto usado para carrear moléculas de oxigênio (King et al., 1989). Como os hepatócitos são tipos celulares de alta atividade metabólica, através dessa modificação no alginato de sódio, Khattak e colaboradores conseguiram aumentar a demanda de oxigênio para o interior do hidrogel e manter viáveis as células cultivadas.

Ao contrário dos hepatócitos, os condrócitos necessitam de um ambiente com baixo teor de oxigênio para manterem suas características (Sheery et al., 2012). É possível que esta seja a razão para não termos observado baixa viabilidade celular, mesmo em 28 dias. Além da hipóxia, outro fator importante para a manutenção do fenótipo e genótipo condrocítico é o estímulo biomecânico (O'Connor et al., 2013).

Para uma análise morfológica e estrutural do hidrogel de alginato de sódio, nós comparamos através de microscopia eletrônica de varredura, 8 gotas do 1º dia de encapsulamento dos condrócitos e 8 gotas do 28º dia. Com apenas um dia de cultivo dos condrócitos, pudemos observar com detalhes os aspectos morfológicos da gota e, diferentemente da gota de 28 dias, sua superfície exterior apresenta

menos deformidade e um aspecto menos irregular. As fibras que formam a matriz interna do hidrogel de alginato de sódio estão mais visíveis e fragmentadas no 1º dia e há poucos componentes extracelulares da matriz. Além disso, os condrócitos não estão devidamente aprisionados em lacunas. Curiosamente, as gotas cultivadas por 28 dias apresentaram morfologia externa diferente das gotas cultivadas por apenas 1 dia. Foi possível observar filamentos com característica cristalina ao redor de toda a gota de alginato de sódio, o que nos levou a crer ser um extravasamento da matriz extracelular produzida pelos condrócitos. Quando rompemos a gota para expor seu exterior, observamos que as fibras responsáveis pela estruturação do hidrogel haviam se mesclado aos componentes da matriz extracelular e apresentaram uma mudança significativa, além de não apresentarem mais espaços fragmentados, como no 1º dia de cultivo.

Uma das características que favorece o uso de determinado biomaterial na bioengenharia de tecido é sua propriedade biomecânica e no caso da cartilagem hialina articular, cada segmento da sua estratificação possui uma propriedade biomecânica diferente da outra. Para avaliarmos a capacidade das gotas de alginato de resistir às forças de tensão e compressão, nós desenvolvemos uma metodologia para empregar uma força nas gotas até que estas se rompessem. No dia de cada análise, nós coletávamos em torno de 20 gotas para realizar o experimento do módulo de Young. Apesar de separarmos 20 gotas, usávamos apenas 15, pois algumas não resistiam ao deslocamento e acabavam se desintegrando. A comparação dos resultados obtidos no ensaio de elasticidade entre as gotas de 1 e 28 dias indicaram uma diminuição pequena do módulo de elasticidade das gotas, quando comparamos os resultados obtidos para 28 dias de cultivo com o primeiro dia. Além disso, após 28 dias, a gota apresentou-se mais quebradiça. Esse efeito pode ser uma consequência da mudança estrutural nas fibras do alginato, observada na microscopia eletrônica de varredura.

Uma variável importante para se executar o cálculo do módulo de Young é a dimensão do biomaterial. Com o auxílio de um paquímetro, nós medimos 15 gotas no 1º, 14º e 28º dia e pudemos observar que o hidrogel estava em expansão. Não podemos afirmar que esse aumento nas dimensões do biomaterial se deve exclusivamente à produção de matriz extracelular pelos condrócitos presentes na gota de alginato. É possível que a própria difusão de líquidos e componentes para o

interior do alginato tenha contribuído para o aumento do seu tamanho, tal como a expressão de matriz. Isso demonstra a flexibilidade do hidrogel e sua capacidade de alterar seu tamanho e formato.

É possível produzir e mimetizar um microambiente controlado propício para o tipo celular que se deseja cultivar. Como quase todas as células são circundadas por matriz extracelular, em um molde 3D no ambiente *in vivo*, a cultura de células em monocamada acaba não reproduzindo com fidelidade estas condições. No caso dos condrócitos, estar em um ambiente que proporcione sua produção de matriz extracelular é fundamental para o seu desenvolvimento. Dashtdar e colaboradores, em 2011, levantaram a hipótese de que o fenótipo condrocítico, bem como a condrogênese, estaria relacionada com a morfologia das células encapsuladas e o formato arredondado da gota de alginato de sódio pode ajudar no processo de diferenciação celular (Tuan *et al.*, 2003).

Devido às propriedades físico-químicas do hidrogel de alginato de sódio, ele tem sido usado como um sistema de liberação de fármacos (Giovagnoli *et al.*, 2010). Isso nos possibilita fazer um paralelo e imaginar uma ação parácrina de fatores liberados pelos condrócitos encapsulados, em um possível uso na bioengenharia tecidual, tanto como modelo de estudo, quanto para o reparo de uma lesão no tecido. A gota de alginato de sódio tem uma característica visco-elástica intrínseca e sua organização estrutural possibilita a variação do seu tamanho, sem comprometer sua estabilidade (Thornton *et al.*, 2004), permitindo, assim, que os condrócitos sejam capazes de receber estímulos mecânicos adequados, responsáveis por modular sua atividade natural (Angele *et al.*, 2004).

Futuros estudos serão necessários para responder algumas perguntas, como: o que de fato terá causado a alteração na estrutura das fibras do alginato? O que são os filamentos observados na microscopia eletrônica de varredura após 28 dias de cultivo? Os condrócitos proliferam quando estão encapsulados pelo hidrogel de alginato?

O alginato como um biomaterial para encapsular os condrócitos é uma metodologia promissora para estudar a atividade dos condrócitos e demonstrou ser um bom modelo de cultivo em 3 dimensões, possibilitando futuros estudos de formas terapêuticas que tenham a cartilagem como alvo.

6. CONCLUSÃO

- 6.1.** O cultivo de condrócitos em hidrogel de alginato de sódio manteve a viabilidade celular ao longo do tempo de cultivo;
- 6.2.** Os condrócitos encapsulados pelo hidrogel de alginato de sódio apresentam uma característica histológica semelhante à cartilagem hialina articular;
- 6.3.** Os condrócitos encapsulados na gota de alginato de sódio apresentavam elevada síntese do que pareceu ser matriz extracelular, após 28 dias de cultivo;
- 6.4.** As gotas de alginato de sódio cultivadas por 1 dia apresentaram uma rigidez levemente maior do que as gotas cultivadas por 28 dias;
- 6.5.** As dimensões das gotas de alginato de sódio aumentaram ao longo dos dias de cultivo e após 28 dias foi observado alteração na integridade do hidrogel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JC & Watt FM. **Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix.** Development 117:1183–1198. 1993

Akimau P, Bhosale A, Harrison PE, Roberts S, McCall IW, Richardson JB, et al. **Autologous chondrocyte implantation with bone grafting for osteochondral defect due to posttraumatic osteonecrosis of the hip - a case report.** Acta Orthop.77:333-6. 2006.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. **Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges.** Critical reviews in biomedical engineering. 40(5):363-408. 2012.

Andrade LR, Arcanjo KD, Martins HS, dos Reis JS, Farina M, Borojevic R, Duarte ME. **Fine structure and molecular content of human chondrocytes encapsulated in alginate beads.** Cell Biology International. 35(3):293-7. 2011.

Angele P, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R, Füchtmeier B, Nerlich M, Neumann C, Kujat R. **Cyclic, Mechanical Compression Enhances Chondrogenesis of Mesenchymal Progenitor Cells in Tissue Engineering Scaffolds.** Biorheology. 41(3-4):335-46. 2004.

Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. **Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds.** Biomaterials. 25:3211–22. 2004.

Ayala YA, Pontes B, Ether DS, Pires LB, Araujo GR, Frases S, Romão LF, Farina M, Moura-Neto V, Viana NB, Nussenzveig HM. **Rheological properties of cells measured by optical tweezers.** BMC Biophys. 22;9:5. 2016.

Balestrini JL, Gard AL, Liu A, Leiby KL, Schwan J, Kunkemoeller B, Calle EA, Sivarapatna A, Lin T, Dimitrievska S, Campbell SG, Niklason LE. **Production of decellularized porcine lung scaffolds for use in tissue engineering.** Integrative Biology: Quantitative Biosciences From Nano to Macro. 7(12):1598-610. 2015

Bernhard JC & Panitch A. **Synthesis and characterization of an aggrecan mimic.** Acta Biomaterialia. 8(4):1543-50. 2012

- Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa MA, Soares R, Granja PL. **Immobilization of human mesenchymal stem cells within RGD-grafted alginate microspheres and assessment of their angiogenic potential.** *Biomacromolecules*. 11:1956–64. 2010
- Boonthekul T, Kong HJ, Mooney DJ. **Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution.** *Biomaterials*. 26:2455–65. 2005
- Brasil. Portal Da Saúde – Ministério Da Saúde. **Lista de Espera – Sistemas Nacional de Transplantes.** 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/julho/01/maio.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2016
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.** *N Engl J Med*. 331:889-95. 1994.
- Brooks P, Emery P, Evans JF, et al. **Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2.** *Rheumatology*. 38(8):779–788. 1999.
- Camplejohn KL, Allard SA. **Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies.** *Histochemistry*. 89(2):185-8. 1988.
- Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. **Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone.** *Matrix Biology*. 22(1): p. 81–91. 2003.
- Cannizzaro C, Tandon N, Figallo E, Park H, Gerecht S, Radisic M, Elvassore N, Vunjak-Novakovic G. **Practical aspects of cardiac tissue engineering with electrical stimulation.** *Methods in Molecular Medicine*. 140:291-307. 2007
- Chang SCN, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, Vacanti CA, Bonassar LJ. **Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants.** *Journal of Biomedical Materials Research*. 55:503–11. 2001

- Chang SCN, Tobias G, Roy AK, Vacanti CA, Bonassar LJ. **Tissue engineering of autologous cartilage for craniofacial reconstruction by injection molding.** Plastic and Reconstructive Surgery. 112:793–9. 2003
- Chen X, Macica CM, Dreyer BE, Hammond VE, Hens JR, Philbrick WM, Broadus AE. **Initial characterization of PTH-related protein gene-driven lacZ expression in the mouse.** Journal of Bone Mineralization Research. 21(1):113-23. 2006
- Clair, B.L., A.R. Johnson, and T. Howard. **Cartilage repair: current and emerging options in treatment.** Foot and Ankle Specialist. 2(4): p. 179–88. 2009.
- Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vaucel M, Maugars Y, Weiss P, Grimandi G, Guicheux J. **From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage.** Drug Discovery Today. 14(19–20): p. 913–25. 2009.
- Cooper C, Snow S, Mcalindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D and Dieppe PA. **Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis.** Arthritis & Rheumatism. 43:995–1000. 2000
- Cooper JA & Schafer DA. **Control of actin assembly and disassembly at filament ends.** Curr. Opin. Cell Biol. 12:97–103. 2000.
- Cox SC, Thornby JA, Gibbons GJ, Williams MA, Mallick KK. **3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications.** Mater Sci Eng C Mater Biol. 47:237-47. 2015
- De Kroon LMG, Narcisi R, Blaney Davidson EN, et al. **Activin Receptor-Like Kinase Receptors ALK5 and ALK1 Are Both Required for TGF β -Induced Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.** Plos One. 10(12):e0146124. 2015
- Degala S, Zipfel WR, Bonassar LJ. **Chondrocyte calcium signaling in response to fluid flow is regulated by matrix adhesion in 3-D alginate scaffolds.** Archives of Biochemistry and Biophysics. 505:112–7. 2011.
- Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P. **Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads.** Journal of Bone and Joint Surgery Br.85(5):740-7. 2003

Erickson IE, Huang AH, Chung C, Li RT, Burdick JA, Mauck RL. **Differential Maturation and Structure Function Relationships in Mesenchymal Stem Cell- and Chondrocyte-Seeded Hydrogels.** Tissue Engineering Part A. 15:1041-1052. 2009.

European Commission, **Indicators for Monitoring Musculoskeletal Conditions Project.** Cited 3. 2009.

Evangelista MB, Hsiong SX, Fernandes R, Sampaio P, Kong HJ, Barrias CC, Salema R, Barbosa MA, Mooney DJ, Granja PL. **Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix.** Biomaterials. 28:3644–55. 2007.

Eyre DR, Wu JJ. **Collagen structure and cartilage matrix integrity.** Journal of Rheumatology. 43:82-5. 1995

Fell HB. **Tissue culture and its contribution to biology and medicine.** The Journal of Experimental Biology. 57(1):1-13. 1972.

Flannery CR, Hughes CE, Schumacher BL, Tudor D, Aydelotte MB, Kuettner KE, Caterson B. **Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 254(3):535-41. 1999

Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA. **The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function.** Sports Health. 1(6):461-468. 2009.

Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. **Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials.** Biomaterials. 32:6692-6709. 2011

Furman BD, Olson SA, Guilak F. **The development of posttraumatic arthritis after articular fracture.** Journal of Orthopaedic Trauma. 20(10):719-25. 2006.

Gallagher MP, Kelly PJ, Jardine M, *et al.* **Long-Term Cancer Risk of Immunosuppressive Regimens after Kidney Transplantation.** Journal of the American Society of Nephrology. 21(5):852-858. 2010

Giannini S, Buda R, Griolo B, Vannini F. **Autologous chondrocyte transplantation in osteochondral lesions of the ankle joint.** Foot Ankle Int. 22:513-7. 2001

Giovagnoli, S.; Tsai, T.; Deluca, P.P. **Formulation and Release Behaviour of Doxycycline-Alginate Hydrogel Microparticles Embeddeed into Pluronic F127 Thermogels as a Potential New Vehicle for Doxycycline Intradermal Sustained Delivery.** AAPS. Pharm. Sci. Tech., 2010.

Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. **Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis.** Nature. 31;434 (7033):644-8. 2005.

Goldring MB. **Update on the Biology of the Chondrocyte and New Approaches to Treating Cartilage Diseases.** Best Pract Res Clin Rheumatol. 20(5):1003-25. 2006.

Gombotz WR & Wee SF. **Protein release from alginate matrices.** Advanced Drug Delivery Reviews. 31:267–85. 1998.

Gudas R, Kalesinskas RJ, Kimtys V, Stankevicius E, Toliushis V, Bernotavicius G, Smailys A. **A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes.** Arthroscopy. 21(9):1066-75. 2005.

Guilak F, Mow VC. **The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell—matrix interactions in articular cartilage.** Journal of Biomechanical. 33:1663-1673. 2000.

Guilak F, Ratcliffe A, Lane N, Rosenwasser MP, Mow VC. **Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis.** Journal of Orthopaedic Research. 12(4):474-84. 1994

Gurdon J, Murdoch A. **Nuclear transfer and iPS may work best together.** Cell Stem Cell. 7;2(2):135-8. 2008.

H. Wickham. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.** New York. Springer-Verlag, 2009.

Hall BK. **Cartilage, Vol I: Structure, Function, and Biochemistry.** Academic Press. 1983.

Hall, BK. **Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life.** Clin Orthop Relat Res. (225):255-72. 1987.

Hangody L, Ráthonyi GK, Duska Z, Vásárhelyi G, Füles P, Módis L. **Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique.** J Bone Joint Sur Am. 86:65–72. 2004.

Hashimoto T, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Wu S, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C. **Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons.** Experimental Brain Research. 146:356–68. 2002.

Heinegard D & Sommarin Y. **Isolation and characterization of proteoglycans.** Methods in Enzymology. 144:319–72. 1987.

Heldin CH, Miyazono K, tenDijke P. **TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.** Nature. 390(6659):465–71. 1997.

Hoshikawa A, Nakayama Y, Matsuda T, Oda H, Nakamura K, Mabuchi K. **Encapsulation of chondrocytes in photopolymerizable styrenated gelatin for cartilage tissue engineering.** Tissue Eng 12:2333–2341. 2006.

Hsiong SX, Carampin P, Kong HJ, Lee KY, Mooney DJ. **Differentiation stage alters matrix control of stem cells.** Journal of Biomedical Materials Research Part A. 85:145–56. 2008.

Hsueh MF, Khabut A, Kjellström S, Önnarfjord P, Kraus VB. **Elucidating the Molecular Composition of Cartilage by Proteomics.** Journal of Proteome Research. 5;15(2):374-88. 2016

Hunt NC & Grover LM. **Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine.** Biotechnology Letter. 32:733–742. 2010

Hunt NC, Shelton RM, Grover LM. **An alginate hydrogel matrix for the localized delivery of a fibroblast/keratinocyte co-culture.** Biotechnology Journal. 4(5):730-7. 2009

Igarashi T, Iwasaki N, Kasahara Y, Minami A. **A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model.** Journal of Biomedical Materials Research: Part A. 94:844–55. 2010.

Jackson, D.W, T.M. Simon, H.M. Aberman. **Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium.** Clinical Orthopaedics and Related Research. (391 Suppl): p.S14–25. 2001.

Jeon O, Powell C, Ahmed SM, Alsberg E. **Biodegradable, photocrosslinked alginate hydrogels with independently tailorable physical properties and cell adhesivity.** Tissue Engineering: Part A.16:2915–25. 2010.

Jones SW, Watkins G, Le Good N, Roberts S, Murphy CL, Brockbank SM, Needham MR, Read SJ, Newham P. **The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13.** Osteoarthritis Cartilage. 17(4):464-72. 2009.

Junqueira LC & Carneiro J. **Histologia Básica.** 12^a Edição. Guanabara Koogan. 2013.

Kellgren JH. **Osteoarthritis in Patients and Populations.** British Medical Journal. 2:1-6. 1979.

Kierszenbaum AL, Tres LL. **Histology and Cell Biology – An introduction to Pathology. 1st edition.** Elsevier. Figure 5-10, Growth plates and bone growth in length. 2002.

King AT, Mulligan BJ, Lowe KC. **Perfluorochemicals and cell culture.** Nature Biotechnology. 7(10):1037–1042. 1989

Kolambkar YM, Dupont KM, Boerckel JD, Huebsch N, Mooney DJ, Hutmacher DW, Guldberg RE. **An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects.** Biomaterials. 32:65–74. 2011.

Koulalis D, Schultz W, Psychogios B, Papagelopoulos PJ. **Articular reconstruction of osteochondral defects of the talus through autologous chondrocyte transplantation.** Orthopedics. 27:559-61. 2004

- Kraus VB, Huebner JL, DeGroot J, Bendele A. **The OARSI Histopathology Initiative - Recommendations for Histological Assessments of Osteoarthritis in the Guinea Pig.** Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society. 18(Suppl 3):S35-S52. 2010.
- Kronenberg HM. **Developmental regulation of the growth plate.** Nature 423, 332–336. 10.1038. 2003.
- Kronenberg HM. **PTHrP and Skeletal Development.** Ann N Y Acad Sci. 1068:1-13. 2006.
- Landau LD & Lifshitz EM. **Theory of Elasticity,** Elsevier. 1986.
- Langer R & Vacanti JP. **Tissue engineering.** Science 1993;260:920e6
- Lawson MA, Barralet JE, Wang L, Shelton RM, Triffitt JT. **Adhesion and growth of bone marrow stromal cells on modified alginate hydrogels.** Tissue Engineering. 10:1480–91. 2004.
- Lee J & Lee KY. **Injectable microsphere/hydrogel combination systems for localized protein delivery.** Macromol Biosci. 9: 671–6. 2009.
- LeRoux MA, Guilak F, Setton LA. **Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration.** Journal Biomedical Materials Research. 47:46–53. 1999.
- Li X, Shah A, Franklin P. **Arthroscopic debridement of the osteoarthritic knee combined with hyaluronic acid (Orthovisc®) treatment: a case series and review of the literature.** Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 3: 1-8. 2008.
- Lin HR & Yeh YJ. **Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies.** J Biomed Mater Res Part B. 71:52–65. 2004.
- Ma PX. **Biomimetic Materials for Tissue Engineering.** Advanced drug delivery reviews. 60(2):184-198. 2008.

Mak KK, Chen MH, Day TF, Chuang PT, Yang Y. **Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation.** Development. 133(18):3695-707. 2006.

Marcacci M, Filardo G, Kon E. **Treatment of cartilage lesions: What works and why?** Injury, Int. J. Care Injured. 44:S11–S15. 2013.

Marler JJ, Upton J, Langer R, Vacanti JP. **Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration.** Advanced Drug Delivery Reviews. 33:165 –182. 1998 Nair LS, Laurencin CT. **Biodegradable polymers as biomaterials.** Prog. Polym. Sci. 32:762–798. 2007.

Mitsugi S, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Kataoka Y, Takahashi T, Nishihara T. **Mechanisms involved in inhibition of chondrogenesis by activin-A.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 6;420(2):380-4. 2012.

Moore DS & McCabe G. **Introduction to the practice of statistics.** New York, Freeman. 2004.

Nair LS, Laurencin CT. **Biodegradable polymers as biomaterials.** Prog. Polym. Sci. 32:762–798. 2007.

O'Connor CJ, Case N, Guilak F. **Mechanical Regulation of Chondrogenesis** Stem Cell Research & Therapy. 4:61. 2013.

Oussedik S, Tsitskaris K, Parker D. **Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review.** Arthroscopy. 31(4):732-44 2015

Park DJ, Choi BH, Zhu SJ, Huh JY, Kim BY, Lee SH. **Injectable bone using chitosanalginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites.** J Cranio Maxill Surg 33:50–4. 2005.

Queen D, Orsted H, Sanada H, Sussman G. **A dressing history.** International Wound Journal. 1:59–77. 2004.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.

Richter, W. **Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration**. Journal of Internal Medicine. 266(4): p. 390–405. 2009.

Rose T, Craatz S, Hepp P, Raczynski C, Weiss J, Josten C, Lill H. **The autologous osteochondral transplantation of the knee: clinical results, radiographic findings and histological aspects**. Arch Orthop Trauma Sur. 125: 628–637. 2005

Roughley PJ. **The structure and function of cartilage proteoglycans**. European Cells & Materials. 12:92–101. 2006

Rowley JA, Sun ZX, Goldman D, Mooney DJ. **Biomaterials to spatially regulate cell fate**. Advanced Materials. 14:886–9. 2002.

Rudraiah N, Kasiviswanathan SR, Kaloni PN. **Generalized dispersion in a synovial fluid of human joints**. Biorheology. 28(3-4):207-19. 1991.

Sandy JD. **A Contentious Issue Finds Some Clarity: On the Independent and Complementary Roles of Aggrecanase Activity and MMP Activity in Human Joint Aggrecanolysis**. Osteoarthritis Cartilage. 14:95-100. 2006.

Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Haspl M, Bohnsack M, Fortems Y, Vandekerckhove B, Almqvist KF, Claes T, Handelberg F, Lagae K, van der Bauwhede J, Vandenuecker H, Yang KG, Jelic M, Verdonk R, Veulemans N, Bellemans J, Luyten FP. **Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture**. Am J Sports Med. 36(2):235-46. 2008.

Scanzello CR, Goldring SR. **The Role of Synovitis in Osteoarthritis pathogenesis**. Bone. 51(2):249-257. 2012.

Schwaab M. **Análise de dados experimentais 1**. Brasil. E-Papers. 2007

Sellam J & Berenbaum F. **The Role of Synovitis in Pathophysiology and Clinical Symptoms of Osteoarthritis**. Nature Reviews Rheumatology. 6(11):625-35. 2010.

Sgaglione NA, Miniaci A, Gilloly SD and Carter TR. **Update on Advanced Surgical Techniques in the Treatment of Traumatic Focal Articular Cartilage Lesions in**

the Knee. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery. 18:9–32. 2002.

Sharma AR, Jagga S, Lee S-S, Nam J-S. **Interplay between Cartilage and Subchondral Bone Contributing to Pathogenesis of Osteoarthritis.** International Journal of Molecular Sciences. 14(10):19805-19830. 2013.

Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ. **Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 417(1):305-10. 2012

Shih-Feng L, Barbara SM, Binil S. **Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: A study of cell viability, morphology and drug metabolism.** Toxicology in vitro 24:1314-1323. 2010

Shintani N, Siebenrock KA, Hunziker EB. **TGF- β 1 enhances the BMP-2-induced chondrogenesis of bovine synovial explants and arrests downstream differentiation at an early stage of hypertrophy.** Plos One. 8(1):e53086. 2013.

Shoichet, M. S., Li, R. H., White, M. L., Winn, S. R. **Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose.** Biotechnol. Bioeng. 50, 374–381. 1996

Silva EA, Mooney DJ. **Effects of VEGF temporal and spatial presentation on angiogenesis.** Biomaterials. 31:1235–41. 2010.

Smidsrod O & Skjak-Bræk G. **Alginate as immobilization matrix for cells.** Trends in Biotechnology. 8:71–8. 1990.

Spector M. **Decellularized tissues and organs: an historical perspective and prospects for the future.** Biomedical Materials. 11(2):020201. 2016.

Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. **Marrow stimulation techniques.** Injury, Int. J. Care Injured. 39S1, S26–S31. 2008.

Szczodry M, Coyle CH, Kramer SJ, Smolinski P, Chu CR. **Progressive chondrocyte death after impact injury indicates a need for chondroprotective therapy.** American Journal of Sports Medicine. 37(12):2318-22. 2009.

Takahashi K, Yamanaka S. **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** 25;126(4):663-76. 2006

Tandon N, Cannizzaro C, Chao PH, Maidhof R, Marsano A, Au HT, Radisic M, Vunjak-Novakovic G. **Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering.** Nature Protocols. 4(2):155-73. 2009.

Team R. **R: A language and environment for statistical computing.** In. Edited by Computing RfS. Vienna, Austria; 2014

Teeple E, Fleming BC, Mechrefe AP, Crisco JJ, Brady MF, Jay GD. **Frictional properties of Hartley guinea pig knees with and without proteolytic disruption of the articular surfaces.** Osteoarthritis Cartilage. 15(3):309-15. 2007

Teven CM, Fisher S, Ameer GA, He TC, Reid RR. **Biomimetic approaches to complex craniofacial defects.** Annals of Maxillofacial Surgery. 5(1):4-13. 2015.

Thornton AJ, Alsberg E, Albertelli M, Mooney DJ. **Shape-defining scaffolds for minimally invasive tissue engineering.** Transplantation. 77:1798–803. 2004.

Tian F, Wu M, Deng L, Zhu G, Ma J, Gao B, Wang L, Li YP, Chen W. **Core Binding Factor Beta (Cbf β) Controls the Balance of Chondrocyte Proliferation and Differentiation by Upregulating Indian hedgehog (Ihh) Expression and Inhibiting Parathyroid Hormone-Related Protein Receptor (PPR) Expression in Postnatal Cartilage and Bone Formation.** Journal of Bone Mineralization Research. 29(7):1564-74. 2014.

Tonnesen HH, Karlsen J. **Alginate in drug delivery systems.** Drug Dev Ind Pharm. 28:621–30. 2002.

Torun Kose G. and V. Hasirci. **Cartilage tissue engineering.** Advances in Experimental Medicine and Biology. 553: p. 317–29. 2004.

Vacanti CA. **History of Tissue Engineering and a Glimpse Into Its Future.** Tissue Engineering. 1137e42. 2006.

Vacanti JP & Langer R. **Tissue engineering. The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation.** Lancet. 354 Suppl 1:SI32-4. 1999.

van der Kraan PM, van den Berg WB. **Osteoarthritis in the context of ageing and evolution. Loss of chondrocyte differentiation block during ageing.** Ageing Research Reviews. 7(2):106-13. 2008.

Vilim V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K. **Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis.** Osteoarthritis Cartilage. 10:707–713. 2002.

Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, Gordeladze J, Brondello JM, Jorgensen C, Weiss P, Guicheux J, Noël D. **Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy.** Current Stem Cell Research and Therapy. 4(4): p. 318–29. 2009.

Vinci M, Gowan S, Boxall B, Patterson L, Zimmermann M, Court W, Lomas C, Mendiola M, Hardisson D, Eccles AS. **Advances in establishment and analysis of threedimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation.** BMC Biology 10:29. 2012

Wang L, Shelton RM, Cooper PR, Lawson M, Triffitt JT, Barralet JE. **Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering.** Biomaterials. 24:3475–81. 2003.

Wang M, Sampson ER, Jin H, Li J, Ke QH, Im HJ, Chen D. **MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis.** BioMed Central. 2013

Weigelt B, Lo TA, Park CC, Gray JW, Bissell MJ. **HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment.** Breast Cancer Res Treat 122:35–43. 2010

Weir MD, Xu HHK, Simon CG. **Strong calcium phosphate cement–chitosan–mesh construct containing cell-encapsulating hydrogel beads for bone tissue engineering.** Journal of Biomedical Materials Research: Part A. 77:487–96. 2006.

Weng YL, Wang M, Liu W, Hu XJ, Chai G, Yan QM, Zhu L, Cui L, Cao YL. **Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone.** Tissue Engineering. 12:1503–13. 2006.

Whitesides TE. **Orthopaedic Basic Science. Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System.** Journal of Bone and Joint Surgery. 83 (3):481-481. 2001.

Williams DF. **On the nature of biomaterials.** Biomaterials. 30:5897–909. 2009.

Wong M, Carter DR. **Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective.** Bone. 33:1-13. 2003.

Zhang Z, Gupte MJ, Ma PX. **Biomaterials and Stem Cells for Tissue Engineering.** Expert opinion on biological therapy. 13(4):527-540. 2013.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“CRIAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA TESTES PRÉ-CLÍNICOS EM CONDRÓCITOS ARTICULARES *IN VITRO*”**, que ajudará na compreensão da artrose do joelho, com o objetivo de melhorar o diagnóstico e tratamento. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em relação à sua cirurgia e ao seu tratamento no hospital.

Durante seu procedimento cirúrgico, será retirada uma parte de seu fêmur ou do seu joelho, e implantada uma prótese nesse local. A porção retirada (denominada fragmento ósseo do joelho ou tecido sinovial do joelho) não poderá mais ser aproveitada por você ou por nenhum outro paciente, mas poderá ser utilizada para fins de pesquisa. Assim, pedimos sua autorização para utilizar a porção retirada na sua cirurgia em nossa pesquisa.

Você receberá uma via deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Não existe risco relacionado com sua participação nesta pesquisa, não havendo qualquer possibilidade de prejuízo para você.

Os benefícios relacionados com a sua participação remetem ao âmbito acadêmico científico, contribuindo com a aquisição de conhecimento da humanidade, sendo estritamente acadêmicos e não pessoais.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação (o pesquisador substituirá seu nome por um número, a fim de proteger e assegurar sua privacidade). Você receberá uma via deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Você gostaria de ser comunicado, caso as amostras doadas por você, forem utilizadas em outro Projeto de Pesquisa?

Sim ☐

Não ☐

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____

Pesquisador responsável: Diego Pinheiro Aguiar

Contato com o pesquisador responsável:

Endereço: Avenida Brasil, 500 – Anexo 4, Térreo

Telefone: (21) 2134-5057

e-mail: daguiar@into.saude.gov.br

Assinatura do pesquisador responsável

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ – CEP:

Telefone: 21 2134-5000

e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

“Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.”

Sujeito da pesquisa: nome do sujeito

Assinatura do sujeito da pesquisa