



UNICAMP

**DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DE TECIDO
ADIPOSO UTILIZANDO COLÁGENO DO TIPO II
COMO SUPORTE PARA REPARO CARTILAGINOSO**

PEDRO BORDEAUX REGO

CAMPINAS

2011

PEDRO BORDEAUX REGO

**DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DE TECIDO
ADIPOSO UTILIZANDO COLÁGENO DO TIPO II
COMO SUPORTE PARA REPARO CARTILAGINOSO**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para Obtenção do título de Mestre em
Fisiopatologia Médica, Área de Concentração Biologia
Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.*

Orientadora: Prof. Dra Sara T Olalla Saad

CAMPINAS

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Rego, Pedro Bordeaux, 1983 –

R265d

Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo utilizando colágeno do tipo II como suporte para reparo cartilaginoso. / Pedro Bordeaux Rego. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tecido adiposo. 2. Células-Tronco Mesenquimais. 3. Cartilagem articular. 4. Terapia tecidual. 5. Biomaterial. I. Saad, Sara Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cell obtained from adipose tissue using collagen type II as support for cartilage repair*

Palavra-chave em inglês:

- *Adipose tissue*
- *Mesenchymal stem cell*
- *Cartilage, Articular*
- *Tissue therapy*
- *Biomaterial*

Área de concentração: *Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento*

Titulação: *Mestre em Fisiopatologia Médica*

Banca examinadora:

- *Sara Teresinha Ollala Saad [Orientador]*
- *William Dias Belangero*
- *Mario Ferretti Filho*

Data da defesa: *26-07-2011*

Programa de Pós-Graduação: *Faculdade de Ciências Médicas*

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Pedro Bordeaux Rego

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:	
Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Olalla Saad -	
Prof(a). Dr(a). William Dias Belangero -	
Prof(a). Dr(a). Mario Ferretti Filho -	

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/07/2011

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente meu pai Antônio Carlos (Bordeaux), minha mãe Beatriz e meus irmãos Bruno e Fábio pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, compreensão e amor. Agradeço por compartilharem minhas conquistas, e os momentos de incertezas e de alegria.

À minha orientadora Prof. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad, por sua orientação na realização deste trabalho. Agradeço sua compreensão, confiança, as oportunidades oferecidas e o privilégio de trabalhar ao seu lado; um exemplo de pessoa, médica e orientadora. Este trabalho é fruto de sua orientação e significa mais uma conquista que compartilhamos desde minha iniciação científica em 2007.

À minha namorada Mariana Lazarini, pelo apoio e auxílio nas inúmeras dificuldades que tivemos durante o projeto, pelos crescentes laços de amizade que formamos e principalmente pelo seu carinho e afeto recebidos a cada dia, dando-me alegria e felicidade em inúmeros momentos.

À Dra. Ângela Luzo, pela sua ajuda, inestimável ao longo de meu percurso acadêmico. Agradeço também pela co-orientação no presente trabalho.

À minha amiga Adriana Duarte que sempre participou de minha formação acadêmica com sua constante presença e incentivo em especial durante a realização deste trabalho. Agradeço a seus ensinamentos e, acima de tudo, agradeço à sua amizade.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, Thiago Borsoi, Marilisa, Shankar e Audrey, que me ajudaram nos experimentos, análises e me deram força para seguir em frente. Muito obrigado pela amizade e a oportunidade de compartilhar as experiências acadêmicas e pessoais.

Aos alunos e a equipe de trabalho da Prof. Dra. Sara que me auxiliaram em diferentes momentos. Agradeço à Tereza Sueko que sempre me incentivou e me ajudou desde minha iniciação científica. A todos os alunos; Victor, Mariana Baratti, Daniela Crosara, Patrícia Favaro, Fabíola Traina, Patrícia Rodrigues, Carolina Bigarella, Matheus Lopes, João Kleber, Gisele, Rita, Bruna Palodetto, Paulo, Anamika, Shankar, e todos os funcionários, Simone, Lena, Ana Leda, Fernanda, Irene, Luís Gustavo e Karla, agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências e o carinho.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal e sua equipe, pelo auxílio nos experimentos e disponibilidade de seu laboratório. Ao Dr. João Batista de Miranda e ao Alessandro Zorzi por todo auxílio nos experimentos e auxílios. Ao Dr. José Vasallo por colocar seu laboratório a disposição e ao Paulo Latuf Filho pela grande disponibilidade e ajuda nos experimentos em histologia.

Aos docentes e funcionários do Hemocentro da UNICAMP, pelo apoio e estrutura na realização deste trabalho.

Aos pacientes, um agradecimento especial, pois sem eles este trabalho não teria sido idealizado e nem realizado.

À Arlete e ao Leonardo pelo apoio didático durante a realização deste trabalho.

Às secretárias Patrícia e Raquel pela disponibilidade em me ajudar e pela amizade.

À secretária da pós-graduação Salete pela ajuda imprescindível.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e INCT do sangue.

Agradeço a Deus pela oportunidade de ter saúde, de ter uma família feliz, de ter conhecido todas as pessoas aqui citadas, de ter seguido este caminho e, mais uma vez, conquistar um objetivo.

RESUMO

A lesão cartilaginosa é um problema significativo e crescente na área da saúde pública. A terapia com células-tronco adultas têm sido uma alternativa promissora e têm despertado muito interesse dos pesquisadores. As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo são caracterizadas por serem uma população homogênea com morfologia fibroblástica, aderentes e com grande capacidade de proliferação, apresentarem positividade para marcadores celulares CD90+, CD105+, CD29+ e CD73+ e por possuírem a capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas tais como linhagem osteogênica condrogênica e adipogênica.

Além da escolha da fonte celular é necessária a utilização de um biomaterial que mimetize um microambiente e que possa dar suporte para as células-tronco possibilitando a restauração do tecido e sua função. Sabe-se que a matriz extracelular da cartilagem hialina é composta pelas proteínas de colágeno, principalmente colágeno do tipo II que tem importância durante a diferenciação e manutenção da cartilagem. O biomaterial de hidrogel de colágeno do tipo II é capaz de dar suporte às células-tronco mesenquimais e permitir a diferenciação dessas células. Descrevemos um método para diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo em um hidrogel de colágeno do tipo II, com o aumento da expressão dos genes relacionados com a formação da matriz extracelular da cartilagem (colágeno do tipo II e agrecana), e relacionado com o controle da diferenciação condrogênica (Sox-9) e o aumento do nível das proteínas glicosaminoglicanas na matriz extracelular. Experimentos em modelo animal para lesão cartilaginosa demonstram que as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e os hidrogéis de colágeno do tipo II são capazes de preencher lesões cartilaginosas e formar um tecido preenchido com células mesenquimais transplantadas.

Dessa forma, esse estudo demonstra que hidrogéis de colágeno do tipo II apresentam características apropriadas para o uso em tratamentos para reparo cartilaginoso e que as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo podem ser uma fonte alternativa para recuperação de lesões cartilaginosas

ABSTRACT

The cartilage injury is a significant and growing problem of public health. Therapies with adult stem cells have been a promising alternative and have attracted much interest from researchers. The mesenchymal stem cells derived from adipose tissue are characterized as being a homogeneous population with fibroblastic morphology, adherent and with great capacity for proliferation, positive for cell markers CD90 +, CD105 +, CD29 + and CD73 +. They also have the capacity to differentiate into mesoderm lineage such as osteogenic, adipogenic and chondrogenic.

Besides the choice of cell source, it is necessary to use a biomaterial that mimics a microenvironment that can support and allow the stem cells to restore tissue and function. It is known that the extracellular matrix of hyaline cartilage is composed of the protein collagen, mainly type II collagen which is important for the differentiation and maintenance of cartilage tissue. The biomaterial collagen type II hydrogel is able to support the mesenchymal stem cells and allow the differentiation of these cells. We describe a method for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from adipose tissue in a collagen type II hydrogel, with increased expression of genes related to the formation of the extracellular matrix of cartilage (collagen type II and aggrecan), and Sox-9 (a gene related with the control of chondrogenic differentiation) and increased the level of glycosaminoglycans in the extracellular matrix proteins. Experiments in animal model for cartilage lesions show that mesenchymal stem cells from adipose tissue and collagen type II hydrogel are able to develop a cartilaginous-like tissue filled with transplanted mesenchymal stem cells.

Thus, this study demonstrates that collagen type II hydrogel have characteristics suitable for use in treatments to repair cartilage and mesenchymal stem cells from adipose tissue may be an alternative source for recovery of cartilage lesions

LISTA DE ABREVIACÕES

BLAT- é um software desenvolvido por Jim Kent da Universidade da Califórnia para identificar semelhanças entre sequências de DNA e sequências de proteínas. Ele foi desenvolvido para ajudar na anotação da sequência do genoma humano. BLATlicença torna-o livre para uso não- comercial (<http://genome.csdb.cn/cgi-bin/hgBlat>).

BrdU- Bromodeoxiuridina (5-bromo-2-deoxiuridina, BrdU) é um nucleosídeo sintético análogo da timidina. BrdU é comumente usado para detectar células que sofreram proliferação celular. BrdU é incorporado ao DNA sintetizado durante a fase S, em vez de trifosfato desoxitimidina (dTTP). Ele pode ser detectado com um anticorpo anti-BrdU acoplado a um fluoróforo ou uma enzima

BSA- Albumina de soro bovino

cDNA-complementary DNA

DNA- Desoxiribonucleic Acid

DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole é uma substancia fluorescente que se liga fortemente ao DNA

dATP- Adenosine triphosphate

dCTP- Deoxycytidine triphosphate

dGTP- Deoxyguanosine triphosphate

DMB- azul de 1,9,dimetildimetileno (1,9,dimethyl-metilene blue)

DMEM-LG- Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low glucose

DNase- Deoxyribonuclease

dTTP Thymidine triphosphate

EDTA- Ethylenediaminetetraacetic acid

FBS- Fetal bovine serum

GAGs- Glicosaminoglicanas

HCL-Ácido clorídrico

HE-Hematoxilina e Eosina

HEPES- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HLA-DR- a MHC class II cell surface receptor encoded by the human leukocyte antigen complex

HPRT- Hypoxanthine phosphoribosyltransferase

IgG- Imunoglobulina G

LaserNLO- lase non-linear optical

MSC- Mesenchymal stem cell

NaCl- Cloreto de sódio

NDD- non-descanned detector

PBS- Phosphate buffered saline(, solução tampão de fosfato)

PCR- Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PCRq- Polymerase Chain Reaction quantitativeR

RNA- Ribonucleic acid

RNase- Ribonuclease

SHG- Second harmonic generation

SSC- Side light scatter (

FSC- Forward Scatter

TGF-Beta- Transforming growth factor beta

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Obtenção de células-tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meios e suplementos para indução da diferenciação: adipogênese, osteogênese e condrogênese 34

Tabela 2: Sequência de iniciadores desenhados para avaliação da diferenciação das células-tronco mesenquimais após a diferenciação condrogênica em hidrogeis de colágeno..... 41

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Ilustração de uma rede polimérica de um hidrogel preenchido com células tronco mesenquimais aderidas ao material 27
- FIGURA 2: Produtos resultantes da PCR para amplificação de $\beta 2$ –microglobulina visualizados em gel de agarose. 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo, 3 – 8: produtos da amplificação das amostras de cDNA amplificados. As setas indicam a presença da banda de 300 pb correspondente ao produto amplificado de $\beta 2$ –microglobulina. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida..... 39
- FIGURA 3: Modelo animal de lesão cartilaginosa. (A) Figura representativa do modelo de lesão cartilaginosa de 3 mm de diâmetro realizada no joelho de um coelho.(B) Lesão cartilaginosa no joelho de coelhos após 12 semanas da cirurgia feita para implementar o modelo animal. O osso sub-condral (seta preta) continua exposto, sem nenhum tecido (cartilaginoso ou fibrocartilaginoso) recobrando a área lesionada, evidenciando que o coelho não foi capaz de se regenerar sem nenhum tratamento 43
- FIGURA 4: Análises de proliferação celular por incorporação 5-Bromo-2-Deoxyridine (BrdU) e microscopia de imunofluorescência. Expansão das células-tronco mesenquimais. Após a incubação das células-tronco mesenquimais com BrdU nos dia 1, 2, 5 e 7, as células são marcadas em verde com anticorpo anti-BrdU e os núcleos marcados com DAPI (azul). 47
- FIGURA 5: Microscopia óptica e imunofluorescencia de células-tronco mesnquimais após a quarta passagem em lamínulas de vidro. A- foto de microscopia óptica com aumento de 10x. B-D Fotos de Imunocitoquímica dos marcadores CD105 (vermelho), CD90 (roxo) e CD73 (verde) e nuclear (DAPI-azul), aumento de 40X. 48
- FIGURA 6: Citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais após a quarta passagem. A- Dot-Plot das células e a região na qual as células ADSC se encontram, mostrando característica homogênea dessa população. B- Painel de histogramas dos marcadores. Em vermelho está representado a expressão do marcador específico e em branco o controle (IgG com fluorocromo). Observe a expressão dos marcadores CD105, CD90, CD29 e CD73 e ausência de expressão de HLA-DR, STRO-1, CD45, CD14 e

CD34. C-tabela com as médias das porcentagens dos marcadores celulares positivos e negativos dos paciente (n=6) 49

FIGURA 7: Microscopia óptica de células-tronco mesenquimais submetidas à diferenciação. A- Células-tronco mesenquimais na quarta passagem apresentando uma morfologia fibroblástica B-C Células-tronco mesenquimais diferenciadas em linhagem adipogênica coradas com Oil Red, mostrando o acúmulo de vesículas de lipídios nas células. D células-tronco mesenquimais diferenciadas na linhagem osteogênica coradas com Alzarin Red S mostrando o acúmulo de cálcio formado, E células-tronco mesenquimais em microscopia óptica durante a cultura de diferenciação, mostrando a formação de colônias e a o alinhamento das células com sua estrutura alongada. F-G. células-tronco mesenquimais diferenciadas em linhagem condrogênica coradas com Alcian blue, observa-se a mudança da morfologia das células (arredondadas) e a produção de matriz com proteoglicanas corado em azul. 51

FIGURA 8: . Microscopia óptica dos moldes de colágeno. A – Foto do molde de colágeno corado com HE, observa-se a irregularidade dos poros e suas interconexões. B – Foto do molde de colágeno cultivado com células-tronco mesenquimais em processo diferenciação por 3 semanas. A seta preta indica região que apresentou retração durante a diferenciação C- Foto de microscopia óptica de um corte histológico do molde de colágeno com células corado com HE. Seta vermelha indica região do molde onde não houve migração celular e seta preta indica região onde as células permaneceram. D- Foto do molde de colágeno com as células-tronco mesenquimais em cultura, a seta indica região onde ocorreu adesão das células ao material e a placa de cultura. Muitas células migraram do material para a placa de cultura 53

FIGURA 9: Microscopia óptica e de fluorescência das células-tronco mesenquimais após 5 dias em hidrogéis de colágeno do tipo II.(A-B) Imagem de microscopia óptica com aumento de 40X e de 4 X, respectivamente, das células-tronco mesenquimais junto com o Hidrogel de Colágeno do tipo II. Observa-se na Figura A uma distribuição espacial homogênea das células no material, com algumas células apresentando uma morfologia arredondada (seta preta) enquanto outras apresentam uma morfologia fibroblástica (seta vermelha). (C-D) Imagem de microscopia de fluorescência com aumento de 40X e de 4 X, respectivamente, das células-tronco mesenquimais viáveis (verdes) cultivadas em

hidrogel de colágeno do tipo II. Nota-se que muitas células estão desfocadas devido aos diferentes níveis das células dentro do material. (E-F) Imagem de microscopia de fluorescência com aumento de 40X e de 4 X, respectivamente, das células-tronco mesenquimais mortas (vermelhas) junto com o Colágeno do tipo II. Poucas células morreram após 5 dias incubadas com o hidrogel de colágeno do tipo II.....55

FIGURA 10: Fotos e micrografias do hidrogel de colágeno do tipo I (H. Col1) e do tipo II(H.Col.2) submetidos a diferenciação condrogênica.(A)- Fotos dos hidrogéis de colágeno após 3 semanas de diferenciação condrogênica, observa-se a coloração branca e a forma de uma esfera. (B-E). Fotos de microscopia óptica (B-C10x e D-E 40x) tiradas de cortes histológicos, corados com azul de toluidina,dos hidrogéis de colágeno , H. Col-1(B e D) e H. Col.2(C e E) respectivamente, após a diferenciação. , os retângulos representam o campo observado pelas fotos De E . Observa-se a disposição das células e a coloração azulada mais intensa na região periférica do hidrogéis, indicando o acúmulo de proteoglicanas nesta região. F-G, Fotos de microscopia óptica (40x) tiradas de cortes histológicos, corados com HE ,dos hidrogéis de colágeno , H. Col-1 e H. Col.2 respectivamente. 57

FIGURA 11: Intensidade de fluorescência e ciclos de amplificação e curvas de dissociação baseadas na temperatura de anelamento dos genes Col-1, Col-2, Agrecana e Sox-9. As curvas de amplificação são ilustradas na primeira coluna. O eixo y indica o ΔRn (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos. As temperaturas resultantes da curva de dissociação estão demonstradas na segunda coluna. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores..... 59

FIGURA 12: Expressão de *Col-1* (A) e *Agrec.*(B) *Sox-9* (C) e *Col-2* (D). RT-PCR em tempo real foi realizado a partir de cDNA de células-tronco mesenquimais e de células em meio de diferenciação condrogênica nos hidrogéis de colágeno. O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão *Col-1* (A) e *Agrec.*(B) *Sox-9* (C) e *Col-2* (D) na qual as células-tronco mesenquimais foram utilizadas como amostra calibradora (valor =1). Note o aumento de expressão de todos os genes testados nas amostras de células-tronco mesenquimais submetidas à diferenciação condrogênica em hidrogéis de colágeno em comparação com células tronco mesenquimais sem diferenciação. 61

FIGURA 13: Aumento de expressão das glicosaminoglicanas durante a diferenciação condrogênica.....	62
FIGURA 14: Imagens das lesões cartilaginosas dos joelhos tratados (A) Imagem de um joelho tratado somente com hidrogel de colágeno e (B) Imagem de um joelho tratado com hidrogel de colágeno e células-tronco mesenquimais. Nota-se um tecido esbranquiçado preenchendo a lesão.	63
FIGURA 14: Gráfico da porcentagem de preenchimento das lesões cartilaginosas do joelho dos coelhos.....	64
FIGURA 15. Cortes histológicos corados em HE da cartilagem hialina do joelho de coelho. (A) Imagem com aumento de 10X da cartilagem, nota-se o osso sub-condral logo abaixo da cartilagem e vários grupos isogênos. (B) Imagem com aumento de 20X da cartilagem. (C) Imagem com aumento de 40 X. Nota-se a organização celular e da matriz extracelular.....	64
FIGURA 16. Cortes histológicos corados em HE da cartilagem hialina do joelho de coelho tratado somente com hidrogel de colágeno do tipo II. (A) Imagem com aumento de 4X da lesão cartilaginosa da lesão tratado com hidrogel. Nota-se que o local da lesão é formado por um tecido desestruturado e sem células. (B) Imagem com aumento de 10X da lesão. (C) Imagem com aumento de 20 X de uma região da lesão com hidrogel, com ausência de células na região. (D) Imagem com aumento de 40 X de uma região da lesão cartilaginosa com hidrogel de colágeno. Note a dissociação tecidual.	65
FIGURA 17. Cortes histológicos corados em HE da cartilagem hialina do joelho de coelho tratados com hidrogel de colágeno do tipo II e células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo. (A) Imagem com aumento de 4X da lesão cartilaginosa da lesão tratado com hidrogel e células-tronco mesenquimais. Nota-se que o local da lesão é formado por um tecido semelhante a matriz extracelular e por conglomerados de células. (B) Imagem com aumento de 10X e (C) de 20X de uma região do implante, com conglomerados celulares. (D) Imagem com aumento de 40X de um conglomerado celular.....	66
FIGURA 18. Microscopia óptica e geração de segundo harmônico de crtes histológicos de cartilagem articular de joelho de coelhos. (A) microscopia óptica , seta vermelha indica a região cartilaginosa e a seta preta indica a região do osso sub condral. (B)	

geração de segundo harmônico, em vermelho são fibras de colágeno , encontrados alinhadas na cartilagem articular. 67

FIGURA 19. Microscopia de confocal e de segundo harmônico de cortes histológicos de um tecido cartilaginoso saudável e da lesão do joelho dos coelhos. (A) microscopia confocal de uma cartilagem saudável, em verde é a auto fluorescência do tecido, observa se nos espaços vazios os locais onde os condrócitos se localizavam. (B) geração do segundo harmônico de uma cartilagem saudável, em vermelho as fibras de colágeno alinhadas. (C) microscopia confocal das lesões cartilaginosas, na qual foram implantado hidrogel de colágeno do tipo II, em verde nota-se a auto fluorescência do tecido evidenciando a desestruturação do tecido formado. (D) imagem gerada por segundo harmônico da mesma região do implante do hidrogel, em vermelho são as fibras de colágeno que estão totalmente desalinhadas. Escala (barra branca) 50 μm 68

FIGURA 20. Microscopia de confocal e de segundo harmônico de cortes histológicos dos implantes das células-tronco mesenquimais com hidrogéis de colágeno do tipo II no joelho dos coelhos. (A, C, E) microscopia confocal de um implante, a auto fluorescência do tecido é observado em verde, os espaços vazios são locais onde as células mesenquimais se localizavam. (B, D, F) geração do segundo harmônico do implante das células-tronco mesenquimais, em vermelho as fibras de colágeno alinhadas. Escala (barra branca) 50 μm 69

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	viii
RESUMO.....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES	xiii
LISTA DE ESQUEMAS	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
INTRODUÇÃO	22
Células-tronco mesenquimais	24
Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo.....	24
Células-tronco mesenquimais para a bioengenharia da cartilagem.....	25
Biomateriais:	26
Hidrogel:	27
Hidrogel de colágeno.....	27
Modelo animal:	28
OBJETIVOS	30
Objetivo Geral.....	30
Objetivos Específicos	31
MATERIAIS E MÉTODOS	32
Obtenção de tecido adiposo	32
Separação celular do tecido adiposo.....	32
Expansão e cultura das Células-tronco mesenquimais	32
Diferenciação das células-tronco mesenquimais :.....	34
Imunocitoquímica e Microscopia confocal.....	35
Biomaterial.....	36
Extração de Colágeno do tipo I.....	36
Extração de Colágeno do tipo II.....	36
Moldes porosos de Colágeno	36
Preparo dos Hidrogéis de Colágeno	37
Diferenciação condrogênica <i>in vitro</i>	37
Ensaio de Viabilidade celular.....	37
Extração do RNA total.....	38
Tratamento do RNA total com DNase I	38
Transcrição em cDNA	38

Desenho de oligos iniciadores.....	40
Concentração dos iniciadores e curvas de eficiência.....	40
PCR quantitativo (PCRq) em tempo real.....	42
Extração de proteoglicanas (GAGs).....	42
Animais	42
Procedimento cirúrgico.....	43
Implante do hidrogel de colágeno	44
Histoquímica	45
Imagens em Confocal e geração de Segundo Harmônico(SHG).	45
Análise Estatística	45
RESULTADOS.....	46
Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais	46
Diferenciação das células-tronco mesenquimais.....	50
Diferenciação Adipogênica.....	50
Diferenciação Osteogênica	51
Diferenciação Condrogênica.....	51
Biomateriais de colágeno para diferenciação condrogênica	52
Moldes porosos	52
Hidrogéis de colágeno	55
Viabilidade celular	55
Diferenciação <i>in vitro</i> das células-tronco mesenquimais nos hidrogéis	57
Avaliações macroscópicas e microscópicas dos hidrogéis	56
Análise da expressão gênica por PCR quantitativo	58
Expressão de GAGs.....	62
Experimentos <i>in vivo</i> de células-tronco mesenquimais com hidrogéis d.....	63
Modelo experimental.....	63
Análises macroscópicas das lesões.....	63
DISCUSSÃO	74
ANEXO I	82
REFERÊNCIAS	84

Introdução

INTRODUÇÃO

A lesão em cartilagem é um problema significativo e crescente na área da saúde pública. Doenças congênitas e metabólicas (Doença de Paget, Hemofilia, Acromegalia) podem causar lesões na articulação, assim como lesões traumáticas (fratura intrarticular ou danos no ligamento) levam, direta ou indiretamente, a defeitos na cartilagem articular. Estas lesões podem evoluir causando degeneração da cartilagem¹. A lesão cartilaginosa é uma doença complexa, difícil de diagnosticar, que induz sintomas clínicos como dores articulares, limitações dos movimentos e vários graus de inflamações locais. Esses sinais são associados com defeitos na integridade da cartilagem articular, ocasionando perda de cartilagem, em seguida com hipertrofia do osso e encurtamento da cápsula ocorre a osteoartrite(OA)². Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que a osteoartrite é mais comum em mulheres, sua prevalência aumenta dramaticamente com a idade, é umas das maiores causas de problemas em mobilidade.^{2,3}.

A cartilagem articular tem limitada capacidade de auto-regeneração e reparo, que junto à escassez de terapias disponíveis, leva a conseqüências graves na articulação⁴. Algumas modalidades de tratamento têm sido utilizadas, uma delas é a microfratura subcondral⁵, que consiste no reparo da cartilagem defeituosa com células retiradas da medula óssea pelo procedimento de pequenas perfurações no osso subcondral, na expectativa de que células-tronco mesenquimais presentes na medula óssea se diferenciem em condrócitos produzindo uma nova cartilagem. Mas na prática clínica, existem dúvidas quanto a eficácia destes procedimentos^{6,7}. Outras técnicas utilizadas, tais como: transplante de pericôndrio e mosaico plasticidade, não estão isentas de problemas clínicos dentre eles a dificuldade na fixação do transplante de pericôndrio⁸.

Na década de 90, pelos estudos de Brittberg e colaboradores com transplante autólogo de condrócitos, surge uma nova técnica mais elaborada. A princípio os pesquisadores retiravam uma biopsia de uma região saudável da cartilagem do próprio paciente e a partir dessa biopsia, os condrócitos eram isolados e expandidos. Numa segunda cirurgia o local da lesão era preparado, retirando-se o tecido lesionado e dessa maneira eram implantados os condrócitos do próprio paciente. As células implantadas eram contidas com auxílio de fragmentos do periósteo que era suturado no local⁹. A partir desse estudo, muitos outros trabalhos surgiram sobre o

transplante autólogo de condrócitos. Essa é uma técnica que resulta em bons resultados nas lesões isoladas, a técnica é recomendada para pacientes que não obtiveram sucesso em outros tratamentos, tais como mosaicoplastia ou microfratura. No entanto essa técnica apresenta certas limitações tais como custo elevado, exige dois procedimentos cirúrgicos e a hipertrofia do perióstio¹⁰.

A segunda geração do transplante autólogo de condrócitos surge com algumas mudanças no tratamento, utilizando-se uma matriz que auxilia o cultivo dos condrócitos e seu implante. Geralmente essas matrizes são obtidas de proteínas e derivados da matriz cartilaginosa com o intuito de dar suporte a essas células e manter o seu fenótipo. São inúmeros os biomateriais utilizados e desenvolvidos para o reparo cartilaginoso. Exemplos desses biomateriais comercializados são: (1)MACI (Genzyme Biosurgery, Cambridge, MA), que possui colágeno suíno tipo I/III (2)Chondro-Gide (Geistlich Biomaterials, Switzerland) semelhante ao MACI; (3)ChondroMimetic™ (Tigenix Inc, Leuven, Belgium) formado por colágeno do tipo I, glicosaminoglicanas e fosfato de cálcio, que estimula a expansão dos condrócitos. (4)Hyalograft C (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy) é uma matriz tridimensional de ácido hialurônico que permite o crescimento de condrócitos e a manutenção do fenótipo desses quando cultivados na matriz¹⁰. Mas muitas desvantagens ainda são encontradas durante o transplante autólogo de condrócitos, sendo uma delas a forma de obtenção e expansão dessas células. A retirada de cartilagem de um local para a obtenção dos condrócitos pode levar a mais uma lesão no paciente assim como aumentar os seus riscos¹¹⁻¹³. O método para isolar os condrócitos faz com que as células sofram dano após o processo enzimático e mudem suas características. Outro ponto relevante são os métodos para expansão celular, que revertem o estado quiescente dos condrócitos, levando à perda do fenótipo celular, com uma desdiferenciação celular, ocasionando a formação de uma fibrocartilagem^{14,15}.

Dessa forma, a necessidade de superar as desvantagens apresentada pelas técnicas leva a busca de novas alternativas para o tratamento dos defeitos cartilagosos. Assim, nos últimos anos, diferentes técnicas para reparo da cartilagem articular têm sido desenvolvidas, e a terapia com célula-tronco tem se mostra uma alternativa promissora e desperta o interesse dos pesquisadores.

Células-tronco mesenquimais

Células-tronco do estroma de medula óssea, não hematopoiéticas, são conhecidas atualmente como células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cell - MSC) e foram primeiramente descritas por Friedenstein e colaboradores na década de 80¹⁶. As células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de se diferenciar em linhagens de origem mesodérmica, tais como: músculo esquelético, ossos, tendões, cartilagem e tecido adiposo, quando submetidas a meios de cultura suplementados com fatores de crescimento e hormônios específicos¹⁷⁻¹⁹. Atualmente tem sido descrita a capacidade das células-tronco mesenquimais de se diferenciar em células de tecidos de outras origens, tais como células neuronais e hepáticas^{20,21}. Além disso, as células-tronco mesenquimais possuem outras características tais como: efeito imunomodulador, efeito parácrino, fácil obtenção, grande capacidade de proliferação, grande aderência e comportamento migratório²²⁻²⁴.

A primeira e principal fonte de obtenção das células-tronco mesenquimais (MSC) foi a medula óssea. No entanto, são células raras, que geralmente correspondem a 1 em cada 10.000 células nucleadas da medula. Também é possível obter as MSC de várias outras fontes tais como: sangue de cordão umbilical, fígado fetal, líquido amniótico, polpa dentária e tecido adiposo²⁵⁻³⁰.

Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

O tecido adiposo possui uma organização complexa, formado basicamente por adipócitos maduros e imaturos, fibroblastos, células da musculatura lisa vascular, células endoteliais, macrófagos, linfócitos e células-tronco mesenquimais^{31,32}. As células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo também possuem o potencial de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e condrócitos³³⁻³⁶, em células endoteliais e vasculares³⁷⁻³⁹, hepatócitos⁴⁰, células pancreáticas⁴¹, progenitores hematopoiéticos⁴² entre outras.

As células-tronco mesenquimais possuem três principais características: é uma população celular morfológicamente homogênea, apresentam grande capacidade de diferenciação em diversas linhagens (principalmente linhagem adipócita, cartilaginosa e óssea) e apresentam as mesmas características moleculares, mesmo sendo de origem tecidual diferente

(devem ser positivas para marcadores celulares CD90, CD105 e CD73 e negativas para marcadores de linhagem hematopoiética, como CD34, CD45, CD14^{43,44}).

Atualmente, a lipoaspiração é um processo rotineiro na medicina estética e propicia a obtenção de grande quantidade de tecido adiposo que será descartado. O isolamento de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo é realizado através de processo enzimático simples, mostrando que esse tecido é uma fonte atrativa para pesquisadores e clínicos em terapia celular^{45,46}. Análises comparativas de células-tronco mesenquimais isoladas de sangue de cordão umbilical, medula óssea e tecido adiposo, que são fontes mais utilizadas, demonstram que as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo não são diferentes em relação à morfologia, fenótipo imune, frequência na formação de colônias e capacidade de diferenciação⁴⁷. Em estudo comparativo, Wagner e colaboradores analisaram, através de microarranjos, a expressão global dos genes de células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical⁴⁸. Os resultados demonstraram que, quando as células foram cultivadas em meios de cultura idênticos, a expressão de genes envolvidos na produção de proteínas da matriz extracelular, morfogênese e desenvolvimento foi semelhante, sugerindo que as células-tronco mesenquimais de diferentes fontes são semelhantes do ponto de vista de expressão gênica⁴⁸. Dessa forma, a utilização do tecido adiposo como fonte de células-tronco mesenquimais torna-se vantajosa para a pesquisa isso porque contém grandes quantidades de células mesenquimais e ser um material de descarte.

Células-tronco mesenquimais para a bioengenharia da cartilagem

A cartilagem tem capacidade de regeneração muito baixa por ser um tecido avascular, com baixa taxa mitótica de condrócitos, baixa renovação da matriz extracelular e limitado número de células progenitoras⁴⁹⁻⁵¹. O recente desenvolvimento da medicina regenerativa aponta para as células-tronco mesenquimais como candidatas potenciais para engenharia tissular. As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo preenchem os requisitos básicos para a prática da bioengenharia tecidual, com alta capacidade de proliferação e fácil manipulação *in vitro*. Assim as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo são atrativas para a regeneração tecidual da cartilagem⁵².

Após o isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais embrionárias, se derivadas de periósteos, a condrogênese é induzida em culturas *in vitro* de alta densidade, na presença de TGF-beta. Membros da família de TGF-Beta têm mostrado papel importante no desenvolvimento de cartilagem e ossos. As isoformas de TGF-Beta possuem efeitos nos progenitores de condrócitos e em outras células⁵³ e podem induzir diferenciação condrogênica de células humanas e de camundongos retiradas da medula óssea, resultando no surgimento de um fenótipo característico⁵⁴⁻⁵⁶. Este fenótipo é caracterizado pelo aumento da expressão de moléculas do tipo; colágeno tipo II, IX e X, agrecana, versicana e decorin. Métodos de histologia que detectam colágeno tipo II e proteoglicanas confirmam a diferenciação condrogênica⁵⁷.

Biomateriais

Para a terapia celular de cartilagem, além da escolha da fonte celular para o reparo, é importante estabelecer um ambiente em que a célula prolifere, se diferencie e mantenha a capacidade de adesão de modo possibilitar o implante no paciente. A cartilagem é um tecido avascular com matriz protéica extracelular reforçada com fibras de colágeno tridimensional. Devido a essa singular organização, a integração do tecido ou das células implantadas têm sido uma dificuldade no tratamento.

Para contornar esse problema, muitos procedimentos para o implante de tecidos têm sido utilizados, como tratamentos enzimáticos na superfície da matriz cartilaginosa⁵⁸, suturas para fixação^{59,60} ou mesmo o uso de pinos absorvíveis⁶¹. Mas atualmente, na área de bioengenharia tecidual tem sido desenvolvidos materiais para criar suportes (scaffold) com propriedades adesivas para o tecido cartilaginoso que proporcione crescimento tridimensional⁶² e otimização na integração do tecido transplantado com o tecido do paciente. Com esse intuito, muitos estudos vêm sendo feitos para o desenvolvimento de biomateriais que dão suporte e que propiciem um ambiente para regeneração tissular⁶³. Geralmente esses biomateriais são feitos de polímeros sintéticos^{64,65} ou de materiais biológicos (biomateriais)⁶⁶. Existe uma variedade de biomateriais sendo produzidos e explorados para propiciar esse tipo de suporte para o reparo cartilaginoso, como: colágeno⁶⁷⁻⁶⁹, compostos de colágeno e glicosaminoglicanas^{70,71}

,alginato^{72,73}, agarose^{74,75}, chitosan^{76,77} e ácido hialurônico⁷⁷. Muitos outros suportes têm sido utilizados para o uso clínico⁷⁸.

Hidrogel

Hidrogel é um tipo de biomaterial baseado em redes poliméricas entrelaçadas que possuem cerca de 5 a 20% da massa feita por um ou mais polímeros, solubilizado por um grande volume de água⁷⁹. Geralmente, os hidrogéis são materiais viscosos, que não apresentam estrutura rígida e tendem a simular a natureza de tecidos moles que possuem muita matriz extracelular. Por serem maleáveis, esses materiais são versáteis na utilização para a bioengenharia, permitindo o preenchimento de tecidos e lesões de forma fácil e rápida. Essa rede polimérica tenta mimetizar ao máximo as interações das células à matriz extracelular e dessa forma, vem sendo muito utilizada para reparos cartilagosos⁸⁰ (Figura 1).

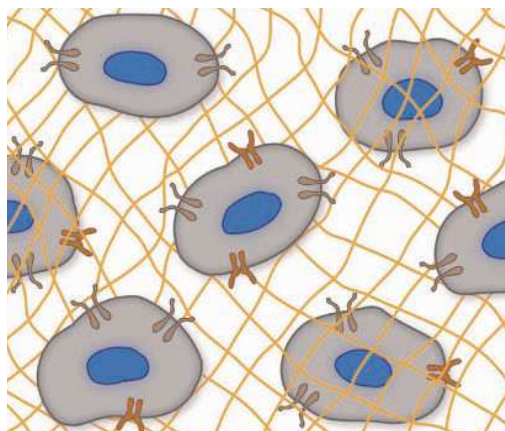


FIGURA1. Ilustração de uma rede polimérica de um hidrogel preenchido com células tronco mesenquimais aderidas ao material

Hidrogel de colágeno.

O colágeno é uma proteína que possui diversas interações na matriz extracelular de inúmeros tecidos sendo importância no desenvolvimento do corpo humano, com atuação na formação de tecidos e órgãos⁸¹. O colágeno está bem caracterizado e tem sido muito utilizado na engenharia tecidual e em outras aplicações biomédicas⁶⁶. Por ser um material natural do

corpo humano, sua utilização é vantajosa, com excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e insignificante imunogenicidade⁸². O colágeno representa cerca de dois terços do peso seco da cartilagem articular adulta⁸³. Colágeno do tipo II é o maior componente da matriz extracelular da cartilagem articular, não só proporcionando suporte estrutural para os condrócitos como também distribuindo a força originada do movimento da articulação. Sabe-se que a matriz extracelular composta pelo colágeno do tipo II é importante na diferenciação, no metabolismo e na atividade dos condrócitos, estabilizando seu fenótipo⁸⁴. Devido a essas características, o colágeno do tipo II na forma de hidrogel ajusta-se à necessidade de dar suporte às células-tronco mesenquimais para sua diferenciação condrogênica *in vitro* e também para a utilização em implantes cartilagosos.

Modelo animal

Em humanos, lesões cartilaginosas geralmente resultam em osteoartrite. Muitos estudos em experimentação animal são feitos para simular lesões cartilaginosas e comumente utiliza-se animais de grande porte, que são submetidos a pequenos procedimentos cirúrgicos. Os animais são submetidos à retirada de parte da cartilagem articular para criação de um defeito cartilaginoso na área de carga do joelho. Coelhos são modelos animais muito utilizados para lesão articular, pois são animais de grande porte, que apóiam o corpo sobre a pata traseira.

Assim o objetivo inicial deste estudo é a obtenção de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo e a sua diferenciação condrogênica *in vitro* utilizando biomateriais feitos de colágeno do tipo II. Finalmente, um estudo *in vivo* foi conduzido para investigar o destino das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo juntamente com o biomaterial de colágeno do tipo II em lesões cartilaginosas de coelhos.

Objetivos

Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo geral investigar a capacidade de diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo em conjunto com o biomaterial de colágeno do tipo II e a sua utilização no reparo cartilaginoso.

Objetivos Específicos

- 1 – Isolar células-tronco mesenquimais de tecido adiposo obtidos por lipoaspiração
- 2 - Induzir e caracterizar a diferenciação condrogênica *in vitro* das células-tronco mesenquimais com hidrogel de colágeno do tipo II
- 3 – Desenvolver modelo animal de lesão cartilaginosa em joelhos de coelhos
- 4 – Realizar experimentos *in vivo* com células-tronco mesenquimais e hidrogel de colágeno do tipo II para reparo cartilaginoso em joelhos de coelhos submetidos a lesões cartilaginosas.

Materiais e Métodos

Obtenção de tecido adiposo:

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (processo CEP-Nº 838/2008), o tecido adiposo foi doado pelos pacientes do Hospital das Clínicas UNICAMP quando estes eram submetidos a uma lipoaspiração. Foram selecionados pacientes com idade entre 25 e 50 anos e excluídos pacientes diabéticos e hipertensos.

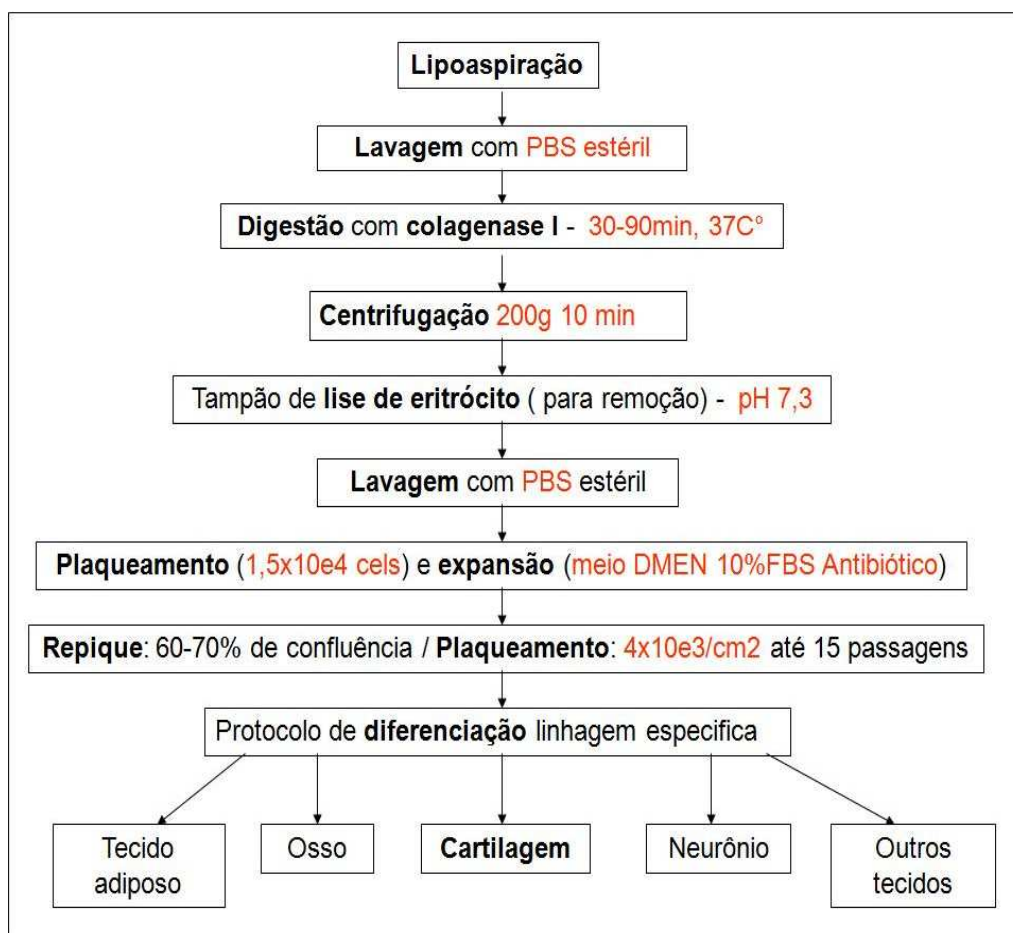
Separação celular do tecido adiposo:

Após lipoaspiração, o material coletado foi submerso em uma solução tampão de fosfato (PBS-Phosphate Buffer Solution) estéril. Em seguida, o tecido adiposo foi dissecado em pequenos fragmentos e lavado com PBS numa centrifugação de 2.000 rpm por 8 minutos. Depois, os fragmentos foram imersos em uma solução enzimática com Colagenase tipo I (1.5mg/mL), 25mM HEPES e albumina de soro bovino (BSA-20mg/ml) por 30-90 minutos a 37°C sob agitação contínua até dissolver parte do tecido gorduroso. A reação enzimática foi desativada pela adição de igual volume de DMEM low glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Gibco, Rockville) com 10% soro fetal bovino (SFB) e centrifugada em rotação de 200g por 10 minutos. O *pellet* celular foi re-suspendido em tampão de lise de eritrócitos (pH 7,3) por 10 minutos e em seguida lavado em 40 ml de PBS gelado, a 200g por 10min. Por final as células obtidas foram ressuspendidas em meio de cultura DMEM-low glucose, com 10% FBS e cultivadas numa densidade de $1,5 \times 10^5$ células/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. Após 2-3 dias de incubação, as células foram lavadas com meio de cultura para a retirada de células mortas ou não aderentes.

Expansão e cultura das Células-tronco mesenquimais –

As células aderidas na placa de cultura foram incubadas por 5-7 dias em estufa a 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95% com meio de cultura DMEM-low glucose / 10% FBS para proliferação. Quando atingiam a confluência de 60-70%, eram tripsinizadas (Tripsina, Gibco, Rockville) e distribuídas aproximadamente numa proporção aproximadamente 3:1, em meio de cultivo DMEM-LG/ 10% FBS com antibiótico. Após a

quarta passagem as células aderentes eram caracterizadas como células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (Esquema 1).



ESQUEMA 1: Obtenção de células-tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo.

Avaliação fenotípica por citometria de fluxo

Após a quarta passagem, as células aderentes foram coletadas, lavadas e ressuspensas em 50 uL em solução de lavagem (PBS1X sem Ca²⁺ Mg²⁺, 3%FCS, 10mM HEPES pH 7,2). Em seguida, foram adicionados os seguintes anticorpos: anti-CD73 , anti-CD90, anti-CD105 , anti-CD3, anti-CD14, anti-CD45 e anti-IGg (controle positivo). Para remover o excesso de anticorpo, as células foram lavadas duas vezes com solução de lavagem e centrifugadas a 220g por 5 min. Dez mil eventos foram adquiridos com um FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA) e analisados através do CellQuest Software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA). A marcação não específica foi

verificada a partir da intensidade de fluorescência do controle isotópico correspondente, subtraída do percentual de população positivo correspondente.

Diferenciação das células-tronco mesenquimais :

Para confirmação da capacidade de pluripotência, as células-tronco mesenquimais foram coletadas e submetidas à diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. O processo de diferenciação é feito após a quarta passagem quando o meio DMEM-LG/ 10% FSB foi substituído por meio indutor de diferenciação, conforme descrito abaixo:

TABELA 1: Meios e suplementos para indução de adipogênese, osteogênese e condrogênese

<i>Diferenciação</i>	Meio	Suplementos
<i>Adipogênese</i>	DMEM High glucose 10%FSB	Dexametasona – 5×10^{-6} M 3-isobutil- metilxantina – $4,5 \times 10^{-4}$ M Insulina – 5ug/ml Indometacina – 3×10^{-4} M
<i>Osteogênese</i>	DMEM Low glucose 10%FSB	Dexametasona – 5×10^{-6} M Ácido Ascórbico – $2,8 \times 10^{-4}$ M β -glicerol-fosfato – 10^{-2} M
<i>Condrogênese</i>	DMEM Low glucose 10%FSB	Ácido Ascórbico – 50 ug/ml TGF β 3– 25ng/ml Insulina – 6,25ug/ml Dexametasona – 1mM Albumina Humana- L-prolina 0,4mM

– **Diferenciação adipogênica:** células-tronco mesenquimais foram cultivadas no meio de indução por duas semanas e foram submetidas à coloração por *Oil Red*.

– **Diferenciação osteogênica:** células-tronco mesenquimais foram cultivadas no meio de indução por três semanas e sua diferenciação foi avaliada pela coloração com *Alzarin Red S*.

– **Diferenciação condrogênica:** células-tronco mesenquimais foram cultivadas em meio de indução e após 3 semanas foram avaliadas pela coloração com Azul de toluidina.

Imunocitoquímica e Microscopia confocal:

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, lavadas com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% por 10 minutos. Em seguida, foram realizados o bloqueio e a permeabilização celular com uma solução 3% de BSA e 0,1% de Triton 100x. Os anticorpos primário anti-CD90, anti-CD73 e anti-CD105 foram diluídos para 10 µg/mL em solução 1% de BSA e incubados com as células, em câmara úmida a 4°C, durante 18 horas. As lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em lâminas, utilizando-se meio de montagem para fluorescência (ProLong® Gold com DAPI, da Molecular Probes).

Para a marcação das células com BrdU (Sigma) durante a proliferação, as células-tronco mesenquimais foram incubadas com meio de cultura contendo 10 µM de BrdU por 24, 48, 72 e 96 horas. Em seguida foram fixadas em Paraformaldeído 4% e incubadas em solução de HCl (2N) por 10 minutos à temperatura ambiente para exposição do DNA. As células foram incubadas em solução tampão (0,1M tetraborato de sódio) por 12 minutos e depois com solução PBS com 0,1% Triton 100X e anticorpo anti-BrdU (Dako) na concentração 1:100 e por 18 horas a 4°C. As células foram novamente levadas e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo Alexa 488 (Invitrogen) por 2 horas a temperatura ambiente sob abrigo de luminosidade. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando-se meio de montagem (ProLong® Gold com DAPI, da Molecular Probes) para fluorescência. As lâminas foram analisadas por rastreamento em um laser LSM-510 montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 40x em óleo de imersão. Em todos os experimentos foram realizados controles negativos, somente com anticorpo secundário, os quais não apresentaram fluorescência.

Biomaterial

Os biomateriais foram feitos a partir de tecidos ricos nas proteínas de colágeno do tipo I e do tipo II. Para a extração do colágeno utilizamos dois procedimentos. O primeiro procedimento foi feito a partir de tendão bovino, de onde extraímos colágeno do tipo I, enquanto que segundo procedimento utilizou parte de cartilagem xifóide de frango, de onde obtivemos colágeno do tipo II.

Abaixo estão descritos brevemente os procedimentos utilizados para a extração e o preparo dos biomateriais, realizados no departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP sob orientação do professor Dr. Benedicto de Campos Vidal.

Extração de Colágeno do tipo I:

Tendões bovinos foram cortados em pequenos cubos, assim os fragmentos foram dissociados em solução de ácido acético com pepsina 1% e ácido clorídrico. Esses fragmentos foram submersos nessa solução por 48 horas a 25 °C em agitação constante e centrifugados. O precipitado foi recolhido e colocado em uma solução de NaCl 10%. Centrifugou-se novamente essa solução descartando o sobrenadante. O material foi deixado por alguns dias em diálise com água destilada e em seguida foi feita a liofilização do material extraído.

Extração de Colágeno do tipo II

Cartilagens xifóides de frangos foram cortadas em pequenos pedaços, pesadas e lavadas em água destilada. O material foi incubado a 37°C com uma solução contendo papaína por alguns dias, formou-se um precipitado que foi retirado e incubado em solução ácida com pepsina por mais 7 dias. Uma suspensão gelatinosa foi formada e posteriormente filtrada, para que fosse incubada em uma solução de ácido acético e precipitada por uma solução de NaCl, mantida a 4°C. Dessa solução foi feita diálise por alguns dias até a formação de uma solução gelatinosa.

Moldes porosos de Colágeno

Os materiais de colágeno purificados e congelados foram liofilizados e dessa forma formou-se um material sólido e poroso. Essa porosidade deve-se aos cristais de gelos que se formaram quando congelados. Os moldes foram cortados no tamanho de 4 mm de diâmetro

e 2 mm de espessura, formando uma pequena pastilha de colágeno. Em contato com meio de cultura, esse molde absorve água e se expande. Um total de 2×10^5 células-tronco mesenquimais foram semeadas para cada molde poroso de colágeno.

Preparo dos Hidrogéis de Colágeno

Os materiais de colágeno purificados, congelados e liofilizados foram solubilizados em água destilada estéril com 0,01% de ácido acético. A concentração dos hidrogéis de colágeno foi de 12 mg/ml (solução gelatinosa). Um total de 2×10^5 células foram semeadas num volume de 50ul de hidrogel de colágeno do tipo I ou do tipo II em poços de uma placa de 96 cavidades. Após 1 hora foi adicionado meio de cultura sobre o hidrogel.

Para implantes do hidrogel de colágeno do tipo II nas lesões cartilaginosas, foi utilizada cola de fibrina para dar aderência do material no local de implante. Dessa forma, foi adicionado fibrinogênio (100mg/mL Sigma) na proporção de 1:1 para o colágeno e em seguida dois microlitros de uma solução de trombina (500U/mL) com cloreto de cálcio (25mg/mL) para formação de fibrina.

Diferenciação condrogênica *in vitro*

Após as células-tronco mesenquimais serem semeadas nos hidrogéis de colágeno, adicionamos meio de diferenciação condrogênica (ver Tabela1) e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias durante três semanas.

Ensaio de viabilidade celular

Células-tronco mesenquimais foram incubadas com hidrogéis de colágeno do tipo I ou do tipo II juntamente com cola de fibrina em placas de 96 cavidades durante sete dias. O material foi então lavado duas vezes com PBS e incubado em solução tampão contendo $4 \mu\text{M}$ de PI e $2 \mu\text{M}$ de Calcein AM (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kit, Molecular Probes™) por 45 minutos a 37°C . Em seguida, as células foram analisadas em microscópio invertido equipado de lâmpada de fluorescência (Ex/Em: Calcein= 494/517 nm e PI= 528/617 nm).

Extração do RNA total

Os hidrogéis de colágeno juntamente com as células-tronco mesenquimais foram retirados da cultura celular durante a diferenciação condrogênica, submetidas a extração de RNA com o *kit Mini RNA Isolation* (GE Healthcare TM). A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Nano Drop Spectrophotometer, ND-1000 ®) com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e este normalmente varia entre 1,6 e 1,8.

Tratamento do RNA total com DNase I

Com o objetivo de eliminar possíveis contaminações do RNA com DNA genômico, o RNA total foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/µL (Life Technologies), utilizando 1 U da enzima para tratar 5 µg de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C.

Transcrição em cDNA

As amostras de RNA total, contendo 5 µg de RNA e tratadas com DNase I, foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) em uma reação de volume final de 20 µL (Life Technologies). A reação foi iniciada adicionando aos 5 µg de RNA tratado 1 µL de oligonucleotídeo (dT) 500 µg/mL e 1µL da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C, e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se, então, 4 µL do tampão de reação 5x, contendo 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ e 0,1 M DTT, e 200 U enzima transcriptase reversa SuperScript II, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50 minutos à 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70°C e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos a 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através de espectrofotometria (Nano Drop Spectrophotometer (ND-1000 ®) com comprimento de onda equivalente a 260 nm.

Como controle da transcrição em cDNA foi realizado uma PCR para o gene $\beta 2$ -*microglobulina*. A PCR para amplificação de $\beta 2$ -*microglobulina* foi realizada para um volume final de 50 μ L de reação que contém: 1,5 μ L do cDNA sintetizado, 5 μ l de tampão de reação, 3 μ L $MgCl_2$ 50 mM, 2,5 unidades de Taq polimerase e 200 nM de cada iniciador. Foi realizado um controle negativo, sem adição de cDNA. As sequências dos iniciadores de $\beta 2$ -*microglobulina* utilizados foram: FW: ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT; RV: CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC. O programa foi composto de 5 minutos de desnaturação à 94°C, seguido por 35 ciclos de 40 segundos à 94°C, 40 segundos à 55°C e 40 segundos à 72°C, com uma fase final de 72°C por 7 minutos, os fragmentos resultantes contém 300 pb e foram visualizadas em luz ultravioleta em gel de agarose 2% (Figura 1).

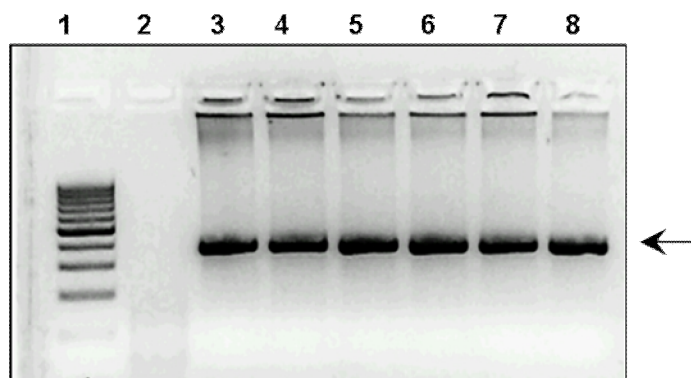


FIGURA 2: Produtos resultantes da PCR para amplificação de $\beta 2$ -*microglobulina* visualizados em gel de agarose. 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo, 3 – 8: produtos da amplificação das amostras de cDNA amplificadas. As setas indicam a presença da banda de 300 pb correspondente ao produto amplificado de $\beta 2$ -*microglobulina*. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida.

Desenho de oligos iniciadores

Os oligos iniciadores para amplificação dos genes específicos foram desenhados com dois programas diferentes. Primeiramente, o programa *PRIMER EXPRESS* (Applied Biosystems) foi utilizado para desenhar os iniciadores com uma temperatura de anelamento de 65°C e tamanho dos produtos entre 100 e 150 pares de bases. Posteriormente, o programa Gene Runner Version 3.5 (Hastings software®) foi utilizado para checar a ausência de estruturas que podem ser formadas dentro do iniciador ou entre os iniciadores senso e anti-senso, como dímeros ou alças, que podem diminuir a eficiência da reação.

Com o objetivo de evitar amplificação de possível DNA contaminante presente nas amostras, os iniciadores da fita sense e anti-sense foram desenhados em éxons diferentes sempre que possível. Para a delimitação de éxons e íntrons utilizou-se o programa BLAT (<http://genome.csdb.cn/cgi-bin/hgBlat>).

Todos os pares de oligos iniciadores desenhados foram então analisados com o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para certificação de que eles não amplificariam produtos inespecíficos. As sequências dos iniciadores utilizados neste estudo estão listadas na Tabela 2.

Concentração dos iniciadores e curvas de eficiência

Para realizar a verificação da concentração ideal de cada par de iniciadores foi realizada uma curva de concentrações de 150 nM, 300 nM, 400 nM, 600 nM e 800 nM, com o objetivo de obter o menor Ct com o maior sinal fluorescente. As concentrações escolhidas encontram-se na Tabela 2.

A eficiência de amplificação é obtida através da fórmula $10^{(-1/slope)}$, onde *slope* é derivado da inclinação da curva e deve estar em torno de -3,32. Quando aplicado a fórmula de eficiência, o valor de $10^{(-1/slope)}$ tem que ser próximo de 2, o que significa que a cada ciclo de amplificação o material genômico está sendo duplicado e isso equivale a 100% de eficiência. Para observação da eficiência foi realizada curva de diluição na ordem de 1:10 com 6 pontos. Cada curva foi realizada em duplicata e a concentração inicial da amostra foi de 240 ng. Apenas os iniciadores considerados com ótima eficiência foram utilizados nas reações de PCR em tempo real. Uma amostra de cDNA de cartilagem humana foi utilizada para padronizar os iniciadores desenhados

TABELA 2: Sequência de iniciadores desenhados para avaliação da diferenciação das células-tronco mesenquimais após a diferenciação condrogênica em hidrogeis de colágeno.

Gene	Numero de acesso	Seqüência sense	Seqüência anti-sense	concentração (nM)
Col-I	NM_000088	GAG AGC ATG ACC GAT GG	GTG ACG CTG TAG GTG AA	300
Col-II	NM_000088	GGC AAT AGC TTC ACG TAC A	CGA TAA CAG TCT TGC CCC ACT	150
Aggrecan	NM_001135	TCG AGG ACA GCG AGG CC	TCG AGG GTG TAG CGT CTA GAG A	300
Sox-9	NM_000346	TCG AGG GTG TAG CGT GTA GAG A	GTT GGG CGG CAG GTA CTG	300

PCR quantitativo (PCRq) em tempo real

Amplificação em tempo real foi realizada no ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Trinta nanogramas de cada amostra de cDNA foram utilizados na reação com os iniciadores. As concentrações e as sequências dos iniciadores são descritas na Tabela 4. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. Cada reação foi realizada em triplicata. As expressões de HPRT, GPDH ou β -actina foram utilizadas como controle endógeno e amostras de células-tronco mesenquimais foram utilizadas como calibradora (valor=1). A quantificação relativa da expressão gênica de colágeno-I, colágeno-II, sox-9 e agrecana foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\Delta C}$.

Extração e quantificação das glicosaminoglicanas

Para cada amostra de hidrogel diferenciado foi adicionada 1 mg de papaína dissolvida em tampão fosfato (cisteína, pH 6,5 contendo EDTA 0,10 M). As amostras foram incubadas a 55° C durante 16 horas. Após incubação foram adicionados 500 μ L de NaCl 4M e, após agitação, o equivalente a 10% do volume total de ácido tricloroacético 90%. O sobrenadante foi precipitado com etanol absoluto (3 vezes o volume) por 16 h a – 20° C. O precipitado foi seco a vácuo e ressuspensão em 100 μ L de água. Às amostras diluídas em água foi adicionado 1 mL do reagente DMMB seguido de suave agitação. A

leitura foi feita em espectrofotômetro a 525 nm, dentro de 3 minutos da adição do DMBB. A curva padrão foi feita utilizando solução de condroitina sulfato.

Animais

Foram utilizados coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia, pesando de 3 a 4 quilogramas, provenientes da cunicultura da Cunha, pertencente à Granja Grota Azul. Antes de serem incluídos no estudo, todos os animais foram acondicionados em gaiolas individuais em ambiente com temperatura constante (21°C) com água e ração à vontade. Os animais apresentaram estado geral de saúde normal, livres de parasitas.

A experimentação animal foi conduzida de acordo com as normas éticas e com aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA/Unicamp, N° 1714-1). O desenvolvimento deste projeto ocorreu no Núcleo de Estudos Experimentais da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com injeções intra-musculares de Ketamina 30mg/kg (VETASET ® FORT DODGE Animal Health Fort Dodge, Iowa, USA) e Xilazina (Sedomin, König, Brasil) 5mg/kg, e colocados em leitos cirúrgicos apropriados. Os joelhos foram tricotomizados, até o terço médio da coxa e da perna. Após assepsia e antisepsia rigorosa, foram colocados campos estéreis nos dois membros inferiores, e realizada uma artrotomia para-patelar medial, para se alcançar a cartilagem hialina do joelho. Com uma trefina especialmente preparada, medindo três mm de diâmetro, marcamos na cartilagem hialina a área de carga do joelho e, com o auxílio de uma cureta pequena, retirou-se a cartilagem hialina delimitada até se chegar ao osso subcondral, que foi mantido intacto, formando assim uma lesão cartilaginosa.

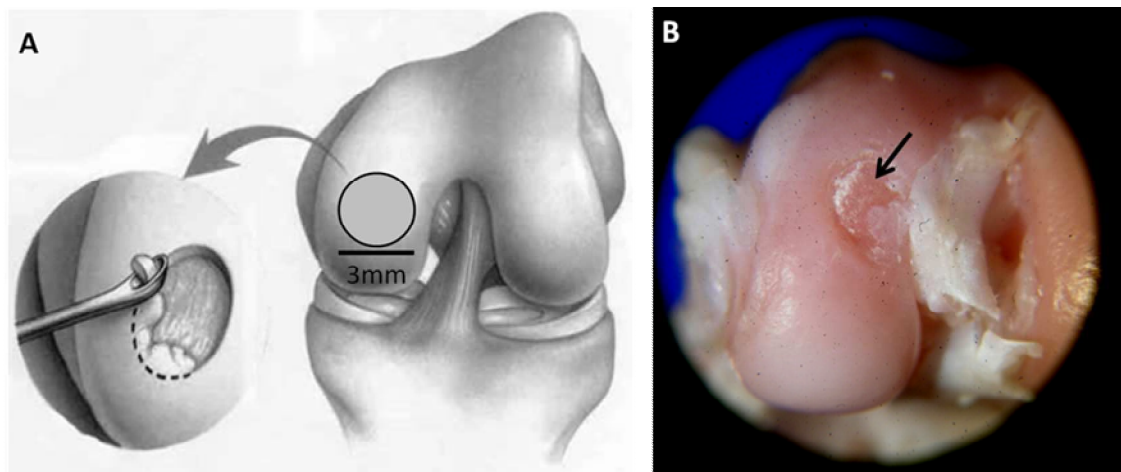


FIGURA 3: Modelo animal de lesão cartilaginosa. (A) Figura representativa do modelo de lesão cartilaginosa de 3 mm de diâmetro realizada no joelho de um coelho. (B) Lesão cartilaginosa no joelho de coelhos após 12 semanas da cirurgia feita para estabelecer o modelo animal. O osso subcondral (seta preta) continua exposto, sem nenhum tecido (cartilaginoso ou fibrocartilaginoso) recobrendo a área lesionada, evidenciando que o coelho não foi capaz de se regenerar sem nenhum tratamento

Implante do hidrogel de colágeno

As células-tronco mesenquimais foram semeadas junto com hidrogéis de colágeno do tipo II (concentração final de 6 mg/ mL) e com o fibrinogênio (concentração final de 50mg/mL) e previamente preparadas para serem implantadas na lesão. Para cada implante foram colocados 10 μ l do material contendo 10^6 células para cada implante ou sem células (controle) na região lesionada da cartilagem. Em seguida, foram adicionados 3-5 μ l de trombina (500U/mL) para transformação do fibrinogênio em fibrina, levando a adesão do biomaterial e das células no local da lesão. O local da lesão com o biomaterial de colágeno foi lavado com solução salina, com o auxílio de uma seringa, para certificar que o material ficou perfeitamente implantado. Em seguida a artrotomia foi fechada, conforme técnica usual. Para cada joelho do animal (esquerdo e direito) foi realizado um implante controle e outro implante contendo células-tronco mesenquimais, minimizando as diferenças inter-animais. Estes procedimentos foram realizados em quatro coelhos, que em seguida foram colocados em gaiolas individuais. Logo após as cirurgias, os coelhos receberam dose diária de antibiótico (Cefazolina) durante três dias. Após 12 semanas, os coelhos foram anestesiados com ketamina e xilaxina para que em seguida fossem sacrificados com uma dose elevada de tiopental (Thiopentax, Cristalia), para análise da área lesionada. Os joelhos foram dissecados para análises macroscópicas e microscópicas da cartilagem.

Histoquímica

Os joelhos dos coelhos foram fixados em solução tamponada de formalina 10% durante 2 dias, em seguida lavados com água, e incubados em solução descalcificadora por 24 horas e armazenados em álcool 70%. Os joelhos passaram por uma desidratação em álcool (70%, 80%, 90% e 100%) e xilol. Ao final, os materiais foram embebidos em parafina e cortados em um micrótomo na espessura de 7 μ m e colocados em lâminas de vidro silanizadas. Para a análise das células, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Após a desidratação seriada, em álcool, os cortes foram montados em Entelan (Merck) e observados em microscopia de luz. Os preparados histológicos foram fotografados em fotomicroscópio Carl-Zeiss/Jeneval

Imagens em Confocal e geração de Segundo Harmônico(SHG)

Os cortes corados em HE foram examinados no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas, usando confocal LSM 780-NLO Zeiss no microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha), usando objetivas EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC. As imagens foram coletadas usando lasers NLO-Mai Tai em 940 nm para excitação e detectores NDD para o SHG transmitido e refletido. No detector NDD transmitido usamos o filtro NDD_LP510/BP455-500 e nos detectores do refletido foram NDD_LP510/BP455-500 e NDD_mirror/BP565/610, com pinhole ajustado para 1 airy unit em cada canal, formato da imagem de 1024x1024

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma®, teste t student pareado. Os valores obtidos foram expressos como Média \pm erro padrão. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

Resultados

Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais

Para a obtenção de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo foi necessário padronizar o método de extração celular, desde a separação celular, expansão e caracterização.

Como podemos observar na Figura 2, as células aderidas e cultivadas em meio de cultura com 5-Bromo-2-Deoxyridine (BrdU) apresentavam pouca proliferação nas primeiras 72 horas de incubação, porém ao longo da cultura as células proliferaram. Assim, no quinto dia todas as células incorporavam BrdU em seu núcleo e no sétimo dia as células apresentavam uma incorporação mais intensa de BrdU . Esse resultado da proliferação celular com BrdU condiz com o tempo das passagens celulares que são realizadas a cada 5-7 dias.

Um dado observado durante a padronização foi que células aderentes do tecido adiposo de doadores obesos e ex-obesos apresentaram uma taxa de proliferação celular muito mais lenta, em torno de 10-14 dias para as passagens. Não sabemos ao certo os motivos dessa diferença, mas acredita-se que as células provenientes desse tecido apresentam uma alteração no seu metabolismo que deve influenciar a taxa de proliferação celular, assim todos os paciente obesos e ex-obesos foram excluídos do estudo.

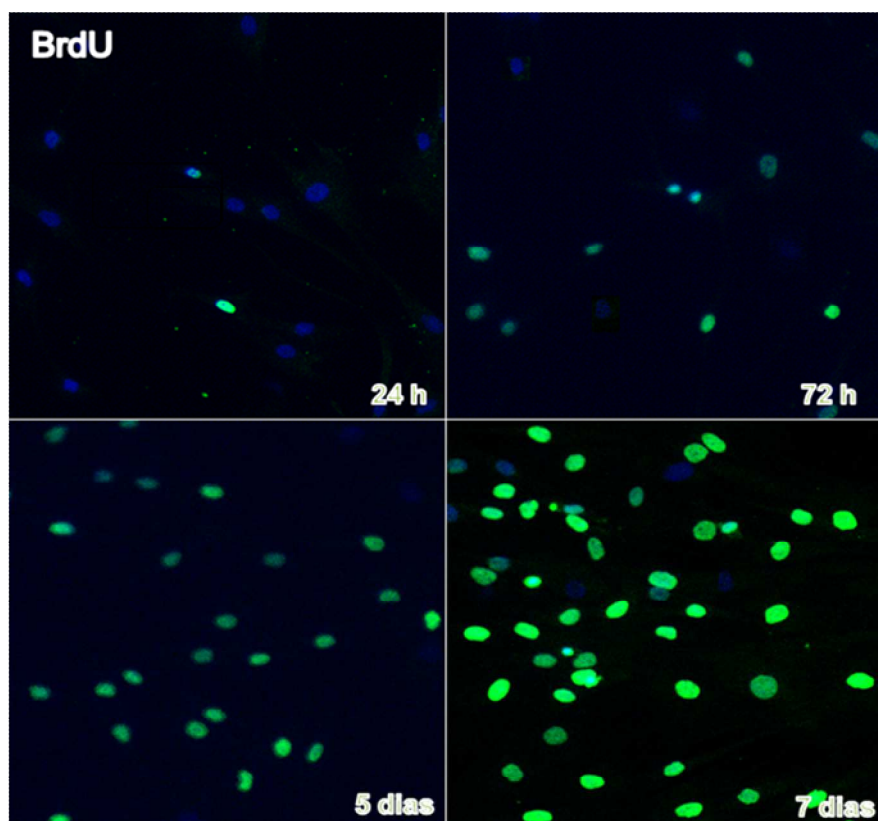


FIGURA 4. Ensaios de proliferação celular por incorporação 5-Bromo-2-Deoxyridine (BrdU) e microscopia de imunofluorescência. Expansão das células-tronco mesenquimais. Após a incubação das células-tronco mesenquimais com BrdU nos dia 1, 2, 5 e 7, as células são marcadas em verde com anticorpo anti-BrdU e os núcleos marcados com DAPI (azul).

As células-tronco mesenquimais constituíram uma população homogênea com morfologia fibroblástica (Figura 5 A). Essas células expressam, em suas membranas e em seu citoplasma, marcadores de células-tronco mesenquimais. (Figuras 5-B-D); CD105, CD90 e CD73. A expressão de CD90 foi encontrada na membrana celular e em vesículas citoplasmáticas, enquanto CD105 e CD73 foram expressos na superfície celular.

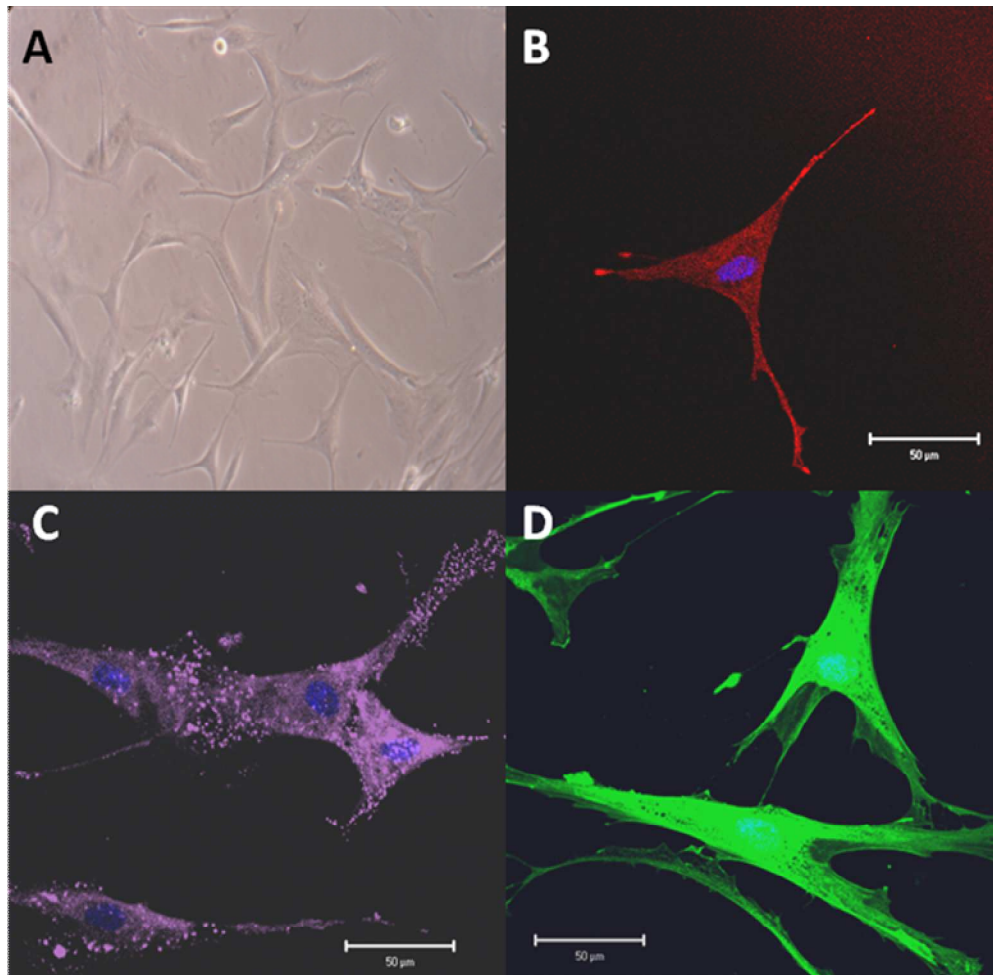


FIGURA 5. Microscopia óptica e imunofluorescência de células-tronco mesenquimais após a quarta passagem em lamínulas de vidro. A- foto de microscopia óptica com aumento de 10x. B-D Fotos de Imunocitoquímica dos marcadores CD105 (vermelho), CD90 (roxo) e CD73 (verde) e nuclear (DAPI-azul), aumento de 40X.

Para uma caracterização mais completa da população celular obtida, foi necessário identificar alguns marcadores de células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo. Para cada amostra de células obtidas dos pacientes do Hospital das Clínicas da UNICAMP (n=6) foram realizadas análises dos marcadores celulares, conforme descrito anteriormente. Todas as células analisadas neste estudo apresentaram homogeneidade quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), conforme observado na região delimitada da Figura 6A e possuíam o mesmo perfil de expressão dos marcadores descrito; CD105 (99.30%), CD29 (84.11%), CD73 (97.87%) e CD90 (99.6%), sendo que o marcador CD90 apresentou marcação mais intensa em todos os experimentos, enquanto os marcadores Stro-1 (1.63%), CD34 (0,84%), CD45 (2.31%), CD14 (1.7%) e HLA-DR (0.96%) mostraram baixa expressão (Figura 4-B). Assim, a caracterização dessas células

com os marcadores específicos definiu a população obtida do tecido adiposo como uma população de células-tronco mesenquimais, definição utilizada para essas células nos demais experimentos.

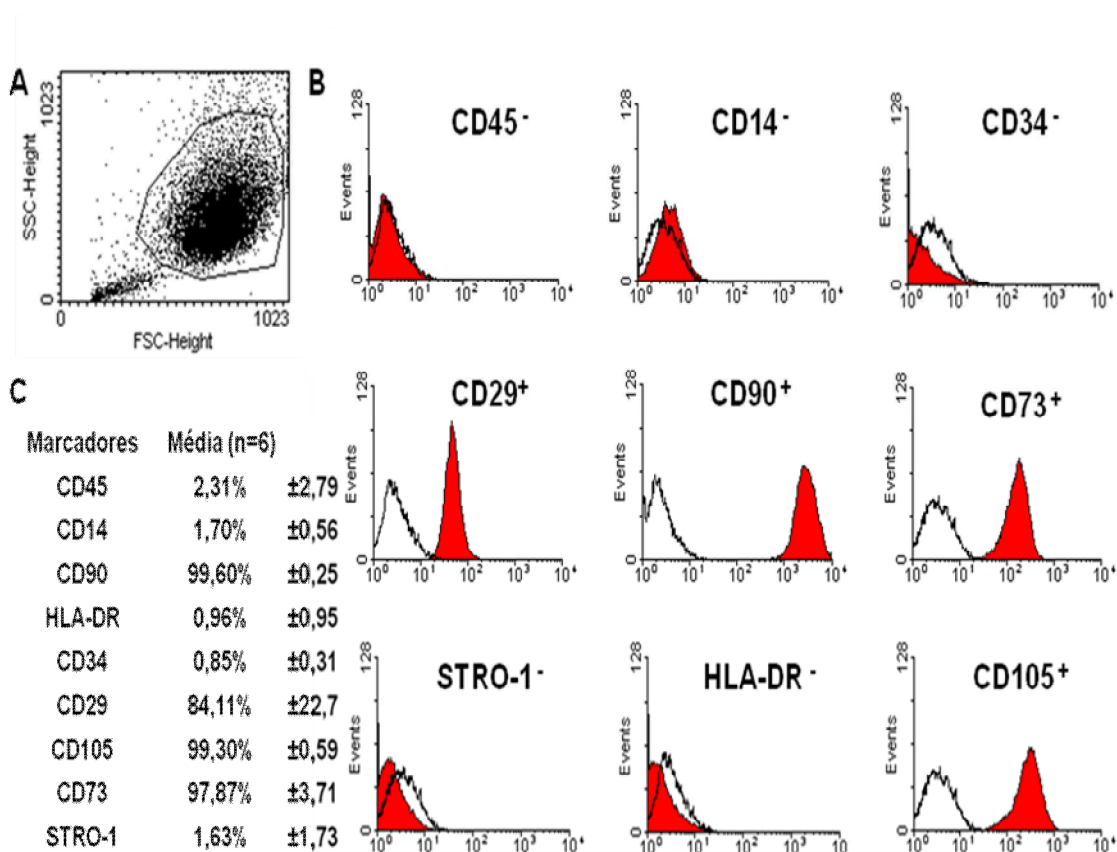


FIGURA 6: Citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais após a quarta passagem. A- Dot-Plot das células, mostrando característica homogênea dessa população. B- Painel de histogramas dos marcadores. Em vermelho está representada a expressão do marcador específico e em branco o controle (IgG com fluorocromo). Observe a expressão dos marcadores CD105, CD90, CD29 e CD73 e ausência de expressão de HLA-DR, STRO-1, CD45, CD14 e CD34. C-Tabela com as médias das porcentagens dos marcadores celulares positivos e negativos (n=6).

Diferenciação das células-tronco mesenquimais

Para comprovar a capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais, padronizamos um protocolo eficiente para diferenciação nas linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas. Após a expansão celular e a caracterização por citometria de fluxo, iniciou-se a diferenciação nas três linhagens descritas:

Diferenciação Adipogênica

Após a diferenciação adipogênica, as células-tronco mesenquimais apresentaram coloração vermelha citoplasmática em pequenas vesículas quando submetidas à coloração com *Oil Red*. A propriedade desse corante de interagir com lipídeos e triglicerídeos neutros mostra uma coloração vermelha que evidencia o acúmulo dessas substâncias em vesículas citoplasmáticas das células diferenciadas. Como podemos observar na Figura 7 B-C as células-tronco mesenquimais perderam sua morfologia fibroblástica e adquiriram uma morfologia redonda e com inúmeras vesículas, caracterizando o acúmulo de lipídeos.

Diferenciação Osteogênica

O processo de diferenciação das células-tronco mesenquimais para a linhagem osteogênica foi evidenciado com a coloração *Alzarin Red S* que cora de vermelho os depósitos de cálcio e outros minerais. Como podemos observar na Figura 7 D-E, em volta das células diferenciadas encontram-se regiões avermelhadas, as quais supõem-se que sejam depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz extracelular mineralizada, semelhante a do tecido ósseo. Outra característica marcante é a mudança de morfologia, pois as células fibroblásticas alteram seu formato para células alongadas e alinhadas, recobrando toda placa de cultura e em alguns lugares, formando aglomerados celulares.

Diferenciação Condrogênica

Após três semanas as células-tronco mesenquimais induzidas para diferenciação condrogênica, foram coradas com *Alcian blue* (Figura 7F-G). As células apresentaram expansão no tamanho celular com significativo aumento no citoplasma, tornando-se arredondadas e achatadas. É possível observar uma coloração celular azulada devido à interação do corante com as glicosaminoglicanas expressas durante a diferenciação.

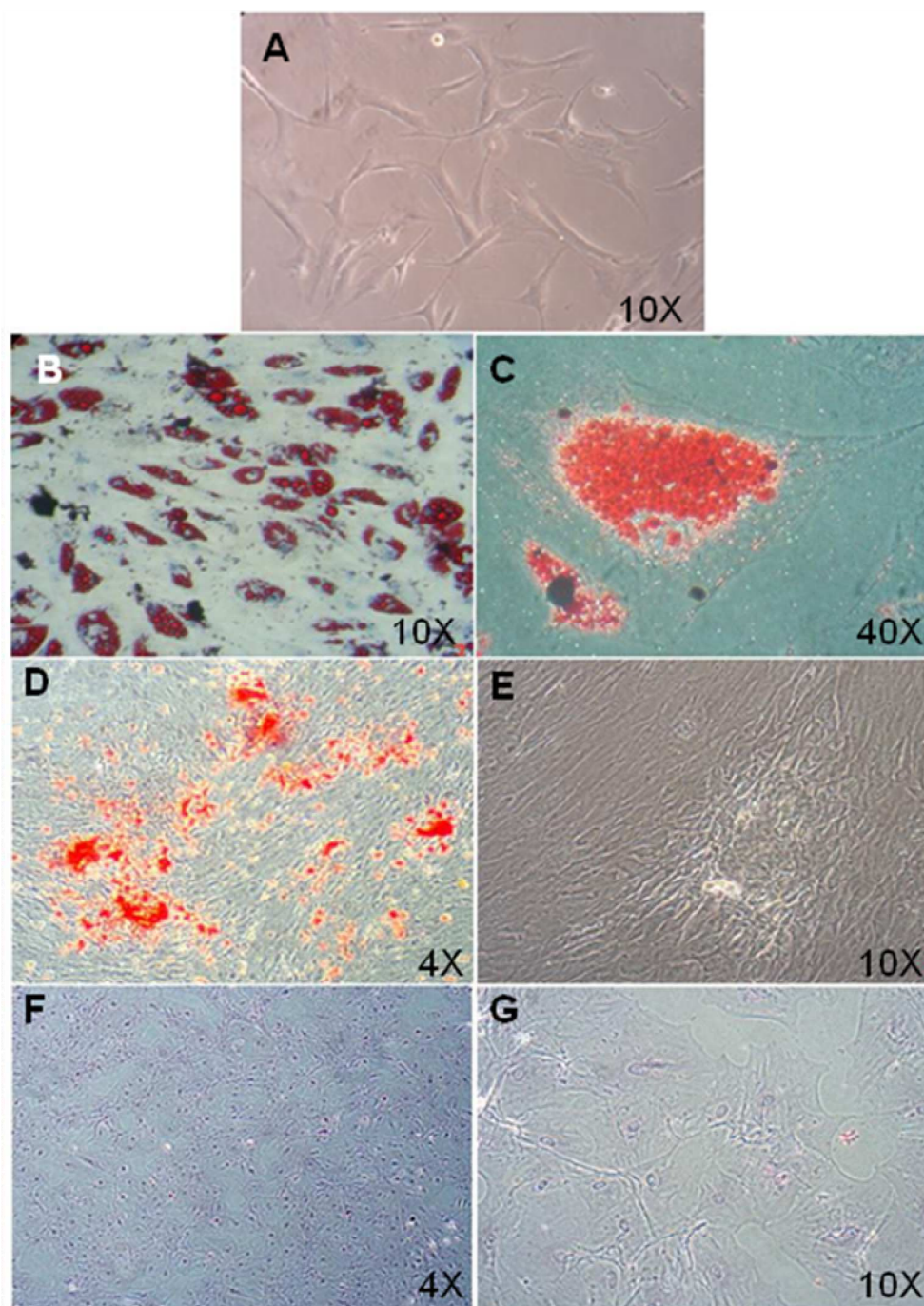


Figura 7: Microscopia óptica de células-tronco mesenquimais submetidas à diferenciação. **A-** Células-tronco mesenquimais na quarta passagem apresentando morfologia fibroblástica **B-C** Células-tronco mesenquimais diferenciadas em linhagem adipogênica coradas com *Oil Red*, mostrando acúmulo de vesículas de lipídios nas células. **D** células-tronco mesenquimais diferenciadas na linhagem osteogênica coradas com *Alzarin Red S* mostrando acúmulo de cálcio formado, **E** células-tronco mesenquimais em microscopia óptica durante a cultura de diferenciação, mostrando formação de colônias e alinhamento das células com sua estrutura alongada. **F-G.** Células-tronco mesenquimais diferenciadas em linhagem condrogênica coradas com *Alcian blue*, observa-se a mudança da morfologia das células (arredondadas) e a produção de matriz com proteoglicanas coradas em azul (n=6)

Biomateriais de colágeno para diferenciação condrogênica

Moldes porosos

A utilização dos moldes porosos de colágeno do tipo II (Figura 8-A) para cultivo de células-tronco mesenquimais não foi eficiente para diferenciação condrogênica. É possível observar na Figura 6 células-tronco mesenquimais cultivadas nos moldes porosos durante 3 semanas. Na Figura 8A observa-se cortes histológicos dos moldes sem as células, nota-se as interconexões dos poros e o tamanho das porosidades. A Figura 8B representa os moldes porosos de colágeno do tipo II após a diferenciação condrogênica, nota-se que o material deformou-se em algumas extremidades (seta preta). Interessante notar que as células-tronco mesenquimais migraram do material para a placa de cultura, indicando que nem todas as células-tronco mesenquimais conseguiram migrar para o interior do material. Essa suposição é reforçada quando avaliamos as micrografias de cortes histológicos feitos em parafina com as células cultivadas dentro dos materiais de colágeno (Figura 8-C). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para identificação dos núcleos celulares e dessa forma observa-se que a grande maioria das células-tronco mesenquimais manteve-se localizada na periferia do material (seta preta), enquanto algumas células migraram para o interior dos moldes. Muitas regiões internas do material ficaram sem a presença de células (seta vermelha). Assim essa heterogeneidade celular mostrou que o material apresenta regiões distintas, com algumas regiões sem nenhuma célula e outras com muitas células agregadas. Essa desproporção ocorreu devido à dificuldade das células em migrar para o interior do material, o que está relacionado com a formação inapropriada das porosidades. Dessa forma, optamos por não utilizar o material poroso no projeto e ao invés disso, passamos a utilizar o colágeno do tipo II solubilizado em água, formando um hidrogel de consistência viscosa.

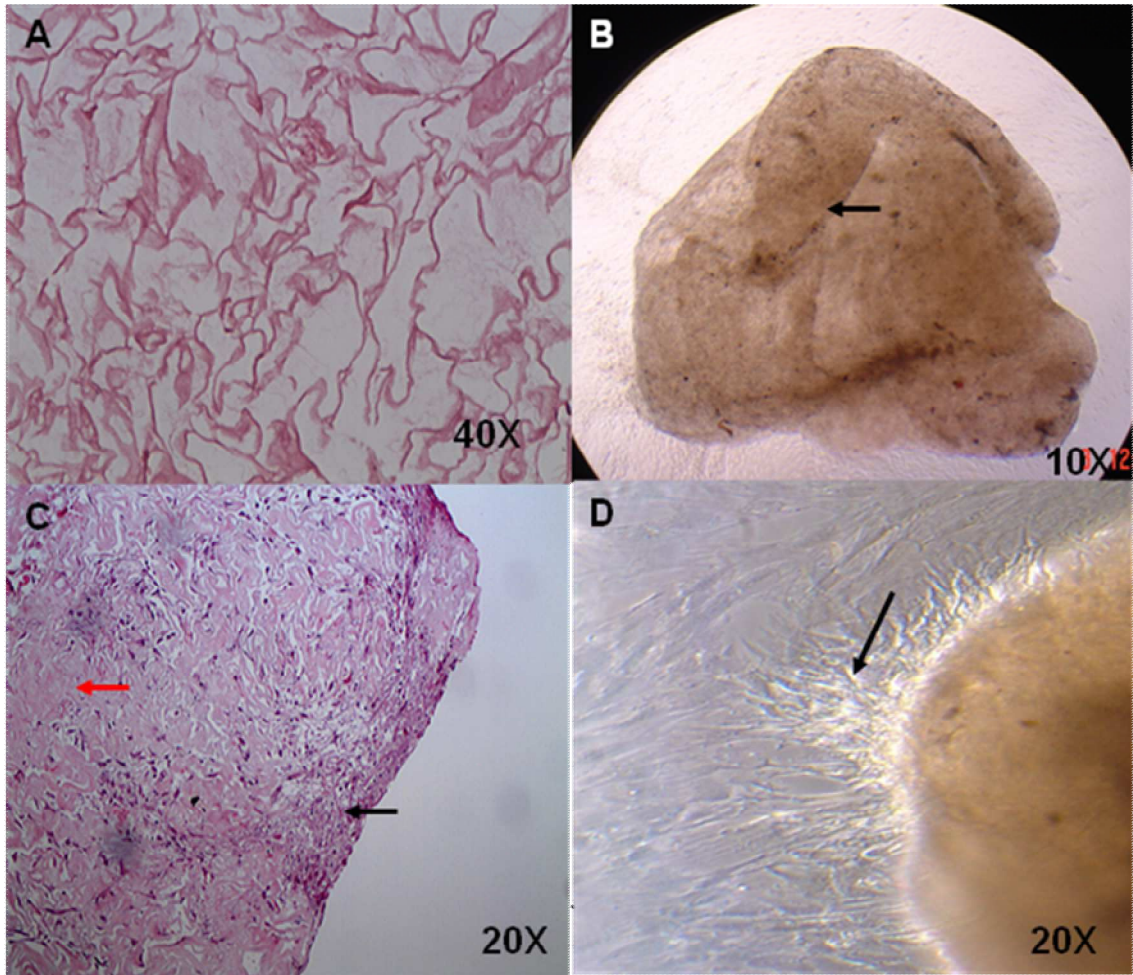


FIGURA 8: Microscopia óptica dos moldes de colágeno. **A** – Foto do molde de colágeno corado com HE, observa-se a irregularidade dos poros e suas interconexões. **B** – Foto do molde de colágeno cultivado com células-tronco mesenquimais em processo diferenciação por 3 semanas. A seta preta indica região que apresentou retração durante a diferenciação **C**- Foto de microscopia óptica de um corte histológico do molde de colágeno com células corado com HE. A seta vermelha indica região do molde onde não houve migração celular e a seta preta indica região onde as células permaneceram. **D**- Foto do molde de colágeno com as células-tronco mesenquimais em cultura, a seta indica região onde ocorreu adesão das células ao material e a placa de cultura. Muitas células migraram do material para a placa de cultura.(n=2)

Hidrogéis de colágeno

Os hidrogéis de colágeno do tipo I e do tipo II foram utilizados como suporte tridimensional para o estudo da diferenciação condrogênica *in vitro* das células-tronco mesenquimais. O colágeno do tipo I serviu como controle para comparação com o colágeno do tipo II por ser um material amplamente utilizado na diferenciação condrogênica *in vitro* e *in vivo*.

Viabilidade celular

Análises de viabilidade celular das células-tronco mesenquimais nos materiais de colágeno foram realizadas com o corante Azul de Trypan e com um kit específico para citotoxicidade celular. As análises por Azul de Trypan não evidenciaram células com comprometimento na membrana após oito horas de incubação com os hidrogéis de colágeno. Análises de citotoxicidade dos hidrogéis com as células por um período mais longo de cultura foram realizadas com o *kit LIVE/DEAD*. Esse Kit é usado para determinar se existe morte celular durante a incubação e a detecta utilizando as substâncias de: Calceína AM e Iodeto de Propídio (PI). Quando a Calceína AM é adicionada no meio de cultura (4mM) uma reação ocorre. Nessa reação as células viáveis são distinguidas pela presença do esterase intracelulares, determinada pela conversão enzimática do Calceína (não fluorescente) para o corante Calceína polianiônico (fluorescente) conservado dentro de células vivas, produzindo uma intensa fluorescência verde (in/ex~495nm/~515nm). Já o Iodeto de Propídio nas células com membranas danificadas, resultam numa ligação da substância ao DNA, produzindo uma fluorescência vermelha brilhante no núcleo das células mortas (in/ex~495nm/~635 nm).

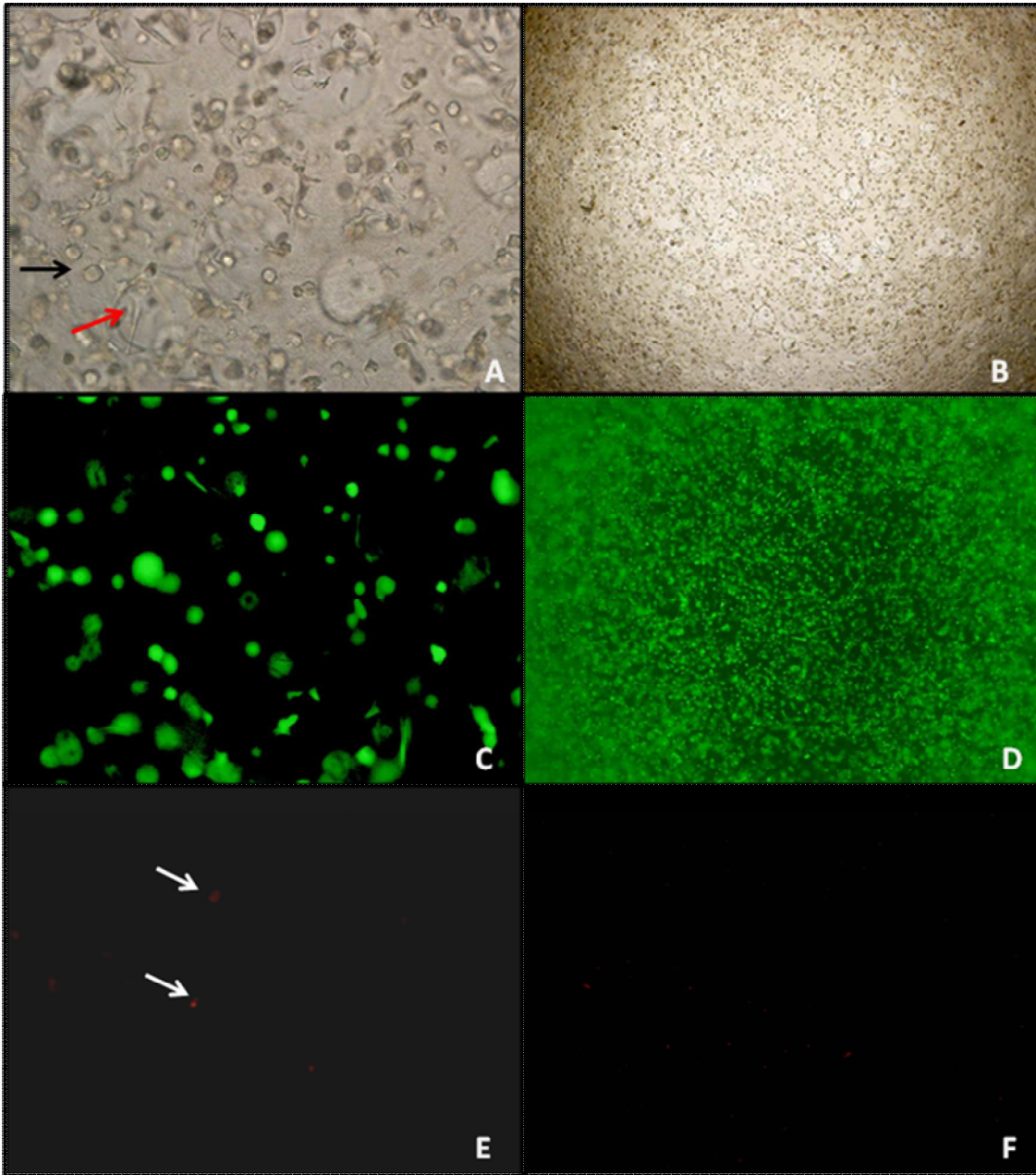


FIGURA 9: Microscopia óptica e de fluorescência das células-tronco mesenquimais após 5 dias de cultivo em hidrogéis de colágeno do tipo II.(A-B) Imagem de microscopia óptica com aumento de 40X e de 4 X, respectivamente, das células-tronco mesenquimais com o Hidrogel de Colágeno do tipo II. Observa-se na Figura A uma distribuição espacial homogênea das células no material, com algumas células apresentando uma morfologia arredondada (seta preta) enquanto outras apresentam uma morfologia fibroblástica (seta vermelha). (C-D) Imagem de microscopia de fluorescência com aumento de 40X e de 4 X, respectivamente, das células-tronco mesenquimais viáveis (verdes) cultivadas em hidrogel de colágeno do tipo II. Nota-se que muitas células não estão focalizadas devido aos diferentes níveis das células dentro do material. (E-F) Imagem de microscopia de fluorescência com aumento de 40X e de 4 X, respectivamente, das células-tronco mesenquimais mortas (vermelhas) junto com o Colágeno do tipo II. Poucas células morreram após 5 dias incubadas com o hidrogel de colágeno do tipo II.(n=3)

Após cinco dias de incubação, foi possível observar que as células-tronco mesenquimais incubadas com o hidrogel de colágeno do tipo II estavam viáveis. As Figuras 9 C-D apresentam as células viáveis (em verde) dentro do biomaterial, e na Figura 9 E-F nota-se apenas algumas células mortas (em vermelho). A grande maioria das células apresenta morfologia arredondada dentro do material, enquanto outras apresentam morfologia fibroblástica após cinco dias em cultura. Dessa forma, o material não apresentou citotoxicidade após um longo período de incubação.

Diferenciação *in vitro* das células-tronco mesenquimais cultivadas em hidrogéis de colágeno

Avaliações macroscópicas e microscópicas dos hidrogéis

Durante a diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais com os hidrogéis de colágenos observaram-se algumas mudanças na estrutura do hidrogel. Durante a primeira semana de diferenciação, o material inicialmente viscoso e transparente sofre retração, formando uma pequena esfera esbranquiçada (Figura 10A-B). Após três semanas, os hidrogéis tornam-se sólidos, firmes, arredondados e de coloração esbranquiçada. (Figura 10-A). Este experimento foi realizado tanto com o hidrogel feito de colágeno do tipo I quanto com hidrogel feito de colágeno do tipo II e ambos apresentaram os mesmos resultados. Interessante notar que os materiais de colágeno do tipo II apresentaram um volume maior após a diferenciação, ou seja, menor retração.

Para avaliarmos as características internas e microscópicas do material foram realizados cortes histológicos após a diferenciação condrogênica. Foram feitas colorações com Hematoxilina e Eosina (Figura 10 F-G) que mostraram a disposição das células (em azul) dentro do material após a diferenciação por três semanas. Ao contrário das células cultivadas em moldes porosos de colágeno, as células cultivadas em hidrogel de colágeno apresentaram distribuição celular homogênea. Também nota-se a presença de fibras de colágeno, com coloração rosada, distribuídas dentro da matriz dos hidrogéis. A coloração com azul de toluidina permite avaliar a matriz extracelular dos hidrogéis de colágeno após a diferenciação, corando em azul as proteoglicanas presentes no material.

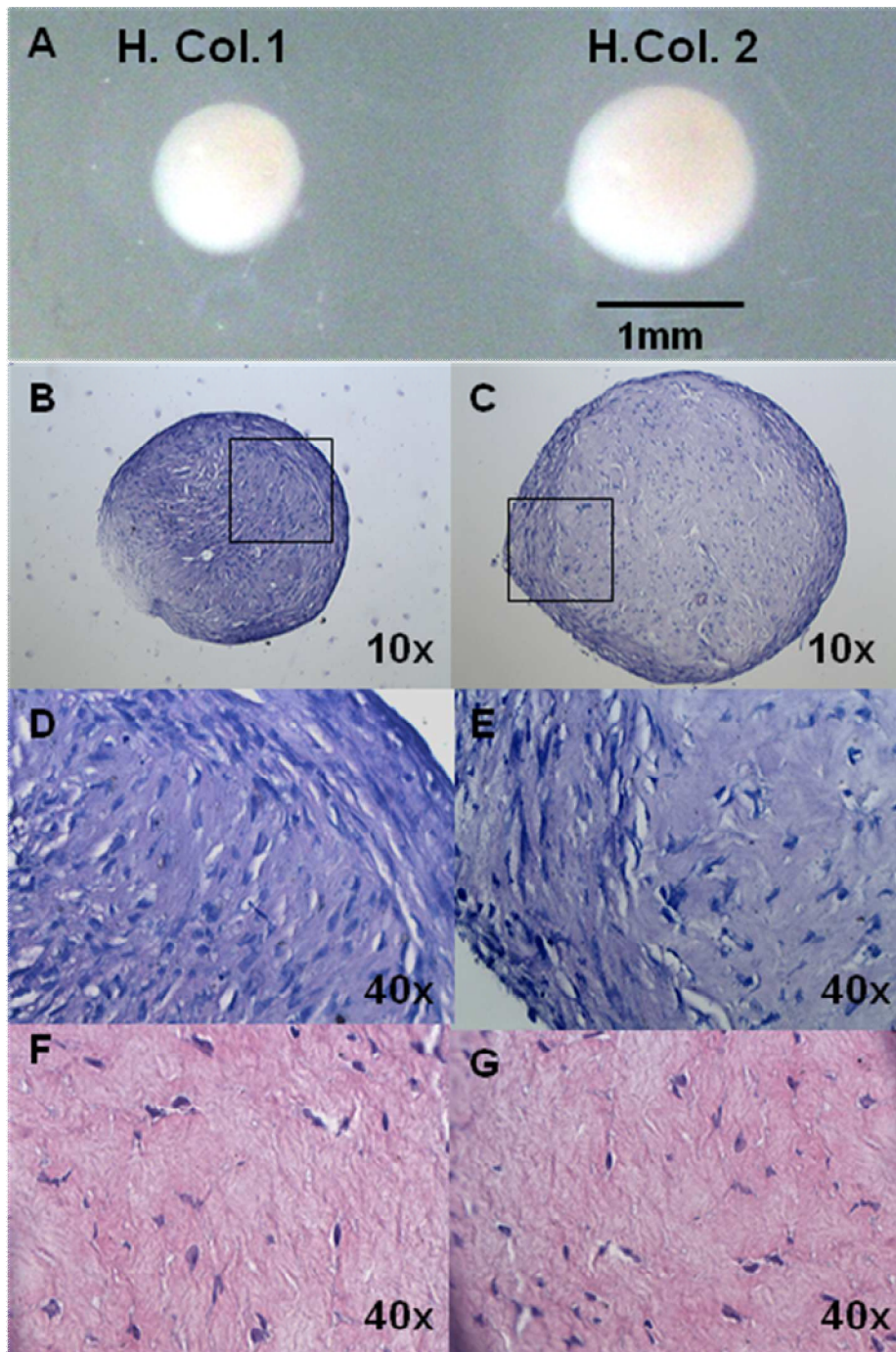


FIGURA 10: Fotos e micrografias do hidrogel de colágeno do tipo I (H. Col1) e do tipo II (H.Col.2) submetidos à diferenciação condrogênica. (A)- Fotos dos hidrogéis de colágeno após 3 semanas de diferenciação condrogênica, observa-se a coloração branca e a forma de uma esfera. (B-E). Fotos de microscopia óptica (B-C10x e D-E 40x) de cortes histológicos, corados com azul de toluidina, dos hidrogéis de colágeno, H. Col-1 (B e D) e H. Col.2 (C e E) respectivamente, após a diferenciação. Os retângulos representam o campo observado pelas fotos D e E. Observa-se a disposição das células e a coloração azulada mais intensa na região periférica do hidrogéis, indicando o acúmulo de proteoglicanas nesta região. F-G, Fotos de microscopia óptica (40x) de cortes histológicos, corados com HE, de H. Col-1 e H. Col.2 respectivamente. (n=4)

Na Figura 10B-E CE nota-se uma coloração azulada em toda a esfera dos hidrogéis de colágeno, tanto tipo I quanto do tipo II. As regiões periféricas dessas esferas apresentam uma maior coloração, evidenciando a expressão aumentada das proteoglicanas.

Análise da expressão gênica por PCR quantitativo após a diferenciação condrogênica

As análises da expressão gênica por PCR quantitativo foram realizadas a partir de RNA das células-tronco mesenquimais submetidas à diferenciação condrogênica em hidrogéis de colágeno. Foram escolhidos genes envolvidos com processos da diferenciação condrogênica e da sua matriz. Assim, analisamos a expressão de *colágeno do tipo I (Col-1)* e *colágeno tipo II (Col-2)*. O colágeno tipo I é uma proteína expressa na matriz extracelular principalmente de tecido ósseo, enquanto colágeno tipo II é a proteína mais expressa na matriz extracelular de tecido cartilaginoso em articulações⁸³. A expressão de agrecana (Agrec) e Sox-9 também foi analisada. Agrecana é uma proteína que se liga às estruturas das fibras de colágeno do tipo II dando as características físico/mecânicas de uma cartilagem articular⁸⁵. Sox-9, por sua vez, é um fator de transcrição envolvido na diferenciação condrogênica, sendo que a sua deficiência leva à malformação durante o desenvolvimento dos ossos e cartilagens⁸⁶. As concentrações dos iniciadores desenhados para a reação de PCR quantitativo foi padronizada. As concentrações escolhidas foram 150nM para *col-2* e 300 nM para *col-1*, *agrecana (agrec)* e *sox-9* (Figura 9).

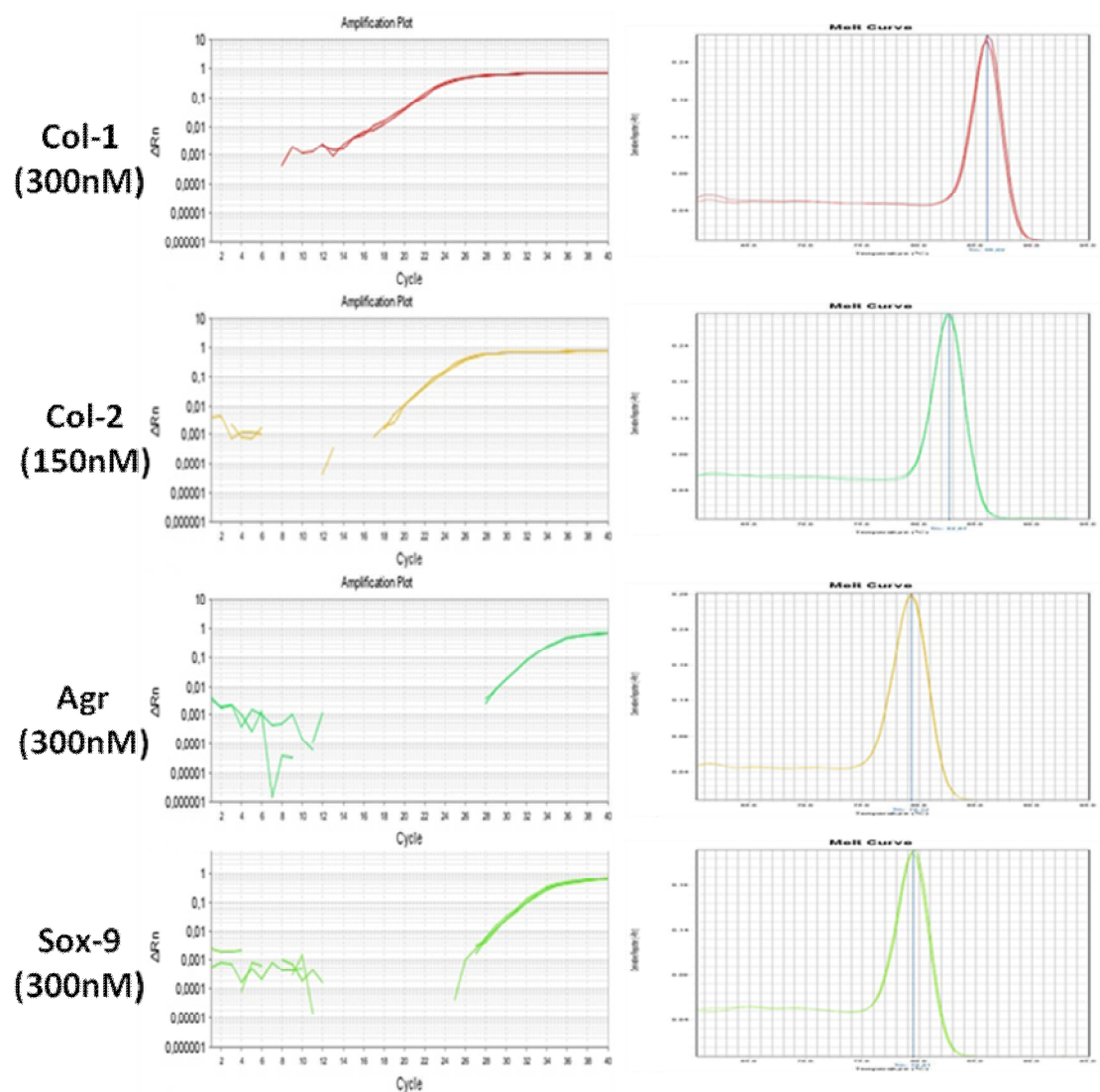


FIGURA 11: Intensidade de fluorescência e ciclos de amplificação e curvas de dissociação baseadas na temperatura de anelamento dos genes *col-1*, *col-2*, *agrecana* e *sox-9*. As curvas de amplificação estão ilustradas na primeira coluna. O eixo y indica o ΔRn (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos. As temperaturas resultantes da curva de dissociação estão demonstradas na segunda coluna. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores

A eficiência dos iniciadores para *col-1*, *col-2*, *agrecana* e *sox-9* foi verificada através de uma curva de diluição na ordem de 1:2 com 5 pontos. A eficiência ideal é de 100 % com valores toleráveis de 10 % a mais ou a menos. Após análise, os iniciadores foram considerados com ótima eficiência: 103,7% para *colágeno-1*, 97,8% para *colágeno-2*, 95.5% para *agrecana* e 95% para *sox-9*.

O estudo através de PCR quantitativo revelou aumento de expressão dos genes relacionados com a diferenciação condrogênica após três 3 semanas de cultura das células-tronco mesenquimais com os hidrogéis de colágeno em meio de cultura para diferenciação condrogênica (Figura 12). Comparou-se a expressão das células-tronco mesenquimais antes e após três semanas de diferenciação. O controle endógeno utilizado foi HPRT e todas as expressões foram normalizadas em relação às amostras de células-tronco mesenquimais indiferenciadas.

A expressão gênica de *colágeno do tipo II* teve um aumento acentuado em ambos os tipos de hidrogéis de colágeno, sendo cerca de 50 vezes [33,6 – 69,7] no hidrogel de colágeno do tipo I e 136 vezes [72,2 -257,3] no hidrogel de colágeno do tipo II (Figura 12-D), comparado com as células-tronco mesenquimais sem sofrer processo de diferenciação. Também nota-se aumento de expressão de do gene *sox-9* de 3,3 vezes [3,0-3,6] no hidrogel de colágeno do tipo I e de 5,6 vezes [4,17-7,6] no hidrogel de colágeno do tipo II (Figura 12-C).

O gene de *agrecana* aumentou 8 vezes [7,7-9,1] e 14 vezes [10,6-19,4], nos hidrogéis de colágeno tipo I e II, respectivamente (Figura 9-B). Já o gene do *colágeno do tipo I* teve um leve aumento na sua expressão durante a diferenciação em ambos os hidrogéis 5,9[5,4-6,5] vezes e 6,3 [5,3-7,5] vezes, respectivamente (Figura12-A). Não houve diferença estatística na expressão gênica entre os dois tipos de hidrogéis de colágeno.

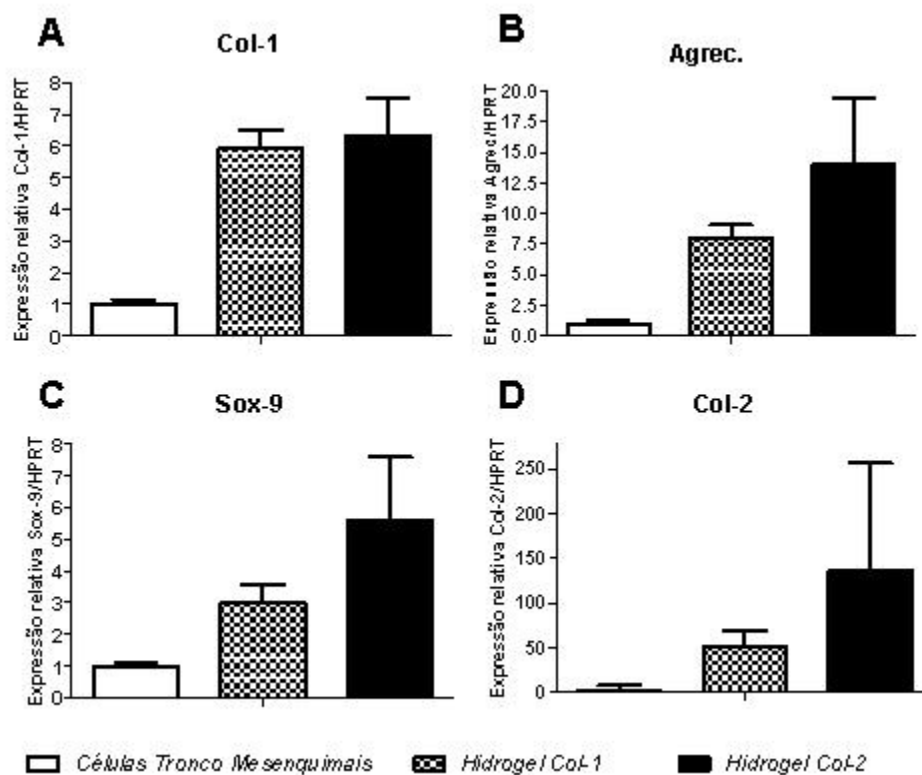


FIGURA 12: Expressão de *colágeno-1* (A), *agrecana* (B), *sox-9* (C) e *col-2* (D). PCR quantitativo foi realizado a partir de cDNA de células-tronco mesenquimais e de células em meio de diferenciação condrogênica nos hidrogéis de colágeno. O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão *col-1* (A), *agrec.*(B) *sox-9* (C) e *col-2* (D) em que células-tronco mesenquimais foram utilizadas como amostra calibradora (valor=1). Note o aumento de expressão de todos os genes testados nas amostras de células-tronco mesenquimais submetidas à diferenciação condrogênica em hidrogéis de colágeno em comparação com células-tronco mesenquimais sem diferenciação. Análise estatística não mostra diferença significativa entre os grupos de colágenos (n=2)

Expressão de Glicosaminoglicanas (GAGs).

Durante a diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais junto ao Hidrogel de colágeno do tipo II, observa-se o aumento da expressão de glicosaminoglicanas durante os dias 7 e 14 de diferenciação. No dia 0 de diferenciação, o nível de GAGs é quase que nulo (Figura 13) e nos dias 7 e 14 da diferenciação ocorre um aumento no nível de GAGs de aproximadamente 7ug e 12 ug nos hidrogéis, respectivamente (Figura 13)

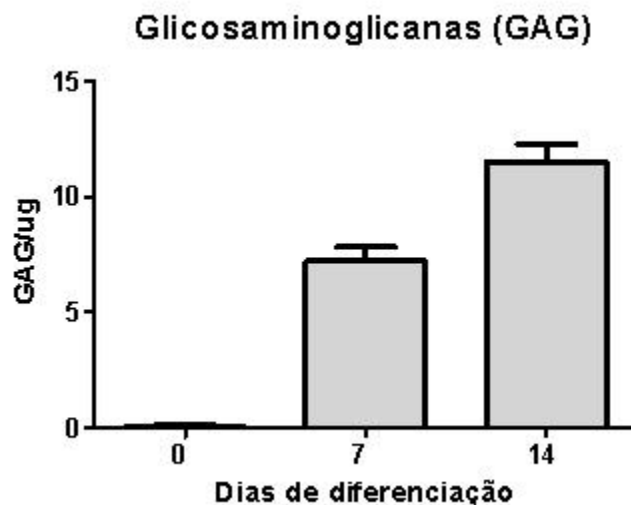


FIGURA 13. Aumento de expressão das glicosaminoglicanas durante a diferenciação condrogênica.(n=2)

Experimentos *in vivo* de células-tronco mesenquimais com hidrogéis de colágeno para reparo cartilaginoso

Modelo experimental

O modelo experimental com coelhos foi bem sucedido, após doze semanas da cirurgia para lesão cartilaginosa, foram realizadas análises das cartilagens e não foi observada recuperação tecidual da região lesada dos joelhos sem tratamento. Na Figura 12-B está representado um joelho de coelho que sofreu uma lesão em sua cartilagem e não foi submetido a tratamento. Pode-se observar que não houve recuperação da área lesionada após dez semanas

Experimentos *in vivo* foram realizados a partir de implantes de células-tronco mesenquimais e dos hidrogéis de colágeno do tipo II nas lesões cartilaginosas do joelhos dos coelhos. O implante do hidrogel com ou sem células-tronco mesenquimais nos coelhos não desencadeou processo inflamatório pós-cirúrgico, os coelhos não tiveram diferença comportamental com ou sem implante e andaram normalmente pela gaiola após os implantes. Após 12 semanas os coelhos foram sacrificados e seus joelhos retirados e submetidos a análises macroscópica e microscópica.

Análises macroscópicas das lesões

A Figura 14 mostra imagens macroscópicas do local onde foram feitas as lesões cartilaginosas após doze semanas da cirurgia, em que se observa tecido preenchendo os locais lesionados dos dois joelhos, tratados ou não com células-tronco mesenquimais. A análise macroscópica revelou grande diferença entre os joelhos tratados com hidrogel de colágeno do tipo II e células-tronco mesenquimais e joelhos tratados somente com hidrogel de colágeno do tipo II. Enquanto os joelhos tratados só com hidrogel de colágeno apresentam apenas um pequeno preenchimento da lesão, observamos que joelhos que receberam células-tronco mesenquimais e o hidrogel de colágeno do tipo II tiveram um maior preenchimento da lesão

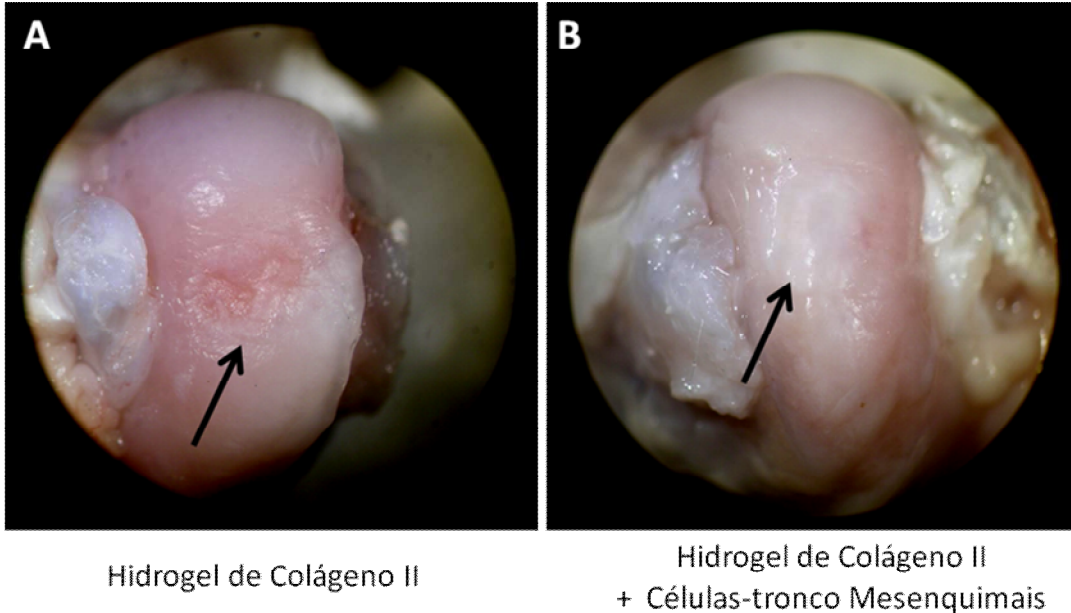


FIGURA 14: Lesões cartilaginosas dos joelhos lesionados e submetidos a tratamento (A) Imagem de um joelho tratado somente com hidrogel de colágeno. (B) Imagem de um joelho tratado com hidrogel de colágeno e células-tronco mesenquimais. Nota-se um tecido esbranquiçado preenchendo a lesão.(n=4).(Imagens de todos os joelhos estão no Anexo I)

Avaliações macroscópicas dos joelhos foram realizadas por três observadores não relacionados com o projeto e de maneira duplo-cego. Cada observador avaliou as lesões de oito joelhos (quatro controles e quatro tratados) e a média das avaliações está descrita na Figura 15. Os joelhos tratados com células-tronco mesenquimais apresentaram uma maior porcentagem de preenchimento da lesão do que os animais tratados somente com hidrogéis de colágeno.

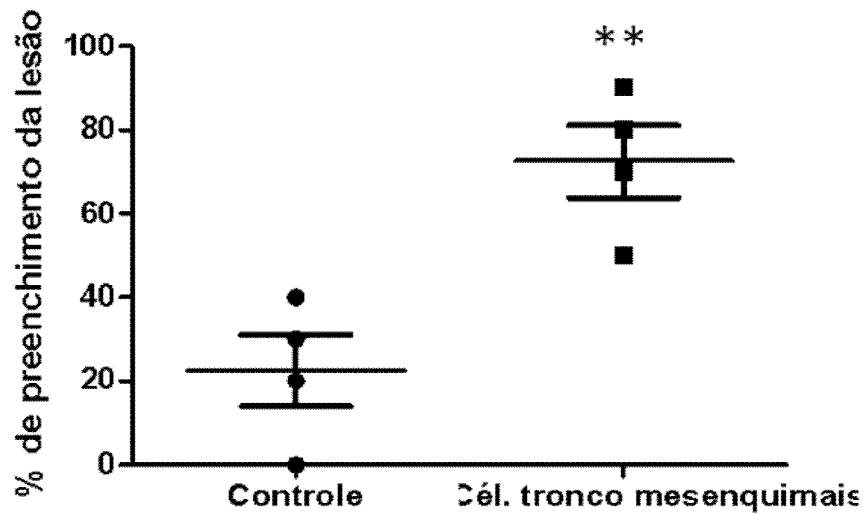


Figura 15: Gráfico da porcentagem de preenchimento das lesões cartilaginosas do joelho dos coelhos. (teste t , pareado (two tailed)n=4, ** p<0,01)

Com o objetivo de avaliarmos os implantes e as suas características microscópicas, foram realizados cortes histológicos dos joelhos dos coelhos na região da lesão cartilaginosa.

Imagens de cortes histológicos de uma cartilagem hialina do joelho de um coelho estão representadas na figura 15. Observa-se a organização desse tecido com condrócitos dispersos na matriz extracelular. De acordo com a localização no tecido cartilaginoso, os condrócitos apresentam formas diversas. Na periferia da cartilagem, estas células apresentam forma elíptica, enquanto que na região central do tecido, apresentam uma morfologia arredondada, formando pequenos grupos celulares com até oito células, chamados grupos isógenos. O processo histológico provoca retração dos condrócitos e da matriz, permitindo a observação das lacunas entre as células e a matriz.

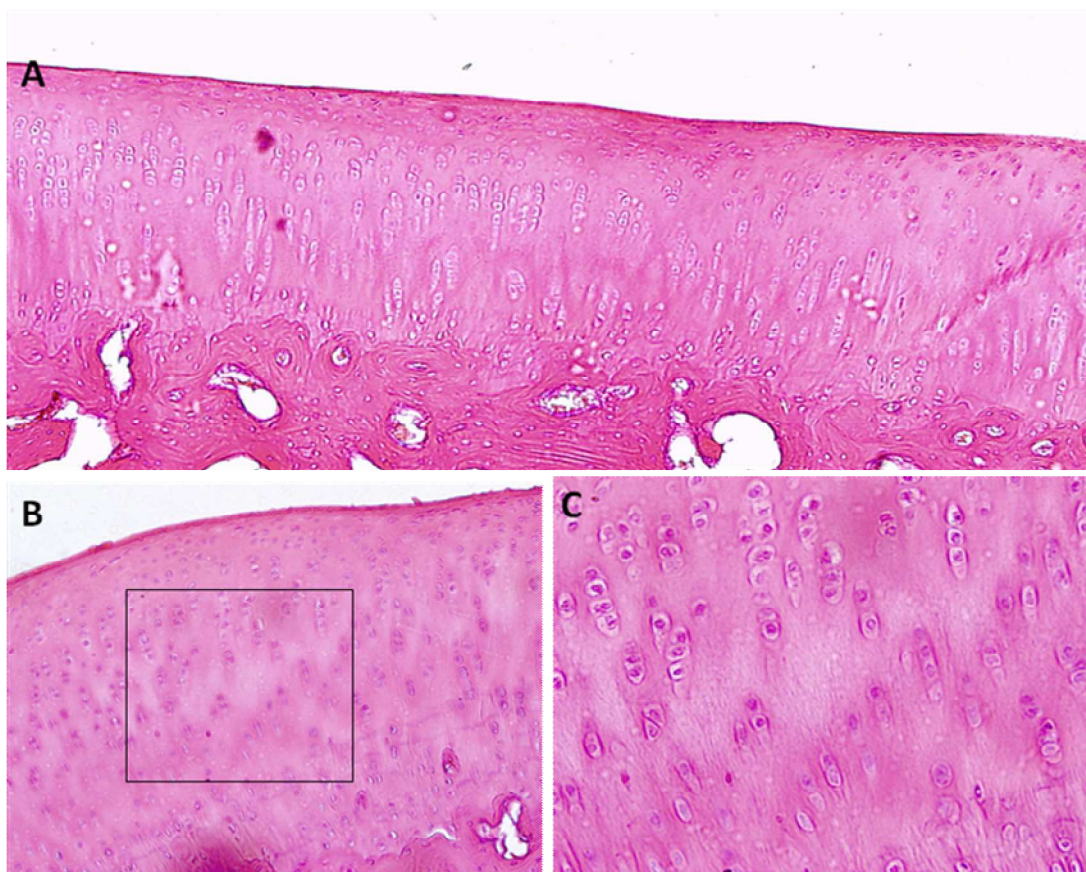


Figura 16. Cortes histológicos corados em HE da cartilagem hialina do joelho de coelho. (A) Imagem com aumento de 10X da cartilagem, nota-se o osso sub-condral logo abaixo da cartilagem e vários grupos isogénos. (B) Imagem com aumento de 20X da cartilagem. (C) Imagem com aumento de 40 X. Nota-se a organização celular e da matriz extracelular.

Na figura 16 estão representadas imagens de cortes histológicos das lesões cartilaginosas com os implantes de hidrogel de colágeno do tipo II. Nota-se que nesse implante formou-se um tecido desestruturado, com ausência de células. Observe que parte desse material se encontra dissociado evidenciando uma desorganização da matriz, a qual apresenta alguns infiltrados que separam o material da cartilagem. Em imagens de maior aumento fica evidenciada a ausência de células.

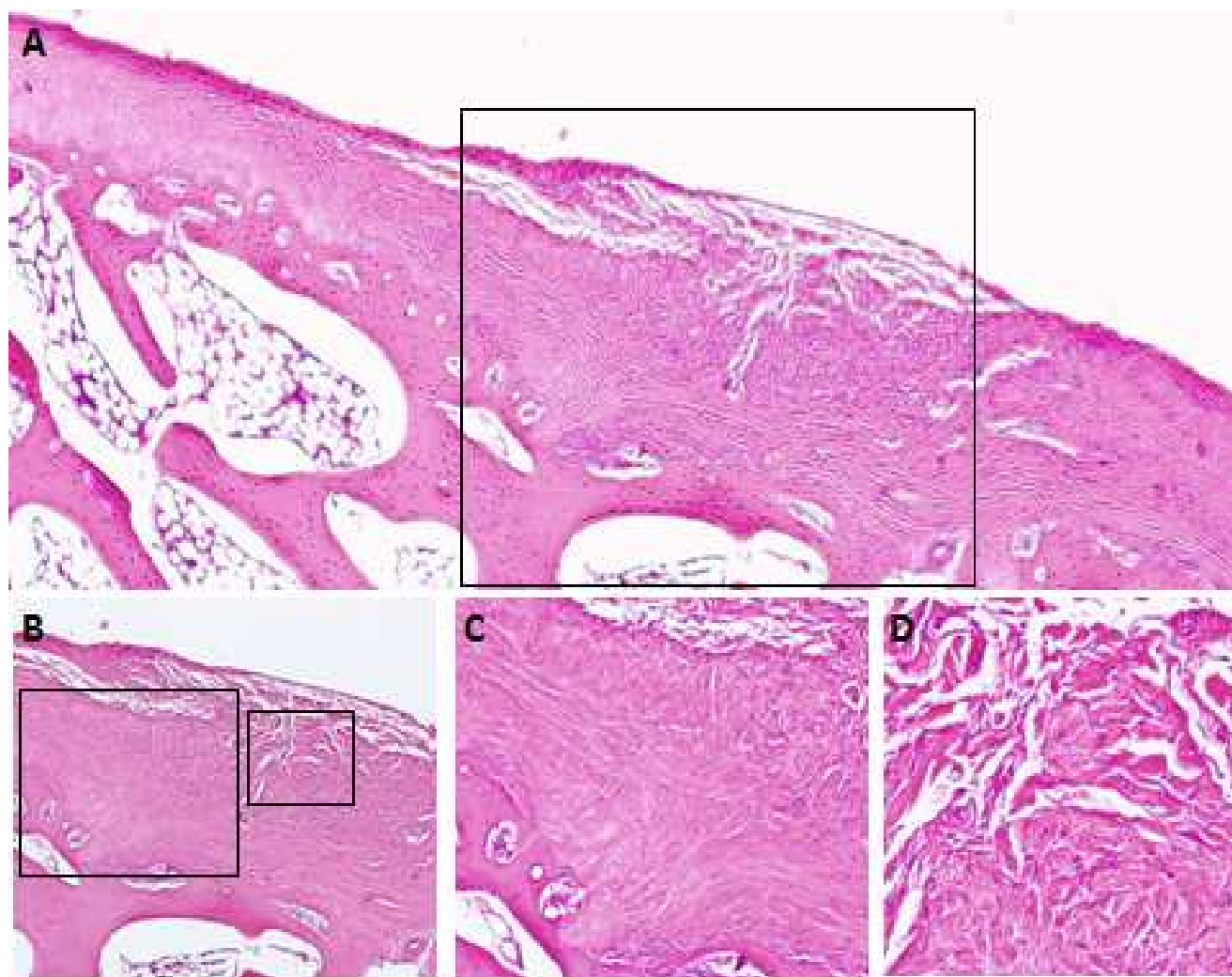


FIGURA 17. Cortes histológicos corados em HE da cartilagem hialina do joelho de coelho tratado somente com hidrogel de colágeno do tipo II. (A) Imagem com aumento de 4X da lesão cartilaginosa da lesão tratado com hidrogel. Nota-se que o local da lesão é formado por um tecido desestruturado e sem células. (B) Imagem com aumento de 10X da lesão. (C) Imagem com aumento de 20 X de uma região da lesão com hidrogel, com ausência de células na região. (D) Imagem com aumento de 40 X de uma região da lesão cartilaginosa com hidrogel de colágeno. Note a dissociação tecidual.

Nas Figuras 17 e 18 observam-se regiões onde foram implantados o hidrogel de colágeno do tipo II com as células-tronco mesenquimais. Nota-se que essas regiões foram parcialmente preenchidas por uma matriz extracelular e por grupos celulares. Em ambas as figuras observamos grandes grupos celulares que preenchem parte da lesão cartilaginosa.

Na figura 17, observam-se diversos grupos celulares na matriz (grupos com cerca de 30-50 células em meio a uma matriz extracelular) e uma região dissociada, sem

integração com a cartilagem ao seu redor. Nota-se também que a espessura desse tecido é menor do que o tecido cartilaginoso ao seu redor, mostrando que não houve completo preenchimento da lesão.

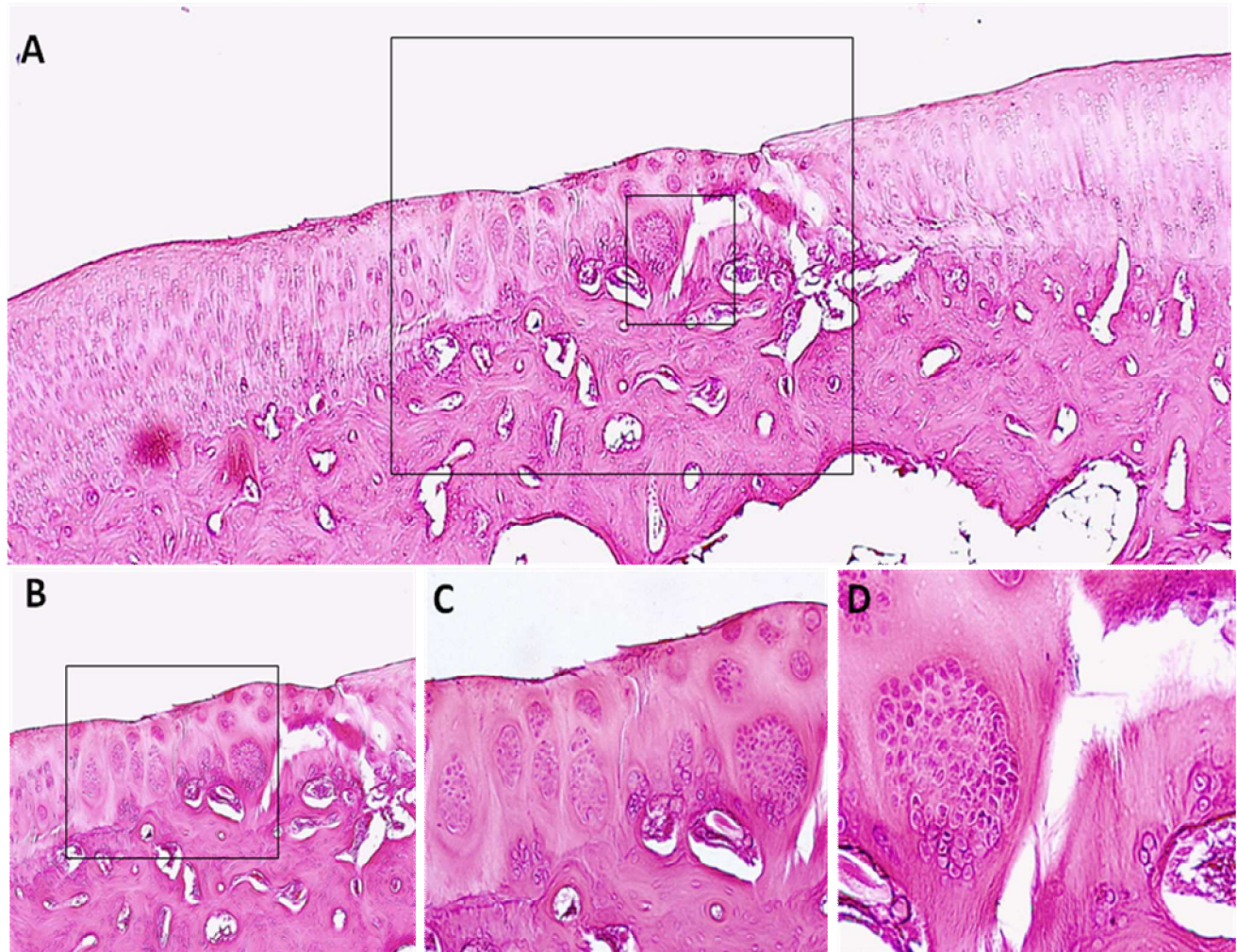


FIGURA 18. Cortes histológicos corados em HE da cartilagem hialina do joelho de coelho tratados com hidrogel de colágeno do tipo II e células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo. (A) Imagem com aumento de 4X da lesão cartilaginosa da lesão tratado com hidrogel e células-tronco mesenquimais. Nota-se que o local da lesão é formado por um tecido semelhante a matriz extracelular e por conglomerados de células. (B) Imagem com aumento de 10X e (C) de 20X de uma região do implante, com conglomerados celulares. (D) Imagem com aumento de 40X de um conglomerado celular.

Na figura 18, observa-se uma região cartilaginosa com o implante do hidrogel e das células. Nota-se que o tecido de preenchimento da lesão é menor que o tecido cartilaginoso adjacente. Também observa-se uma região com um aglomerado celular (Figura 18 B e C) e outra região sem células (figura 18 D).

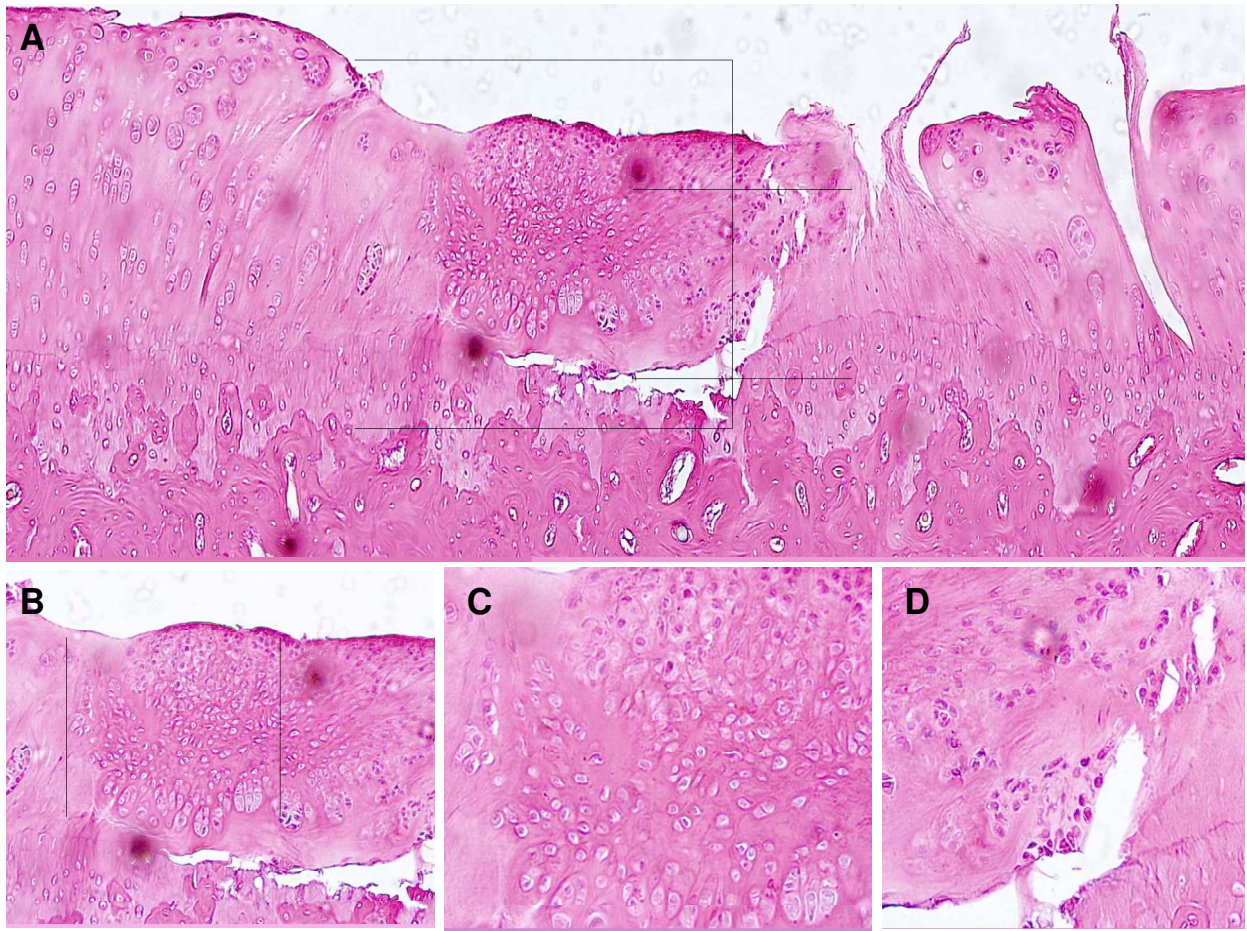


FIGURA 19. Cortes histológicos corados em HE da cartilagem hialina do joelho de coelho tratado com hidrogel de colágeno do tipo II e células-tronco mesenquimais do tecido adiposo. (A) Imagem com aumento de 4X da lesão cartilaginosa da lesão tratado com hidrogel e células-tronco mesenquimais. Nota-se que o local da lesão é formado por um tecido semelhante a matriz extracelular e por conglomerados de células. (B) Imagem com aumento de 10X e (C) de 20X de uma região do implante, com conglomerados celulares. (D) Imagem com aumento de 40X de um conglomerado celular.

Geração do segundo harmônico

Com a utilização do segundo harmônico é possível observar a agregação, orientação e a intensidade de colágeno entre as células e a matriz extracelular. Analisando as imagens (figura 20) da geração de segundo harmônico do tecido cartilaginoso, é possível observar a orientação das fibras de colágeno na matriz extracelular. Essa orientação é tangencial à superfície cartilaginosa. Também é importante notar que existe uma maior intensidade das fibras de colágeno na região profunda do tecido cartilaginoso, na qual as fibras se encontram em maior concentração e com orientação paralela aos núcleos isogênicos dos condrócitos.

Nota-se que logo abaixo, no tecido ósseo sub-condral, não há orientação das fibras de colágeno, isso devido às características desse tecido que é uma interface da cartilagem com o tecido ósseo.

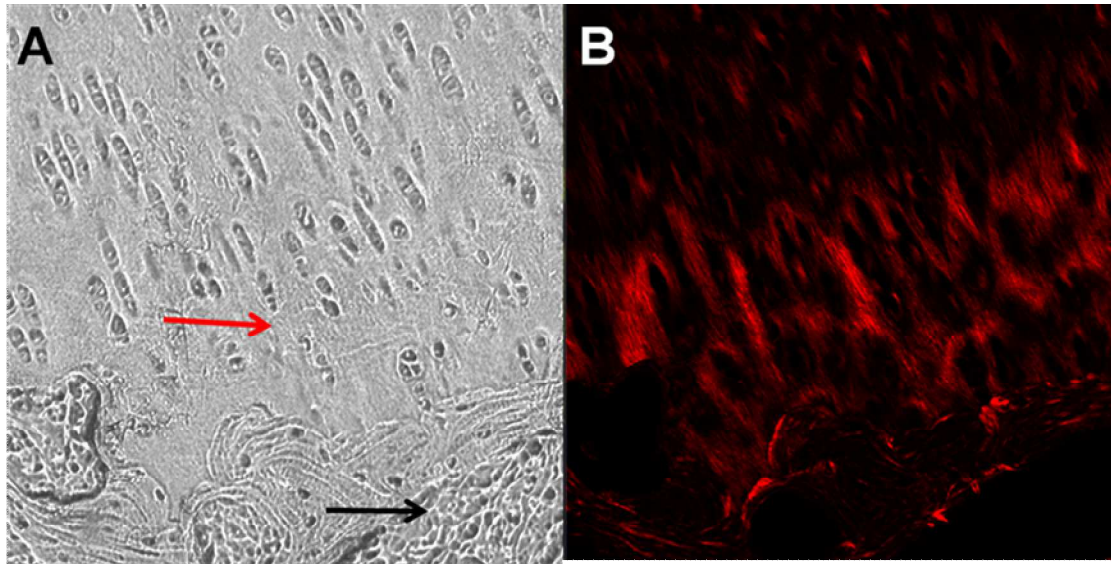


FIGURA 20. Microscopia óptica e geração de segundo harmônico de cortes histológicos de cartilagem articular de joelho de coelhos. (A) microscopia óptica , seta vermelha indica a região cartilaginosa e a seta preta indica a região do osso sub condral. (B) geração de segundo harmônico, em vermelho são fibras de colágeno, alinhadas na cartilagem articular.

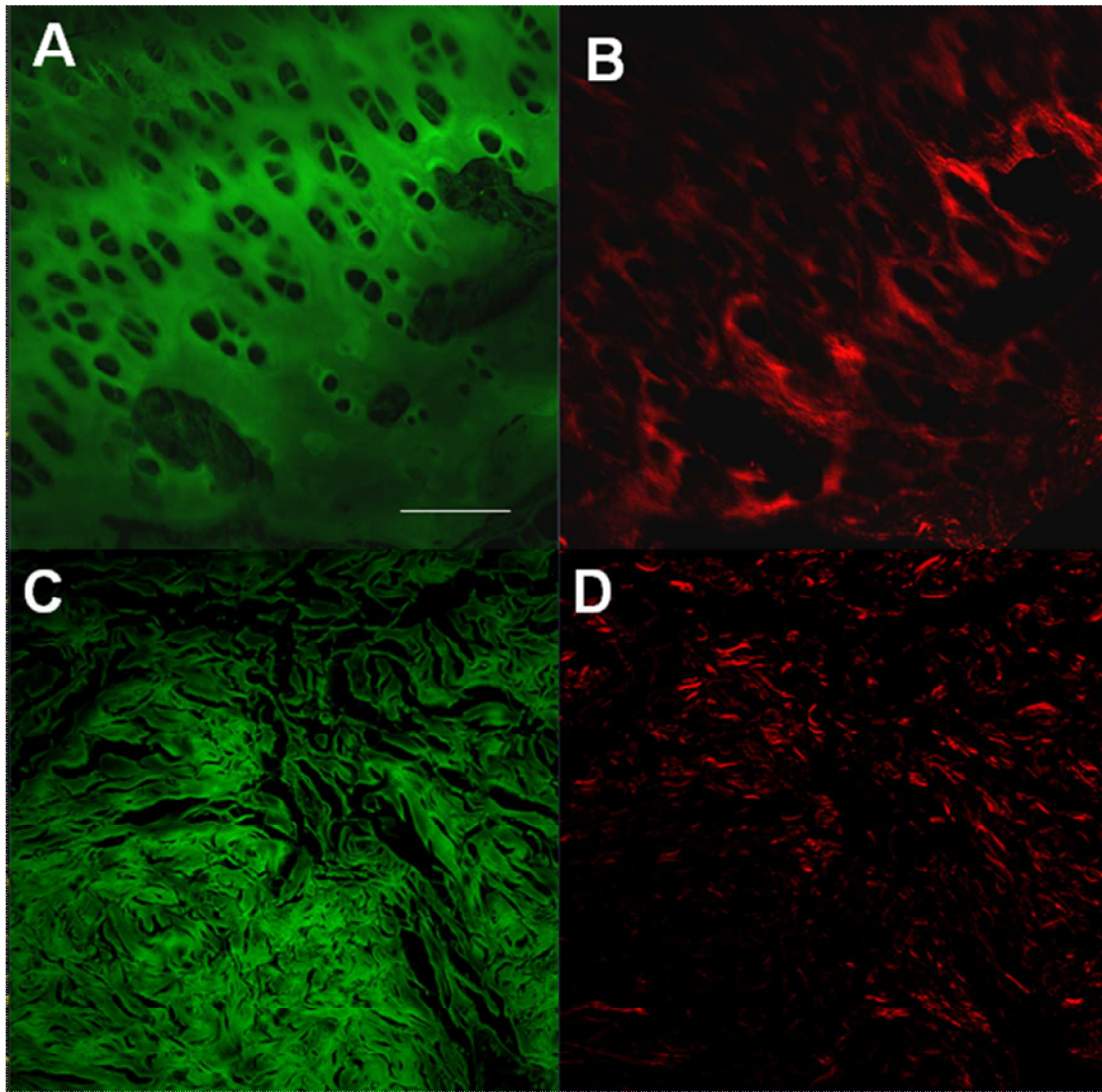


FIGURA 21. Microscopia confocal e de segundo harmônico de cortes histológicos de um tecido cartilaginoso saudável e da lesão do joelho dos coelhos. (A) microscopia confocal de uma cartilagem saudável; em verde é a auto fluorescência do tecido, observa-se nos espaços vazios os locais onde os condrócitos se localizavam. (B) geração do segundo harmônico de uma cartilagem saudável; em vermelho as fibras de colágeno alinhadas. (C) microscopia confocal das lesões cartilaginosas, na qual foi implantado hidrogel de colágeno do tipo II: em verde nota-se a auto-fluorescência do tecido evidenciando a desestruturação do tecido formado. (D) imagem gerada por segundo harmônico da mesma região do implante do hidrogel: em vermelho são as fibras de colágeno que estão totalmente desalinhadas. Escala (barra branca) 50 μm .

Na figura 21 é possível a diferença entre as fibras de colágeno de uma região cartilaginosa normal e de uma lesão cartilaginosa preenchida com hidrogel de colágeno do tipo II. Além da desestruturação do tecido formado pelo implante de colágeno, nota-se que não existe orientação nas fibras de colágeno, ao contrário de uma cartilagem normal.

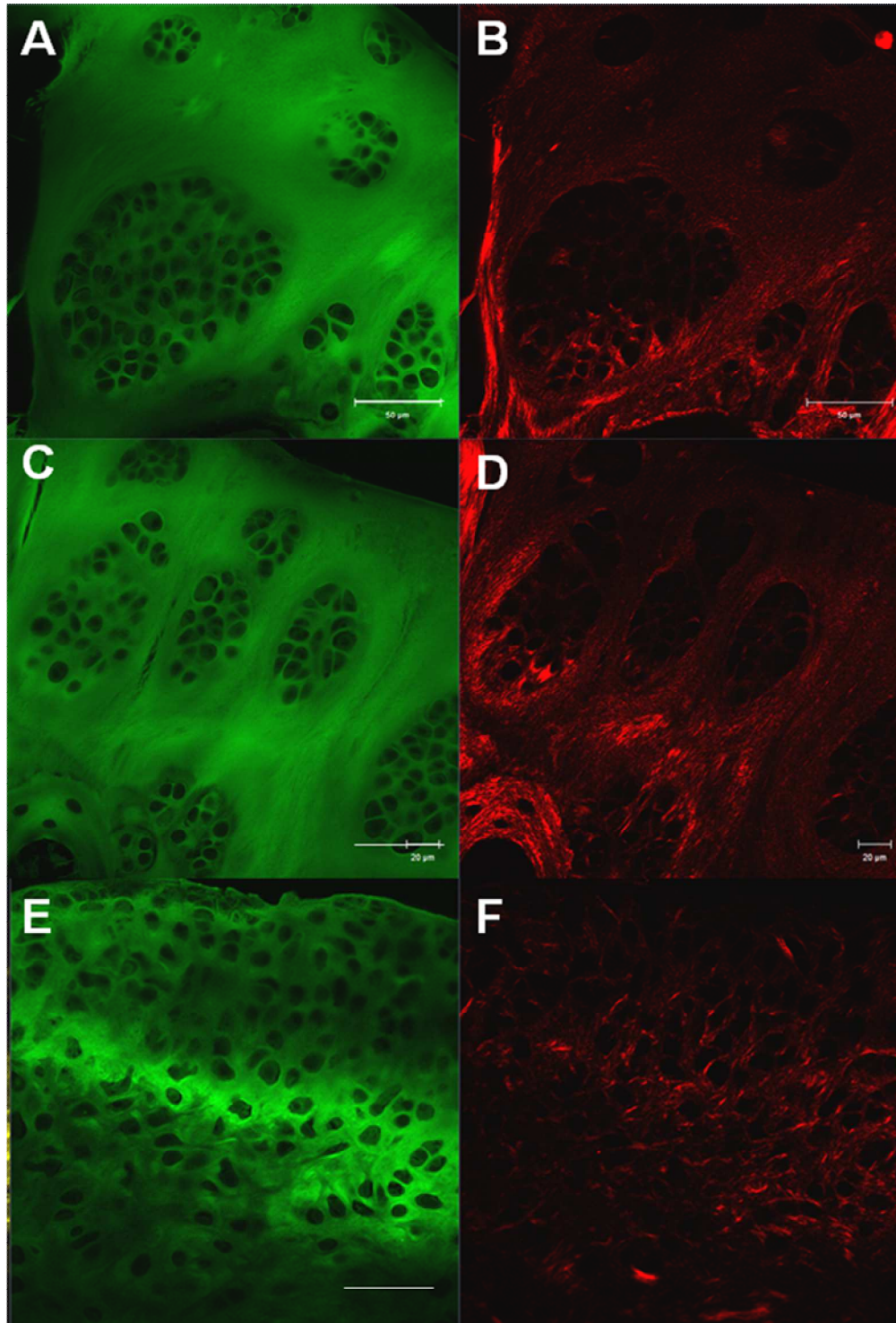


FIGURA 22. Microscopia confocal e de segundo harmônico de cortes histológicos dos implantes das células-tronco mesenquimais com hidrogeis de colágeno do tipo II no joelho dos coelhos. (A, C, E) microscopia confocal de um implante: a auto fluorescência do tecido é observado em verde, os espaços vazios são locais onde as células mesenquimais se localizavam. (B, D, F) geração do segundo harmônico do implante das células-tronco mesenquimais: em vermelho as fibras de colágeno alinhadas. Escala (barra branca) 50 µm

Na figura 22 observa-se a geração de segundo harmônico dos implantes com as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e do hidrogel de colágeno. Nota-se que apesar da morfologia e da organização celular ser diferente de uma cartilagem normal, existe uma certa orientação das fibras de colágeno. As fibras encontram-se perpendiculares à superfície cartilaginosa e com uma maior intensidade nas regiões onde existem mais agregados celulares. Acredita-se que talvez essas fibras de colágeno possam ter sido expressas pelas próprias células implantadas, possivelmente durante uma diferenciação condrogênica, e por isso apresentam certa organização na sua orientação, diferentemente das fibras de colágeno do hidrogel que mostram desorganizadas (Figura 22)

Discussão

As células-tronco mesenquimais surgiram como uma importante fonte celular para o reparo de tecidos lesionados. Estudos na literatura têm descrito a capacidade dessas células em se diferenciar em diversos tipos celulares e sua aplicabilidade no tratamento de doenças cardíacas, lesões cartilaginosas, reparos ósseos entre outras disfunções e lesões. O desenvolvimento de novos biomateriais e suas aplicações na medicina, acoplado aos estudos das células-tronco mesenquimais surge como um novo campo de conhecimento que chamamos de bioengenharia. Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho foi estudar as propriedades das células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo e sua interação com um biomaterial de colágeno do tipo II, tanto para suporte na diferenciação condrogênica, como para o reparo cartilaginoso.

Muitos estudos demonstram que o tecido adiposo é uma fonte alternativa de células-tronco, pois as células mesenquimais provenientes deste tecido possuem as mesmas características das células mesenquimais provenientes da medula óssea^{57,87,88}. Nossos resultados demonstram que o tecido adiposo proporciona uma grande quantidade de células-tronco mesenquimais, capazes de diferenciar nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. Estas células também apresentam capacidade de proliferação, evidenciada pelo ensaio de incorporação de BrdU. Estas características, combinadas com a facilidade de obtenção desse tecido, quando comparadas às outras fontes, tornam o tecido adiposo uma promissora fonte de células-tronco mesenquimais para a utilização na prática clínica.

Inicialmente, neste trabalho, foram estudados biomateriais de colágeno do tipo I e do tipo II. O colágeno é facilmente processado durante o desenvolvimento dos biomateriais para constituir moldes porosos, esponjas, filmes e hidrogéis⁸⁹. Nossos resultados demonstram que ambos os biomateriais de colágeno I e tipo II são maleáveis, podendo formar tanto moldes porosos como hidrogéis. Porém, resultados de experimentos *in vitro* com as células-tronco mesenquimais, demonstram que os moldes porosos não conferem às células uma distribuição homogênea, ou seja, as células se concentraram na periferia dos moldes, enquanto a região central apresentou um baixo número de células. Esta baixa distribuição celular dentro do material deve ser consequência de algumas características do biomaterial poroso, principalmente o pequeno tamanho dos poros e as suas poucas

interconexões. Outros estudos demonstraram essa mesma dificuldade em se trabalhar com os moldes porosos^{79,90}.

Ao contrário dos moldes porosos, os hidrogéis de colágeno são materiais versáteis, que não apresentam forma definida, possibilitando uma combinação homogênea com as células-tronco mesenquimais. Outro dado importante sobre os hidrogéis é a facilidade de sua utilização para preenchimento das lesões cartilaginosas. No presente trabalho, não só utilizamos colágeno do tipo II para formar os hidrogéis, como também adicionamos ao material um pouco de fibrinogênio e trombina, que ao serem, misturados formam fibrina e se tornam abrasivos. Esta adição de fibrina ao biomaterial de colágeno adicionou a propriedade de adesão do material ao substrato, que pode ser uma lesão cartilaginosa ou uma placa de cultura. Diversos trabalhos também utilizam fibrina na composição do biomaterial, conferindo a mesma propriedade abrasiva que identificamos⁹¹. Estudos realizados por Saey e colaboradores demonstram que a utilização de fibrina junto com células-tronco mesenquimais não afeta a diferenciação condrogênica e estes resultados são semelhantes ao que apresentamos nesse trabalho⁹².

No presente trabalho também avaliamos a expressão de genes envolvidos com a formação de tecido cartilaginoso e sua matriz extracelular em células-tronco mesenquimais submetidas à diferenciação condrogênica em hidrogéis de colágeno. Dentre os genes estudados, encontram-se o *colágeno I* e *colágeno II*. A matriz cartilaginosa dos joelhos é formada por diversos tipos de colágeno: III, VI, IX, X, XI, XII e XIV, mas o colágeno do tipo II é a principal proteína na formação da matriz extracelular. As interações entre os condrócitos e a matriz extracelular cartilaginosa, formada principalmente por colágeno do tipo II, são importantes para a manutenção da estrutura cartilaginosa, mantendo o fenótipo celular, controlando a proliferação celular, diferenciação condrogênica, a difusão de nutrientes e as características físicas e químicas da cartilagem⁹³. Em ambos os hidrogéis, as células-tronco mesenquimais apresentaram aumento na expressão de *colágeno-1*, *colágeno-2*, *angrecana* e *sox-9*, em comparação com as células-tronco mesenquimais que não foram submetidas à diferenciação. O gene que apresentou maior aumento de expressão foi o *colágeno-2* (aumento de mais de 100 vezes no hidrogel de colágeno do tipo II). Comparando-se os dois hidrogéis de colágeno, não houve diferença estatística significativa na expressão gênica. O aumento na expressão destes genes indica que os biomateriais de colágeno tipo I e tipo II influenciam e regulam positivamente a diferenciação condrogênica

das células-tronco mesenquimais. Corroborando nossos resultados, outros estudos têm demonstrado que condrócitos cultivados em biomateriais de colágeno do tipo I mantêm a expressão de componentes da matriz extracelular cartilaginosa, como colágeno II e proteoglicanas⁹⁴, favorecendo a regeneração cartilaginosa em experimentos *in vivo*^{69,95}. Existem poucos trabalhos com hidrogéis de colágeno do tipo II, devido às dificuldades e ao custo elevado para a extração dessa proteína, além da dificuldade da solubilização e formação do hidrogel⁸⁰. Porém alguns estudos mostraram que células-tronco mesenquimais em contato com hidrogéis de colágeno do tipo II apresentaram uma maior diferenciação condrogênica quando comparados com hidrogéis de colágeno do tipo I, evidenciado por uma expressão acentuada de genes relacionados com a matriz extracelular do tecido cartilaginoso^{90,96}.

A modulação na expressão gênica das células-tronco mesenquimais foi acompanhada pelo aumento na produção de glicosaminoglicanos (GAG) durante a diferenciação condrogênica. Este aumento está relacionado com a diferenciação das células mesenquimais em tecido cartilaginoso. Nas cartilagens, os condrócitos sintetizam os vários tipos de proteoglicanos que formam um complexo supramolecular junto com a matriz colagênica, que confere a este tecido a capacidade de resistir a forças de alta compressão, além de estar envolvido no crescimento e remodelação do tecido. Essa remodelação está relacionada com a mudança estrutural no hidrogel de colágeno que observamos durante a diferenciação condrogênica, em que o hidrogel se transforma de um material translúcido e viscoso, para uma estrutura esbranquiçada e com formato redondo. Esses dados se correlacionam com os obtidos por Bosnakovski e Nötch, que induziram a diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais de medula óssea em hidrogéis de colágeno tipo II e tipo I e também observaram aumento das GAGs e a mudança estrutural dos hidrogéis^{80,90}.

Os experimentos com os hidrogéis de colágeno do tipo II e com as células-tronco mesenquimais humanas no modelo animal foram bem sucedidos. A princípio existiam dúvidas quanto à possibilidade de utilizar as células-tronco mesenquimais humanas em coelhos, devido à possibilidade de rejeição dessas células. Porém, não observamos nenhum processo de rejeição por parte do coelho, pois não houve resposta inflamatória após a cirurgia e também não foram observadas infiltrações linfocitárias e de macrófagos na região lesada após 12 semanas do implante. Isto foi observado tanto nos joelhos que receberam

hidrogel de colágeno do tipo II sem células quanto nos joelhos em que foram implantados o mesmo hidrogel com as células-tronco mesenquimais. Dados semelhantes foram mostrados em trabalhos com células-tronco mesenquimais humanas em reparos cartilagosos no modelo animal com coelhos^{65,97}. Estes trabalhos também não relatam a rejeição das células nos implantes e nenhum utiliza drogas, como ciclosporina A, para promover imunossupressão^{65,97}.

Análises macroscópicas das lesões dos joelhos após 12 semanas foram realizadas e observamos que as lesões cartilagosas tratadas com hidrogéis de colágeno tiveram o local parcialmente preenchido por um tecido esbranquiçado. Quando comparamos com as lesões cartilagosas tratadas com os implantes de hidrogéis de colágeno do tipo II e com as células-tronco mesenquimais, notamos um maior preenchimento das lesões, indicando que as células tiveram um efeito positivo no tratamento. Após análises microscópicas de cortes histológicos das regiões das lesões, observamos que as células e o hidrogel de colágeno do tipo II implantados mantiveram-se aderidos nas lesões e na cartilagem adjacente, e formou-se uma matriz extracelular para dar suporte a este implante. Apesar dessa adesão, observamos que a organização estrutural dessas células e dessa matriz não se assemelha ao tecido normal. Foram formados diversos agregados celulares na região contendo dezenas de células e algumas regiões com células dispersas, ao contrário da organização tecidual encontrada em tecido normal, em que os condrócitos ficam dispersos na matriz extracelular formando apenas alguns grupos celulares de oito células. É interessante ressaltar que os implantes celulares tiveram uma boa adesão ao osso subcondral além de ter uma integração com o tecido adjacente da lesão. Apesar dos implantes dos hidrogéis de colágeno do tipo II sem as células-tronco mesenquimais terem formado um pequeno tecido de preenchimento da lesão (observado macroscopicamente e microscopicamente), as imagens dos cortes histológicos desse tecido mostram que existe desestruturação da matriz extracelular. Esse resultado está sendo estudado com mais detalhes para a aplicação desse material em outros estudos envolvendo regeneração cartilaginosa.

A aquisição de imagens dos tecidos formados nas lesões cartilagosas por técnicas de microscopia de geração de segundo harmônico são capazes de revelar interações das formadas pelas fibras de colágenos, exibindo a rede de colágeno da matriz extracelular⁹⁸. Esta técnica é capaz de mostrar como essas fibras estão organizadas em diferentes tecidos. Neste trabalho, mostramos que a rede de colágeno no tecido ósseo da região subcondral da

cartilagem exibe uma organização totalmente diferente da encontrada no tecido cartilaginoso. Enquanto que no tecido ósseo as proteínas de colágeno encontram-se desalinhadas umas das outras, no tecido cartilaginoso as fibras de colágeno são encontradas alinhadas uma às outras em posição transversal ao osso. Observamos que essas fibras possuem concentração maior na região hipertrofiada da cartilagem próxima ao osso subcondral. Quando analisamos as fibras de colágeno do hidrogel implantado sem as células-tronco mesenquimais, observamos desorganização dessas fibras, enquanto que no hidrogel implantado com células, observamos a formação de fibras de colágeno alinhadas umas às outras, como no tecido cartilaginoso saudável. Esse resultado indica que as células-tronco mesenquimais implantadas foram capazes de formar fibras de colágeno junto à matriz extracelular, promovendo características semelhantes ao tecido normal. Essa organização molecular das fibras de colágeno pode ter promovido um suporte adequado as células implantadas e a matriz extracelular resultando em um tecido mais organizado.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou a diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo em hidrogel de colágeno do tipo II. O estudo também identificou a aplicabilidade desse material para reparo cartilaginoso, que foi capaz de formar uma matriz extracelular para suporte a implantes celulares. Os achados aqui descritos sugerem que o hidrogel de colágeno do tipo II pode ser utilizado como um biomaterial para reparo cartilaginoso e as células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo podem ser utilizadas como fonte celular. Os resultados obtidos neste trabalho são muito promissores e vão estimular novas investigações, porém são necessários maiores estudos para uma aplicação eficiente e segura dessas células e desse biomaterial no reparo cartilaginoso.

Conclusão

CONCLUSÃO

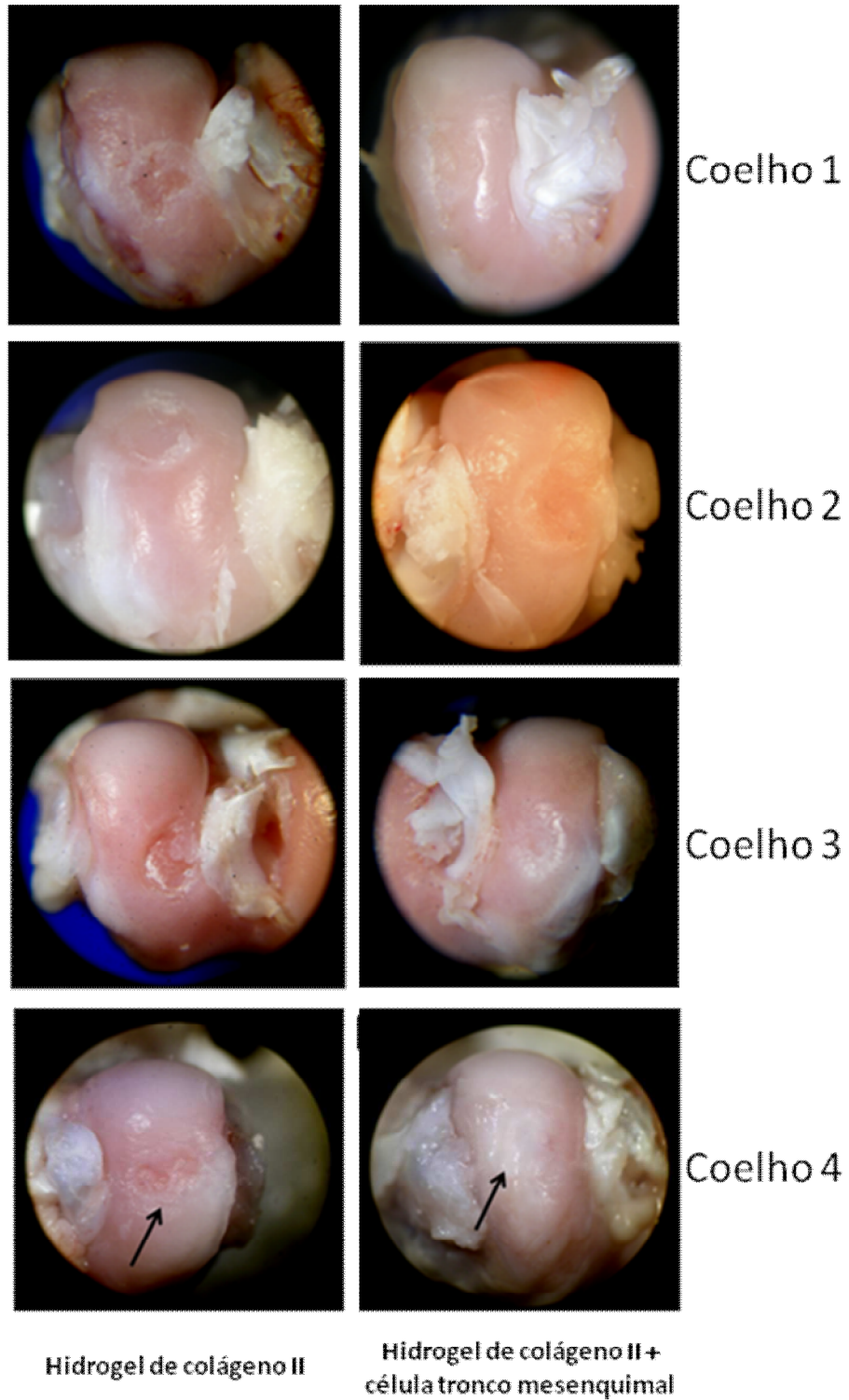
O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

1. Desenvolvimento de um método eficaz de isolar as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo. Essas células são capazes de se diferenciar nas linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas.
2. Desenvolvimento de um biomaterial de hidrogel de colágeno tipo II com cola de fibrina.
3. Os hidrogéis de colágeno do tipo II foram capazes de oferecer suporte *in vitro* às células-tronco mesenquimais durante a diferenciação condrogênica. Análises de expressão gênica e bioquímica dessas células evidenciam essa diferenciação.
4. Implantar um modelo animal eficaz para reparo cartilaginoso em articulações.
5. Células-tronco mesenquimais humanas e hidrogéis de colágeno do tipo II implantadas em articulações de coelhos não mostraram reação inflamatória e processo de rejeição.
6. Hidrogéis de colágeno do tipo II e células-tronco mesenquimais são capazes de preencher uma lesão cartilaginosa após 12 semanas.

A redação de um manuscrito está sendo realizada.

Anexos

ANEXO I



ANEXO I. Lesões cartilaginosas dos joelhos lesionados e submetidos a tratamento (A) Imagem de um joelho tratado somente com hidrogel de colágeno. (B) Imagem de um joelho tratado com hidrogel de colágeno e células-tronco mesenquimais

Referências

REFERÊNCIAS

1. Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng.* 2006;12:3405-3416.
2. Hunsche E, Chancellor JV, Bruce N. The burden of arthritis and nonsteroidal anti-inflammatory treatment. A European literature review. *Pharmacoeconomics.* 2001;19 Suppl 1:1-15.
3. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997;349:1269-1276.
4. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1331-1342.
5. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy.* 2003;19:477-484.
6. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A:455-464.
7. Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:503-507.
8. Bouwmeester SJ, Beckers JM, Kuijer R, van der Linden AJ, Bulstra SK. Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop.* 1997;21:313-317.
9. 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.* 1994;331:889-895.
10. Ferretti M, Viola DCM, Jesus-Garcia Filho R. Treatment of osteochondral defects of the knee. *Einstein.* 2009;7:245-247.
11. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 2002;18:730-734.
12. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10:432-463.
13. Messner K, Gillquist J. Cartilage repair. A critical review. *Acta Orthop Scand.* 1996;67:523-529.
14. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 1982;30:215-224.
15. Grigolo B, Roseti L, De Franceschi L, et al. Molecular and immunohistological characterization of human cartilage two years following autologous cell transplantation. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:46-57.
16. Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus.* 1980;25:19-29.
17. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980;56:289-301.
18. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:568-584.
19. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.

20. Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008;17:909-916.
21. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:70-77.
22. Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen Med.* 2008;3:531-546.
23. Gnecci M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J.* 2006;20:661-669.
24. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739-2749.
25. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001;98:2396-2402.
26. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000;109:235-242.
27. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells.* 2004;22:1338-1345.
28. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 2004;103:1669-1675.
29. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004;22:1330-1337.
30. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208:64-76.
31. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1796-1808.
32. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821-1830.
33. Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116:1686-1696.
34. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:845-853.
35. Hui JH, Li L, Teo YH, Ouyang HW, Lee EH. Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng.* 2005;11:904-912.
36. Hong L, Peptan IA, Colpan A, Daw JL. Adipose tissue engineering by human adipose-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs.* 2006;183:133-140.
37. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:318-322.

38. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656-663.
39. Boquest AC, Noer A, Sorensen AL, Vekterud K, Collas P. CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage. *Stem Cells*. 2007;25:852-861.
40. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328:258-264.
41. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341:1135-1140.
42. Corre J, Barreau C, Cousin B, et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol*. 2006;208:282-288.
43. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005;87:125-128.
44. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25:818-827.
45. Casteilla L, Planat-Benard V, Cousin B, et al. Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases? *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005;98:922-926.
46. Oedayrasingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8:166-177.
47. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24:1294-1301.
48. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33:1402-1416.
49. Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage*. 1999;7:15-28.
50. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*. 1982;64:460-466.
51. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2001:S362-369.
52. Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury*. 2008;39 Suppl 1:S58-65.
53. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001;268:189-200.
54. Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J*. 2004;45 Suppl:41-47.
55. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998;238:265-272.

56. Noel D, Caton D, Roche S, et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res.* 2008;314:1575-1584.
57. Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.* 2003;48:418-429.
58. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78:721-733.
59. Lee CS, Gleghorn JP, Won Choi N, Cabodi M, Stroock AD, Bonassar LJ. Integration of layered chondrocyte-seeded alginate hydrogel scaffolds. *Biomaterials.* 2007;28:2987-2993.
60. Dorotka R, Bindreiter U, Macfelda K, Windberger U, Nehrer S. Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:655-664.
61. Nakamura N, Horibe S, Iwahashi T, Kawano K, Shino K, Yoshikawa H. Healing of a chondral fragment of the knee in an adolescent after internal fixation. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A:2741-2746.
62. Brun P, Abatangelo G, Radice M, et al. Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 1999;46:337-346.
63. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 2003;22:81-91.
64. Andriano KP, Tabata Y, Ikada Y, Heller J. In vitro and in vivo comparison of bulk and surface hydrolysis in absorbable polymer scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 1999;48:602-612.
65. Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park KH. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin constructs evaluated in vitro and in nude mouse and rabbit defects models. *Biomaterials.* 2003;24:1495-1507.
66. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.* 2001;221:1-22.
67. Stark Y, Suck K, Kasper C, Wieland M, van Griensven M, Scheper T. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Exp Toxicol Pathol.* 2006;57:305-311.
68. Mizuno S, Allemann F, Glowacki J. Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges. *J Biomed Mater Res.* 2001;56:368-375.
69. Katsube K, Ochi M, Uchio Y, et al. Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in Atelocollagen gel. Comparison with cultured chondrocytes in suspension. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2000;120:121-127.
70. Farrell E, O'Brien FJ, Doyle P, et al. A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue Eng.* 2006;12:459-468.
71. Vickers SM, Squitieri LS, Spector M. Effects of cross-linking type II collagen-GAG scaffolds on chondrogenesis in vitro: dynamic pore reduction promotes cartilage formation. *Tissue Eng.* 2006;12:1345-1355.
72. Yang IH, Kim SH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ, Lee JW. Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J.* 2004;45:891-900.

73. Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM, Barry F. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2002;38:457-466.
74. Mauck RL, Yuan X, Tuan RS. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14:179-189.
75. Mauck RL, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Ann Biomed Eng.* 2002;30:1046-1056.
76. PP BM, Pedro AJ, Peterbauer A, Gabriel C, Redl H, Reis RL. Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16:1077-1085.
77. Tognana E, Borrione A, De Luca C, Pavesio A. Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage. *Cells Tissues Organs.* 2007;186:97-103.
78. O'Grady JE, Bordon DM. Global regulatory registration requirements for collagen-based combination products: points to consider. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55:1699-1721.
79. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2009;103:655-663.
80. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng.* 2006;93:1152-1163.
81. Fonseca MJ, Alsina MA, Reig F. Coating liposomes with collagen (Mr 50,000) increases uptake into liver. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1279:259-265.
82. Kosher RA, Church RL. Stimulation of in vitro somite chondrogenesis by procollagen and collagen. *Nature.* 1975;258:327-330.
83. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 1977;267:531-532.
84. Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? *J Cell Sci Suppl.* 1987;8:327-343.
85. Watanabe H. [Cartilage proteoglycan aggregate: structure and function]. *Clin Calcium.* 2004;14:9-14.
86. de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:721-727.
87. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174:101-109.
88. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:4397-4402.
89. Revell CM, Athanasiou KA. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15:1-15.
90. Noth U, Rackwitz L, Heymer A, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 2007;83:626-635.

91. Zhao H, Ma L, Zhou J, Mao Z, Gao C, Shen J. Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomed Mater.* 2008;3:015001.
92. Ho ST, Cool SM, Hui JH, Hutmacher DW. The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*;31:38-47.
93. Aigner T, Stove J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55:1569-1593.
94. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop Relat Res.* 1984:231-239.
95. Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng.* 1998;4:429-444.
96. Funayama A, Niki Y, Matsumoto H, et al. Repair of full-thickness articular cartilage defects using injectable type II collagen gel embedded with cultured chondrocytes in a rabbit model. *J Orthop Sci.* 2008;13:225-232.
97. Wang W, Li B, Yang J, et al. The restoration of full-thickness cartilage defects with BMSCs and TGF-beta 1 loaded PLGA/fibrin gel constructs. *Biomaterials.* 2010;31:8964-8973.

98. Filova E, Burdikova Z, Rampichova M, et al. Analysis and three-dimensional visualization of collagen in artificial scaffolds using nonlinear microscopy techniques. *J Biomed. J Biomed Opt.* 2010;15(6):066011.