

## **VIABILIDADE CELULAR DE CONDRÓCITOS CULTIVADOS EM PÉROLAS DE ALGINATO.**

Gabrielle Reinoldes Bizarria Guilherme, Elenice Deffune, Renata Aparecida de Camargo Bittencourt, Sérgio Felisbino, Hamilton Pereira Rosa. – Medicina - Ciências Biológicas Modalidade Médica – Departamento de Urologia – Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP – Campus de Botucatu

Em todo mundo são gastos milhares de dólares todos os anos em tratamentos para reduzir os sintomas das doenças ortopédicas. Só no Brasil, no ano de 2002, foram realizados 36.842 procedimentos cirúrgicos de joelho pelo Sistema Único de Saúde - SUS (Fonte: [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)). Essas intervenções cirúrgicas muitas vezes não obtêm os bons resultados esperados em longo prazo. Uma das formas de reduzir os gastos e melhorar a qualidade de vida do paciente, quanto a possíveis rejeições e incômodos com próteses é o auto-transplante, que se caracterizam pela retirada de material autólogo e, após a realização de cultura celular, o re-implante.

Estas considerações se aplicam, entre outros, a transplantes de cartilagem em pacientes que apresentam problemas ortopédicos como a osteoartrite e a artrite reumatóide. Essas são doenças degenerativas e sem cura efetiva. Portanto, estudar as cartilagens e novos meios de cura para as doenças que envolvem esse tecido é de importância extrema.

O tecido cartilaginoso é um tecido essencial para a sustentação de tecido mole, o revestimento de superfícies diversas, além de outras funções. Ele é composto, basicamente, por condrócitos e matriz extracelular que contém colágeno, elastina, proteoglicanas e glicoproteínas<sup>1</sup>. Esse tipo de tecido origina-se a partir do mesoderma do embrião durante a quinta semana de vida. O mesoderma, por sua vez, origina células mesenquimais com alto poder de diferenciação resultando em células do tecido cartilaginoso, ósseo, muscular e adiposo; o processo de diferenciação depende de genes ativos específicos e condições ambientais – fatores de crescimento<sup>1,2</sup>.

A cartilagem apresenta baixa capacidade de regeneração e devido a isso, doenças degenerativas e crônicas, como osteoartrite e artrite reumatóide, dificultam qualquer tipo de tratamento, a curto ou longo prazo, sendo que a maioria das patologias tem apenas tratamento sintomático e paliativo. Quando ocorre degeneração no adulto, a reconstituição da cartilagem lesionada se dá, frequentemente, de modo incompleto, além disso, os tratamentos mais utilizados atualmente têm duração limitada, e são altamente invasivos fazendo com que os pacientes, geralmente idosos, não apresentem uma resposta satisfatória<sup>3,4</sup>.

A literatura aponta ainda, outros tipos de tratamento envolvendo a terapia celular. Essa terapia consiste em produzir a cartilagem articular “in vitro” para realização de transplantes autólogos, com a finalidade de regenerar o tecido lesado. Essa produção de tecido “in vitro” se faz a partir de células autólogas, e como não há incompatibilidade imunológica as chances de rejeição são extremamente reduzidas<sup>5</sup>.

Uma das formas de realizar um transplante autólogo é utilizar condrócitos retirados por artroscopia da cartilagem (margens da articulação do joelho) do paciente. Os condrócitos são células que para manterem suas características morfológicas e bioquímicas devem ser cultivados em matrizes tridimensionais, pois necessitam de estímulo constante da interação entre células e matriz extracelular. Portanto se fossem cultivados em monocamada perderiam sua diferenciação, tornando-se células com características fibroblásticas. Para isso, escolheu-se a matriz tridimensional de alginato a 1,2% que apresenta as seguintes características favoráveis para sua utilização: formação de matriz tridimensional rígida, mas que permite a passagem de nutrientes do meio de cultivo e podem ser re-implantadas diretamente nos organismos utilizados, pois são feitas de material reabsorvível. O cultivo em laboratório se deu por duas a quatro semanas antes de serem transplantadas novamente no local lesionado<sup>5</sup>.

Neste trabalho, foi padronizado o cultivo celular tridimensional com células provenientes articulação de joelho de coelho. Para a realização destes tipos de transplantes é de grande relevância a observação do grau de viabilidade celular destas culturas, pois com base nestes dados é possível estimar se o cultivo celular em matriz tridimensional possui células suficientes e se essas terão condições de, quanto re-implantadas – num possível transplante -, restaurar a cartilagem lesionada.

Os condrócitos analisados foram colhidos em condições estéreis por artroscopia de 2 coelhos brancos, machos, da raça “Botucatu” com 12 meses de idade, pesando em torno de 1,8 a 2 kg, alojados

no Biotério do Laboratório Experimental de Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu. No laboratório de Engenharia Celular (Hemocentro de Botucatu) o tecido colhido foi processado destruição completa da matriz extracelular com diversas enzimas (tripsina, hialuronidase e colagenase tipo I). Uma alíquota de 100µL das células foi separada para contagem em Câmara de Neubauer (ver procedimento abaixo). O restante das células foi ressuspensão em alginato de sódio 1,2% numa seringa de 10cc e agulha de 21g. Por gotejamento dentro de uma solução de gelificação a base de cloreto de cálcio, forma-se as pérolas de alginato que são distribuídas em placa 24 poços (figura 1 e 2). O meio de cultura apropriado para o cultivo das pérolas é o D-MEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco - Gibco® - com 1 g/L de glicose/ Ham's F12 – 1:1 volume/volume (D-MEM F12) suplementado com ácido ascórbico e fator de crescimento TGFβ<sub>3</sub>, que foi trocado a cada dois dias. No sétimo e décimo quarto dia de cultivo, foi coletadas aleatoriamente 6 pérolas de alginato para realização da viabilidade celular por Câmara de Neubauer com o corante de viabilidade azul de toluidina. As pérolas de alginato foram dissolvidas quando incubadas com citrato de sódio 155mM a 37°C por 45 minutos. Após centrifugação, o pellet formado foi dissolvido em D-MEM F12 sem soro fetal bovino, e com uma alíquota de 100µL foi feito o teste de viabilidade celular. Na Câmara de Neubauer se fez a contagem dos quadrantes específicos (figura 3) e o resultado foi colocado na fórmula abaixo para obtenção do número final de células, sendo que somente são consideradas células viáveis aquelas que não foram coradas pelo corante azul de toluidina (figura 4)<sup>6,7,8</sup>:

$\text{Cels/mL} = \text{média dos quadrantes 1,2,3,4} \times \text{fator de diluição} \times \text{fator de correção da câmara de Neubauer}$
--

Da amostra do coelho um obteve-se, aproximadamente, 200 mg de tecido cartilaginoso, que depois de digerido apresentava  $3 \times 10^4$  células por pérola de alginato. Após sete dias de cultivo, a Câmara de Neubauer e o corante de viabilidade celular apontaram um crescimento na cultura, onde cada pérola de alginato tinha, aproximadamente,  $3,6 \times 10^4$  células. Ao fim da cultura, houve um aumento total de 58.3% de células viáveis - aproximadamente  $4,7 \times 10^4$  células por pérola de alginato – (figura 5). Enquanto da amostra do coelho dois obteve-se, aproximadamente, 300 mg de tecido cartilaginoso, que após digestão apresentou  $3,6 \times 10^4$  células por pérola de alginato. No sétimo dia de cultivo, houve um crescimento na cultura, e cada pérola continha, aproximadamente,  $5,8 \times 10^4$  células. No décimo quarto dia (fim do cultivo), houve um aumento total de 102.7% de células viáveis - aproximadamente  $7,3 \times 10^4$  células por pérola de alginato - (figura 6). A estatística desses resultados mostrou que a diferença das médias da amostra um e dois não é significativa ( $p < 0,05$ ). E o teste t comprovou que o desvio padrão de ambas as amostras também não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (figura 7).

A partir dos dados analisados, podemos concluir que:

- o crescimento das culturas de condrócitos é influenciada pelo número inicial de células;
- o cultivo em matriz tridimensional, com os meios de cultura e estímulos apropriados, gera um aumento da viabilidade celular significativa;
- avaliar, e seguir durante o tempo de cultivo determinado, a viabilidade celular é de extrema importância para verificarmos como as células estão reagindo frente ao ambiente que lhe são proporcionado;
- examinar a viabilidade celular permite sabermos que o transplante das pérolas de alginato possui células suficientes para regenerar o local lesado;
- e por fim, observamos a eficiência da Câmara de Neubauer e do corante de viabilidade: o azul de toluidina.

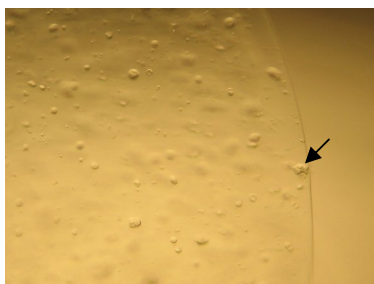


Figura 1: Pérola de Alginato



Figura 2: Condrócitos formando grupo isógeno na pérola de alginato

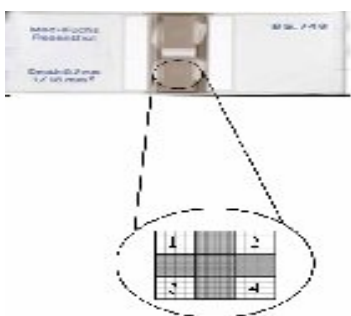


Figura 3: Câmera de Neubauer com os quadrantes aumentados

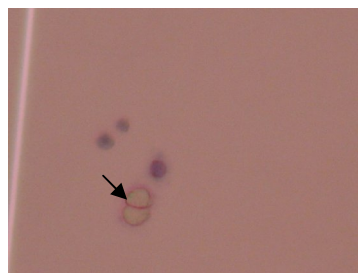


Figura 4: Condrócitos corados por azul de toluidina em Câmera de Neubauer – células viáveis não estão coradas em azul

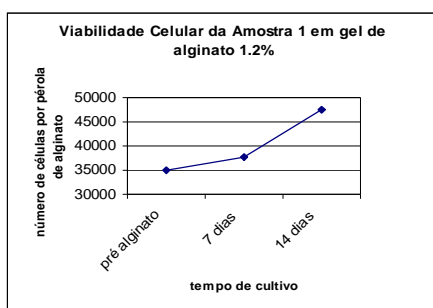


Figura 5: Resultado da viabilidade celular da amostra 1

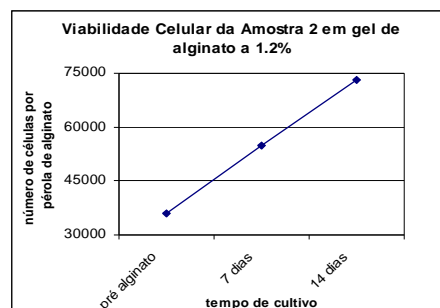


Figura 6: Resultado da viabilidade celular da amostra 2

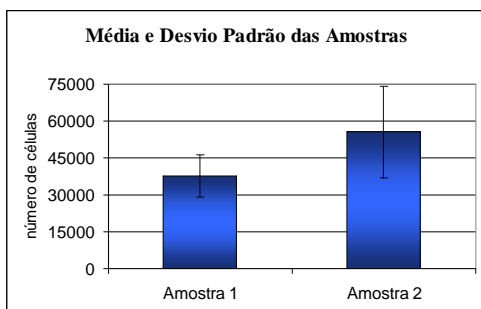


Figura 7: Média e desvio padrão das Amostras 1 e 2

Referência Bibliográfica:

1. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Nona ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1999. p.104-128
2. WROBE, R. R. Articular cartilage injury and autologous chondrocyte implantation. **Phys. Sportsmed.**, Minneapolis, v. 28, 2000. Disponível em: <http://www.physportsmed.com/issues>.
3. BENTLEY, G.; MINAS, T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. **Br. Med. J.**, London, v.10, 2001. Disponível em <http://www.bmj-pt.com>
4. GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Imunologia**. Quarta ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora REVINTER Ltda., 2002. p 517-526
5. KLINIKUM LEVERKUSEN TRAUMATOLOGY & ORTHOPEDIC SURGERY. **Autologous chondrocyte implantation**. Leverkusen, 2000. Disponível em: <[http:// www.Unflchirurgie.com/english/autologous\\_chondrocyte\\_implant.htm](http://www.Unflchirurgie.com/english/autologous_chondrocyte_implant.htm)>. Acesso em: 28 abr. 2003
6. MA H-L., HUNG S-C, LIN S-Y., CHEN Y-L., LO W-H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. **Wiley Periodicals, Inc.**, 2002. p. 273-281
7. Yamaoka H. *et al.* Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2006. DOI: 10.1002/jbm.a.30655.
8. SCHNEIDER N., LEJEUNE J-P., DEBY C., DEBY-DUPONT G., SERTEYN D. Viability of equine articular chondrocytes in alginate beads exposed to different oxygen tensions. **The Veterinary Journal**, v. 168, 2004. p. 167-173