

CARACTERIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO CARTILAGINOSO DIFERENCIADO EM CULTURA.

Andrei Moroz, Elenice Deffune, Renata Aparecida Camargo Bittencourt, Sérgio Luis Felisbino, Hamilton Rosa Pereira.
– Morfologia – Ciências Biológicas – Departamento de Urologia – Divisão Hemocentro – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina de Botucatu.

Uma vez danificada, a cartilagem não cicatriza espontaneamente, provavelmente devido à baixa eficiência de reparo da rede de colágeno, já que a deficiência das proteoglicanas é reversível (LAFEBER *et al*, 1992). Estima-se que cerca de um milhão de pessoas por ano necessitam de tratamento relacionado a defeitos em cartilagens, principalmente as das articulações do joelho (LANGER & VACANTI, 1993). Estudos experimentais têm mostrado que há um declínio na atividade de crescimento da cartilagem com o aumento da idade (GOESSLER *et al.*, 2004). No entanto, a engenharia de tecidos oferece novas oportunidades para restauração funcional e estrutural do tecido lesionado. Na literatura, relata-se que os condrócitos necessitam de um arcabouço em três dimensões (3D) para crescerem e preservarem a morfologia e produção de componentes de matriz próprios de condrócitos quando em cultura celular (YANG *et al.*, 2004, CAPITO & SPECTOR, 2006). Caso contrário, quando cultivados em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente de cultura, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características morfológicas e passam a produzir componentes de matriz fibroblásticas como colágeno tipo I (BENYA & SHAFFER, 1982, BINETTE *et al.*, 1998, MANDL, *et al.*, 2004). Para se conseguir a produção de um tecido cartilaginoso funcional, é crucial evitar a desdiferenciação dos condrócitos durante o processo de engenharia de cartilagem (ZHANG *et al.*, 2004).

A matriz cartilaginosa divide-se em matriz territorial ou pericelular (em torno das lacunas) e interterritorial. No caso da cartilagem hialina a matriz territorial é composta por grande quantidade de condroitino-sulfato e pouco colágeno, deixando-a basófila, ao passo que a matriz interterritorial é mais rica em colágeno tipo II e mais pobre em proteoglicanas (GARTNER & HIATT, 1999, FELISBINO & CARVALHO, 2005).

A morfologia, estabilidade e funcionalidade das células cartilaginosas dependem das interações entre os condrócitos e sua matriz extracelular (MARTINEZ-HERNANDEZ, 2002). Além do colágeno tipo II, a cartilagem hialina, apresenta em sua matriz, em menor quantidade, colágenos tipo IX, X e XI, e outros colágenos secundários. As glicosaminoglicanas presentes são condroitino-4-sulfato, condroitino-6-sulfato, heparan-sulfato e ácido hialurônico (GARTNER & HIATT, 1999, FELISBINO & CARVALHO, 2005).

O presente trabalho investigou a morfologia do tecido cartilaginoso gerado em cultura celular em pérolas de alginato e em *pellet* tridimensional (3D), através de métodos histológicos e imunohistoquímica.

As pérolas de alginato e os *pellets* 3D foram fornecidos pelo Laboratório de Engenharia Celular, do Hemocentro de Botucatu. A análise morfológica foi realizada no Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia. Para avaliar a presença dos componentes da matriz extracelular, as pérolas de alginato foram fixadas em formaldeído a 10%, passadas por soluções criopreservantes (solução de glicose a concentrações crescentes) e seccionadas em criostato. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina a 0,3%, pH 3.65.

Para a mesma finalidade, os *pellets* foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo. Os corantes utilizados foram hematoxilina-eosina (HE), *alcian blue* e picrossírius. Foram confeccionadas lâminas de tecido natural como controle morfológico, com os mesmos corantes. Para a análise por IH as secções das pérolas de alginato foram submetidas a tratamento com proteinase K ou tampão citrato (etapa de recuperação antigênica) e incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio em metanol para bloquear as peroxidases endógenas. Depois foram incubadas com leite 5%, seguido do anticorpo primário 1:50 (*anti-collagen type II goat polyclonal IgG*), em BSA 1%, e posteriormente com o anticorpo secundário 1:50 (*bovine anti-goat IgG polyclonal antiserum HRP*).

complexed) também em BSA 1%. A reação foi revelada com diaminobenzidina, e as lâminas contra-coradas com hematoxilina.

Os *pellets* celulares de 21 dias de cultura foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo. Foram realizados testes para colágeno II (COL II), colágeno I (COL I) e condroitin-sulfato seguindo a mesma metodologia já explanada. Para o teste de colágeno II foram utilizados os mesmo anticorpos primários e secundários já citados. Para o teste de colágeno I o anticorpo primário foi *anti-colagen type I goat polyclonal IgG antibody*, e o anticorpo secundário foi *bovine anti-goat IgG polyclonal antibody HRP complexed*. Para o teste de condroitim sulfato o anticorpo primário foi *anti-chondroitin sulfate mouse monoclonal antibody*, e o anticorpo secundário foi *bovine anti-mouse IgG polyclonal antibody HRP complexed*.

A análise histológica por azul de toluidina revelou média concentração celular (++) nas amostras de alginato (Fig. 1), em comparação às amostras de *pellets* em HE (Fig. 2), que atingiram altas celularidades (++++). Houve dificuldade em trabalhar com o alginato, sendo que diversas vezes ocorreu dissolução da esfera, possivelmente por pH ácido de algum dos componentes usados na metodologia. Outra dificuldade foi a não aceitação do alginato em parafina, tendo sido adotado o corte micrométrico em criostato. Houve marcação para anti-colágeno II (COL II) nas pérolas de alginato (Fig. 3).

Através da coloração com azul de toluidina das secções das pérolas de alginato (Fig. 1) foi possível observar a distribuição bem definida dos condrócitos no gel e uma coloração mais intensa nas áreas da matriz pericelular e/ou territorial ao redor dos condrócitos ou grupos de condrócitos (grupos isógenos). A matriz extracelular nos *pellets* foi evidenciada pela marcação nas lâminas com *alcian blue* (++) e picrossírius (++) (Fig. 4 e Fig. 5). Houve marcação discreta para COL I e COL II nos *pellets* (+) (Fig.6 e Fig.7), com a marcação para COL II mais expressiva; altas concentrações de condroitin-sulfato foram evidenciadas pela forte marcação obtida (++++). O tratamento de recuperação antigênica por digestão enzimática forneceu resultados mais satisfatórios do que por tampão citrato.

A lâmina de pérola de alginato corada em azul de toluidina nos mostra células dentro de espaços do arcabouço de alginato, onde as células cartilaginosas crescem em três dimensões, obtendo o suporte necessário para manter suas características morfológicas e de matriz extracelular de condrócitos. Vê-se que as células nestes espaços mantiveram sua morfologia arredondada, característica de condrócitos, formando grupos isógenos de três células ou mais, característicos do tecido cartilaginoso natural. A lâmina do *pellet* celular corada em HE demonstrou alta concentração celular, morfologia arredondada característica de condrócitos, como nos *pellets* do trabalho de Capito e Spector, 2006. Pode-se ver núcleos em roxo escuro e citoplasma rosa em volta do mesmo. No entanto, não se observou a separação das células em grupos isógenos como no tecido natural ou como no trabalho de Capito e Spector, 2006; onde se observaram células em lacunas.

Neste trabalho, os autores testaram diferentes fatores de crescimento, como TGFβ-1, PDGF-ββ. Sabe-se que os TGFβs participam como fatores cruciais no estímulo de produção de GAGs e COL II por condrócitos articulares (GRIMAUD *et al*, 2002; QUIAO *et al*, 2005). Sabe-se também que os TGFβs regulam o reparo de lesões de cartilagem por produção de matriz extracelular (GRIMAUD *et al*, 2002). Na cultura celular previamente a análise morfológica utilizou-se apenas o TGFβ-3 como fator de crescimento.

A lâmina do pellet corada em *alcian blue* nos evidencia a matriz extracelular, corando as GAGs em azul, e os espaços arredondados clareados correspondem às células. Comparando-se esta lâmina com nosso controle morfológico, percebe-se que em ambas a matriz foi corada, sendo a reação na lâmina controle mais forte (grânulos mais intensos), além de serem visíveis os espaços clareados arredondados que correspondem às células também nas duas lâminas. A lâmina corada em picrossírius também evidencia a matriz, embora seja um corante diferencial para colágeno. Nela vemos focos fibrosos corados em vermelho, aos quais correspondem ao colágeno na matriz interterritorial, e marcação discreta da matriz pericelular. Comparando-a com a lâmina controle morfológico, vê-se que a distribuição de colágeno é diferente, pois temos um padrão mais forte e homogêneo da matriz interterritorial, além de marcação intensa da matriz pericelular.

Nas lâminas onde o anticorpo primário foi anti-colágeno I verificamos um resultado levemente positivo. Isso significa que algumas células da cultura estão secretando colágeno I, que não é prioritário em condrócitos. Embora pareça à primeira vista um resultado estranho, não o é, pois é aceitável algum grau de produção deste tipo de colágeno, como no trabalho de Jenniskens *et al*, 2006; onde o acúmulo de colágeno I deu-se em clusters celulares, onde havia de duas a quatro células juntas. Na análise onde o anticorpo primário foi anti-colágeno II a reação foi positiva, mais visível, indicando que as células estão secretando colágeno II na matriz extracelular com maior intensidade, o que reforça que as células estão mantendo-se com fenótipo de condrócitos, de maneira geral. Todavia, a marcação indica que, assim como diversos outros trabalhos, a produção de GAGs é intensa durante a cultura celular, mas a quantidade de colágeno II produzida é limitada (JENNISKENS *et al*, 2006).

O melhor resultado foi encontrado quando utilizamos anti-condroitim-sulfato (Fig. 8) como anticorpo primário. Verificam-se os núcleos corados pela hematoxilina, o citoplasma ao redor deles em claro, e por toda a matriz uma intensa coloração castanha, evidenciando a grande quantidade de condroitim sulfato na matriz. Percebe-se que o condroitim-sulfato espalhou-se de fato pela matriz extracelular, como uma massa amorfa e fibrosa em um padrão próprio do tecido cartilaginoso, indo de acordo aos resultados prévios relatados na literatura (DESSAU *et al*, 1980).

Juntando todos os resultados obtidos – presença de colágeno II, grande presença de condroitim sulfato na matriz extracelular, morfologia arredondada característica de condrócitos – chegamos à conclusão que as células do *pellet* estão mantendo um fenótipo característico de condrócitos, com exceção à formação dos grupos isógenos. A marcação de *alcian blue* e picrossírius demonstrou que as GAGs estavam abundantes e homogeneamente distribuídas ao redor das células, como em trabalhos anteriores (YANG *et al*, 2004, JENNISKENS *et al*, 2006). Concluímos também que as lâminas de imunohistoquímica tratadas com digestão enzimática forneceram resultados melhores do que as tratadas com recuperação em tampão citrato. Sugere-se que em futuras tentativas, quando o colágeno for ser testado, faz-se necessário um tratamento mais refinado de digestão enzimática (precedente à incubação com o anticorpo primário) usando-se mais enzimas, tais como hialuronidase e condroitinase C. As pérolas de alginato mantiveram o fenótipo arredondado, característico de tecido cartilaginoso articular hialino, e formaram grupos isógenos. Entretanto, não houve produção significativa de matriz extracelular.

Referências Bibliográficas

- 1- Benya, P., Shaffer, J., 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30: 215-224.
- 2- Binette, F., McQuaid, D.P., Haudenschild, D.R., Yaeger, P.C., McPherson, J.M., Tubo, R., 1998. Expression of a stable articular phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J. Orthop. Res.*, 16: 207-216.
- 3- Capito, R.M., Spector, M., 2006. Effect of expansion medium on ex vivo gene transfer and chondrogenesis in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*.
- 4- Dessau, W., Vertel, B.M., von der Mark, H., von der Mark K., 1981. Extracellular matrix formation by chondrocytes in monolayer culture. *J. Cell. Biol.*, 90: 78-83.
- 5- Felisbino, S.L., Carvalho, H.F., 2005. Condrócito. In: Carvalho, H.F., Collares-Buzato, C.B. *Células: Uma abordagem multidisciplinar*. Editora Manole 11-21.
- 6- Gartner, P., Hiatt, J.L., 1999. Matriz extracelular. In: *Tratado de histologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 56-66.
- 7- Goessler, U.R., Hörmann, K., Riedel, F., 2003. Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (Review). *Intern J Mol Med*, 13: 505-513.
- 8- Grimaud, E., Heymann, D., Redini, F., 2002. Recent advances in TGF-beta effects chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13: 241-57.
- 9- Jenniskens, Y.M., Koevoet W., de Bart, A.C.W., Weinans H., Jahr, H., Verhaar, J.A.N., DeGroot, J., van Osch, G.J.V.M., 2006. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGF β 2 and FGF2. *Osteoarthritis and Cartilage*.

- 10- Lafeber, F.P., van Roy, H., Wilbrink, B., Huber-Bruning, O., Bijlsma, J.W., 1992. Human osteoarthritic cartilage is synthetically more active but in culture less vital than normal cartilage. *J Rheumatol.*, 19:123-9.
- 11- Langer, R., Vacanti, J.P., 1993. *Tissue Eng., Science*, 260: 920-926
- 12- Mandl, E.W., Van Der Veen, S.W., Verhaar, J.A.N., Van Osch, G.J.V.M., 2004. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng.*, 10: 109-118.
- 13- Martinez-Hernandez, A., 2002. Reparação, regeneração e fibrose. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. *Patologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Chapter 3: 75- 101.
- 14- Qiao, B., Padilla, S.R., Benya, P.D., 2005. Transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1 mimics and mediates TGF-beta-induced stimulation of type II collagen synthesis in chondrocytes independent of Col2a1 transcription and Smad3 signaling. *J Biol Chem.*, 280: 62-71.
- 15- Zhang, Z., McCaffery, J.M., Spencer, R.G.S., Francomano, C.A., 2004. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J. Anat.*, 205: 229-237.
- 16- Yang, I.H., Kim, Su-Hyang, Kim, Y.H., Sun, H.J., Kim S.J., Lee, J.W., 2004. Comparison of phenotypic characterization between alginate bead and pellet culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med. J.*, 45: 891-900.

Figuras

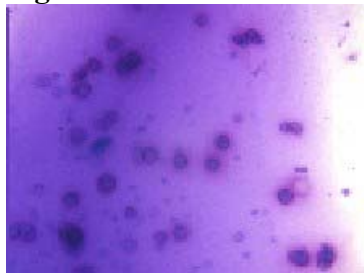


Figura 1: Alginato corado em HE
Aumento 40x

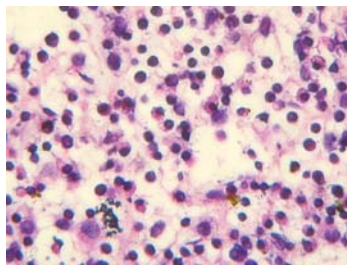


Figura 2: Pellet corado em HE
Aumento 40x



Figura 3: Alginato marcado COL II
Aumento 100x

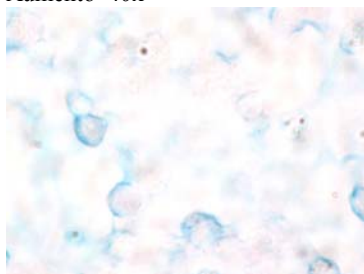


Figura 4: Pellet corado em alcian blue
Aumento 100x

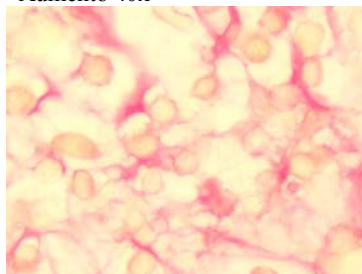


Figura 5: Pellet corado em picrosirius
Aumento 100x

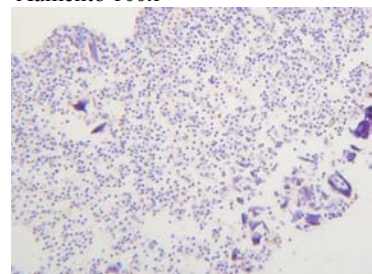


Figura 6: Pellet marcado com COL I
Aumento 10x

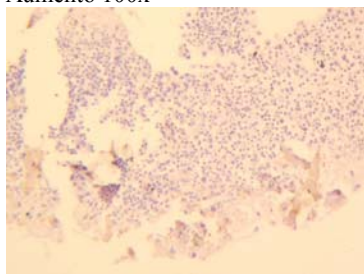


Figura 7: Pellet marcado com COL II
Aumento 10x

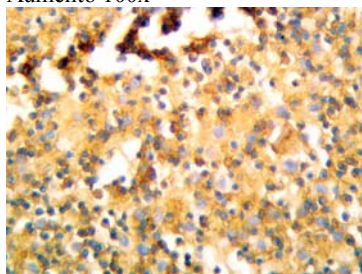


Figura 8: Pellet marcado com condroitim-sulfato
Aumento 40x

Agradecimentos: Gostaria de agradecer a Tâta da Eng. Celular, ao Justulin e Sueli da Morfologia, e a todos que me orientaram. Obrigado!!