

Cultura de condrócitos humanos para tratamento de lesões cartilaginosas*

Human chondrocytes culture to treatment of cartilaginous injuries

**Nuberto Teixeira Neto⁽¹⁾, Marcelo D. O. A. Tostes⁽¹⁾,
Victor Augusto Thome Grillo⁽¹⁾, André Paggiaro⁽²⁾,
Solange Carrasco⁽²⁾, Marcos Castro Ferreira⁽²⁾**

Teixeira Neto N, Tostes MDOA, Grillo VAT, Paggiaro A, Carrasco S, Ferreira MC. Cultura de condrócitos humanos para tratamento de lesões cartilaginosas. Rev Med (São Paulo). 2005 abr.-jun.;84(2):82-9.

RESUMO: Este trabalho apresenta como objetivo testar o cultivo de condrócitos por um método não enzimático. Para isto, foram isolados condrócitos de cartilagem costal humana pelo método de explante primário, em que as células migraram da cartilagem e se aderiram ao fundo do frasco de cultura. Posteriormente, pelo método de imunofluorescência indireta dosou-se a capacidade de produção de colágeno tipo II pelos condrócitos isolados, a fim de se avaliar a capacidade das células de produzirem matriz extracelular para demonstrar a manutenção das capacidades fisiológicas das células isoladas em cultura. Desta forma, pela bioengenharia abre-se a possibilidade de criar cartilagem *in vitro* para substituir um tecido lesado, o qual não é capaz de se regenerar. O explante é um método simples e barato que permite o isolamento de condrócitos humanos. Comprovou-se que os condrócitos cultivados mantêm sua capacidade fenotípica de produzir colágeno tipo II. Deste modo, comprova-se que as células isoladas produzem matriz extracelular típica do tecido cartilaginoso e são potencialmente utilizáveis para tratamento de lesões cartilaginosas.

DESCRITORES: Colágeno Tipo II/uso terapêutico. Cartilagem/lesões. Condrócitos. Cultura de células. Doenças das cartilagens/terapia.

* 1º lugar, área: Básica, 2004.

⁽¹⁾ Alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

⁽²⁾ Orientadores.

Endereço para correspondência: Nuberto Teixeira Neto. Av. Monte Celeste, 153 - CEP 02561-000, São Paulo, SP.
e-mail: nubertoneto@uol.com.br

INTRODUÇÃO

Os maiores desafios são os enfrentados pela medicina com relação aos defeitos do contorno facial. Alguns acidentes causam traumatismo facial com perda de substância levando não somente à uma aparência anômala como a distúrbios funcionais. Em algumas situações, há perda de tecido cartilaginoso ou ósseo podendo gerar assimetrias e deformidades faciais extensas. Desvios de septo nasal trazem obstrução à respiração, enquanto a perda do assoalho ósseo da órbita pode causar diplopia¹.

Alguns tumores cutâneos exigem uma abordagem cirúrgica radical para êxito do tratamento, sendo que algumas vezes se faz necessário a retirada de estruturas cartilaginosas inteiras como nariz ou orelha.

A ausência de estruturas anexas da face pode ocorrer ao nascimento. Existem crianças que nascem sem o pavilhão auditivo (anotia) ou mesmo com este diminuído (microtia)¹. A cirurgia plástica é uma das especialidades médicas mais envolvidas no tratamento deste tipo de problemática. A fim de reparar estas lesões, os cirurgiões quase sempre costumam utilizar-se de enxertos de cartilagem autógena, que por possuir certa resistência e elasticidade permitem que seja possível a construção de arcabouços que garantam a preservação da forma.

Os enxertos de cartilagem são usados para reparar tanto a perda de tecido cartilaginoso como ósseo. A reconstrução de orelhas baseia-se no uso de cartilagem costal, a qual é usada para esculpir um molde semelhante ao ouvido externo para ser aplicado sob a pele. Nos traumas de face, quando o assoalho da órbita é fraturado perde-se o suporte ósseo para o globo ocular, o qual desce para o seio maxilar. Com um enxerto de cartilagem na posição da falha óssea, o globo se mantém em sua posição e a visão binocular estará preservada².

Apesar da grande importância do enxerto de tecido cartilaginoso autógeno, existem grandes dificuldades em seu uso. O primeiro problema é a pouca disponibilidade de áreas doadoras de tecido autógeno para enxertia, portanto grandes defeitos não podem ser reparados. Além disso, após enxertia costuma ocorrer um processo de reabsorção com perda de sua massa inicial e alterando os resultados estéticos finais².

O uso de aloenxertos estão condenados ao insucesso pois o enxerto é degradado pelo sistema imune, que acaba por eliminar o "corpo estranho"².

Alternativa aos enxertos de cartilagem surgiu com o advento dos materiais aloplásticos, ou seja, produtos sintéticos que pretendiam ser inertes, sem despertar o sistema imune. Entretanto, o uso clínico destes materiais não se mostrou animador, pois é

comum as complicações causadas por infecção e extrusão da prótese².

Recentemente, com o advento da bioengenharia de tecidos abriu-se uma nova perspectiva para os cirurgiões reconstrutores e para os pacientes. A principal meta desta nova ciência é a criação de próteses biológicas funcionais, em que se utilizam substâncias biocompatíveis e biodegradáveis servindo de base para o crescimento de tecido biológico. Na última década, diversos trabalhos descrevem a cultura de diversos tipos celulares sobre bases biológicas para criação *in vitro* de novos tecidos ou até verdadeiros órgãos. Os cientistas tentam recriar em laboratório desde pele até osso, tecido muscular, fígado, pâncreas, entre outros³.

Devido a algumas características do tecido cartilaginoso, esta é uma das estruturas do organismo humano que os cientistas mais buscam recriar em laboratório. Normalmente, a cartilagem humana apresenta uma elasticidade e resistência próprias. Além disso, a cartilagem humana não apresenta capacidade regenerativa eficiente sendo substituída por um tecido fibroso sem as mesmas propriedades físicas, com conseqüentes alterações estéticas. Desta forma, pela bioengenharia abre-se a possibilidade de criar cartilagem *in vitro* para substituir o tecido lesado, o qual não é capaz de se regenerar⁴.

Cartilagem é composta basicamente por condrócitos que produzem a matriz extracelular que os circundam. A matriz extracelular contém proteoglicanas como sulfato de condroitina, ácido hialurônico e proteínas como elastina e colágeno. No corpo humano, o colágeno forma 30% das proteínas totais sendo descritos mais de 12 tipos de colágeno que predominam em cada tipo de tecido. O colágeno do tipo II é típico do tecido cartilaginoso, pois este é o único tecido humano em que esta proteína predomina⁴.

Portanto, a engenharia de cartilagem, iniciada por Vacanti et al.⁽³⁾, postula o isolamento de condrócitos humanos e seu cultivo em monocamada, para posteriormente, colocá-los sobre bases que simulem matrizes extracelulares, para reimplantar este sistema em um organismo vivo.

A cultura de condrócitos apresenta algumas peculiaridades que transformam este tipo de cultivo em um processo complexo, exigindo um grande conhecimento do comportamento celular da cultura em monocamada.

Normalmente, quando os condrócitos estão presos na matriz extracelular, estas células apresentam-se diferenciadas mantendo uma morfologia esférica e produzindo grandes quantidades de colágeno tipo II. Quando estas células são cultivadas em monocamada, os condrócitos sofrem um processo de "desdiferenciação" passando a

apresentar uma morfologia fusiforme semelhante a fibroblastos, e após aproximadamente 8 semanas em cultivo sofrem um "switch" com aumento da produção de colágeno tipo I e III, e redução da síntese de colágeno II⁴.

Esta "desdiferenciação" induzida pela cultura em monocamada é cessada quando estas células são colocadas em estruturas tridimensionais. Sittinger e Bujia⁵ demonstraram que os condrócitos quando recolocados em estruturas tridimensionais de agarose recuperam sua forma esférica e se rediferenciam.

Para o isolamento de condrócitos a maioria dos autores utiliza o método de digestão enzimática, que através de banhos seriados da cartilagem em enzimas proteolíticas como colagenase, tripsina e hialuronidase, gerando uma degradação da matriz extracelular e a liberação das células para cultivo em frascos de cultura. Este método de isolamento é extremamente eficiente, isolando um maior número de células em menor tempo. Entretanto, apresenta um alto custo e algum grau de toxicidade celular⁶⁻⁹.

Este protocolo apresenta como objetivo testar o cultivo de condrócitos por um método não enzimático. Para isto, foram isolados condrócitos de cartilagem costal humana pelo método de explante, em que as células migraram da cartilagem e se aderiram ao fundo do frasco de cultura. Posteriormente, pelo método de imunofluorescência indireta dosou-se a capacidade de produção de colágeno tipo II pelos condrócitos isolados, a fim de se avaliar a capacidade das células de produzirem matriz extracelular, demonstrando a manutenção das capacidades fisiológicas das células isoladas e seu potencial de uso para tratamento de lesões cartilaginosas.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. Isolamento de condrócitos

Os condrócitos foram obtidos a partir de fragmentos de cartilagem costal humana. Na Disciplina de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HC-FMUSP, este tipo de material é utilizado como enxerto autógeno de cartilagem para tratamento de microtia ou deformidades traumáticas do pavilhão auditivo. Normalmente neste tipo de procedimento, retira-se a sétima e oitava cartilagem costal cirurgicamente, e o cirurgião molda um novo pavilhão auditivo e enxerta-o no paciente. Geralmente, há um excedente de cartilagem costal que costuma ser desprezado. Desta forma serão utilizados estes excedentes de cartilagem costal como matéria-prima para o isolamento de condrócitos. A amostra foi

transportada em solução salina (NaCl 0,9%) até o laboratório. O material foi lavado em soro fisiológico, depois em álcool 70% de forma rápida (máximo de 20 segs.), e finalmente é lavado pela última vez mergulhando em dois frascos contendo soro fisiológico.

1. Cultura primária por explante

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, a cartilagem costal foi cortada em fragmentos mínimos de 1 mm. Esses fragmentos são molhados em Soro Fetal Bovino para facilitar sua aderência ao frasco de cultura e depositados no fundo das garrafas. Inverte-se então os frascos de modo que os fragmentos fiquem voltados para cima, acrescenta-se 2 ml de Dubbecos Modified Eagle Medium (DMEM) + 10% de Soro Fetal Bovino (PBS) + 1% de Penicilina/Estreptomicina e deixa-se na estufa de CO₂ durante 2 horas. Por fim, desinverte-se cuidadosamente os frascos para evitar que os fragmentos desgrudem da base da garrafa de cultura.

Após um período de 10 dias deve-se trocar o meio de cultura, adicionando-se 5 ml de DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino + 1% de Penicilina/Estreptomicina. A partir de então, o meio é trocado a cada 10 dias até que se inicie a migração celular. As células crescem até a semi-confluência e são então tripsinizadas com tripsina 0,05% + EDTA 0,02%. A tripsina é neutralizada pela adição do DMEM com 10% de SFB, centrifugada e passada para outras duas garrafas para o crescimento dos condrócitos.

2. Demonstração da produção de colágeno II por imunofluorescência indireta

As células foram cultivadas sobre lamínulas até a semi-confluência. Estas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 e fixadas com paraformoldeído a 4% por 1 hora a 4°C. Parte das lamínulas foi incubada com ácido acético 0,15M por 1 minuto, em seguida lavada com PBS e então fixadas, como descrito acima. As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 10 minutos em água oxigenada 3% com metanol 1:1 à temperatura ambiente.

Posteriormente as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com leite desnatado 5% em PBS por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas com anticorpo anticolágeno do tipo II policlonal obtido em camundongos na diluição de 1:50, incubando-se durante a noite à 4°C. Após este período as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS com Tweem20, e então incubadas com IgG anti rabbit conjugado com FITC (Sigma), diluído 1:50 em azul de Evans (5 mg%), por 90 minutos à temperatura

ambiente. Finalmente, após incubação as lamínulas foram novamente lavadas com PBS com Tween20, montadas com glicerina 1:2 em PBS e lidas em microscópio de fluorescência (NIKON).

RESULTADOS

1) Cultura de condrócitos humanos

Foram realizadas três amostras de cartilagem, sendo que todas liberaram células. O tempo médio para início da liberação celular é de 40 a 50 dias. A confluência da primeira garrafa é atingida em aproximadamente 55 a 70 dias.

Abaixo são mostradas as imagens das células ainda presas na matriz extracelular da cartilagem e quando se liberam da matriz e aderem-se ao fundo do frasco de cultura.

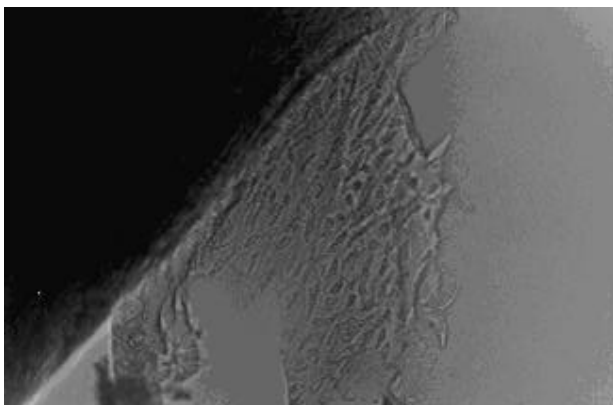


Figura 1. Aumento 10 X: Nesta figura visualiza-se no canto superior esquerdo a imagem da cartilagem cortada de forma mais espessa, enquanto que no centro da foto é possível visualizar os condrócitos com morfologia arredondada, com núcleo visível, permanecendo presos na matriz extracelular.

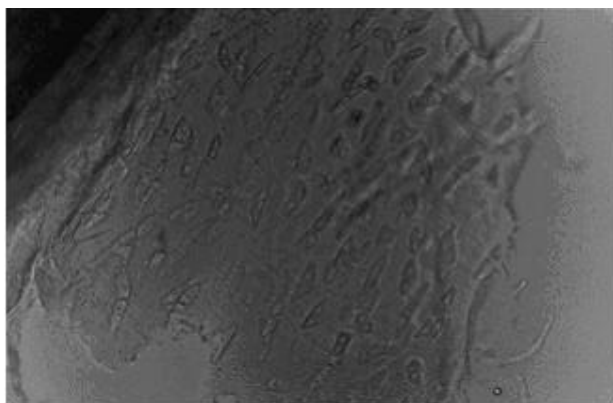


Figura 2. Aumento de 20 X: Trata-se de uma foto com aumento maior da mesma figura acima. Nesta imagem pode-se perceber com mais detalhes a morfologia arredondada das células quando presas na matriz extracelular.

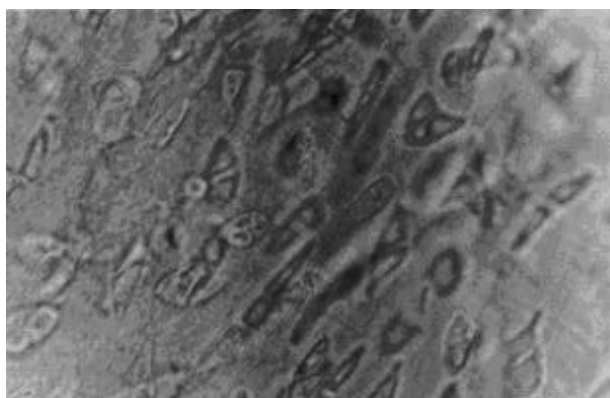


Figura 3. Aumento de 40X: Nesta imagem as células apresentam-se presas na matriz, mantendo forma circular com núcleos visíveis, mostrando com maiores detalhes a matriz extracelular circundando a membrana plasmática celular e mantendo as células presas.

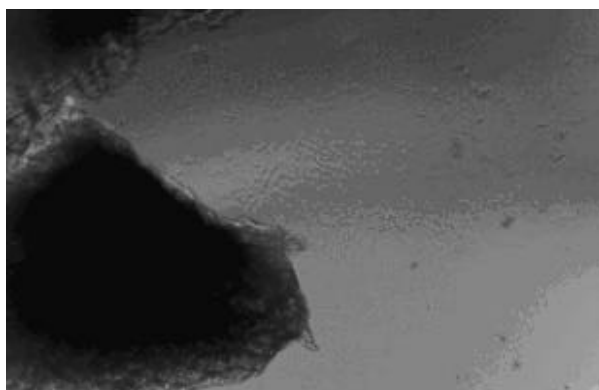


Figura 4. Após 40 dias de cultura, nesta imagem vê-se as células soltas da matriz extracelular, já aderidas ao fundo do frasco de cultura. Os condrócitos apresentam uma forma fusiforme, lembrando fibroblastos.

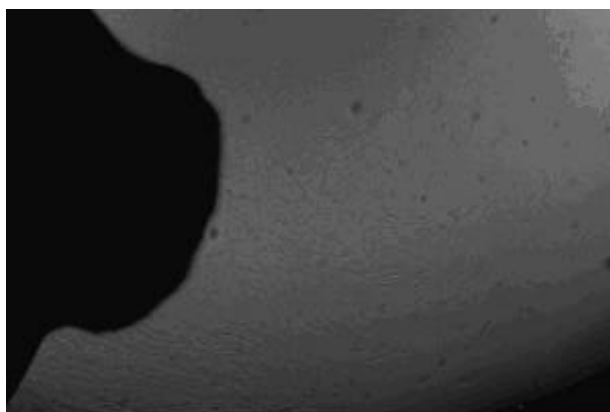


Figura 5. Em outra imagem após 50 dias, os condrócitos mantêm sua morfologia fusiforme e se proliferam em todas as direções do fundo do frasco de cultura.

2) Demonstração da produção de colágeno II por testes de imunofluorescência

Após a aplicação de anticorpos anti colágeno II marcados, estes reagem com o antígeno colágeno II produzido pelos condrócitos humanos. Foram então utilizadas anticorpos anti-anticorpo colágeno II. Estes anticorpos são marcados com substância fluorescente que foi visualizado por microscopia fluorescente.

A reação de imunohistoquímica foi realizada após 65 dias de cultura. As imagens mostraram intensa fluorescência ao redor das células cultivadas, indicando uma grande produção de colágeno II, comprovando tratar-se de condróctios humanos.

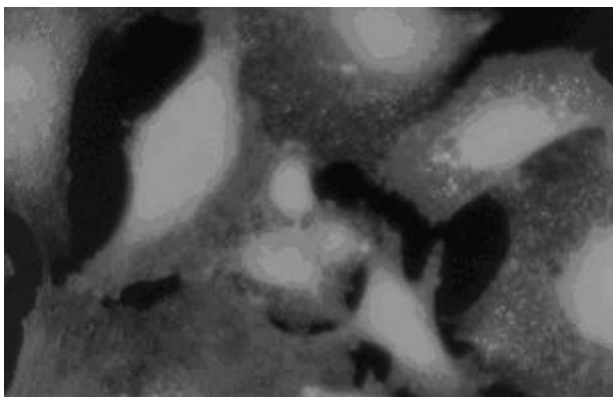


Figura 6. Por microscopia de fluorescência, a imagem acima mostra inúmeras células de coloração amarelada com núcleo e membrana citoplasmática bem definida. Ao redor das células, há pontos fluorescentes esverdeados. Estes pontos ocorrem pela reação entre antígeno (colágeno II) e anticorpo (anticolágeno II). Desta maneira, comprova-se que as células continuam produzindo intensamente colágeno II, específico de condrócitos humanos.

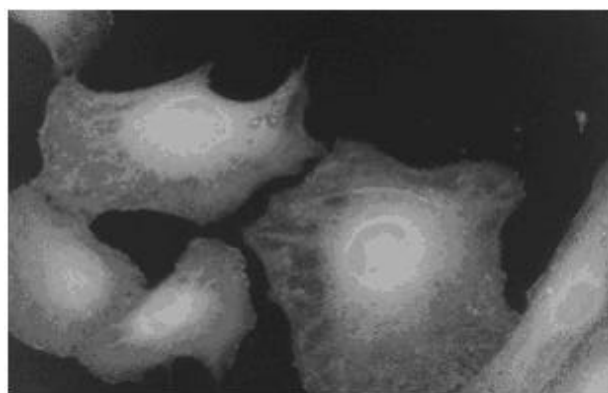


Figura 7. A foto acima comprova que ao redor das células há pontos fluorescentes esverdeados, que são colágeno II marcado.

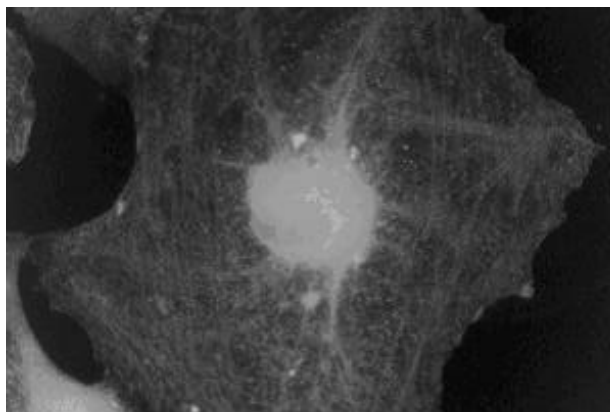


Figura 8. Nesta imagem, enfoca-se uma única célula, no centro em amarelo vê-se o núcleo mais alaranjado e membrana plasmática em um tom mais amarelo. No extracelular, os pontos fluorescentes esverdeados mostram colágeno II marcado.

CONCLUSÃO

- O explante é um método simples e barato que permite o isolamento de condrócitos humanos.
- Por imunofluorescência indireta, comprovou-se que os condrócitos cultivados mantêm sua capacidade fenotípica de produzir colágeno tipo II. Deste modo, comprova-se que as células isoladas produzem matriz extracelular típica do tecido cartilaginoso e são potencialmente utilizáveis para tratamento de lesões cartilaginosas.

DISCUSSÃO

Traumas, tumores cutâneos e doenças congênitas da face são algumas das situações que podem provocar destruição de tecido cartilaginoso. As articulações também podem ser afetadas pelas doenças degenerativas relacionadas a cartilagem, levando a um distúrbio da biomecânica articular e posteriormente, a artrose^{1,2}.

A Cirurgia Plástica e Reconstructiva permanece buscando o material ideal de implante para reparação de defeitos teciduais. Freqüentemente, enxertos autólogos de cartilagens esculpidas são utilizadas para restaurar alterações do contorno facial. Entretanto, apresenta como desvantagens a morbidade e a pouca disponibilidade de áreas doadoras, a distorção e reabsorção do tecido cartilaginoso enxertado. Os materiais aloplásticos inorgânicos são outra opção, mas a extrusão, infecção e a pobre biocompatibilidade são alguns dos problemas do uso destes materiais².

Com o desenvolvimento de um novo campo de pesquisa denominado bioengenharia de tecidos, surgiu uma perspectiva para o tratamento das destruições teciduais. Esta nova ciência alia os princípios da engenharia com conceitos biológicos para desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar a função tecidual.

Por alguns motivos acredita-se que as cartilagens são o tecido ideal para ser reconstruído pela técnica de bioengenharia. Trata-se de um tecido de limitada capacidade regenerativa, composto por um único tipo celular (condrócitos) que necessitam de uma baixa taxa de oxigênio e, *in vivo*, se nutrem por difusão, já que as cartilagens não são vascularizadas. Além disso, as células podem ser isoladas, mantendo a capacidade de produzir matriz extracelular. Desta forma, o transplante destas células poderia ser mantido por difusão até que as células se integrem ao organismo⁴.

A bioengenharia apresenta duas estratégias principais para uso de condrócitos na reparação de cartilagens. A primeira é o uso isolado das células em soluções líquidas para nutrição celular. Alguns cientistas suecos realizaram estudos clínicos para reparação de artrose de joelho injetando condrócitos autógenos cultivados sob o resto de pericôndrio sadio da articulação doente. Após alguns meses, por ressonância magnética identificou-se áreas de restauração da cartilagem, com melhora clínica dos pacientes¹⁰.

A segunda estratégia foi inaugurada em 1988 por Vacanti et al.⁽¹⁾. Esta linha de pesquisa baseia-se no cultivo de condrócitos *in vitro* em matrizes bioabsorvíveis tridimensionais pré-moldadas, para manter as células diferenciadas. Diferentes tipos de matrizes têm sido testadas, desde substâncias biodegradáveis como colágeno até polímeros.

A maior parte dos trabalhos publicados na literatura, realizam o isolamento celular de condrócitos pelo método enzimático, ou seja, usam banhos seriados com enzimas proteolíticas que digerem a matriz extracelular da cartilagem, liberando as células para cultivo. Tripsina, hialuronidase, colagenase, DNAase, entre outras, são citadas como possíveis reagentes degradantes da matriz das cartilagens⁶⁻⁹.

O método enzimático é extremamente rápido, pois em apenas 18 a 24 horas, milhões de células são liberadas para cultivo. Apesar deste maior rendimento, trata-se de uma metodologia extremamente complexa, pois as enzimas apresentam também uma toxicidade celular, e várias vezes as células liberadas apresentam-se mortas (baixa viabilidade celular). Além disso, outro ponto negativo é o alto custo das enzimas utilizadas, inviabilizando bastante o uso deste modo de isolamento celular⁶⁻⁹.

Considerando os argumentos apresentados, neste protocolo apresentamos uma forma alternativa de isolamento celular chamado de explante. Trata-se de um método simples, barato e que inicialmente foi proposto para o isolamento de fibroblastos da derme humana. Basicamente, as cartilagens são cortadas em micro fragmentos e aderidos ao fundo de um frasco de cultura. Mantém-se o sistema em estufa com CO₂ a 5% à temperatura de 36,5°C com meio de cultura DMEM, até que as células migrem dos fragmentos e se adiram ao fundo da garrafa até a semi-confluência.

Foram realizados três amostras de cartilagem costal pelo método de explante. Em todas as três houve liberação celular após 40 a 50 dias de cultura. A semi-confluência foi atingida após 55 a 70 dias.

Deste modo, o método mostrou-se eficiente para o isolamento celular, porém mostrou maior morosidade em comparação com os métodos enzimáticos. Em contrapartida, o custo dos experimentos foi extremamente baixo, e a metodologia é de fácil manipulação e reprodutibilidade.

Neste protocolo, a escolha da cartilagem costal em detrimento de cartilagem auricular e articular como fonte doadora de condrócitos deveu-se a análise de trabalho publicado por Xu et al.¹¹, em 2004. Neste protocolo, os autores isolaram condrócitos destas fontes e mantiveram em cultura sobre um gel de fibrina. Posteriormente, este sistema foi incluído no dorso de ratos atímicos. Após 12 semanas, mediu-se a massa final da mistura. Os condrócitos auriculares geraram uma estrutura 20% maior, os articulares produziram uma redução de 40%, enquanto os costais mantêm uma estabilidade durante todo o tempo estudado. Deste modo, os condrócitos costais se mostraram os mais adequados para a bioengenharia, pois o material produzido *in vitro*, quando implantado em organismo vivo, tende a manter suas proporções sem sofrer grandes distorções¹¹.

A morfologia das células cultivadas era fusiforme, lembrando fibroblastos. Portanto, uma segunda etapa deste trabalho visava demonstrar que as células isoladas eram realmente condrócitos. Estas células são capazes de produzir glicosaminoglicanas e proteínas para formação da matriz extracelular cartilaginosa. O colágeno é uma das principais proteínas sintetizadas. Vários tipos de colágeno são fabricados pelos condrócitos como os do tipo I e III, entretanto o principal tipo produzido é o colágeno II, que é específico das cartilagens.

A comprovação do tipo das células cultivadas foi realizada por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos anti-colágeno II marcados. Algumas células foram colocadas sobre lâminas e cultivadas até a semi-confluência, neste momento foram diluídos os anticorpos anti colágeno II. Posteriormente,

visualizou-se o material por microscopia de fluorescência. As lâminas mostraram-se intensamente coradas com grande captação fluorescente, comprovando que as células produzem colágeno II, confirmando a hipótese de que são condrócitos.

Outro fator importante comprovado é que pelo método de explante, após oito semanas de cultura as células mantêm a capacidade de produção de grande quantidade de colágeno II. Pelo método enzimático, os condrócitos cultivados em monocamada sofrem um processo de desdiferenciação e após 8 semanas apresentam uma redução da produção de colágeno II e um aumento da produção do tipo I e III. Entretanto, por explante após oito semanas a produção de colágeno II permanece grande como demonstrado por imunohistoquímica.

Os achados citados acima sugerem que por explante, os condrócitos possam ter um

comportamento biológico diferente daqueles obtidos por métodos enzimáticos. Para esclarecer estas dúvidas seriam necessários novos estudos da cultura por explante, mantendo-a por mais tempo e dosando os diferentes tipos de colágeno produzidos ao longo de sua evolução.

Os condrócitos isolados podem ser usados tanto isoladamente para restauração das articulações como com matrizes biodegradáveis servindo de base de cultura. Na verdade, a busca pela matriz ideal envolve a maior parte dos esforços atuais da comunidade científica, pois desta maneira será possível construir estruturas rígidas, que podem servir para a reconstrução dos defeitos do contorno facial. Apesar das dúvidas que ainda envolvem o cultivo de condrócitos por explante, as células isoladas desta forma abrem uma grande perspectiva de uso clínico destas células para tratamento das lesões cartilaginosas.

Teixeira Neto N, Tostes MDOA, Grillo VAT, Paggiaro A, Carrasco S, Ferreira MC. Human chondrocytes culture to treatment of cartilaginous injuries Rev Med (São Paulo). 2005 abr.-jun.;84(2):82-9.

ABSTRACT: This work presents as objective to test the culture of chondrocytes for a not enzymatic method. For this, they had been isolated chondrocytes of costal cartilage human being for the method of primary explante, where the cells migrate of the cartilage and if they had adhered to the deep one in the bottle of culture. Later, for the method of indirect immunofluorescence it was dosed capacity of production of collagen type II for the isolated chondrocytes in order to evaluate the capacity of the cells to produce extracellular matrix to demonstrate the maintenance of the physiological capacities of the isolated cells in culture. For bioengineering confides possibility to create cartilage in vitro to substitute one fabric injured, which is not capable of if regenerating by your own. The explante is a simple and cheap method that allows the isolation of human chondrocytes. One proved that the cultivated chondrocytes keep its phenotypic capacity to produce collagen type II. In this way, one proves that the isolated cells produce extracellular matrix typical of the fabric cartilaginous and are potentially usable for treatment of cartilaginous injuries.

KEY WORDS: Collagem Type II/therapeutic use. Cartilage/injuries. Chondrocytes. Cell culture. Cartilage diseases/therapy.

REFERÊNCIAS

1. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Vacanti JP, Vacanti CA. Injectable cartilage. *Plast Reconst Surg.* 1995;96:1390-8.
2. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconst Surg.* 1997;100:297-304.
3. Erggelet C, Steinwachs M. Autologous chondrocyte transplantation: chondrocyte culturing and clinical aspects. *Biol. Matrices Tissue Reconst.* 1999;189-93.
4. Vacanti CA, Rodriguez A. The effect of long-term culture on the ability of human auricular chondrocytes to generate tissue engineered cartilage. *Biol. Matrices Tissue Reconst.* 1999;189-93.
5. Bujia J, Sittinger M, Wilmes E, Hammer C. Effect of growth factor on cell proliferation by septal chondrocytes cultured in monolayer. *Acta Otolaryngol.* 1994;114:539-43.
6. Chu CR, Monosov AZ, Amiel D. In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices. *Biomaterials.* 1995;16:1381-4.

7. Britt JC, Park SS. Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1998;124:671-7.
8. Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. Plast. Reconst. Surg. 1998;101:1580-5.
9. Cook JL, Kreeger JM, Payne JT, Tomlinson JL. Three-dimensional culture of canine articular chondrocytes on multiple transplantable substrates. AJVR. 1997;58:419-24.
10. 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;331:889-95.
11. Xu JW, Zaporozhan V, Peretti GM, Roses RE, Morse KB, Roy AK, et al. Injectable tissue-engineered cartilage with different chondrocyte sources. Plast Reconst Surg. 2004;113:1361-71.

Cultura de condrócitos humanos para tratamento de lesões cartilaginosas*

Human chondrocytes culture to treatment of cartilaginous injuries

**Nuberto Teixeira Neto⁽¹⁾, Marcelo D. O. A. Tostes⁽¹⁾,
Victor Augusto Thome Grillo⁽¹⁾, André Paggiaro⁽²⁾,
Solange Carrasco⁽²⁾, Marcos Castro Ferreira⁽²⁾**

Teixeira Neto N, Tostes MDOA, Grillo VAT, Paggiaro A, Carrasco S, Ferreira MC. Cultura de condrócitos humanos para tratamento de lesões cartilaginosas. Rev Med (São Paulo). 2005 abr.-jun.;84(2):82-9.

RESUMO: Este trabalho apresenta como objetivo testar o cultivo de condrócitos por um método não enzimático. Para isto, foram isolados condrócitos de cartilagem costal humana pelo método de explante primário, em que as células migraram da cartilagem e se aderiram ao fundo do frasco de cultura. Posteriormente, pelo método de imunofluorescência indireta dosou-se a capacidade de produção de colágeno tipo II pelos condrócitos isolados, a fim de se avaliar a capacidade das células de produzirem matriz extracelular para demonstrar a manutenção das capacidades fisiológicas das células isoladas em cultura. Desta forma, pela bioengenharia abre-se a possibilidade de criar cartilagem *in vitro* para substituir um tecido lesado, o qual não é capaz de se regenerar. O explante é um método simples e barato que permite o isolamento de condrócitos humanos. Comprovou-se que os condrócitos cultivados mantêm sua capacidade fenotípica de produzir colágeno tipo II. Deste modo, comprova-se que as células isoladas produzem matriz extracelular típica do tecido cartilaginoso e são potencialmente utilizáveis para tratamento de lesões cartilaginosas.

DESCRITORES: Colágeno Tipo II/uso terapêutico. Cartilagem/lesões. Condrócitos. Cultura de células. Doenças das cartilagens/terapia.

* 1º lugar, área: Básica, 2004.

⁽¹⁾ Alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

⁽²⁾ Orientadores.

Endereço para correspondência: Nuberto Teixeira Neto. Av. Monte Celeste, 153 - CEP 02561-000, São Paulo, SP.
e-mail: nubertoneto@uol.com.br

INTRODUÇÃO

Os maiores desafios são os enfrentados pela medicina com relação aos defeitos do contorno facial. Alguns acidentes causam traumatismo facial com perda de substância levando não somente à uma aparência anômala como a distúrbios funcionais. Em algumas situações, há perda de tecido cartilaginoso ou ósseo podendo gerar assimetrias e deformidades faciais extensas. Desvios de septo nasal trazem obstrução à respiração, enquanto a perda do assoalho ósseo da órbita pode causar diplopia¹.

Alguns tumores cutâneos exigem uma abordagem cirúrgica radical para êxito do tratamento, sendo que algumas vezes se faz necessário a retirada de estruturas cartilaginosas inteiras como nariz ou orelha.

A ausência de estruturas anexas da face pode ocorrer ao nascimento. Existem crianças que nascem sem o pavilhão auditivo (anotia) ou mesmo com este diminuído (microtia)¹. A cirurgia plástica é uma das especialidades médicas mais envolvidas no tratamento deste tipo de problemática. A fim de reparar estas lesões, os cirurgiões quase sempre costumam utilizar-se de enxertos de cartilagem autógena, que por possuir certa resistência e elasticidade permitem que seja possível a construção de arcabouços que garantam a preservação da forma.

Os enxertos de cartilagem são usados para reparar tanto a perda de tecido cartilaginoso como ósseo. A reconstrução de orelhas baseia-se no uso de cartilagem costal, a qual é usada para esculpir um molde semelhante ao ouvido externo para ser aplicado sob a pele. Nos traumas de face, quando o assoalho da órbita é fraturado perde-se o suporte ósseo para o globo ocular, o qual desce para o seio maxilar. Com um enxerto de cartilagem na posição da falha óssea, o globo se mantém em sua posição e a visão binocular estará preservada².

Apesar da grande importância do enxerto de tecido cartilaginoso autógeno, existem grandes dificuldades em seu uso. O primeiro problema é a pouca disponibilidade de áreas doadoras de tecido autógeno para enxertia, portanto grandes defeitos não podem ser reparados. Além disso, após enxertia costuma ocorrer um processo de reabsorção com perda de sua massa inicial e alterando os resultados estéticos finais².

O uso de aloenxertos estão condenados ao insucesso pois o enxerto é degradado pelo sistema imune, que acaba por eliminar o "corpo estranho"².

Alternativa aos enxertos de cartilagem surgiu com o advento dos materiais aloplásticos, ou seja, produtos sintéticos que pretendiam ser inertes, sem despertar o sistema imune. Entretanto, o uso clínico destes materiais não se mostrou animador, pois é

comum as complicações causadas por infecção e extrusão da prótese².

Recentemente, com o advento da bioengenharia de tecidos abriu-se uma nova perspectiva para os cirurgiões reconstrutores e para os pacientes. A principal meta desta nova ciência é a criação de próteses biológicas funcionais, em que se utilizam substâncias biocompatíveis e biodegradáveis servindo de base para o crescimento de tecido biológico. Na última década, diversos trabalhos descrevem a cultura de diversos tipos celulares sobre bases biológicas para criação *in vitro* de novos tecidos ou até verdadeiros órgãos. Os cientistas tentam recriar em laboratório desde pele até osso, tecido muscular, fígado, pâncreas, entre outros³.

Devido a algumas características do tecido cartilaginoso, esta é uma das estruturas do organismo humano que os cientistas mais buscam recriar em laboratório. Normalmente, a cartilagem humana apresenta uma elasticidade e resistência próprias. Além disso, a cartilagem humana não apresenta capacidade regenerativa eficiente sendo substituída por um tecido fibroso sem as mesmas propriedades físicas, com conseqüentes alterações estéticas. Desta forma, pela bioengenharia abre-se a possibilidade de criar cartilagem *in vitro* para substituir o tecido lesado, o qual não é capaz de se regenerar⁴.

Cartilagem é composta basicamente por condrócitos que produzem a matriz extracelular que os circundam. A matriz extracelular contém proteoglicanas como sulfato de condroitina, ácido hialurônico e proteínas como elastina e colágeno. No corpo humano, o colágeno forma 30% das proteínas totais sendo descritos mais de 12 tipos de colágeno que predominam em cada tipo de tecido. O colágeno do tipo II é típico do tecido cartilaginoso, pois este é o único tecido humano em que esta proteína predomina⁴.

Portanto, a engenharia de cartilagem, iniciada por Vacanti et al.⁽³⁾, postula o isolamento de condrócitos humanos e seu cultivo em monocamada, para posteriormente, colocá-los sobre bases que simulem matrizes extracelulares, para reimplantar este sistema em um organismo vivo.

A cultura de condrócitos apresenta algumas peculiaridades que transformam este tipo de cultivo em um processo complexo, exigindo um grande conhecimento do comportamento celular da cultura em monocamada.

Normalmente, quando os condrócitos estão presos na matriz extracelular, estas células apresentam-se diferenciadas mantendo uma morfologia esférica e produzindo grandes quantidades de colágeno tipo II. Quando estas células são cultivadas em monocamada, os condrócitos sofrem um processo de "desdiferenciação" passando a

apresentar uma morfologia fusiforme semelhante a fibroblastos, e após aproximadamente 8 semanas em cultivo sofrem um "switch" com aumento da produção de colágeno tipo I e III, e redução da síntese de colágeno II⁴.

Esta "desdiferenciação" induzida pela cultura em monocamada é cessada quando estas células são colocadas em estruturas tridimensionais. Sittinger e Bujia⁵ demonstraram que os condrócitos quando recolocados em estruturas tridimensionais de agarose recuperam sua forma esférica e se rediferenciam.

Para o isolamento de condrócitos a maioria dos autores utiliza o método de digestão enzimática, que através de banhos seriados da cartilagem em enzimas proteolíticas como colagenase, tripsina e hialuronidase, gerando uma degradação da matriz extracelular e a liberação das células para cultivo em frascos de cultura. Este método de isolamento é extremamente eficiente, isolando um maior número de células em menor tempo. Entretanto, apresenta um alto custo e algum grau de toxicidade celular⁶⁻⁹.

Este protocolo apresenta como objetivo testar o cultivo de condrócitos por um método não enzimático. Para isto, foram isolados condrócitos de cartilagem costal humana pelo método de explante, em que as células migraram da cartilagem e se aderiram ao fundo do frasco de cultura. Posteriormente, pelo método de imunofluorescência indireta dosou-se a capacidade de produção de colágeno tipo II pelos condrócitos isolados, a fim de se avaliar a capacidade das células de produzirem matriz extracelular, demonstrando a manutenção das capacidades fisiológicas das células isoladas e seu potencial de uso para tratamento de lesões cartilaginosas.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. Isolamento de condrócitos

Os condrócitos foram obtidos a partir de fragmentos de cartilagem costal humana. Na Disciplina de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HC-FMUSP, este tipo de material é utilizado como enxerto autógeno de cartilagem para tratamento de microtia ou deformidades traumáticas do pavilhão auditivo. Normalmente neste tipo de procedimento, retira-se a sétima e oitava cartilagem costal cirurgicamente, e o cirurgião molda um novo pavilhão auditivo e enxerta-o no paciente. Geralmente, há um excedente de cartilagem costal que costuma ser desprezado. Desta forma serão utilizados estes excedentes de cartilagem costal como matéria-prima para o isolamento de condrócitos. A amostra foi

transportada em solução salina (NaCl 0,9%) até o laboratório. O material foi lavado em soro fisiológico, depois em álcool 70% de forma rápida (máximo de 20 segs.), e finalmente é lavado pela última vez mergulhando em dois frascos contendo soro fisiológico.

1. Cultura primária por explante

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, a cartilagem costal foi cortada em fragmentos mínimos de 1 mm. Esses fragmentos são molhados em Soro Fetal Bovino para facilitar sua aderência ao frasco de cultura e depositados no fundo das garrafas. Inverte-se então os frascos de modo que os fragmentos fiquem voltados para cima, acrescenta-se 2 ml de Dubbecos Modified Eagle Medium (DMEM) + 10% de Soro Fetal Bovino (PBS) + 1% de Penicilina/ Estreptomicina e deixa-se na estufa de CO₂ durante 2 horas. Por fim, desinverte-se cuidadosamente os frascos para evitar que os fragmentos desgrudem da base da garrafa de cultura.

Após um período de 10 dias deve-se trocar o meio de cultura, adicionando-se 5 ml de DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino + 1% de Penicilina/ Estreptomicina. A partir de então, o meio é trocado a cada 10 dias até que se inicie a migração celular. As células crescem até a semi-confluência e são então tripsinizadas com tripsina 0,05% + EDTA 0,02%. A tripsina é neutralizada pela adição do DMEM com 10% de SFB, centrifugada e passada para outras duas garrafas para o crescimento dos condrócitos.

2. Demonstração da produção de colágeno II por imunofluorescência indireta

As células foram cultivadas sobre lamínulas até a semi-confluência. Estas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 e fixadas com paraformoldeído a 4% por 1 hora a 4°C. Parte das lamínulas foi incubada com ácido acético 0,15M por 1 minuto, em seguida lavada com PBS e então fixadas, como descrito acima. As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 10 minutos em água oxigenada 3% com metanol 1:1 à temperatura ambiente.

Posteriormente as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com leite desnatado 5% em PBS por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas com anticorpo anticolágeno do tipo II policlonal obtido em camundongos na diluição de 1:50, incubando-se durante a noite à 4°C. Após este período as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS com Tweem20, e então incubadas com IgG anti rabbit conjugado com FITC (Sigma), diluído 1:50 em azul de Evans (5 mg%), por 90 minutos à temperatura

ambiente. Finalmente, após incubação as lamínulas foram novamente lavadas com PBS com Tween20, montadas com glicerina 1:2 em PBS e lidas em microscópio de fluorescência (NIKON).

RESULTADOS

1) Cultura de condrócitos humanos

Foram realizadas três amostras de cartilagem, sendo que todas liberaram células. O tempo médio para início da liberação celular é de 40 a 50 dias. A confluência da primeira garrafa é atingida em aproximadamente 55 a 70 dias.

Abaixo são mostradas as imagens das células ainda presas na matriz extracelular da cartilagem e quando se liberam da matriz e aderem-se ao fundo do frasco de cultura.

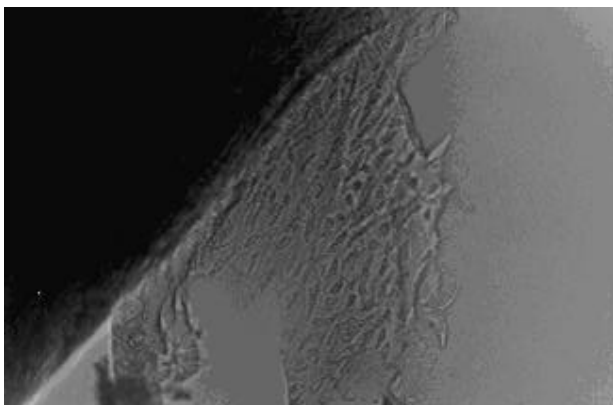


Figura 1. Aumento 10 X: Nesta figura visualiza-se no canto superior esquerdo a imagem da cartilagem cortada de forma mais espessa, enquanto que no centro da foto é possível visualizar os condrócitos com morfologia arredondada, com núcleo visível, permanecendo presos na matriz extracelular.

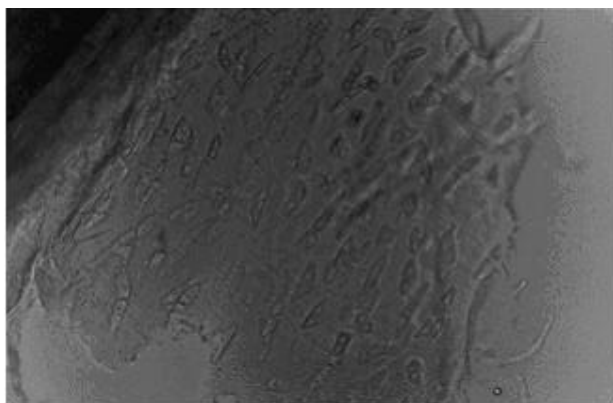


Figura 2. Aumento de 20 X: Trata-se de uma foto com aumento maior da mesma figura acima. Nesta imagem pode-se perceber com mais detalhes a morfologia arredondada das células quando presas na matriz extracelular.

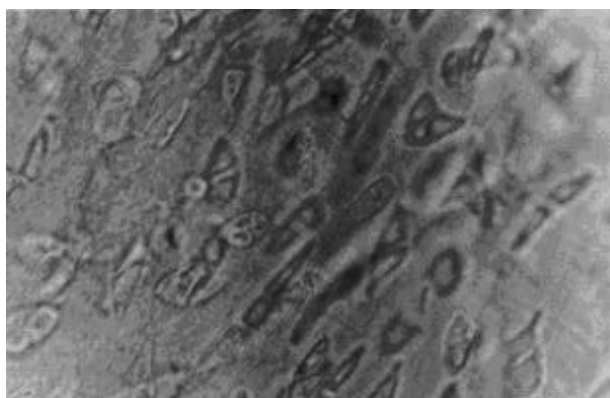


Figura 3. Aumento de 40X: Nesta imagem as células apresentam-se presas na matriz, mantendo forma circular com núcleos visíveis, mostrando com maiores detalhes a matriz extracelular circundando a membrana plasmática celular e mantendo as células presas.

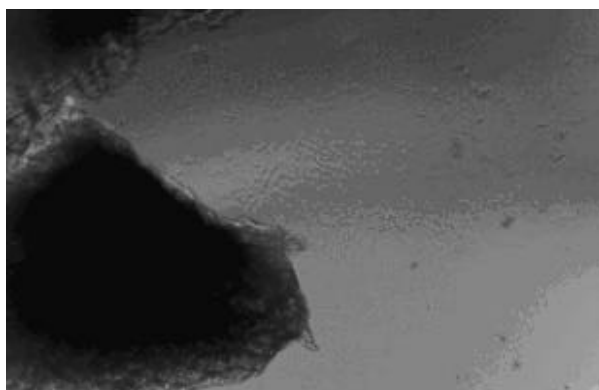


Figura 4. Após 40 dias de cultura, nesta imagem vê-se as células soltas da matriz extracelular, já aderidas ao fundo do frasco de cultura. Os condrócitos apresentam uma forma fusiforme, lembrando fibroblastos.

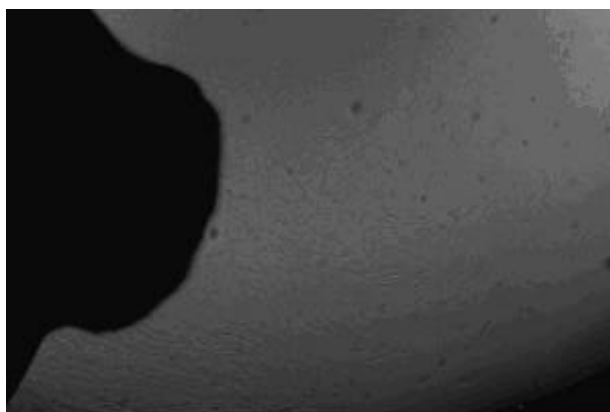


Figura 5. Em outra imagem após 50 dias, os condrócitos mantêm sua morfologia fusiforme e se proliferam em todas as direções do fundo do frasco de cultura.

2) Demonstração da produção de colágeno II por testes de imunofluorescência

Após a aplicação de anticorpos anti colágeno II marcados, estes reagem com o antígeno colágeno II produzido pelos condrócitos humanos. Foram então utilizadas anticorpos anti-anticorpo colágeno II. Estes anticorpos são marcados com substância fluorescente que foi visualizado por microscopia fluorescente.

A reação de imunohistoquímica foi realizada após 65 dias de cultura. As imagens mostraram intensa fluorescência ao redor das células cultivadas, indicando uma grande produção de colágeno II, comprovando tratar-se de condróctios humanos.

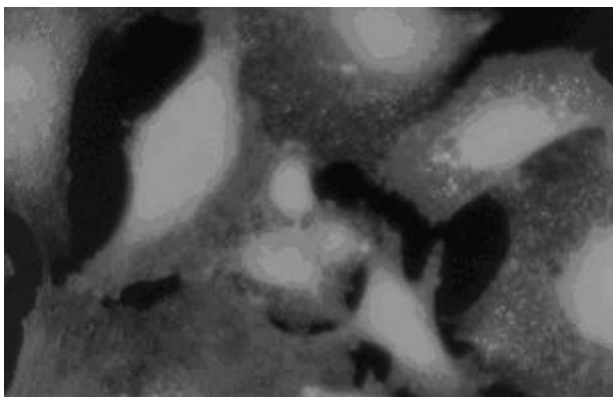


Figura 6. Por microscopia de fluorescência, a imagem acima mostra inúmeras células de coloração amarelada com núcleo e membrana citoplasmática bem definida. Ao redor das células, há pontos fluorescentes esverdeados. Estes pontos ocorrem pela reação entre antígeno (colágeno II) e anticorpo (anticolágeno II). Desta maneira, comprova-se que as células continuam produzindo intensamente colágeno II, específico de condrócitos humanos.

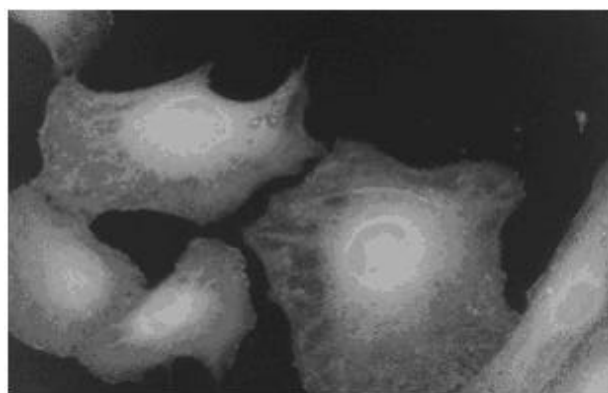


Figura 7. A foto acima comprova que ao redor das células há pontos fluorescentes esverdeados, que são colágeno II marcado.

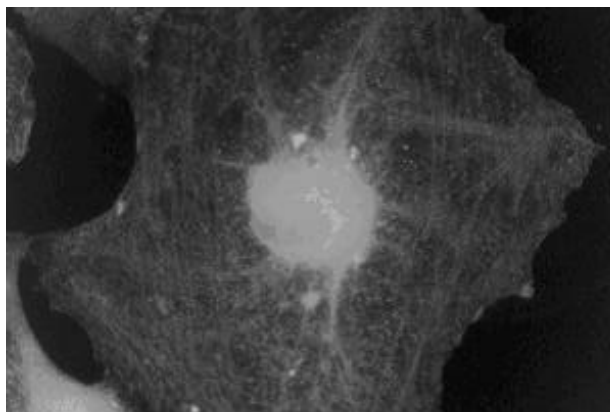


Figura 8. Nesta imagem, enfoca-se uma única célula, no centro em amarelo vê-se o núcleo mais alaranjado e membrana plasmática em um tom mais amarelo. No extracelular, os pontos fluorescentes esverdeados mostram colágeno II marcado.

CONCLUSÃO

- O explante é um método simples e barato que permite o isolamento de condrócitos humanos.
- Por imunofluorescência indireta, comprovou-se que os condrócitos cultivados mantêm sua capacidade fenotípica de produzir colágeno tipo II. Deste modo, comprova-se que as células isoladas produzem matriz extracelular típica do tecido cartilaginoso e são potencialmente utilizáveis para tratamento de lesões cartilaginosas.

DISCUSSÃO

Traumas, tumores cutâneos e doenças congênitas da face são algumas das situações que podem provocar destruição de tecido cartilaginoso. As articulações também podem ser afetadas pelas doenças degenerativas relacionadas a cartilagem, levando a um distúrbio da biomecânica articular e posteriormente, a artrose^{1,2}.

A Cirurgia Plástica e Reconstructiva permanece buscando o material ideal de implante para reparação de defeitos teciduais. Freqüentemente, enxertos autólogos de cartilagens esculpidas são utilizadas para restaurar alterações do contorno facial. Entretanto, apresenta como desvantagens a morbidade e a pouca disponibilidade de áreas doadoras, a distorção e reabsorção do tecido cartilaginoso enxertado. Os materiais aloplásticos inorgânicos são outra opção, mas a extrusão, infecção e a pobre biocompatibilidade são alguns dos problemas do uso destes materiais².

Com o desenvolvimento de um novo campo de pesquisa denominado bioengenharia de tecidos, surgiu uma perspectiva para o tratamento das destruições teciduais. Esta nova ciência alia os princípios da engenharia com conceitos biológicos para desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar a função tecidual.

Por alguns motivos acredita-se que as cartilagens são o tecido ideal para ser reconstruído pela técnica de bioengenharia. Trata-se de um tecido de limitada capacidade regenerativa, composto por um único tipo celular (condrócitos) que necessitam de uma baixa taxa de oxigênio e, *in vivo*, se nutrem por difusão, já que as cartilagens não são vascularizadas. Além disso, as células podem ser isoladas, mantendo a capacidade de produzir matriz extracelular. Desta forma, o transplante destas células poderia ser mantido por difusão até que as células se integrem ao organismo⁴.

A bioengenharia apresenta duas estratégias principais para uso de condrócitos na reparação de cartilagens. A primeira é o uso isolado das células em soluções líquidas para nutrição celular. Alguns cientistas suecos realizaram estudos clínicos para reparação de artrose de joelho injetando condrócitos autógenos cultivados sob o resto de pericôndrio sadio da articulação doente. Após alguns meses, por ressonância magnética identificou-se áreas de restauração da cartilagem, com melhora clínica dos pacientes¹⁰.

A segunda estratégia foi inaugurada em 1988 por Vacanti et al.⁽¹⁾. Esta linha de pesquisa baseia-se no cultivo de condrócitos *in vitro* em matrizes bioabsorvíveis tridimensionais pré-moldadas, para manter as células diferenciadas. Diferentes tipos de matrizes têm sido testadas, desde substâncias biodegradáveis como colágeno até polímeros.

A maior parte dos trabalhos publicados na literatura, realizam o isolamento celular de condrócitos pelo método enzimático, ou seja, usam banhos seriados com enzimas proteolíticas que digerem a matriz extracelular da cartilagem, liberando as células para cultivo. Tripsina, hialuronidase, colagenase, DNAase, entre outras, são citadas como possíveis reagentes degradantes da matriz das cartilagens⁶⁻⁹.

O método enzimático é extremamente rápido, pois em apenas 18 a 24 horas, milhões de células são liberadas para cultivo. Apesar deste maior rendimento, trata-se de uma metodologia extremamente complexa, pois as enzimas apresentam também uma toxicidade celular, e várias vezes as células liberadas apresentam-se mortas (baixa viabilidade celular). Além disso, outro ponto negativo é o alto custo das enzimas utilizadas, inviabilizando bastante o uso deste modo de isolamento celular⁶⁻⁹.

Considerando os argumentos apresentados, neste protocolo apresentamos uma forma alternativa de isolamento celular chamado de explante. Trata-se de um método simples, barato e que inicialmente foi proposto para o isolamento de fibroblastos da derme humana. Basicamente, as cartilagens são cortadas em micro fragmentos e aderidos ao fundo de um frasco de cultura. Mantém-se o sistema em estufa com CO₂ a 5% à temperatura de 36,5°C com meio de cultura DMEM, até que as células migrem dos fragmentos e se adiram ao fundo da garrafa até a semi-confluência.

Foram realizados três amostras de cartilagem costal pelo método de explante. Em todas as três houve liberação celular após 40 a 50 dias de cultura. A semi-confluência foi atingida após 55 a 70 dias.

Deste modo, o método mostrou-se eficiente para o isolamento celular, porém mostrou maior morosidade em comparação com os métodos enzimáticos. Em contrapartida, o custo dos experimentos foi extremamente baixo, e a metodologia é de fácil manipulação e reprodutibilidade.

Neste protocolo, a escolha da cartilagem costal em detrimento de cartilagem auricular e articular como fonte doadora de condrócitos deveu-se a análise de trabalho publicado por Xu et al.¹¹, em 2004. Neste protocolo, os autores isolaram condrócitos destas fontes e mantiveram em cultura sobre um gel de fibrina. Posteriormente, este sistema foi incluído no dorso de ratos atímicos. Após 12 semanas, mediu-se a massa final da mistura. Os condrócitos auriculares geraram uma estrutura 20% maior, os articulares produziram uma redução de 40%, enquanto os costais mantêm uma estabilidade durante todo o tempo estudado. Deste modo, os condrócitos costais se mostraram os mais adequados para a bioengenharia, pois o material produzido *in vitro*, quando implantado em organismo vivo, tende a manter suas proporções sem sofrer grandes distorções¹¹.

A morfologia das células cultivadas era fusiforme, lembrando fibroblastos. Portanto, uma segunda etapa deste trabalho visava demonstrar que as células isoladas eram realmente condrócitos. Estas células são capazes de produzir glicosaminoglicanas e proteínas para formação da matriz extracelular cartilaginosa. O colágeno é uma das principais proteínas sintetizadas. Vários tipos de colágeno são fabricados pelos condrócitos como os do tipo I e III, entretanto o principal tipo produzido é o colágeno II, que é específico das cartilagens.

A comprovação do tipo das células cultivadas foi realizada por imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos anti-colágeno II marcados. Algumas células foram colocadas sobre lâminas e cultivadas até a semi-confluência, neste momento foram diluídos os anticorpos anti colágeno II. Posteriormente,

visualizou-se o material por microscopia de fluorescência. As lâminas mostraram-se intensamente coradas com grande captação fluorescente, comprovando que as células produzem colágeno II, confirmando a hipótese de que são condrócitos.

Outro fator importante comprovado é que pelo método de explante, após oito semanas de cultura as células mantêm a capacidade de produção de grande quantidade de colágeno II. Pelo método enzimático, os condrócitos cultivados em monocamada sofrem um processo de desdiferenciação e após 8 semanas apresentam uma redução da produção de colágeno II e um aumento da produção do tipo I e III. Entretanto, por explante após oito semanas a produção de colágeno II permanece grande como demonstrado por imunohistoquímica.

Os achados citados acima sugerem que por explante, os condrócitos possam ter um

comportamento biológico diferente daqueles obtidos por métodos enzimáticos. Para esclarecer estas dúvidas seriam necessários novos estudos da cultura por explante, mantendo-a por mais tempo e dosando os diferentes tipos de colágeno produzidos ao longo de sua evolução.

Os condrócitos isolados podem ser usados tanto isoladamente para restauração das articulações como com matrizes biodegradáveis servindo de base de cultura. Na verdade, a busca pela matriz ideal envolve a maior parte dos esforços atuais da comunidade científica, pois desta maneira será possível construir estruturas rígidas, que podem servir para a reconstrução dos defeitos do contorno facial. Apesar das dúvidas que ainda envolvem o cultivo de condrócitos por explante, as células isoladas desta forma abrem uma grande perspectiva de uso clínico destas células para tratamento das lesões cartilaginosas.

Teixeira Neto N, Tostes MDOA, Grillo VAT, Paggiaro A, Carrasco S, Ferreira MC. Human chondrocytes culture to treatment of cartilaginous injuries Rev Med (São Paulo). 2005 abr.-jun.;84(2):82-9.

ABSTRACT: This work presents as objective to test the culture of chondrocytes for a not enzymatic method. For this, they had been isolated chondrocytes of costal cartilage human being for the method of primary explante, where the cells migrate of the cartilage and if they had adhered to the deep one in the bottle of culture. Later, for the method of indirect immunofluorescence it was dosed capacity of production of collagen type II for the isolated chondrocytes in order to evaluate the capacity of the cells to produce extracellular matrix to demonstrate the maintenance of the physiological capacities of the isolated cells in culture. For bioengineering confides possibility to create cartilage in vitro to substitute one fabric injured, which is not capable of if regenerating by your own. The explante is a simple and cheap method that allows the isolation of human chondrocytes. One proved that the cultivated chondrocytes keep its phenotypic capacity to produce collagen type II. In this way, one proves that the isolated cells produce extracellular matrix typical of the fabric cartilaginous and are potentially usable for treatment of cartilaginous injuries.

KEY WORDS: Collagem Type II/therapeutic use. Cartilage/injuries. Chondrocytes. Cell culture. Cartilage diseases/therapy.

REFERÊNCIAS

1. Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, Vacanti JP, Vacanti CA. Injectable cartilage. *Plast Reconstr Surg*. 1995;96:1390-8.
2. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100:297-304.
3. Erggelet C, Steinwachs M. Autologous chondrocyte transplantation: chondrocyte culturing and clinical aspects. *Biol. Matrices Tissue Reconst*. 1999;189-93.
4. Vacanti CA, Rodriguez A. The effect of long-term culture on the ability of human auricular chondrocytes to generate tissue engineered cartilage. *Biol. Matrices Tissue Reconst*. 1999;189-93.
5. Bujia J, Sittinger M, Wilmes E, Hammer C. Effect of growth factor on cell proliferation by septal chondrocytes cultured in monolayer. *Acta Otolaryngol*. 1994;114:539-43.
6. Chu CR, Monosov AZ, Amiel D. In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices. *Biomaterials*. 1995;16:1381-4.

7. Britt JC, Park SS. Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1998;124:671-7.
8. Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. Plast. Reconst. Surg. 1998;101:1580-5.
9. Cook JL, Kreeger JM, Payne JT, Tomlinson JL. Three-dimensional culture of canine articular chondrocytes on multiple transplantable substrates. AJVR. 1997;58:419-24.
10. 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;331:889-95.
11. Xu JW, Zaporozhan V, Peretti GM, Roses RE, Morse KB, Roy AK, et al. Injectable tissue-engineered cartilage with different chondrocyte sources. Plast Reconst Surg. 2004;113:1361-71.