

## Cultura primária de condrócitos articular humana em monocamada

### Culture of human articular chondrocyte in monolayer

Fabio T. KITADAI<sup>1\*</sup>  
Cristina A. FIGUEIREDO<sup>2</sup>  
Suely P. CURTI<sup>2</sup>  
Luis Eugênio G. LEME<sup>1</sup>  
Clara D. R. CARELLI<sup>1</sup>  
Marco M. AMATUZZI<sup>1</sup>

RIALA6/962

Kitadai, F. T. et al. Cultura primária de condrócitos articular humana em monocamada. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 221 - 226, 2003.

**RESUMO.** O objetivo deste trabalho foi padronizar a metodologia para obtenção de cultura primária de condrócitos de cartilagem hialina articular humana para sua utilização em transplante autólogo. Foram selecionados cinco pacientes do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) sem doença degenerativa articular, com indicação de cirurgia artroscópica para correção de afecção do ligamento cruzado anterior do joelho. Os fragmentos de cartilagem articular pesando aproximadamente 300-500 mg foram colocados em placas de Petri contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) com 40µg/ml de gentamicina. Cada fragmento foi cortado e colocado em 2mg/ml de colagenase diluída em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram isoladas e cultivadas em frasco de cultura T25 em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células aderiram ao frasco de cultura após 24 h e após o 3º dia de cultivo as células apresentavam morfologia elipsóide e estrelada. As culturas foram fixadas e coradas intensamente com azul de toluidina sugerindo que as células iniciaram a síntese de uma nova matriz extracelular. A curva de crescimento mostrou que a razão de crescimento foi em torno do segundo e terceiro dia de cultivo, com a duplicação do número de células semeadas. As culturas apresentaram alta viabilidade celular após o congelamento celular em nitrogênio líquido.

**PALAVRAS-CHAVE.** cartilagem, condrócito, cultura celular

<sup>1</sup>- Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP)

<sup>2</sup>- Pesquisadora Científica – Divisão de Biologia Médica, Serviço de Virologia, Seção de Vírus Produtores de Exantemas do Instituto Adolfo Lutz

\*Endereço para correspondência: Instituto da Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 335 - Cep: 05403-010

e-mail: kitadaifabio@uol.com.br

## INTRODUÇÃO

O tecido cartilaginoso é conjuntivo, avascular, formado células (condrócitos), substância intersticial (matriz extracelular) constituída de fibras e por uma substância intermediária (condromucóide). Há três tipos de cartilagem: hialina, elástica e fibrocartilagem, cada uma com características peculiares.

A cartilagem hialina, destaque do presente estudo, apresenta a substância intersticial com delgadas fibras de colágeno obscurecidas pela substância fundamental (condromucóide). Além desta característica, nos adultos, as células apresentam-se em grupos isógenos. Na matriz extracelular, encontram-se fibrilas heterotípicas de colágeno formadas pela associação de fibrilas de colágeno do tipo II com as moléculas de colágeno do tipo IX e do tipo XI<sup>11,15,16</sup>. Encontra-se, ainda, uma grande quantidade de proteoglicano específico, o agregano, que além de conter os glicosaminoglicanos (condroitim sulfato e queratam sulfato), tem a capacidade de interagir com o ácido hialurônico formando assim grandes agregados com massa molecular total ao redor de 10<sup>7</sup> KDa<sup>11</sup>. Outros proteoglicanos de menor massa molecular são encontrados nas cartilagens hialinas associados à superfície das fibrilas de colágeno. Os colágenos formam uma rede de macromoléculas resistentes à tensão, enquanto os agregados de proteoglicanos formam um gel hidratado e viscoso, responsável pela absorção das diferentes pressões impostas à cartilagem.

Os condrócitos mantêm o equilíbrio da matriz extracelular através de mecanismos de síntese e degradação. Quando o equilíbrio é alterado, a função da cartilagem é prejudicada. O metabolismo do condrócito sofre influência de estímulos mecânicos exercidos sobre a cartilagem, como peso e pressões, que exercidos sobre a cartilagem estimulam a produção de proteoglicanos. Porém, quando a cartilagem articular sofre alguma agressão que provoca ruptura, o processo de reparação é limitado.

Atualmente as culturas de células animais são utilizadas em várias áreas de pesquisa. Entre as principais aplicações, destacam-se o cultivo primário de condrócitos e sua utilização como transplante autólogo<sup>4,10,12,13,14,15,16</sup>.

O isolamento e cultivo de condrócitos a partir de tecido cartilaginoso humano foi feito pela primeira vez por Manning et al<sup>14</sup>. No entanto, a metodologia que emprega condrócitos obtidos “in vitro” para o tratamento de lesões de cartilagem em seres humanos só foi conseguida por Brittberg et al<sup>4</sup> na década de 90. Neste trabalho, os autores utilizaram condrócitos, cultivados a partir de amostras de cartilagem do próprio paciente, que após o crescimento “in vitro” foram transplantados nas áreas lesadas da cartilagem dos joelhos.

Os condrócitos têm sido cultivados utilizando-se duas metodologias: a descrita por Green<sup>9</sup>, que utiliza a digestão enzimática em série: hialuronidase, tripsina e collagenase; e a descrita por Benya et al<sup>3</sup> na qual a digestão enzimática é realizada usando uma solução de collagenase em baixa concentração de CO<sub>2</sub>, que resulta na obtenção de 90% de condrócitos do tecido articular. Os autores realizaram modificações nos métodos de extração já descritos na literatura, com o intuito de obter um maior número de células viáveis para cultivo celular.

O objetivo desse trabalho foi a padronização de uma metodologia básica para o cultivo de condrócitos de cartilagem hialina articular humana para sua utilização como transplante autólogo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados cinco pacientes do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) que se submeteram a tratamento cirúrgico do joelho com problemas do ligamento cruzado anterior e que não apresentavam doenças degenerativas prévias (Tabela 1).

Os pacientes foram informados do procedimento proposto e concordaram em participar do presente estudo.

**Tabela 1.** Pacientes Triados

Paciente	Idade	Sexo	Diagnóstico*	Peso do fragmento da cartilagem (mg)
1	22	M	L.C.A	500
2	25	M	L.C.A	475
3	24	M	L.C.A	465
4	30	M	L.C.A	440
5	34	M	L.C.A	300

\*- L.C.A- Cirurgia Artroscópica para Tratamento de Lesão do Ligamento Cruzado Anterior

**Tabela 2.** Critérios de inclusão e exclusão para obtenção de amostras de cartilagem

	INCLUSÃO	EXCLUSÃO
IDADE	Até 49,5 anos	Acima de 49,5 anos
PESO*	Peso Normal	Sobrepeso/Obesidade
ANTECEDENTES DE DOENÇAS OSTEOARTICULARES**	Ausente	Presente
EXAME DE CARTILAGEM	Aspecto Normal	Aspecto Degenerado

Destes pacientes foram retirados fragmentos da cartilagem articular do joelho, sem sinais aparentes de degeneração, obtidos de zona não submetida à carga, utilizando-se bisturi fino. Todas as amostras de cartilagem articular obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão (Tabela 2).

### Cultura de Condrócitos

Os fragmentos da cartilagem articular dos cinco pacientes pesavam aproximadamente de 300 a 500mg (Tabela 1), totalmente livres de outros tecidos. Foram colhidos asépticamente e colocados em meio DMEM em solução salina balanceada de Earle, contendo gentamicina (40mg/ml). Os fragmentos da cartilagem foram cortados em pedaços de 3x3 mm e lavados duas vezes no próprio meio de cultura contendo 40 mg/ml de gentamicina.

As amostras foram incubadas a 37° C em 10 ml de meio de cultura com 10% SFB contendo 2mg/ml de collagenase tipo I, pH 7,2 durante 30 minutos. Após este período, o meio contendo os condrócitos liberados da matriz foram colhidos e ao tecido não digerido foi adicionado nova solução de collagenase e, a amostra incubada novamente a 37°C.

Os condrócitos obtidos de cada extração foram, então, filtrados em tela de nylon para remover os fragmentos não dissolvidos e mantidos em banho de gelo até a completa extração da amostra.

As células foram lavadas duas vezes em meio de cultura, centrifugando-se a 1.000 RPM por 10 minutos. Após as lavagens, as células foram delicadamente ressuspendidas em DMEM com 10% de SFB sem antibiótico e semeadas em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> (Costar, Falcon) numa concentração de 1x10<sup>5</sup> céls./ml.

A viabilidade celular foi quantificada com o corante vital azul de tripan (0,5% em solução fisiológica) em câmara hemocitométrica. As culturas celulares das amostras foram mantidas em estufa a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi acompanhado por observação diária em microscópio invertido.

### Curva de Crescimento

Para a realização da curva de crescimento celular, tubos de ensaios foram semeados com as células obtidas da amostra da cartilagem articular dos pacientes número 1 e 2. As células foram cultivadas em tubos de cultura numa concentração de

1x10<sup>5</sup> células/ml em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 24 horas de cultivo, o meio foi descartado e as células foram tratadas com uma solução de ATV (tripsina 0,2% versene 0,02%). Após o descolamento das células do tubo de cultura foi feita a contagem de células provenientes de 3 tubos de ensaio, utilizando-se a câmara hemocitométrica. As contagens celulares foram realizadas durante o período de 10 dias consecutivos, com intervalos de 24 horas.

A partir do número de células contadas em cada tubo, calculou-se a média diária que foi utilizada para a elaboração da curva do crescimento celular.

### Congelamento Celular

Visando futuros estudos, as culturas foram preservadas em nitrogênio líquido a -196°C. O meio de preservação foi constituído de DMEM com 10% de SFB, contendo 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO).

### Estudos Morfológicos

#### Microscopia de Fase

As culturas de condrócitos em semi-confluência e confluência foram examinadas e fotografadas diariamente no microscópio Zeiss, de microscopia de fase, utilizando-se um filtro verde como contraste.

#### Microscopia de Luz

As monocamadas das culturas de condrócitos em semi-confluência e confluência foram coradas pelo corante azul de toluidina. Antes da fixação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e as células foram fixadas em 1.0% de glutaraldeído em tampão (fostato de sódio e potássio 0.15 M, pH 7,2). A fixação ocorreu por 10 minutos em temperatura ambiente.

A seguir, o material foi lavado em uma solução contendo tampão durante 15 minutos e corado durante 10 minutos numa solução aquosa de azul de toluidina 0,5% em pH 3,5. Após esse tempo, o corante foi removido e as culturas foram lavadas em tampão e rapidamente observadas e fotografadas em microscópio óptico comum da marca Olympus.

## RESULTADOS

O cultivo primário de condrócitos foi estabelecido a partir de quatro fragmentos dos cinco pacientes testados. As células

isoladas do fragmento de cartilagem do paciente número 5 não foram quantitativamente suficientes para a formação da monocamada celular.

Os condrócitos foram isolados do tecido utilizando colagenase diluída em DMEM contendo 10% de SFB. Após as lavagens celulares, foi feito o teste de viabilidade celular, realizado com base na incorporação do corante vital azul de tripan. O método de extração celular foi excelente com 95% das células viáveis.

O cultivo primário foi iniciado com incubação de  $10^5$  células/ml em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e mantidas a  $37^\circ\text{C}$ . Após 24 horas foram observadas colônias de células elipsóides e estreladas que aderiram ao frasco de cultura. As células que não aderiram ao frasco de cultura foram contadas em câmara hemocitométrica e a contagem celular mostrou que 5% das células não foram capazes de aderir e morreram no transcorrer das primeiras 72 horas. Na Figura 1A, observa-se o estágio de desenvolvimento atingido após 72 horas. Os agregados celulares que constituem colônias e também condrócitos isolados exibem aspecto elíptico e estrelado com grande quantidade de prolongamentos celulares irregulares. Por volta do 7º dia de cultivo, os condrócitos cresceram sobre toda a superfície do frasco de cultura, o que resultou no aparecimento de uma monocamada celular (Figura 1B) com aspecto fusiforme. A cultura primária de condrócitos foi mantida até o 25º dia de cultura. Na Figura 1C, podemos verificar a cultura corada com azul de toluidina mostrando o acúmulo da matriz metacromática sintetizada pelos condrócitos em cultivo.

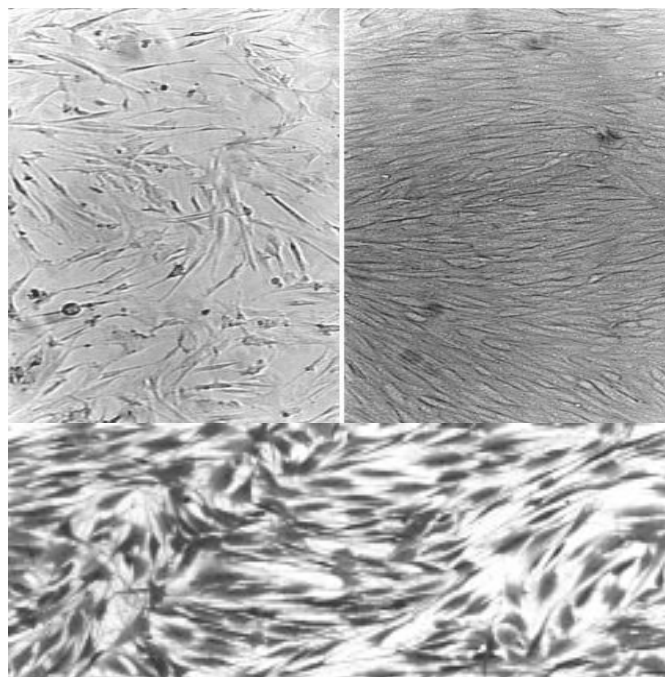
A morfologia e o crescimento dos condrócitos obtidos da extração enzimática das quatro amostras das cartilagens articulares utilizadas foram semelhantes.

A curva de crescimento indicou que o maior índice de multiplicação celular foi em torno do segundo e terceiro dia de cultivo, com a duplicação do número de células semeadas (Fig. 2). A densidade máxima foi atingida no sétimo dia de cultivo com uma diminuição da velocidade de multiplicação no décimo dia. Não houve diferença no crescimento celular das culturas dos pacientes nº 1 e 2, quando realizadas as curvas de crescimento. Não realizamos a curva de crescimento dos pacientes 3 e 4, visto que as 4 amostras apresentavam padrões semelhantes.

As culturas primárias continuaram apresentando alta viabilidade celular após o congelamento em meio de preservação constituído pelo meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 10% de DMSO, à temperatura do nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ). Frascos contendo  $1 \times 10^6$  células/ml foram descongelados e cultivados em frasco de cultura. As células aderiram após 24 horas, iniciaram sua multiplicação celular até a formação de uma monocamada celular.

## DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com o objetivo de estabelecer a cultura primária de condrócitos de cartilagem hialina articular para sua utilização em transplante autólogo.



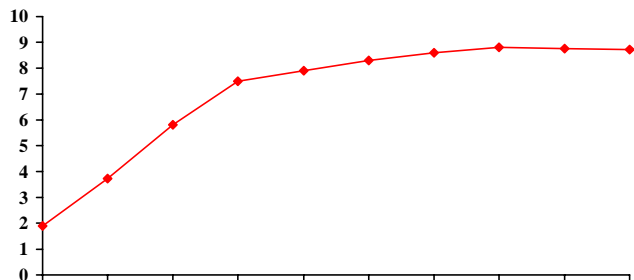
**Figura 1.** Fotomicrografias da cultura de condrócitos no microscópio de contraste de fase corada com azul de toluidina. Em A, observa-se o estágio da cultura de condrócitos após 72 horas. Observam-se agregados celulares que constituem colônias e condrócitos isolados, com aspecto elíptico, com grande quantidade de prolongamentos celulares. Em B, nota-se no 15º dia, as células formando uma monocamada celular e o aspecto fusiforme dos condrócitos. Em C, a cultura de condrócitos no 8º dia de cultivo, coradas com azul de toluidina, onde se observa a metacromasia. Aumento 100x.

Os resultados obtidos neste estudo, mostrou que o método de extração utilizado resultou em uma completa separação celular com a obtenção de 95% de células viáveis para o cultivo. As células foram semeadas na concentração de  $1 \times 10^5$  céls./ml, pois vários estudos têm demonstrado que as células cultivadas na concentração acima descrita sintetizam colágeno II e agrecano<sup>2, 3, 6, 9, 18</sup>.

Os condrócitos obtidos a partir dos fragmentos da cartilagem e cultivados em alta densidade celular ( $1 \times 10^5$  células/ml) aderiram ao frasco de cultura após 24 horas e após este período, colônias de células com aspectos elíptico e estrelado, com prolongamentos celulares foram visualizadas por microscopia óptica.

Com a amostra do paciente número 5 não foi possível obter a cultura de condrócitos, pois o fragmento articular era pequeno, pesava aproximadamente 300 mg, o que demonstrou que o tamanho do fragmento e a quantidade de células são fatores extremamente importantes para a obtenção e cultivo de condrócitos “in vitro”.

Em relação ao estudo da curva de crescimento, todas as amostras de cartilagem apresentavam padrões semelhantes, como: tamanho da amostra, idade do paciente, padrão histológico e de crescimento celular em cultura. Assim foram realizadas apenas as curvas de crescimento das culturas dos



**Figura 2.** Curva de Crescimento da Cultura de Condrcitos dos pacientes 1 e 2 . Cada ponto plotado na curva representa a média das densidades celulares de três tubos de cultura após contagem em câmara de Neubauer.

pacientes n° 1 e 2, pois estas amostras foram consideradas representativas do grupo. Em nenhuma cultura foi utilizado qualquer fator de estimulação ou de inibição que pudesse alterar a curva de crescimento<sup>7</sup>. Os nossos resultados foram semelhantes aos vários estudos realizados por outros autores.

A cultura de condrócitos atingiu a confluência celular apresentando morfologia fusiforme descrita por Aulhouse et al<sup>(1)</sup>. Durante todo o seu cultivo, no que diz respeito à transformação celular “in vitro”<sup>6,17</sup> as características

morfológicas e as do crescimento celular da cultura não sofreram qualquer alteração. Após a confluência celular, as células perderam sua motilidade e passaram a apresentar alterações na membrana plasmática com perda da área de superfície em contato com o substrato e portanto, alterando sua adesão ao mesmo. Essas alterações, descritas por Folkman e Moscona<sup>5</sup> e Freshney et al<sup>6</sup>, demonstram que as células controlam a sua densidade populacional de maneira análoga ao sistema de retroalimentação negativo, sugerindo que os fatores de crescimento e as proteínas da matriz extracelular mantêm o seu microambiente celular<sup>1,2,3,6,17,18</sup>.

Em nosso estudo constatamos que a vitalidade metabólica dos condrócitos “in vitro” depende de três fatores essenciais: a) do tamanho do fragmento de cartilagem usado para a obtenção das células; b) da densidade celular ; c) e da manutenção da adesividade das células ao frasco de cultura.

Os resultados deste trabalho foram promissores abrindo perspectivas para que seja realizado no Brasil o transplante autólogo de cartilagem hialina.

RIALA6/962

Kitadai, F. T. et al. - Culture of human articular chondrocyte in monolayer. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 221 - 226, 2003.

**ABSTRACT.** The purpose of this study was the padronization of the obtained human articular cartilage cell culture methodology. Five patients were selected from Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP). All patients suffered from anterior ligament lesion with cartilage degeneration. The diagnosis and the surgery were performed by knee arthroscopy. The articular cartilage fragments (weight, 300 to 500 mg) were placed in Petri dishes containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 40µg/ml. The fragment was finely diced and treated with 2mg/ml collagenase in medium DMEM containing 10% fetal serum bovine. The cells isolated were seeded at high density in T25 flasks in medium DMEM with 10% of fetal calf serum (FCS). The cells attached to the flask after 24 hours the cells began to adhere to the flask. By day 3 the cell culture presented elipsoid and star morphology. Cultures fixed and stained with toluidine blue showed extracellular staining, suggesting these cells had begun to synthesize a new matrix. The growth rate of chondrocytes was high in the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> days of the cultive. The chondrocytes were frozen into liquid nitrogen and showed high viability.

**KEY WORDS.** cartilage, chondrocyte, cell culture

## REFERÊNCIAS

1. Aulthouse, A. et al. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. **Vitro Cell. Dev. Biol.**, 25:659-68, 1989.
2. Archer, W.C. et al. Phenotypic modulation in sub-populations of human articular chondrocytes in vitro. **J. Cell. Sci.**, 97: 361-71, 1990.
3. Benya, P.D. et al. The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III type I trimer, but not type II. Verifications by cyanogens bromide peptide analysis. **Biochemistry**, 16: 865-72, 1977.
4. Brittberg, M. et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. **N. Engl. J. Med.**, 331: 889-95, 1994.
5. Folkman, J.; Moscona, A. Role of cell shape in growth control. **Nature**, 273: 345-9, 1978.
6. Freshney, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. New York, Alan, R. Liss Inc., 1987.
7. Glowacki, J. et al. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 172: 93-8, 1983.
8. Gorti, G.K. et al. Cartilage tissue engineering using cryogenic chondrocytes. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 129 (8): 889-93, 2003
9. Green, W.T. Behavior of articular chondrocytes in cell culture. **Clin. Orthop.**, 75: 248-60, 1971.
10. Green, W.T. Articular Cartilage Repair: Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. **Clin. Orthop.**, 124: 237-50, 1977.
11. Hascall, V. C.; Hascall G. K. Proteoglycans in Hay, E.D (ed). **Cell Biology of extracellular matrix**. New York , p. 39-52, 1981.
12. Kuriwaka, M. et al. Optimum combination of monolayer and three-dimensional cultures for cartilage-like tissue engineering. **Tissue Eng.**, 9(1): 41-9, 2003.
13. Mandl, E.W. et al. Serum free medium supplemented with high-concentration FGF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity. **Tissue Eng.**, 8(4): 573-80, 2002
14. Manning, W. K. et al. Isolation and culture of chondrocytes from human articular cartilage. **Arthritis Rheum.**, 10: 235-93, 1967.
15. Mayne, R.; Burgeson R.E. Collagen types in cartilage. In: **Articular Cartilage Biochemistry** (Kuettner, Schleyerbach and Hascall)ed. New York, Raven Press, 1987.
16. Van Der Rest, M.; Mayne R. Type IX collagen proteoglycan form cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. **J. Biol. Chem.**, 26: 1615-8, 1988.
17. Von Der Mark, K. et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. **Nature**, 267: 531-2, 1977.
18. Watt, F. M. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. **J. Cell. Sci.**, 89: 373-8, 1988.

Recebido em 18/08/2003; Aprovado em 12/11/2003