



## Associação de células-tronco mesenquimais com scaffold de colágeno para indução condrogênica

Mesenchymal stem cells associated to collagen scaffold in view of chondrogenesis

Bruno Paiva dos Santos<sup>1</sup>, Maiele Dornelles Silveira<sup>1</sup>, Renata Guarani<sup>1</sup>, Luciana Fraga da Costa Diesel<sup>1</sup>, Patrícia Sesterheim<sup>2</sup>, Magno da Silva Marques<sup>3</sup>, Ana Paula Horn<sup>3</sup>, Nance Beyer Nardi<sup>1</sup> e Melissa Camassola<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Células-tronco e Engenharia de Tecidos, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

<sup>2</sup>Fundação Estadual de Produção e Pesquisa do Rio grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brasil

<http://www.seer.ufms.br/index.php/pecibes/index>

### Resumo

\*Autor correspondente: Melissa Camassola, Universidade Luterana do Brasil – ULBRA..  
E-mail:  
[melissa.camassola@ulbra.br](mailto:melissa.camassola@ulbra.br)

As células-tronco mesenquimais estão presentes em todo o organismo, possuem grande plasticidade e são candidatas para aplicação clínica em terapias de regeneração tecidual. Na engenharia de tecidos, vários *scaffolds* biodegradáveis tridimensionais são usados como substitutos artificiais para a matriz extracelular. O biomaterial colágeno, disponível comercialmente, contém uma matriz composta de esponja de colágeno altamente porosa e que permite a adesão celular. O reparo de lesões em cartilagem articular é uma preocupação na medicina devido a sua limitada capacidade de autorrenovação. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (do inglês, *Adipose Derived Stem Cells* - ASCs) a um *scaffold* a base de colágeno, cultivar este construto em diferentes condições *in vitro* e analisar histologicamente a capacidade condrogênica após implantação *in vivo*. As ASCs foram associadas a um *scaffold* comercial de colágeno tipo I-III e cultivadas durante 4 e 6 semanas em meio de cultura completo e em meio de diferenciação condrogênica. A associação do biomaterial com as ASCs foi analisada *in vitro* e, em seguida, este construto foi implantado na região subcutânea de camundongos. As ASCs tiveram alta taxa de adesão e proliferação quando associadas ao colágeno na densidade de  $1,28 \times 10^6$  células/cm<sup>3</sup>. A análise histológica dos construtos após serem implantados *in vivo* revelou que o fenótipo condrogênico aparece após a implantação e há uma menor vascularização nos grupos induzidos a diferenciação condrogênica durante 4 e 6 semanas. Nossos resultados sugerem que o construto ASCs-*scaffold* colágeno possui potencial condrogênico em ambiente fisiológico.

Palavras-chave: ASC; reparação cartilaginosa; biomaterial; vascularização.

Key-words: ASC; chondrogenic repair; biomaterial; vascularization.

### Abstract

Mesenchymal stem cells are present throughout the organism, have great plasticity and are promisors to be used in clinical application. In tissue engineering, a variety of three-dimensional biodegradable scaffolds (3D) is used as artificial substitutes for extracellular matrix. Collagen is an available scaffold and easily purified. Matrix composed of collagen sponge is highly porous and allows cell adhesion. Repair in articular cartilage lesions is an important concern in surgery due to limited ability to self-renewal. Our goal in this study is to evaluate Adipose stem cell response to a commercial 3D collagen scaffold, maintain this construct in different conditions *in vitro* and analyze cartilage formation after implantation *in vivo*. Murine ASC were associated upon a comercial Type I-III collagen scaffold, cultivated during 4 and 6 weeks in Complete Culture Medium (CCM) and in chondrogenic differentiation medium and implanted subcutaneously. ASC had high adhesion rate and high proliferation rate upon scaffold in  $1.28 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>. Histological analysis of *in vivo* inserts suggests biomaterial can maintain chondrogenic phenotype after implantation and there is a lower vascularization in groups treated during 4 and 6 weeks *in vitro*. Our results suggest 3D collagen scaffold has chondrogenic potential in physiologic environment.

## 1. Introdução

Células-tronco mesenquimais (do inglês, Mesenchymal Stem Cells - MSCs) são células de origem mesodérmica primordial e que possuem grande plasticidade fenotípica (Beyer Nardi e Da Silva Meirelles, 2006). As MSCs estão presentes em todo o organismo (Da Silva Meirelles et al., 2006; Da Silva Meirelles et al., 2008) e seu potencial terapêutico é explicado principalmente pela produção de moléculas bioativas e respostas a essas biomoléculas. Estas biomoléculas e as MSCs proporcionam um microambiente regenerativo em lesões, sendo capazes de limitar a área lesada e de criar uma resposta autorregenerativa. O conhecimento sobre as características das MSCs é maior sobre seu desempenho *in vitro* quando comparado ao *in vivo*. As principais propriedades das MSCs são: (i) a auto-renovação e plasticidade, (ii) a capacidade quimiotática e migração para os locais de lesão e inflamação, (iii) a secreção de mediadores parácrinos e fatores tróficos, (iv) propriedades imunomoduladoras, (v) propriedade angiogênica e (vi) o papel de regulação durante reações inflamatórias locais (Meirelles e Nardi, 2009; Matri et al., 2014).

Na engenharia de tecidos, vários tipos de scaffolds biodegradáveis tridimensionais (3D) são usados como substitutos artificiais para a matriz extracelular. Esses biomateriais podem ser compostos de moléculas naturais e/ou sintéticas poliméricas. Em contraste aos sistemas de cultura celular convencionais bidimensionais (2D), suportes 3D proporcionam um substrato aderente físico para cultura celular *in vitro* bem como para a regeneração de tecidos *in vivo* (Saito et al., 2001; Tan et al., 2001). Os componentes purificados e derivados de matriz extracelular decelularizada são escolhas lógicas de scaffolds visto que mantêm a estrutura e composição química da matriz. Suportes celulares podem ser compostos por diferentes biomoléculas, tais como colágeno, fibrina e ácido hialurônico, tornando-se potencialmente menos imunogênicos e com estrutura adequada para o crescimento celular (Matthews et al., 2002). Quando scaffolds são enriquecidos por células, os tecidos ósseo e o cartilaginoso estão entre os poucos tecidos onde as MSCs podem conduzir a regeneração por colonização e diferenciação, enquanto que em outros cenários, tais como o tecido cardíaco ou doenças vasculares, as MSCs atuam principalmente por ação parácrina/autócrina e possivelmente propriedades imunomoduladoras (Ciapetti et al., 2012).

Para a cartilagem, o colágeno é um scaffold candidato e facilmente purificado a partir de tecidos. A matriz composta de esponja de colágeno é altamente porosa e com poros interligados, eficaz para a infiltração de células e facilitando o aporte de oxigênio e nutrientes. O construto esponja colágeno-células pode ser melhorado com a adição de fibras de colágeno que proporcionam aumento da adesão celular sem afetar a morfologia das células (Hiraoka et al., 2003). A reparação de lesões da cartilagem articular é uma preocupação importante na medicina, devido a sua limitada capacidade de autorrenovação, isto é, baixa capacidade de regeneração *in vivo*. Estratégias baseadas em biomateriais, suplementação de células e adição de biomoléculas ativas têm sido amplamente estudadas na engenharia de tecidos para promover a reparação da cartilagem (Betre et al., 2006; Malda et al., 2005;).

Alguns estudos mostram que MSCs humanas induzidas à diferenciação condrogênica perderam o seu comprometimento condrogênico quando implantadas no ambiente subcutâneo, passando a comprometer-se com linhagem osteogênica (Pelletari et al., 2006; Cui et al., 2007). Um estudo cultivou MSCs em scaffold de ácido polilático revestido com ácido poliglicólico e este construto foi induzido à diferenciação condrogênica *in vitro* por 4 a 12 semanas e então implantado via subcutânea em camundongos, durante 12 ou 24 semanas. Apesar das análises histológica e morfológica e a quantificação de glicosaminoglicanos terem revelado estrutura típica de cartilagem após 8 semanas de indução *in vitro*, os construtos ossificaram quando implantados *in vivo*. Por outro lado, as amostras induzidas durante 12 semanas *in vitro* mantiveram a estrutura de cartilagem, após implantadas *in vivo* (Liu et al., 2008). Isto indica que as MSCs necessitam alcançar um estado diferenciado e maduro de diferenciação *in vitro* para manter o seu fenótipo após implantadas em um microambiente diferente do de origem. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta das MSCs associadas a um scaffold comercial de colágeno, cultivar este construto em diferentes condições *in vitro* e analisar histologicamente a capacidade condrogênica após implantação *in vivo*.

## 2. Material e Métodos

O meio de cultura completo (CCM) foi composto por meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal de bovino (CULTILAB, São Paulo, Brasil) e 10 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxi)etil)-1-ácido piperazinoetanossulfônico, ácido livre, 2,5 - 3,7 g/L) (HDMEM). Solução salina de Hanks sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> foi usada para lavar tecidos e células. Todos os reagentes utilizados foram da Sigma Chemical (St. Louis, MO), a menos que indicados. Plásticos de cultura utilizados foram da BD Falcon (São Paulo, Brasil).

### 2.1. ANIMAIS

Camundongos C57BL/6N machos com 8-10 semanas de idade foram utilizados neste estudo. Eles foram mantidos em condições normais no biotério. O manuseio foi feito de acordo com os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Arouca (Lei nº 11.794, de Oito de outubro de 2008). A utilização destes animais foi aprovada pela Comissão de Ética da Universidade Luterana do Brasil sob o registro 2009-017A.

### 2.2. ISOLAMENTO DAS ASCs

O tecido adiposo foi coletado da região inguinal e digerido em solução de collagenase tipo I (250 U/mL) durante cerca de 30 min. O tecido digerido foi centrifugado a 400 x g e o precipitado foi plaqueado. As culturas foram mantidas em atmosfera umidificada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando a confluência se aproximava de 90%, as células eram transferidas a uma área maior. As células foram observadas diariamente em microscópio invertido (Axiovert 25; Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) e fotomicrografias foram tiradas com câmera digital (AxioCam MRC, Zeiss), usando software AxioVision 3,1 (Zeiss).

## 2.3. CARACTERIZAÇÃO IN VITRO

### 2.3.1. CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram incubadas durante 30 min a 4 °C, com anticorpos contra CD106, Sca-1, CD34, CD11b e CD45 (Pharmingen BD, San Diego, CA, EUA), conjugados com PE ou FITC. As células foram analisadas num FACScalibur com o laser a 488nm (Becton Dickinson, San Diego, CA) e software CellQuest. O Software inMDI 2,8 foi usado para construir os histogramas. As células estavam nas passagens 4-5 e foram analisados 104 eventos.

### 2.3.2. DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em placas e mantidas durante 4 semanas em meio de diferenciação. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana e sua composição foi HDMEM suplementado com os fatores como a seguir. Para a diferenciação osteogênica, 10<sup>-8</sup>M de dexametasona, 5 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato e 10mM de β-glicerolfosfato. Para observar a deposição de cálcio, as células foram coradas durante 5 min. com Alizarina Red S em pH 4,1. Para a diferenciação adipogênica, 10<sup>-8</sup>M de dexametasona, 2,5 µg/mL de insulina, 100µM de indometacina (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) e 3,5µM de rosiglitazona (GlaxoSmithKline, Middlesex, Reino Unido) (Nora et al., 2012). Os vacúolos lipídicos foram observados em microscópio e corados com Oil Red O durante 5 min.. Para a diferenciação condrogênica: 6,25µg/mL de insulina, 10ng/mL de TGF-β1 e 50ng/mL de ácido ascórbico 2-fosfato. A matriz de cartilagem foi corada com Alcian Blue (pH 2,5) durante 5 min.. Fotomicrografias foram tiradas com câmera digital (AxioCam MRC, Zeiss), usando software AxioVision 3,1 (Zeiss).

### 2.3.3. SCAFFOLD DE COLÁGENO

Matrizes de colágeno comercial (Three Dimensional Collagen Composite Scaffold BD™) foram utilizadas, catálogo número #354613 (San Diego, CA, EUA). As peças continham uma mistura de colágeno tipos I e III de pele bovina. O biomaterial possuía poros que variam entre 100-200µM e as peças possuíam as seguintes dimensões: diâmetro 4,2-5,2mm, altura de 3,9-4,5mm e volume de 0,039cm<sup>3</sup>.

Tabela 1. Grupos experimentais (n=3 para cada grupo)

Grupo	Material implantado
G1	Biomaterial
G2	Biomaterial + ASC cultivadas em CCM por 4 semanas
G3	Biomaterial + ASC cultivadas em meio condrogênico por 4 semanas
G4	Biomaterial + ASC cultivadas em CCM por 6 semanas
G5	Biomaterial + ASC cultivadas em meio condrogênico por 6 semanas
G6	Biomaterial + ASC aderidas por 3 h

## 2.3.4. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO

O biomaterial foi testado em duas condições de cultivo: seco (D) e hidratado (H) com CCM durante 30 min antes de ter as células associadas. Duas densidades celulares foram testadas no biomaterial:  $2,56 \times 10^5$  células/cm<sup>3</sup> (menor densidade-LD) e  $1,28 \times 10^6$  células/cm<sup>3</sup> (maior densidade-HD). As células foram associadas ao biomaterial e incubadas por 3 h em meio CCM. Em seguida, o biomaterial foi lavado com CCM para remover as células não aderentes e estas foram coradas com Giemsa e contadas. Assim, o número de células aderidas a cada peça de biomaterial pôde ser determinado. As células foram observadas em um microscópio de contraste de fase invertida. Os construtos foram mantidos durante 3 dias em CCM e a atividade celular foi avaliada através do ensaio MTT, comparando-se as leituras com uma curva padrão como já descrito anteriormente (Deimling et al., 2011). Esta análise foi feita em triplicata com as ASCs em passagem 4-6.

## 2.3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os construtos foram fixados com paraformaldeído a 4% durante 1h e, em seguida, tratados com etanol, seguido por tratamento com acetato de isoamilo e secagem à vácuo. Finalmente, os construtos foram revestidos por cintilação com ouro e visualizado por MEV (XL20, Philips Electronics NV, Eindhoven, Holanda) no Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise – CMME da Universidade Luterana do Brasil. Scaffolds sem células também foram avaliados.

## 2.4. DIFERENCIAÇÃO CELULAR NO SCAFFOLD E AVALIAÇÃO IN VIVO

As ASCs foram associadas ao scaffold hidratado e seco e induzidas à diferenciação condrogênica durante 4 e 6 semanas e então implantadas na região subcutânea em camundongos C57BL/6N por 14 dias. O tempo foi estipulado depois da realização de um ensaio-piloto feito por nosso grupo e a partir dele pudemos observar que em períodos maiores de implantação este biomaterial foi completamente reabsorvido (dados não publicados). Os animais foram mantidos em biotério. Os grupos experimentais (n = 3 para cada grupo) estão descritos na Tabela 1.

ASC: Célula-tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo; CCM: meio de cultura completo;

## 2.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Amostras de tegumento contendo os construtos foram coletadas e fixadas em formol 10% tamponado durante 8-10h e preservadas em álcool 70% até o processamento. As amostras foram cortadas em micrótomo (6  $\mu\text{m}$ ; LEICA) e coradas com hematoxilina/eosina/azul alcian (HE-AB) para a análise de, respectivamente, estrutura histológica e a deposição de nova matriz de cartilagem no construto. Os parâmetros morfológicos analisados em cortes histológicos foram ausência/presença de células inflamatórias, vascularização e deposição de mucinas.

## 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças entre os grupos foi analisada utilizando

Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) por One-Way ANOVA seguido de Tukey ou de Dunnet como post-hoc ou analisados por teste t-Student, quando necessário. Quando  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 3. Resultados

### 3.1. ANÁLISE IN VITRO

#### 3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS ASC

As ASCs mostraram morfologia fibroblastóide. Quando submetidas a sinais de indução específicos, elas foram capazes de diferenciar-se em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Além disso, no perfil imunofenotípico, as ASCs foram positivas para os marcadores CD29, CD44 e CD49e e negativas para CD11b, CD45. Este perfil é típico de MSCs (Figura 1).

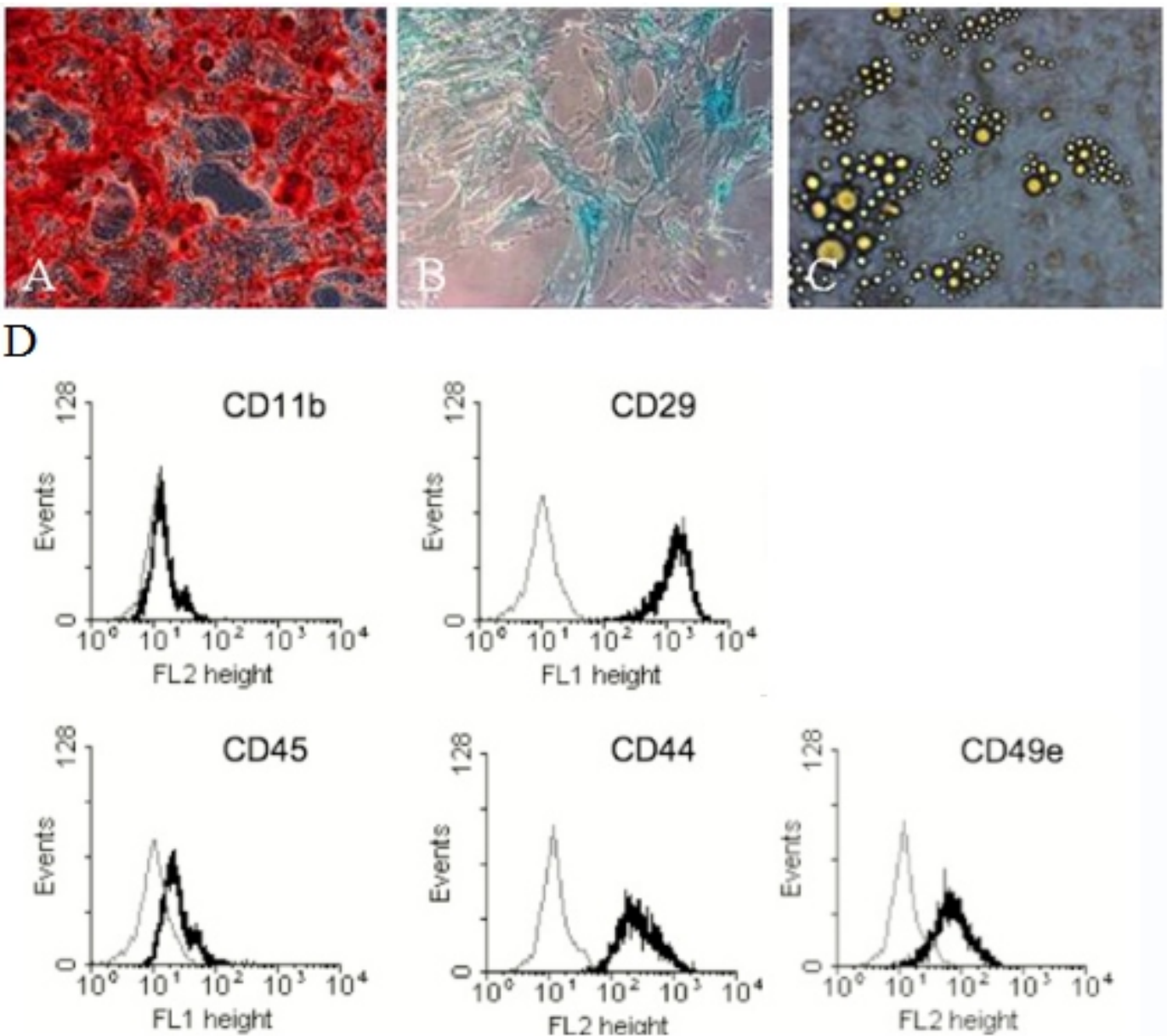


Figura 1. Caracterização das ASCs. As ASCs foram induzidas à (A) diferenciação osteogênica e coradas com Alizarin Red S, Aumento: 100x; (B) diferenciação condrogênica e coradas com Alcian Blue, Aumento: 200x; (C) diferenciação adipogênica e coradas com Oil Red O, Aumento 100x. As células foram induzidas durante 4 semanas. (D) Perfil imunofenotípico analisado por citometria de fluxo. As ASCs foram negativas para CD11b e CD45 e positivas para CD29, CD44 e CD49e.

### 3.1.2. BIOMATERIAL + ASC

Os resultados de adesão e atividade celular são mostrados na Figura 2. As ASCs tiveram alta taxa de adesão nos biomateriais independente das densidades testadas. Em HD, observou-se que a taxa de adesão foi maior no scaffold seco quando comparado ao scaffold hidratado (Fig 2A,  $p < 0,05$ ). Além disso, as ASCs associadas aos scaffolds hidratados em HD apresentam maior atividade celular quando comparadas com o mesmo número de células semeadas em ambiente 2D (Fig. 2B,  $P < 0,01$ ).

Os construtos também foram observados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 3). De maneira geral, nota-se que a estrutura tornou-se mais densa quando as células foram associadas. Quando o construto foi tratado em meio condrogênico, houve a formação de estruturas nodulares (Figura 3G).

### 3.2. Análise In VIVO

#### 3.2.1. HISTOLOGIA

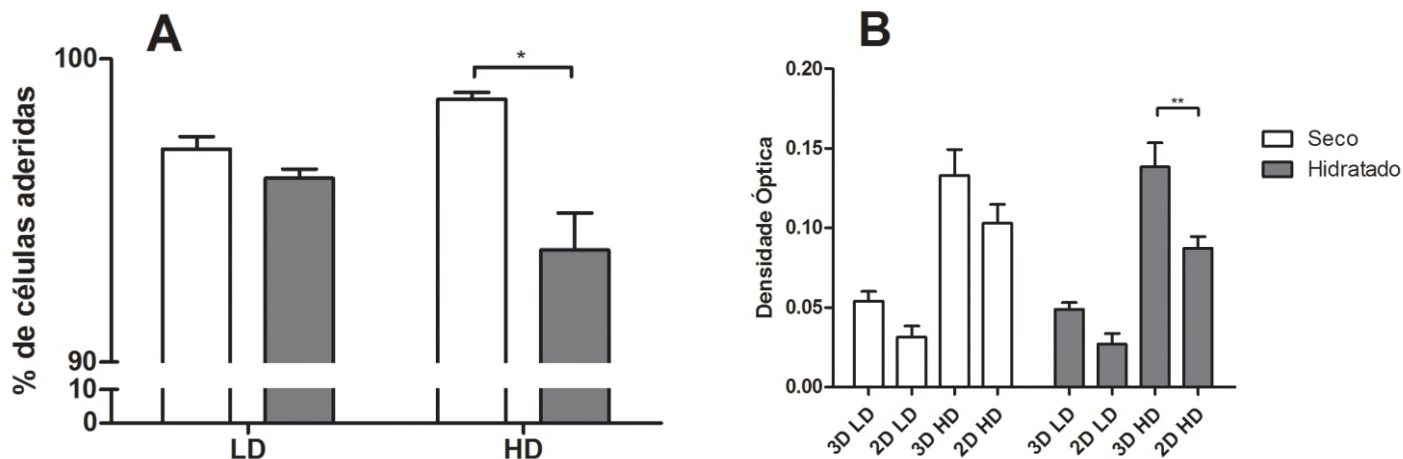


Figura 2. Adesão e atividade celular das ASCs associadas ao biomaterial de colágeno. (A) Percentagem de adesão. As células foram associadas a  $2,56 \times 10^5$  células/cm<sup>3</sup> (LD) e  $1,28 \times 10^6$  células/cm<sup>3</sup> (HD) sobre o biomaterial e incubadas por 3h. Após, os construtos foram lavados e as células não aderentes foram contadas. (B) Atividade celular: as células aderidas no biomaterial foram incubadas por 72 h e a atividade celular medida pelo teste MTT. Densidade óptica lida em 540 nm. Diferenças estatísticas entre os grupos estão indicadas por asteriscos. \* Diferença estatística  $p < 0,05$ . \*\* Diferença estatística  $p < 0,01$ .

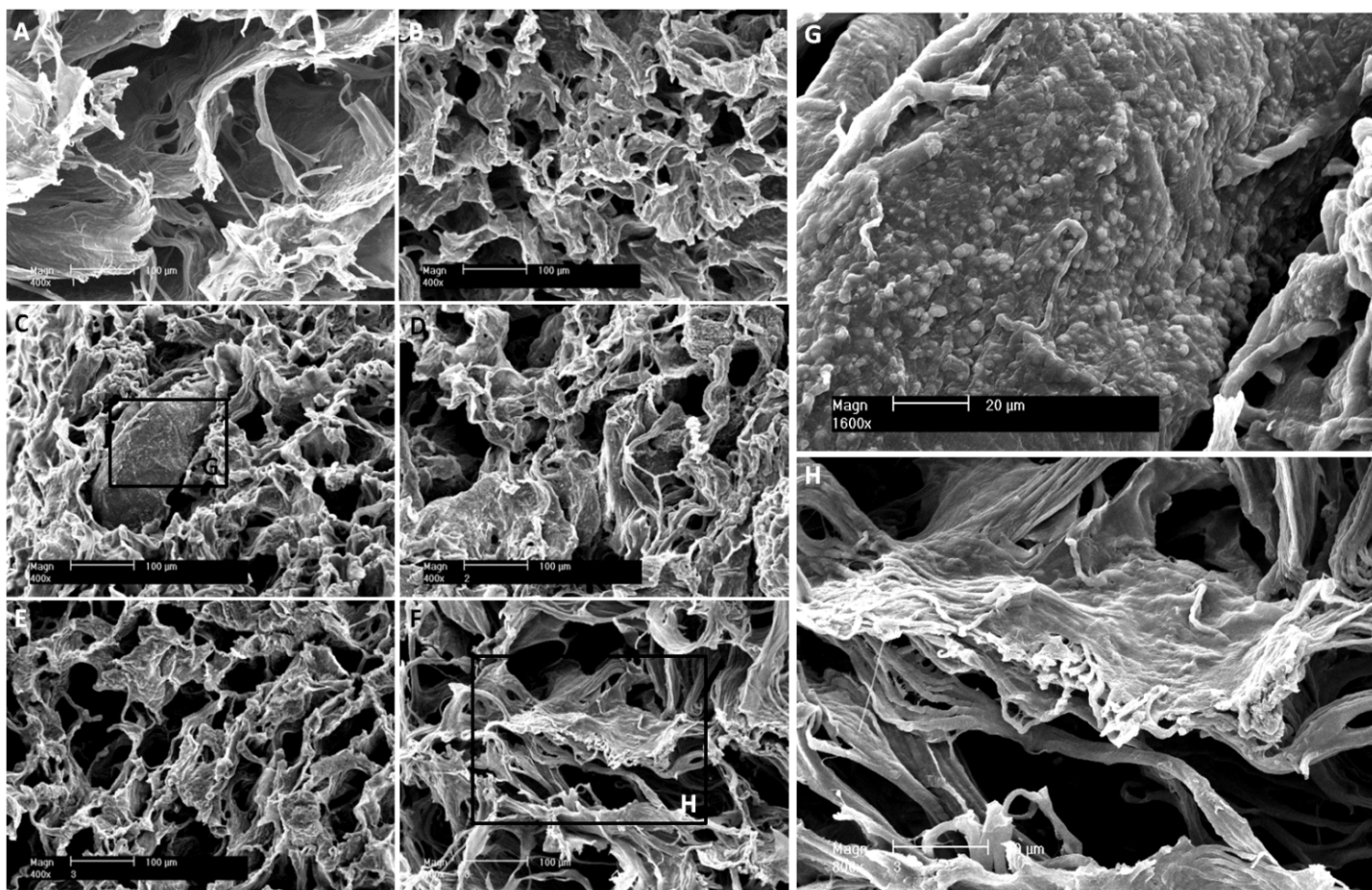


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de cada grupo experimental a  $1,28 \times 10^6$  células/cm<sup>3</sup> (HD). (A) Biomaterial sem células. (B) Biomaterial + ASCs tratadas com meio de cultura completo (CCM) por 4 semanas; (C) Biomaterial + ASCs tratadas com meio indutor condrogênico por 4 semanas; (D) Biomaterial + ASCs tratadas em CCM por 6 semanas; (E) Biomaterial + ASCs tratadas em meio indutor condrogênico por 6 semanas; (F) Biomaterial + ASCs aderidas por 3 h; (G) Detalhe de uma estrutura do tipo nódulo e (H) morfologia celular sobre o biomaterial.

Após 14 dias implantados via subcutânea em camundongos, o construto tornou-se evidentemente vascularizado e com aspecto rígido para todos os grupos. Na análise histológica, podemos observar a formação de tecido fibroso envolvendo o inserto, provavelmente sendo responsável pelo aspecto rígido observado (Figura 4).

Quando somente o biomaterial foi implantado (G1), podemos observar intenso infiltrado celular e vascularização circundante; também foram observados pequenos pontos que contêm a estrutura do biomaterial (corada em rosa). O mesmo padrão é observado no G6 (células aderidas por 3h). No entanto, podemos observar infiltrado celular e

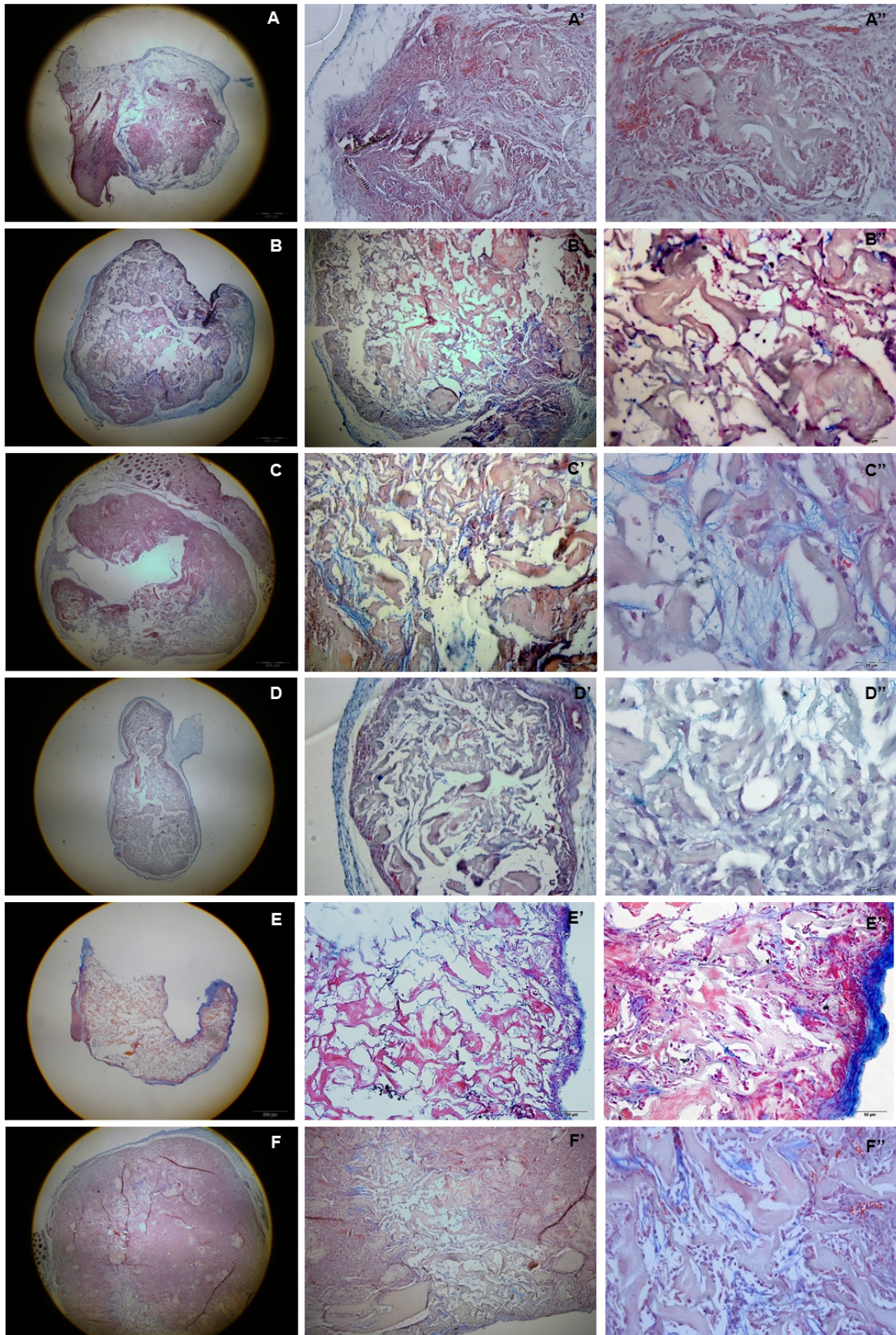


Figura 4. Análise histológica dos construtos constituídos de biomaterial de colágeno e ASCs a  $1,28 \times 10^6$  células/cm<sup>3</sup> após 14 dias de implantação na região subcutânea de camundongos. (A) Biomaterial sem células. (B) Biomaterial + ASCs tratadas com meio de cultura completo (CCM) por 4 semanas; (C) Biomaterial + ASCs tratadas com meio indutor condrogênico por 4 semanas; (D) Biomaterial + ASCs tratadas em CCM por 6 semanas; (E) Biomaterial + ASCs tratadas em meio indutor condrogênico por 6 semanas; (F) Biomaterial + ASCs aderidas por 3h. Coloração com Hematoxilina/Eosina/Alcian Blue. Aumentos: n 40x; n' 200x; n'' 400x.

último grupo. Interessantemente, observou-se que a estrutura do biomaterial está preservada e circundada por matriz de cartilagem neoformada (corada em azul). Nos outros grupos, onde as ASCs foram associados no biomaterial durante 4 semanas (G2 e G3) e 6 semanas (G4 e G5), a estrutura do biomaterial foi mais conservada. Nessas regiões, há ausência de vascularização e leve infiltrado celular. Além disso, há uma grande quantidade de mucinas que foram produzidas.

#### 4. Discussão

Este trabalho foi realizado com o objetivo de explorar o potencial condrogênico das ASCs murinas associadas ao colágeno Tipo I e III. O colágeno do tipo I e III já foi usado como scaffold na engenharia de tecidos da cartilagem. Gigante et al. (2007) caracterizaram condrócitos autólogos associados em colágeno porcino tipo I e III apenas antes da implantação e observaram, por meio de immunostaining, que as células expressam as proteínas S-100, S-condroitina e colágeno tipo II. Este padrão de expressão de proteínas indica que as células não desdiferenciaram ou alteraram o seu estado fenotípico.

No presente trabalho, quando analisamos a resposta celular ao biomaterial, através da adesão e da atividade celular, podemos ver que, em HD, as ASCs tiveram menor taxa de adesão no biomaterial quando hidratado, porém maior taxa de atividade celular (podendo ser indicação de maior número celular) após 72h. Quanto à MEV, podemos observar a estrutura do scaffold com maior densidade quando associada com ASCs e, curiosamente, nos grupos tratados em meio condrogênico, houve a formação de estruturas semelhantes a nódulos. Segundo Gigante et al. (2007), condrócitos de morfologia esférica foram observados quando semeados em colágeno tipo I e III. Porém, como indicado pelos cortes histológicos em nosso estudo, as ASCs induzidas à diferenciação condrogênica não apresentaram morfologia esférica.

A análise in vivo através de histologia mostrou que as peças foram claramente envolvidas por uma cápsula fibrosa, provavelmente, responsável pelo aspecto rígido observado macroscopicamente. Como esperado, G1 e G6 mostraram intensa vascularização e infiltração celular, possivelmente responsável pela reabsorção do inserto. Já está relatado na literatura que células são recrutadas ao local da lesão e que MSCs podem secretar quimiocinas com o mesmo objetivo (Lau e Wang, 2011; Striz et al., 2014.). Além disso, observamos matriz rica em mucinas (corada em azul) em grupos contendo ASCs, independentemente se as ASCs foram induzidas a diferenciação condrogênica ou não, in vitro. Isto sugere que o scaffold composto de colágeno tipo I e III possui perfil condroindutor. Mais análises devem ser realizadas para esclarecer o papel da condroindução deste biomaterial.

Alguns estudos relatam que o tecido cartilaginoso pode produzir fatores anti-angiogênicos, tais como chondromodulina-I e troponina I (Cheung et al., 2001; Fischer et al., 2006). Observamos que a indução condrogênica in vitro pode prevenir a vascularização na interface construto-hospedeiro e mantém a estrutura do biomaterial preservada durante o período in vivo. Observamos, também, que os construtos com matriz de cartilagem neoformada têm a estrutura do biomaterial

circundante preservada. A inibição da angiogênese é uma questão importante na engenharia de tecidos de cartilagem. Se construtos não são adequadamente induzidos ou implantados in vivo, as células podem desviar o seu comprometimento e produzir outros fatores que provocam a ossificação (DeLise et al., 2000; Hattori et al., 2010; Henrotin et al., 2014). Liu et al. (2008) observaram que a manutenção do estado condrogênico in vivo é dependente do estado completamente diferenciado conseguido por indução condrogênica a longo prazo in vitro. Eles sugerem que se construtos não totalmente diferenciados condrogenicamente in vitro forem implantados em uma região diferente da de origem, eles podem ossificar.

De acordo com nossos resultados, o biomaterial composto de colágeno tipo I e III tem potencial de uso na engenharia de cartilagem. As células foram capazes de aderir e proliferar; a análise histológica dos construtos implantados indica que o biomaterial possa induzir a diferenciação condrogênica além de manter o estado condrogênico dos insertos in vivo. Além disso, locais onde houve a produção de possível matriz cartilaginosa (corado em azul nas análises histológicas), mesmo em regiões pontuais, aparentemente não exibem neovascularização.

#### Agradecimentos

A CAPES, CNPq, FAPERGS e ULBRA pelo apoio financeiro.

**Declaração:** Os autores declaram estar cientes e terem atendido integralmente às normas preconizadas para as pesquisas experimentais de acordo com a Declaração Universal do Direito dos Animais. Os autores declaram ainda ausência de conflito de interesse.

#### 5. Referências

- Betre H, Ong SR, Guilak F, Chilkoti A, Fermor B, Setton LA. Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials*, 27, 91-99, 2006
- Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 174, 249-282, 2006.
- Cheung WH, Lee KM, Fung KP, Lui PY, Leung KS. TGF-beta1 is the factor secreted by proliferative chondrocytes to inhibit neo-angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry, Supplement*, 36, 79-88, 2001.
- Ciapetti G, Granchi D, Baldini N. The combined use of mesenchymal stromal cells and scaffolds for bone repair. *Current Pharmaceutical Design*, 18, 1796-1820, 2012.
- Cui JH, Park SR, Park K, Choi BH, Min BH. Preconditioning of mesenchymal stem cells with low-intensity ultrasound for cartilage formation in vivo. *Tissue Engineering*, 13, 351-360, 2007.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119, 2204-2213, 2006.
- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in

- vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26, 2287-2299, 2008.
- Deimling LI, Franke C, Faganello SB, Witz MI, Chem EM, Camassola M, Nardi NB. Interaction of Human, Canine and Murine Adipose-Derived Stem Cells with Different Biomaterials. IFMBE Proceedings 5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering, 37, 1315-21, 2011.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8, 309-334, 2000.
- Fischer C, Schneider M, Carmeliet P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 176 Pt 2, 157-212, 2006.
- Gigante A, Bevilacqua C, Ricevuto A, Mattioli-Belmonte M, Greco F. Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy*, 15, 88-92, 2007.
- Hattori T, Muller C, Gebhard S, Bauer E, Pausch F, Schlund B, Bosl MR, Hess A, Surmann-Schmitt C, von der Mark H, de Crombrughe B, von der Mark K. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development*, 137, 901-911, 2010.
- Henrotin Y, Pesesse L, Lambert C. Targeting the synovial angiogenesis as a novel treatment approach to osteoarthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 6, 20-34, 2014.
- Hiraoka Y, Kimura Y, Ueda H, Tabata Y. Fabrication and biocompatibility of collagen sponge reinforced with poly(glycolic acid) fiber. *Tissue engineering*, 9, 1101-1112, 2003.
- Lau TT, Wang DA. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11, 189-197, 2011.
- Liu K, Zhou GD, Liu W, Zhang WJ, Cui L, Liu X, Liu TY, Cao Y. The dependence of in vivo stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on chondrogenic differentiation in vitro. *Biomaterials*, 29, 2183-2192, 2008.
- Malda J, Woodfield TB, van der Vloodt F, Wilson C, Martens DE, Tramper J, van Blitterswijk CA, Riesle J. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on the composition of tissue engineered cartilage. *Biomaterials*, 26, 63-72, 2005.
- Mastri M, Lin H, Lee T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World Journal of Stem Cells*, 6, 82-93, 2014.
- Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules*, 3, 232-238, 2002.
- Meirelles L da S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*, 14, 4281-4298, 2009.
- Nora CC, Camassola M, Bellagamba B, Ikuta N, Christoff AP, Meirelles Lda S, Ayres R, Margis R, Nardi NB. Molecular analysis of the differentiation potential of murine mesenchymal stem cells from tissues of endodermal or mesodermal origin. *Stem Cells and Development*, 21, 1761-1768, 2012.
- Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis and Rheumatism*, 54, 3254-3266, 2006.
- Saito N, Okada T, Horiuchi H, Murakami N, Takahashi J, Nawata M, Ota H, Nozaki K, Takaoka K. A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nature Biotechnology*, 19, 332-335, 2001.
- Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical Science (London)*, 126, 593-612, 2014.
- Tan W, Krishnaraj R, Desai TA. Evaluation of nanostructured composite collagen--chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Engineering*, 7, 203-210, 2001.

Editor Associado: Rodrigo Juliano Oliveira