PADRONIZAÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA PARA ESTUDOS *IN VITRO* EM OSTEOARTRITE

V. M. F de CARVALHO¹, P. S. S de OLIVEIRA², S. K. S de PAULA², M. G. R. PITTA² e M. C. PEREIRA²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica

E-mail para contato: vanessamylenna@hotmail.com

RESUMO – A osteoartrite (OA) é a doença reumática mais prevalente na população acometendo grande parte dos indivíduos acima dos 45 anos. Entre as alterações morfológicas observadas, a cartilagem articular perde sua característica homogênea e é rompida e fragmentada, com fibrilação, fissuras e ulcerações. Os estudos *in vitro* são importantes porque neles pode-se fazer a prospecção de moléculas com possível atividade anti-inflamatória com potencial ação na OA. Além disso, condrócitos isolados da matriz e cultivados *in vitro* possuem as mesmas características fenotípicas que possuem *in vivo*. Portanto, este trabalho possui o objetivo de uniformizar um modelo de cultura primária de condrócitos murinos na OA. As amostras de cartilagem foram obtidas dos côndilos femorais e tibiais de ratos Wistar, lavadas em PBS, solução de digestão e levadas para incubação overnight em meio DEMEN/F12 contendo 2,5 mg/mL de collagenase tipo II e 5% de SBF a 37°C. Os condrócitos foram filtrados, centrifugados e ressuspensos, onde foram cultivados e após 10-15 dias atingiram sua confluência máxima. 90' após o término observou-se células intensamente liberadas na solução de digestão; 6º dia: poucas células aderidas; 11º dia: alta confluência e 15º dia: máxima confluência, morfologia fusiforme à piramidal e nenhuma contaminação. Portanto, a confluência máxima das células foi atingida no 15º dia e a cultura de condrócitos estava pronta para a realização dos ensaios *in vitro* propostos.

Palavras-chaves: artrose, cartilagem, *in vitro*.

ABSTRACT - Osteoarthritis (OA), a chronic degenerative joint disease, is the most prevalent rheumatic disease in the population affecting most individuals over the age of 45. Among the morphological alterations observed, the articular cartilage loses its homogeneous characteristic and is ruptured and fragmented, with fibrillation, fissures and ulcerations. *In vitro* studies are important because they can be prospected for molecules with possible anti-inflammatory activity with potential action in the AO. In addition, chondrocytes isolated from the matrix and cultured *in vitro* have the same phenotypic characteristics that they possess *in vivo*. Therefore, this work aims to standardize a murine chondrocyte primary culture model in OA. The cartilage samples were obtained from the femoral and tibial condyles of Wistar rats, washed in PBS, digestion solution and taken overnight for incubation in DEMEN / F12 medium containing 2.5 mg / ml collagenase type II and 5% FBS at 37 W. Chondrocytes were

filtered, centrifuged and resuspended, where they were cultured and after 10-15 days reached their maximum confluence. 90 'after completion, cells were intensely released in the digestion solution; 6th day: few cells adhered; 11th day: high confluence and 15th day: maximum confluence, fusiform to pyramidal morphology and no contamination. Therefore, maximum cell confluence was reached on the 15th day and chondrocyte culture was ready for the in vitro assays proposed.

Keywords: arthrosis, cartilage, in vitro.

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA), uma doença articular crônico degenerativa, é a doença reumática mais prevalente na população acometendo grande parte dos indivíduos acima dos 45 anos. Entre as alterações morfológicas observadas, a cartilagem articular perde sua característica homogênea e é rompida e fragmentada, com fibrilação, fissuras e ulcerações (REZENDE et al, 2000). Quando se trata da histologia do tecido, a OA está associada a alterações do colágeno, de proteoglicanas, da síntese de condrócitos, da hidratação e das propriedades mecânicas da cartilagem. As patologias que causam lesão da cartilagem articular estão frequentemente associadas ao prognóstico reservado, devido à dificuldade de plena regeneração da cartilagem hialina e a possível evolução para doença articular degenerativa (SOUZA et al., 2001).

A maioria das tentativas terapêuticas desenvolvidas para a doença, objetiva intervir na patogenia, ou seja, agir no metabolismo dos condrócitos, atuar nas citocinas IL-1 e IL-6 e alguns fatores de crescimento, inibir metaloproteinases, além de estimular fibras colágenas, proteoglicanas e células da matriz. As técnicas de cultura e transplante de condrócitos parecem ser promissoras para o tratamento de lesões decorrentes da osteoartrite. (FERNANDEZ et al, 1997).

Os estudos *in vitro* são importantes porque neles pode-se fazer a prospecção de moléculas com possível atividade anti-inflamatória com potencial ação na OA. Além disso, o estudo da cultura de células pode ser considerado uma maneira muito útil na análise da matriz extracelular, uma vez que parâmetros bioquímicos e morfológicos indicam que condrócitos isolados da matriz e cultivados *in vitro* possuem mecanismos que lhes possibilitam manter as mesmas características fenotípicas que possuem *in vivo* (ARAUJO, 2000). Portanto, este trabalho possui como objetivo geral uniformizar um modelo de cultura primária de condrócitos murinos na OA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de cartilagem articular foram obtidas dos côndilos femorais e tibiais de ratos *Wistar* que seriam descartados. Após o recolhimento do material, as amostras de cartilagem foram lavadas uma vez com PBS e transferidas para uma placa de 6 poços contendo 10 mL de solução de digestão e levadas para incubação em meio DEMEN/F12 contendo 2,5 mg/mL de

colagenase tipo II e 5% de SBF a 37 ° C por 45 min. Em seguida, foram retirados os pedaços de cartilagem do poço e transferidos para outro poço da placa, repetindo as mesmas condições citadas anteriormente. Por último, a solução de digestão foi diluída pelo meio DEMEN e 10 mL foi transferida para outro poço contendo os pedaços de

cartilagem onde ficaram encubadas overnight. Os condrócitos que foram isolados foram filtrados por uma malha de nylon de 70µm para separar os resíduos de matriz extracelular e cartilagem. As células foram posteriormente centrifugadas a 2500 rpm por 3 min. e ressuspensas em meio DEMEN/F12 suplementado com 10% SBF. Os condrócitos foram cultivados a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e após um período de 10-15 dias atingiram sua confluência máxima onde foram utilizados para a realização dos ensaios *in vitro* propostos (adaptado de GOSSET et al., 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1- Aspectos microscópicos de cultura primária de condrócitos murinos. **A:** 1º dia. **B:** 6º dia. **C:** 11º dia. **D:** 15º dia.

Conforme mostra a Figura 1A, 90 minutos após o término do procedimento foi possível observar que as células são intensamente liberadas na solução de digestão. Além disso, verificou-se células redondas e dispostas isoladamente ou em grupo. Na figura 1B observou-se a presença de pouquíssimas células aderidas e manteve-se o aspecto limpo, homogêneo e sem indícios de contaminação das células. Conforme mostra na Figura 1C, a cultura celular já estava bem estabelecida com células mostrando alta confluência. As células da garrafa apresentaram-se muito aderidas com aspecto morfológico variando de fusiforme a piramidal. Na figura 1D as células atingiram sua máxima confluência, estavam bem aderidas e metabolicamente ativas, além de manterem seu aspecto morfológico variando de fusiforme a piramidal. Não foi encontrado nenhum indício de contaminação.

Segundo Emanuele & Anna Christina (2010), o trabalho com cultivos celulares exige uma série de cuidados para se reduzirem os riscos de contaminação. As técnicas assépticas reduzem a probabilidade de infecção, sendo importante que sejam mantidas a

todo momento: antes, durante e ao término do experimento. A necessidade de manutenção da assepsia inclui uma série de procedimentos que vão desde a esterilização dos meios de cultura e instrumentos, até a adoção de quarentena para os cultivos novos. Isso porque as células são cultivadas em meios ricos em nutrientes e a possibilidade de ocorrer propagação de microrganismos contaminantes é alta. Deve-se controlar a umidade e temperatura para evitar o crescimento de micro-organismos no ambiente.

Segundo Gosset et al. (2008) as condições utilizadas para o isolamento e cultura primária dos condrócitos murinos foram uma malha de nylon de 40 μ m para separar os resíduos de matriz extracelular e cartilagem; centrifugação por 400 g durante 10 min. e as células atingiram a confluência máxima após 6-7 dias. No entanto, toda cultura *in vitro* está atrelada a manipulação e possíveis riscos de contaminação pelo manipulador e/ou ambiente, além de que as particularidades de cada laboratório como fatores internos, menor rendimento da cartilagem proveniente dos côndilos femorais e tibiais, dentre outros, alteram a uniformização do protocolo proposto por ele; ressaltando desta forma, a importância da otimização das técnicas para que se alcance a padronização desejada para a realização dos ensaios propostos.

4. CONCLUSÃO

Após o acompanhamento durante todos os dias, fazendo a troca do meio de cultura da garrafa, observou-se que a confluência máxima das células foi atingida no seu 15º dia, onde todas as células estavam bem aderidas, morfologicamente conservadas e aspecto característico de fusiforme à piramidal. Todos os cuidados de higiene e boas práticas de manipulação foram seguidos e nenhum indício de contaminação foi observado ao final do 15º dia. Dessa forma, a cultura de condrócitos estava pronta para a realização dos ensaios *in vitro* propostos de OA.

5. REFERÊNCIAS

ARAUJO, V. G. Estudo ultra-estrutural da matriz extracelular dos grumos celulares formados na cultura de fibrocondrocitos de meniscos de joelhos de coelhos. **Rev. do Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, [s.n], p. 101, 2000.

EGRI, D.; BATTISTELLA, L. R.; YOSHINARI, N. H. O envelhecimento da cartilagem articular. **Rev. Bras. de Reumatol.**, n. 39, p. 45-48, 1999.

EMANUELE, A. A.; ANNA, C. R. G.; Cultivo celular. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**, p. 216-253, 2010.

FERNANDEZ, R. N.; XIMENES, A. C.; RASSI, C. M.; SILVA, N. A. Perspectivas terapêuticas para osteoartrose. **Rev. Bras. de Reumatol.**, n. 37, p. 97-102, 1997.

GOSSET, M.; BERENBAUM, F.; THIRION, S.; JACQUES, C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. **Nature Protocols**, France, v. 3, n. 8, p. 1253-1260, jul. 2008.

REZENDE, M. U.; HERNANDEZ, A. J.; CAMANHA, G. L.; AMATATTUZI, M. M.

Cartilagem articular e osteoartrose. **Act Ortop. Bras.**, n. 8, p. 100-104.

SOUZA, T. D.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I. V. Eletroterapia no processo de reparação da superfície articular de coelhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 819-824, mar. 2001.

VELLUTINI, W. C. Envelhecimento e degeneração da cartilagem articular. **Acta Ortop. Bras.**, v. 5, n.1, p. 43-46, 1997.

6. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica- Suely Galdino (NUPIT-SG) e Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT).