

# Cultura primária de fibrocondrócitos de menisco de coelho

## Primary culture of fibrocondrocytes from rabbit knee joint meniscus.

RIALA6/1050

Cristina Adelaide FIGUEIREDO<sup>1\*</sup>; Paulo Pinto JOAZEIRO<sup>2</sup>

\* Endereço par correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Seção de Vírus Produtores de Exantema, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cep- 02067-060, São Paulo/ SP, email: figueiredocris@uol.com.br

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia, Departamento de Histologia e Embriologia

Recebido: 26/07/2005 – Aceito para publicação: 29/12/2005

### RESUMO

Estudos envolvendo a obtenção de fibrocondrócitos em cultura no Brasil são escassos. Este trabalho descreve a cultura primária de fibrocondrócitos de menisco cultivados em alta densidade com algumas modificações nos métodos de extração já descritos na literatura, com o intuito de obter um maior número de células viáveis para cultivo celular. Foram utilizados meniscos de coelhos New Zealand com 120 dias. Os meniscos foram cortados e tratados com 2mg/ml de colagenase diluída em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbeccos) contendo 10% de SFB sob agitação durante três horas a 37°C. Os fibrocondrócitos foram cultivados em alta densidade ( $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) em frascos de cultura T25 em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células atingiram a confluência celular após o 15º dia de cultivo e sintetizaram sua matrix extracelular evidenciada pela coloração com azul de toluidina. A curva de crescimento mostrou que os fibrocondrócitos duplicaram 2,5 vezes. A cinética de incorporação de sulfato radioativo nos glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibrocondrócitos “in vitro” foi constante. Os fibrocondrócitos cultivados em alta densidade celular apresentaram aspectos ultra-estruturais semelhante as células “in vivo”.

**Palavra-Chave.** cultura de célula, menisco, fibrocondrócitos.

### ABSTRACT

The present study describes a primary culture of meniscus fibrocartilaginous tissue cultivated in high density technique. Cells were isolated from menisci fibrocartilaginous from 120 days-old New Zealand white rabbits. Menisci were finely minced, and treated with 2mg/mL collagenase in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 10% FCS (fetal calf serum) in a shaker for three hours at 37°C. Fibrochondrocyte cells were seeded at high density ( $1 \times 10^5$  cells / $\text{cm}^2$ ) in T25 flasks containing DMEM supplemented with 10% FCS. Nearly 80% of cells attached to the flask, and after culturing for five days the cells were uniformly displayed as an elongated, fibroblastic-like morphology. The cells showed confluence after approximately 15 days of culture, and produced sufficient extracellular matrix which could be evidenced by the appearance of toluidine blue metachromasia. No morphological changes were observed in fibrochondrocytes during cells growing. The fibrochondrocytes cells growth rate increased 2.5 fold, and attained to the stationary phase. During seven days, the newly glycosaminoglycans synthesizing cells, the rate of total synthesis of glycosaminoglycan was high, and it remained stable after monolayer cells confluency. Ultrastructural morphology of monolayer cells after culturing for eight days was identical to typical fibrochondrocyte *in vivo*.

**Key Words.** cell culture, menisci, fibrochondrocytes.

## INTRODUÇÃO

A fibrocartilagem é um tecido conjuntivo avascular, formado por poucas células e uma grande quantidade de matriz extracelular constituída principalmente de colágeno e proteoglicanos<sup>1</sup>. As células que formam a fibrocartilagem são chamadas de fibrocondrócitos, similares aos condrócitos das cartilagens hialina e elástica<sup>2,3</sup>. Os fibrocondrócitos da região superficial (próximos à superfície articular) são ovais ou ligeiramente fusiformes, com poucos processos celulares, enquanto que os fibrocondrócitos da região central (imersos na matriz extracelular) são mais ovais, situados dentro de lacunas, com intensos processos celulares liberados dentro da zona pericelular amorfa. Ambos contêm retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos, enquanto as mitocôndrias são ocasionalmente observadas, sugerindo assim que, como os condrócitos das cartilagens articulares, os fibrocondrócitos obtêm sua energia por glicólise anaeróbica. A sua matriz extracelular é formada principalmente de colágeno e proteoglicanos. O colágeno do tipo I é o principal colágeno encontrado na matriz<sup>4</sup> e em menor quantidade dos outros tipos de colágeno (III, V, VI) Além do colágeno, existe uma grande quantidade de proteoglicanos do tipo agregam e decorim<sup>5,6,7</sup>.

Os fibrocondrócitos mantêm o equilíbrio da matriz extracelular através dos mecanismos de síntese e degradação. Quando o equilíbrio é alterado, a função da fibrocartilagem é prejudicada possibilitando o surgimento de osteoartrite precoce<sup>8</sup>. Com o desenvolvimento das técnicas da cultura de tecidos de mamíferos abriu-se uma nova fronteira nas pesquisas científicas. Em 1994, Brittberg et al.<sup>9</sup> utilizando cultura de células de cartilagem realizou o primeiro transplante autólogo de células em pacientes com lesão na cartilagem. Na última década com o desenvolvimento de técnicas de engenharia de tecidos onde a regeneração de órgãos e tecidos vivos é realizada pela dissociação e cultivo de tecido do próprio paciente sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc), para posteriormente serem reinseridos no paciente. Recentemente, resultados promissores foram obtidos utilizando o colágeno e polímeros como matriz extracelular para o crescimento de fibrocondrócitos<sup>10,11</sup>.

Entretanto, para a realização dos estudos acima citados é necessário a obtenção de fibrocondrócitos viáveis para o crescimento celular “in vitro” e que sintetizem uma matriz extracelular semelhante aos fibrocondrócitos “in vivo”. Os fibrocondrócitos têm sido cultivados utilizando-se duas metodologias: a descrita por Green et al.<sup>12</sup> que utiliza a digestão enzimática em série: hialuronidase, tripsina, colagenase e a descrita por Benya et al.<sup>13</sup> na qual a digestão enzimática é realizada usando uma solução de colagenase em baixa concentração de CO<sub>2</sub>, que resulta na obtenção de 90% de condrócitos do tecido articular. O objetivo deste estudo foi a

padronização de uma metodologia para a obtenção de fibrocondrócitos em cultura e sua utilização para diversos estudos metabólicos e terapêuticos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Meniscos de Coelhos

Os meniscos (lateral e medial) de três coelhos New Zealand com 120 dias foram removidos da articulação dos joelhos. Após a remoção, os meniscos foram lavados em solução salina tamponada, pH 7,5 com gentamicina (40mg/L) para completa remoção do líquido sinovial. O tecido foi cuidadosamente dissecado para assegurar a completa remoção de toda a sinóvia e tecido capsular aderente. A remoção dos meniscos foi realizada dentro das normas preconizadas pelo Comitê de Ética de Manipulação de Animais.

### Cultura Primária

Meniscos de coelhos foram colocados em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, USA) em solução salina balanceada de Earle, livre de sulfato, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco, USA).

Os meniscos foram picados em pedaços de aproximadamente (0,3x0,3) cm e lavados duas vezes no próprio meio de cultura contendo 40mg/ml de gentamicina (Sigma, USA). Os fragmentos do tecido foram incubados a 37°C sob agitação numa solução de 2mg/mL de colagenase tipo I (Gibco, USA) em meio DMEM com 10% SFB pH 7,2 durante três horas. Após este período, o meio contendo os fibrocondrócitos liberados da matriz foram colhidos e ao tecido não digerido foi adicionada nova solução de colagenase. A amostra foi incubada novamente a 37°C durante três horas. Os fibrocondrócitos, obtidos de cada extração, foram 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 a 1000 x g por 10 minutos. Após a lavagem, as células foram gentilmente ressuspendidas em DMEM com 10% de SFB sem antibiótico e semeadas em garrafas de cultura de células de 25cm<sup>2</sup> (Costar, Falcon) na concentração de 1x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>. A viabilidade celular foi quantificada com o corante vital azul de tripan (0,5% em solução fisiológica) em câmara hemocitométrica. As culturas celulares foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi acompanhado por observação diária em microscópio invertido.

### Estudos Morfológicos

#### Microscopia de Fase

As culturas de células em semi-confluência e confluentes foram examinadas e fotografadas rotineiramente no microscópio Zeiss em microscopia de fase utilizando um filtro verde como contraste.

### Microscopia de Luz

As células da Cultura de fibrocondrócitos após o 3º e o 15º dia de cultivo foram coradas pelo corante azul de toluidina. Antes da fixação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e as células foram fixadas em 2,0% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2. A fixação ocorreu por 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir o material foi lavado em uma solução de lavagem contendo tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2 durante 15 minutos e corados durante 10 minutos numa solução aquosa de azul de toluidina 0,5%, pH 3,5. Em seguida, o corante foi removido. As culturas foram lavadas em solução de lavagem e imediatamente observadas e fotografadas em microscópio Olympus no aumento de 100X.

### Análise ultra-estrutural

As culturas celulares em monocamada e cultivadas durante 07 dias em alta densidade ( $10^5$  células/cm<sup>2</sup>) foram fixadas para a análise ultra-estrutural. Antes da fixação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado da monocamada celular e as células foram lavadas em uma solução contendo tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e sacarose 0,2M durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem, as células foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,0% com ou sem ácido tânico 0,1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 1 hora, a 4°C. A seguir o material foi lavado novamente na solução de cacodilato e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 1 hora a 4°C. As culturas fixadas foram novamente lavadas em solução de cacodilato e novamente incubadas durante 20 minutos em acetato de uranila 1% em etanol 70% a 4°C. Em seguida, o material foi desidratado em gradiente de etanol (do etanol 30% ao etanol absoluto) durante 1 hora e pré-embebido em misturas de etanol e resina (araldite) durante três horas. Após este período, o material foi embebido em resina pura durante 24 horas em estufa a 58°C.

Os blocos foram cortados em ultramicrótomo LKB (Modelo 8800 Ultratome III), para obtenção dos cortes semifinos (1µm). Para a localização da região a ser estudada e micrografada, os cortes semifinos foram corados a quente (aproximadamente 70°C) em solução de azul de toluidina 1% em carbonato de sódio 0,23M para posterior análise em microscópio óptico.

Cortes ultrafinos, prateados, com aproximadamente 70nm de espessura, foram obtidos no mesmo ultramicrótomo e contrastados por acetato de uranila a 2,0%, durante 30 minutos<sup>15</sup> e por citrato de chumbo a 0,5% durante 10 minutos<sup>16</sup>.

Os cortes ultrafinos foram estudados e fotografados em um microscópio eletrônico Philips (modelo EM 400).

### Curva de Crescimento

A curva de crescimento foi realizada segundo Freshney<sup>14</sup>. A cultura primária de fibrocondrócitos na primeira passagem foram cultivadas em tubos de cultura celular numa concentração

de  $1 \times 10^5$  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% e versene 0,02%). Após o descolamento das células do tubo de cultura foi feita a contagem de células utilizando-se a câmara hemocitométrica. As contagens celulares foram realizadas durante o período de sete dias consecutivos, com intervalos de 24 horas. Diariamente foram contados três tubos, sendo calculado a média diária que foi utilizada para a elaboração da curva de crescimento.

### Cálculo da eficiência de plaqueamento em substrato sólido

A metodologia realizada para o cálculo da eficiência de plaqueamento em substrato sólido foi descrita por Freshney<sup>14</sup>. Culturas primárias cultivadas em garrafas de cultura de células de 25cm<sup>2</sup> (Costar, Falcon) na concentração de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> após a confluência celular foram tratadas com uma solução de ATV (tripsina 0,2% e versene 0,02%). Após o descolamento das células da garrafa de cultura foi feita a contagem de células utilizando-se a câmara hemocitométrica. As células foram semeadas em duplicata, em placas de Petri de 20cm<sup>2</sup> de área, nas concentrações de 25, 50, 125 e 250 células/cm<sup>2</sup> e incubadas a 37°C em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> por oito dias em meio de cultura DMEM contendo 10% SFB e meio condicionado, que foi obtido do crescimento de células diploides de pulmão de feto humano filtrado em membranas de 0,45µM (Millipore Ind.Com) diluído 1:1 em DMEM contendo 10% SFB. Após este período, o meio de cultura foi desprezado e as células foram fixadas e coradas com solução de violeta de genciana. A eficiência do plaqueamento foi calculada, como razão percentual, entre o número de colônias de diâmetro maior ou igual a 50µm e as concentrações das células plaqueadas. O cálculo foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$E(\%) = \frac{n^\circ \text{ de colônias formadas}}{n^\circ \text{ de células plaqueadas}} \times 100$$

### Cinética da síntese de glicosaminoglicanos

Os fibrocondrócitos foram cultivados em placas de Petri numa concentração de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em meio DMEM com 10% soro fetal bovino. Após a confluência celular o meio de cultura foi descartado e as células foram realimentadas com meio de cultura contendo 50 µCi (<sup>35</sup>S)/mL e incubadas por 24 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A síntese dos glicosaminoglicanos foi medida através da taxa de incorporação de sulfato nas moléculas sintetizadas e agregadas nos compartimentos intracelulares dos fibrocondrócito em triplicata. O meio de cultura foi descartado e a taxa de incorporação de <sup>35</sup>S nos glicosaminoglicanos foi monitorada no período compreendido entre o primeiro e o sétimo dia após o pulso. A quantidade de radioatividade foi feita pela contagem em líquido de cintilação : tolueno contendo 0,5% PPO (2,5 difeniloxazol, Merck, Alemanha) no espectrometro Beckman LS100.

### Congelamento Celular

Visando futuros estudos, as culturas primárias foram preservadas em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . O meio de preservação foi constituído de DMEM com 10% de SFB, contendo 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma, USA).

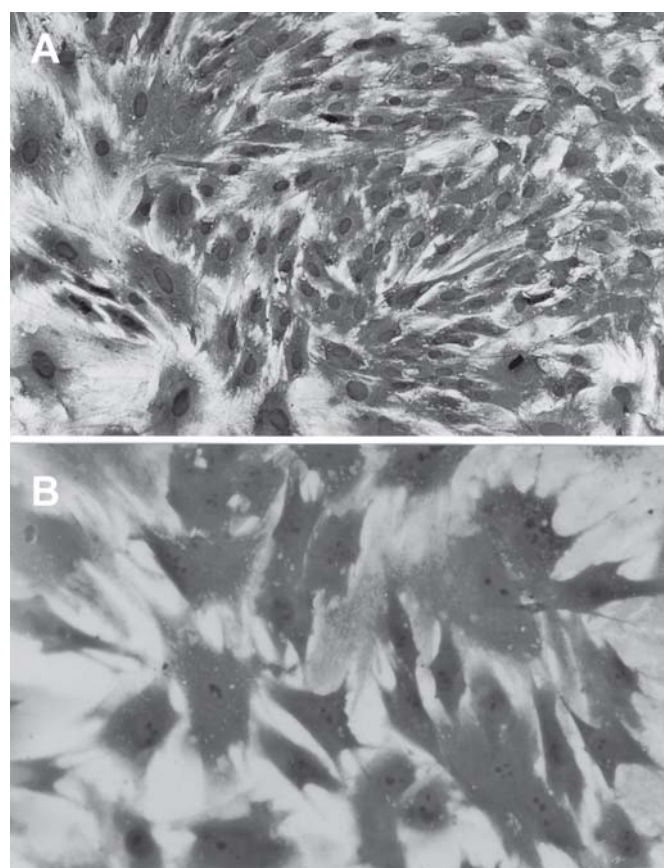
### RESULTADOS

Os fibrocondrócitos recém isolados a partir de meniscos do joelho de coelhos, pela extração enzimática utilizando colagenase diluída em meio DMEM com 10% SFB, apresentaram formas arredondadas em suspensão. O teste de viabilidade destas células, realizado com base na incorporação do corante vital azul de tripan, mostrou que 90-95% das células permaneceram viáveis após o tratamento enzimático, às lavagens e filtrações necessárias ao estabelecimento de uma cultura primária. Os resultados mostram que o método de extração foi eficiente e que 90% destas células aderiram ao frasco de cultura formando colônias celulares.

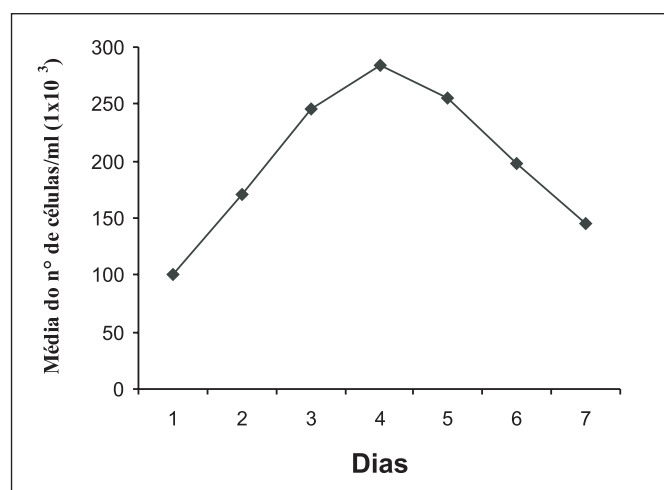
O cultivo primário dos fibrocondrócitos foi iniciado com a incubação de  $10^5$  células/cm<sup>2</sup> suspensas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, isento de antibióticos e mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera úmida em 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de cultivo, foram verificadas colônias de células arredondadas que aderiam ao frasco de cultura. A adesão celular monitorada por microscopia óptica, mostrou que após 48 horas, a partir das colônias de células arredondadas, houve o surgimento de células elipsóides e estreladas que aderiam ao frasco de cultura. Na Figura 1A observa-se as células cultivadas após 5 dias de cultivo e coradas com azul de toluidina. As colônias celulares exibem aspecto elíptico e estrelado, coradas fortemente pelo azul de toluidina e com grande quantidade de prolongamentos celulares, intercomunicando células e núcleos. As células atingiram a confluência após o 15° dia, o que resultou no aparecimento de uma monocamada celular (Figura 1B). As culturas primárias foram subcultivadas somente até a quarta passagem, indicando a sua limitada capacidade de crescimento “in vitro”.

A curva de crescimento celular da cultura de fibrocondrócitos mostrou que as células atingiram a máxima densidade populacional no 4° dia de cultivo e uma densidade populacional 2,5 vezes comparada ao início do estudo (Figura 2).

A influência da densidade populacional na multiplicação dos fibrocondrócitos foi analisada através da capacidade destas células em formar colônias (plaqueamento), quando cultivadas em baixa densidade. Observou-se a formação de colônias apenas nas densidades de 125 e 250 células/cm<sup>2</sup>. As células apresentaram uma eficiência de plaqueamento nas densidades de 125 e 250 ao redor de 1 e 3%, respectivamente, quando cultivadas em meio DMEM; e 5% quando cultivadas usando a combinação dos meios DMEM e condicionado (v/v). Os índices obtidos mostram que a multiplicação dos fibrocondrócitos “in vitro” é sensível à variação da sua densidade populacional.



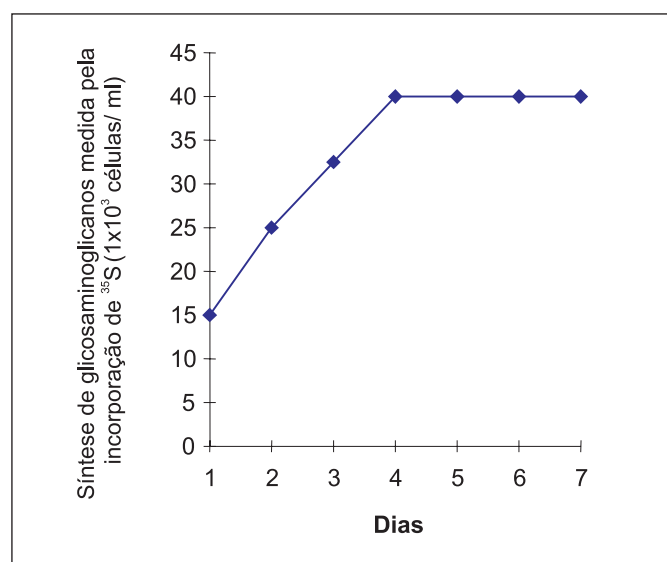
**Figura 1.** Fotomicrografias de cultura de fibrocondrócitos no 5° dia de cultivo. As células foram fixadas em glutaraldeído 2% e coradas com azul de toluidina. **A.** visão panorâmica da cultura mostrando o aspecto da monocamada antes de atingir a confluência. Aumento 100x. **B.** notar o aspecto elipsóide das células, a morfologia nuclear, o número de nucléolos e os grandes prolongamentos citoplasmáticos. Aumento: 200x.



**Figura 2.** Curva de crescimento da cultura de fibrocondrócitos durante 7 dias consecutivos. A contagem de células foi realizada utilizando-se a câmara hemocitométrica.



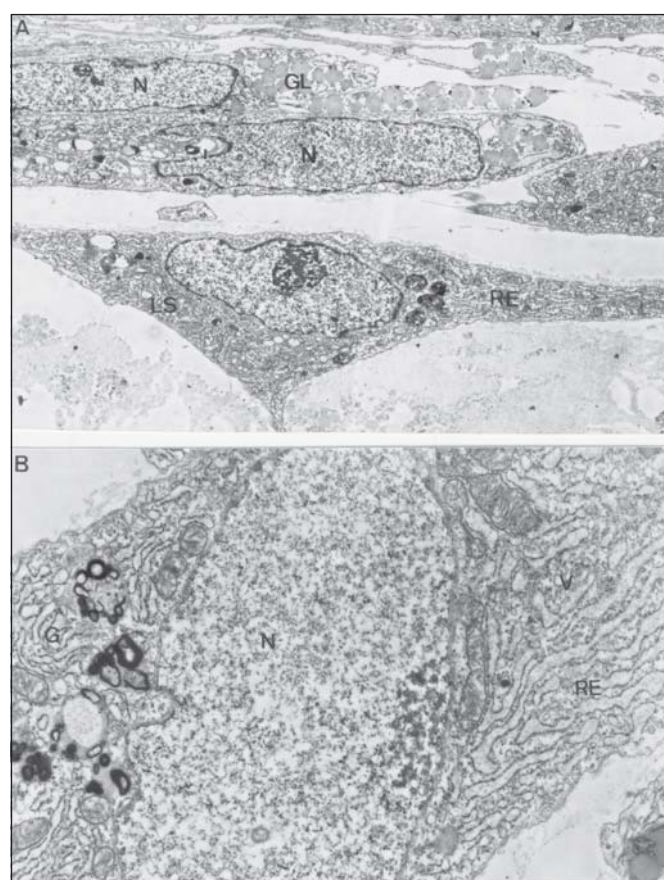
A cinética de incorporação de sulfato radioativo ( $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ ) nos glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibrocondrócitos “in vitro” pode ser observada na Figura 3. As células em cultura sintetizaram os glicosaminoglicanos com uma velocidade constante desde o primeiro até o quarto dia, quando foi atingido um valor máximo (40 CPM/1000 células) permanecendo estável até o sétimo dia. Os fibrocondrócitos cultivados em alta densidade celular ( $5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) apresentaram aspectos ultra-estruturais semelhante aos das células “in vivo”. A análise das micrografias eletrônicas dos cortes ultra-finos, obtidos de colônias celulares cultivadas durante 8 dias, mostrou que os fibrocondrócitos apresentavam perfil elíptico, com um grande núcleo de formato regular, com a maior parte da sua cromatina desespiralizada, sendo a heterocromatina escassa, observada sempre acolada à superfície interna do envoltório nuclear. O citoplasma mostrou-se volumoso com uma grande quantidade de vesículas e lisosomas secundários dispersos pelo citoplasma; como também cisternas do retículo endoplasmático granular com material intracisternal e um complexo de Golgi bastante desenvolvido. As mitocôndrias aparecem em número maior e várias gotículas de lipídeos podem ser observadas (Figuras 4). As culturas primárias continuaram apresentando alta viabilidade celular após o congelamento em meio de preservação constituído pelo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10% de dimetil-sulfóxido, à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C). Frascos contendo  $1 \times 10^6$  células/mL foram descongeladas e sua viabilidade celular realizada com base na incorporação do corante vital azul de tripan mostrou 90% de viabilidade celular.



**Figura 3.** Cinética de incorporação de  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  radioativo na síntese de glicosaminoglicanos pelos fibrocondrócitos “in vitro”. Média da triplicata (cpm/10<sup>3</sup> células/mL) dos valores obtidos em triplicata da contagem em líquido de cintilação.

## DISCUSSÃO

O método de extração aqui utilizado foi eficiente para obtenção de células com 90% de viabilidade celular semelhante aos resultados obtidos por Green et al.<sup>12</sup> e Benya e Shafer<sup>2</sup>. A grande dificuldade na obtenção de células dos tecidos cartilagenosos é a quantidade de células utilizadas no cultivo, pois existe uma relação direta entre a síntese das proteínas sintetizadas para compor a matriz extracelular, a densidade celular e o fenótipo celular. Benya e Shaffer<sup>2</sup>, mostrou que as células cultivadas em baixa densidade celular apresentam fenótipo fibroblástico com alteração na síntese dos tipos de colágeno e proteoglicanos. Esta modulação pode ser prevenida quando as células são cultivadas em alta densidade celular ( $10^5$  células/cm<sup>2</sup>). Além disso, a utilização



**Figura 4.** Micrografias eletrônicas dos fibrocondrócitos cultivados num período de 08 dias. **A:** conjunto de fibrocondrócitos próximos uns aos outros. As células apresentam perfil elíptico ou alongado, com núcleos (N) de cromatina frouxa. No citoplasma, observam-se o abundante retículo endoplasmático granular (RE), lisosomas secundários (LS) e gotículas de lipídeos (GL). Aumento: 7.500x. Em **B:** micrografia de maior aumento, do fibrocondrócito onde pode-se notar o núcleo (N), o aspecto filamentososo da eucromatina e no citoplasma, detalhes do sistema de vesículas (V) associado ao transporte entre o retículo endoplasmático granular (RE) e o complexo de Golgi (G). Aumento: 16.500x.

de somente uma enzima para a obtenção da cultura primária de fibrocondrócitos e o tempo de extração, permite que o custo seja menor em relação as metodologias descritas na literatura. Em relação à morfologia celular, os fibrocondrócitos cultivados em alta densidade ( $1 \times 10^5$  células/mL) apresentaram a forma arredondada, aderiram a garrafa de cultura e formaram colônias de células com aspecto elíptico e estrelado, com prolongamentos celulares. Estes resultados também foram obtidos por Graverand et al.<sup>17</sup> e Isoda et al.<sup>18</sup> que mostraram que os fibrocondrócitos “in vivo” e “in vitro” apresentam prolongamentos celulares que facilitam a comunicação celular e assim, a secreção dos fatores de crescimento “in vitro” que ligam-se à matriz extracelular via proteoglicanos, influenciando o meio ambiente celular. Durante o período de 15 dias no qual os fibrocondrócitos foram mantidos em cultura, no que diz respeito à transformação celular “in vitro”, 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 contato de inibição celular que é observado em culturas primárias. Essas alterações, descritas por Abercombie e Heaysman<sup>19</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, regulando a sua proliferação e a diferenciação celular.

Vários estudos têm demonstrado que os fibrocondrócitos são capazes de proliferar e sintetizar suas proteínas de matriz extracelular (proteoglicanos e colágeno), entretanto a taxa de células aderidas ao substrato celular e a sua taxa crescimento é extremamente importante para a obtenção da cultura primária de fibrocondrócitos<sup>18,20,21,22,23</sup>. Os nossos dados em relação ao cálculo da eficiência de plaqueamento mostram uma dependência dos fibrocondrócitos em relação à sua densidade celular também observado por Webber et al.<sup>22,23</sup>. Em relação a diferença entre a taxa de eficiência de plaqueamento utilizando o meio DMEM e o meio condicionado, indica que alguns fatores presentes neste meio condicionado estimularam o metabolismo dos fibrocondrócitos em cultura. Recentemente, Pangborn et al.<sup>11</sup> mostraram que o fator de crescimento TGF-beta (1) pode ser usado para aumentar a proliferação celular e a síntese de matriz extracelular de fibrocondrócitos cultivados em monocamada e em polímero. A síntese dos glicosaminoglicanos foi utilizada como um marcador da atividade fibrocondrogênica através da incorporação de sulfato nas moléculas de glicosaminoglicanos sintetizados “in vitro”. Os nossos resultados de síntese de glicosaminoglicanos dos fibrocondrócitos estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores<sup>6,7,22,23</sup>.

A nível ultra-estrutural os fibrocondrócitos apresentaram as mesmas características da fibrocartilagem “in vivo”. As células possuem forma oval ou ligeiramente fusiforme, núcleo grande, gotículas de lipídeos no citoplasma, células dentro de lacunas e vários prolongamentos celulares além da presença de matriz territorial e interterritorial como descrito por Ghadially e Ghosh<sup>2,3</sup>.

Nossos resultados mostraram que utilizando este método de cultura primária os fibrocondrócitos foram capazes de proliferar e sintetizar as suas proteínas de matriz extracelular mantendo o seu fenótipo e, portanto possibilitando o uso em reparação tecidual.

## REFERÊNCIAS

1. Junqueira LCU, Carneiro J. Tecido cartilaginoso In: *Histologia Básica*. Ed Guanabara Koogan, 1995. p.94 -100
2. Ghadially FN, Thomas I, Yong N, Lalond J.J. Ultrastructure of rabbit semilunar cartilage. *J Anat* 1978; 125: 499-517.
3. Ghosh P, Taylor KF. The knee joint meniscus. *Clin Orthop Rel Res* 1987; 224: 52-63.
4. Mcdevitt CA, Webber RJ. The ultrasctruture and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop* 1990; 252: 8-18.
5. Eyre DR, Wu JJ. Collagen of fibrocartilage: A distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *Febbs Lett* 1983; 158: 265-70.
6. Roughley PJ, McNicol K, Santer V, Buckwalter J. The presence of a cartilage like proteoglycan in the adult human meniscus. *Biochem J* 1981; 197: 77-83.
7. Roughley PJ, White RJ. The dermatan sulfate proteoglycans of the adult human meniscus. *J Orthop Res* 1992; 10: 631-7.
8. Calvo E, Palácios I, Delgado E, Ruiz-Cabello J, Hernandez P, Sanchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont. High resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartil* 2001; 9: 463-72.
9. Brittberg M, 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.
10. Mueller SM, Shortkroff S, Schneider TO, Breinan HA, Yannas IV, Spector M. Meniscus cells seeded in type I and type II collagen – GAG matrices in vitro. *Biomaterials* 1999; 20: 701-09.
11. Pangborn CA, Syriacos AA. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *Journal Orthopaedic Research* 2005; 23: 1184-90.
12. Green PWB, Fox RR, Sokolof F. Spontaneous degenerative spinal disease in the laboratory rabbit. *J Orthop Res* 1984; 2: 161-8.
13. Benya PD, Shaffer JK. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30: 215-24.
14. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. 4<sup>o</sup> ed. New York, 2000
15. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Byphys Biochem Cytol* 1958; 4: 475-8.
16. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy 1963; 17: 208-12.
17. Graverand MP, Ou Y, Schield-Yee T, Barclay L, Hard D, Natsume T, Rattner JB. The cells of the rabbit meniscus their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat* 2001; 198: 525-35.
18. Isoda K, Saito S. In vitro and in vivo fibrochondrocytes growth behaviour in fibrin gel na immunohistochemical study in the rabbit. *Am J Knee Surg* 1998; 11: 209-16.
19. Abercombie M, Heaysman JEM. Observation on the social behaviour of cells in tissue culture. II monolayering of fibroblasts. *Exp Cell Res* 1981; 6: 293-306.
20. Webber RJ. In vitro culture of meniscal tissue. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 252: 114-20.
21. Webber RJ, Hough AJ JR. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes proliferative response *J Orthop Res* 1988; 6(1):13-8.
22. Webber RJ, Hough AJ JR. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes II. Sulfated proteoglycan synthesis. 1988; *Biochimie* 70: 193-204.
23. Webber RJ, Zitaglio T, Hough AJ JR. In vitro cell proliferation and proteoglycan synthesis of rabbit meniscal fibrochondrocytes as a function of age and sex. *Arthritis and Rheumatism* 1986; 29: 1010-6.