

Pontifícia Universidade Católica de São
Paulo PUC-SP

Flávio Augusto De Andreis

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE MICROESFERA DE POLI (ÁCIDO
LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) COMO AR CABOUÇO PARA ESFEROIDE
CONDROGÊNICO: APLICAÇÕES NA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM
ARTICULAR**

Mestrado em Biomateriais e Medicina Regenerativa

Sorocaba
2024

Pontifícia Universidade Católica de São
Paulo PUC-SP

Flávio Augusto De Andreis

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE MICROESFERA DE POLI(ÁCIDO
LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) COMO AR CABOUÇO PARA ESFEROIDE
CONDROGÊNICO: APLICAÇÕES NA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM
ARTICULAR**

Dissertação apresentada à banca
examinadora da Pontifícia
Universidade Católica de São Paulo,
como exigência parcial para obtenção
do título de MESTRE em Biomateriais e
Medicina Regenerativa sob a
orientação do Prof. Dr. Julio Cesar Gali

Sorocaba
2024

Sistemas de Bibliotecas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo -
Ficha Catalográfica com dados fornecidos pelo autor

DE ANDREIS, FLÁVIO AUGUSTO
DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE MICROESFERA DE POLI(ÁCIDO
LÁCTICO-CO--GLICÓLICO) COMO AR CABOUÇO PARA ESFEROIDE
CONDROGÊNICO: APLICAÇÕES NA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM
ARTICULAR. / FLÁVIO AUGUSTO DE ANDREIS. -- São Paulo:
[s.n.], 2024.
48p. il. ; 30 cm.

Orientador: JULIO CESAR GALI.
Dissertação (Mestrado)-- Pontifícia Universidade Católica de
São Paulo, Programa de Estudos Pós-Graduados em Biomateriais
e Medicina Regenerativa.

1. Biomateriais. 2. Microesferas. 3. Engenharia Tecidual.
4. Cartilagem. I. GALI, JULIO CESAR. II. Pontifícia
Universidade Católica de São Paulo, Programa de Estudos Pós
Graduados em Biomateriais e Medicina Regenerativa. III.
Título.

CDD

Banca Examinadora

Prof. Dr. Júlio Cesar Gali, PUC-SP

Prof. Dr. Edie Benedito Caetano, PUC-SP

Prof. Dr. Thiago Bernardo Carvalho de Almeida, USCS-SP

Aos meus pais Marcelo e Érika, que com muito apoio, amor e sabedoria não mediram esforços para tornar essa jornada possível.

AGRADECIMENTOS

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”. Em 1675 Isaac Newton sugeria a importância de estar cercado por grandes pessoas. Agradeço a Deus por ter colocado tantos gigantes em meu caminho.

Meus pais Marcelo e Érika e meus irmãos Lucas e Caio, o apoio, carinho e amor de nossa família sempre foram o alicerce das minhas provações, obrigado por me ajudarem a sempre acreditar que podia superar limites quando muitas vezes achei que fracassaria.

Agradeço à minha esposa Paula por estar sempre ao meu lado nas decisões e ser minha grande parceira de vida e de profissão.

Ao meu orientador Julio C. Gali pela amizade e por ser o grande incentivador de minha caminhada na vida acadêmica.

Agradeço todo apoio dos gigantes do laboratório de Biomateriais e Medicina Regenerativa pelos ensinamentos e companheirismo: Eliane, Marli, Priscila, Flávia, Jéssica, Ariana e principalmente Moema, Rodrigo e Daniel que dedicaram muito de seu tempo para me acompanhar nos estudos.

Agradeço ainda o apoio de mestres e colegas que, de alguma forma, fizeram parte desse momento: Marcus Luzo, Eduardo e Thiago Almeida, Andres, Monique, Rosana, Marlon, Renata e Carol.

Espero crescer e um dia chegar próximo à altura de gigantes como vocês. Muito obrigado por tudo. Sem vocês nada teria sido possível.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

DE ANDREIS, F.A. DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE MICROESFERA DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) COMO AR CABOUÇO PARA ESFEROIDE CONDROGÊNICO: APLICAÇÕES NA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR.

Introdução: a cartilagem articular é um tecido altamente organizado que facilita movimentos suaves nas articulações diartrodiais. Notável por sua capacidade única de suportar peso e reduzir fricção, a cartilagem hialina é desprovida de redes vasculares, neurais e linfáticas, além de células progenitoras locais. Essas características tornam particularmente desafiador restaurar sua função e integridade após lesões traumáticas ou degenerativas. **Objetivo:** Desenvolver uma nova alternativa terapêutica com microesferas do copolímero poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para cultivo de condrócitos, a partir de modelo *in vitro* visando futuras aplicações clínicas na osteoartrose (OA), e comparar dois protocolos de PLGA por simples emulsão e evaporação de solvente, quanto à produção de arcabouços para cultura celular. **Métodos:** Foi realizada a síntese das microesferas por meio do método de simples emulsão com evaporação de solvente, comparando dois protocolos: (1) utilizando 500 mg de PLGA 80:20 dissolvidos em 12 mL de CHCl₃, misturados com uma solução de PVA a 0,25% e homogeneizados a 10.000 rpm. A emulsão foi sonicada por 10 minutos, agitada por 24 horas, centrifugada, lavada, congelada a -20°C e liofilizada a -100°C, (2) microesferas produzidas dissolvendo PLGA 80:20 em CHCl₃. A esta solução foi adicionado a PVA 1%, com velocidade de agitação de 500 rpm em agitador magnético (DOX-AGIT) por 18 horas. As microesferas foram lavadas em água deionizada e estéril e liofilizadas por 24h a -100°C. A caracterização das microesferas foi avaliada com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com análise de diâmetro dos esferoides. **Resultados:** após avaliação dos dois protocolos utilizados, o protocolo 2 foi o que produziu microesferas com melhores características para o cultivo celular, com diâmetros variando de 2,6 até 398,3 μ ms, sendo a maioria entre 100 e 300 μ ms. **Conclusão:** Os resultados deste estudo demonstraram que o Protocolo 2 foi superior na produção de microesferas para cultivo celular. Dada as dificuldades fisiológicas associadas a esse tecido, o protocolo analisado pode representar uma alternativa promissora para futuras aplicações clínicas.

Palavras-chave: Microesfera, Cartilagem, PLGA.

ABSTRACT

DE ANDREIS, F.A. DEVELOPMENT OF A POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) MICROSHERE MODEL AS A FRAMEWORK FOR CHONGROGENIC SPHEROID: APPLICATIONS IN THE REGENERATION OF JOINT CARTILAGE.

Introduction: Articular cartilage is a highly organized tissue that facilitates smooth movements in diarthrodial joints. Notable for its unique ability to support weight and reduce friction, hyaline cartilage is devoid of vascular, neural, and lymphatic networks, as well as local progenitor cells. These characteristics make it particularly challenging to restore function and integrity after traumatic or degenerative injuries. **Objective:** To develop a new therapeutic alternative with poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) copolymer microspheres for chondrocyte culture, based on an in vitro model aiming at future clinical applications in osteoarthritis (OA), and to compare two PLGA protocols by simple emulsion and solvent evaporation, regarding the production of scaffolds for cell culture. **Methods:** Microspheres were synthesized using the simple emulsion method with solvent evaporation, comparing two protocols: (1) using 500 mg of PLGA 80:20 dissolved in 12 mL of CHCl_3 , mixed with a PVA solution at 0.25% and homogenized at 10,000 rpm. The emulsion was sonicated for 10 minutes, stirred for 24 hours, centrifuged, washed, frozen at -20°C, and freeze-dried at -100°C, (2) microspheres produced by dissolving PLGA 80:20 in CHCl_3 . 1% PVA was added to this solution, with a stirring speed of 500 rpm on a magnetic stirrer (DOX-AGIT) for 18 hours. The microspheres were washed in sterile deionized water and lyophilized for 24h at -100°C. The characterization of the microspheres was evaluated with Scanning Electron Microscopy (SEM) with analysis of the diameter of the spheroids. **Results:** after evaluating the two protocols used, protocol 2 was the one that produced microspheres with the best characteristics for cell culture, with diameters ranging from 2.6 to 398.3 μm , the majority being between 100 and 300 μm . **Conclusion:** The results of this study demonstrated that Protocol 2 was superior in the production of microspheres for cell culture. Given the physiological difficulties associated with this tissue, the analyzed protocol may represent a promising alternative for future clinical applications.

Keywords: Microsphere, Cartilage, PLGA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Principais tipos de cartilagem articular [Olmedilla, 2015]
- Figura 2. Camadas da cartilagem hialina e seus componentes bioquímicos [Daou et al., 2022]
- Figura 3. Classificação de Outerbridge para lesões de cartilagem [apud Zhang et. al., 2014]
- Figura 4. Classificação de Ahlbäck & Rydberg, modificada por Keyes et al. para osteoartrose [Keyes et al., 1992]
- Figura 5. Opções de tratamento cirúrgico de acordo com o tamanho do defeito da cartilagem [Koch et al., 2011; Williams et al., 2010]
- Figura 6. Técnica Implantação de Condrócitos Autólogos Assistida por Matriz (ICAAM). (A) Lesão osteocondral em patela, (B) Debridamento do defeito, (C) Membrana cultivada com condrocitos autólogos fixada com cola de fibrina no defeito osteocondral [Fonte: <https://www.maci.com>]
- Figura 7. A e C: radiografias de dois casos de osteoartrose de joelhos avançada com indicação de artroplastia total. B e D: radiografias demonstrando resultado final da artroplastia com componentes tibial e femoral de liga metálica com cromo e cobalto e componente de polietileno entre eles [Tan et al., 2021]
- Figura 8. Apresentados dois casos de complicações de artroplastia primária de joelho com soltura de componentes tibiais compostos de liga metálica de cromo e cobalto (A) e ao lado (B) as revisões cirúrgicas com necessidade da troca de prótese e adição de hastes femorais e tibiais [Oliver et al., 2020]
- Figura 9. Diferentes sítios doadores de células mesenquimais no corpo humano [Nam et al., 2018]
- Figura 10. A. Mixer ultra Turrex, B. Sonicador, C. Liofilizador
- Figura 11. A. Processo de polimerização de PLA + PGA, B. PLGA 80:20 pronto, C. Microesferas aglutinadas após processo de simples emulsão e evaporação de solvente.
- Figura 12: Microscópio Eletrônico de Varredura
- Figura 13. Protocolo 1: método adaptado de Terukina et al., (2016) submetido ao processo em mixer Ultra Turrex e sonicação apresentou microesferas com variação de 0,25 até 9 μ ms.
- Figura 14. demonstra a degradação de esferas de PLGA em diferentes proporções

de PLA e PGA em 0, 40 e 80 dias, confirmando melhores resultados na proporção de 85:15 [Gabler et al., 2007].

Figura 15. Protocolo 2: método de simples emulsão com evaporação de solvente adaptado de Gabler et al. sem o uso de sonicação apresentou microesferas com variação de diâmetros entre 2,6 e 398,3 μms .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características gerais dos arcabouços para aplicação em engenharia tecidual [Pedrini et al. 2019]

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACI	<i>Autologous Chondrocyte Implantation</i>
Adamts	Agrecanases
AINEs	anti-inflamatórios não esteroidais
BMPs	Proteínas morfogenéticas
CHCL ₃	Clorofórmio ou triclorometano
CTMs	Células-tronco mesenquimais
EMA	European Medicines Agency
EUA	Estados Unidos da América
FDA	U.S. Food and Drug Administration, EUA
GA	<i>Glycolic acid</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LA	<i>Lactic acid</i>
MACI	<i>Matrix-Assisted Chondrocyte Implantation</i>
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMP-13	Metaloproteinase 13
OA	Osteoartrose
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenoglicol
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PVA	Acetato de Polivinilo
TGF-beta	Fatores de crescimento beta
TNF-alpha	Fator de necrose tumoral alpha

LISTA DE SÍMBOLOS

g/mol	gramas por mol
mg	miligramas
mL	mililitro
nm	nanômetro
rpm	rotação máxima por minuto
W	Watts
°C	graus Celsius
µms	micrômetro
%	porcento

SUMÁRIO

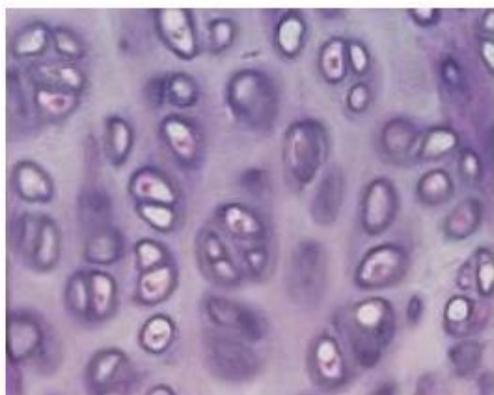
1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVO.....	25
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
3.1	Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa	26
3.1.1	Reparo celular	27
3.1.2	Biomateriais.....	29
3.1.3	Cultura de células em arcabouço de três dimensões.....	31
4	METODOLOGIA	33
4.1	Obtenção de microesferas de PLGA.....	33
4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura das microesferas	34
5	RESULTADOS	36
5.1	Produção de microesferas de PLGA.....	36
6	DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

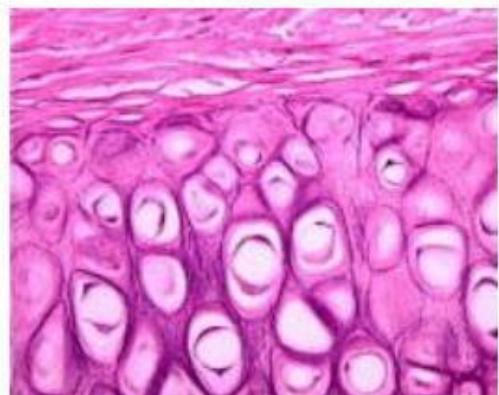
A cartilagem é um tecido conjuntivo altamente especializado que reveste as extremidades dos ossos nas articulações diartrodiais, fundamental para a estrutura e função do corpo humano. Composta principalmente por células chamadas condrócitos e uma matriz extracelular (MEC) abundante, a cartilagem desempenha papel crucial na sustentação mecânica e na flexibilidade das articulações e estruturas do corpo, sendo responsável pela redução do atrito e distribuição de cargas durante o movimento articular. Existem três principais tipos de cartilagem articular, cada um adaptado às suas funções específicas (Figura 1) [Eyre, 2004; Gonzalez-Rodriguez et. al., 2012; Olmedila et. al., 2015]:

- i. Cartilagem hialina: encontrada nas superfícies articulares dos ossos longos, como no joelho e no quadril, além no septo nasal, traqueia, costelas. Caracteriza-se pela presença de uma matriz extracelular rica em colágeno tipo II, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, proporcionando uma superfície lisa e de baixo atrito para o movimento articular.
- ii. Cartilagem elástica: encontrada em locais que necessitam de flexibilidade e elasticidade, como no pavilhão auditivo (orelha) e na epiglote. Contém fibras elásticas adicionais na matriz extracelular, conferindo-lhe maior capacidade de retorno ao seu estado original após o estiramento, essencial para funções como a audição e a proteção da entrada da laringe durante a deglutição.
- iii. Fibrocartilagem: encontrada em áreas sujeitas a grandes pressões e forças de cisalhamento, onde é necessária resistência mecânica superior, por exemplo, discos intervertebrais da coluna vertebral, os meniscos dos joelhos e a articulação temporomandibular. É caracterizada pela presença de matriz extracelular que combina colágeno tipo I e tipo II, tornando-a mais resistente à tração e compressão do que a cartilagem hialina. A fibrocartilagem também contém maior proporção de células de condrócitos.

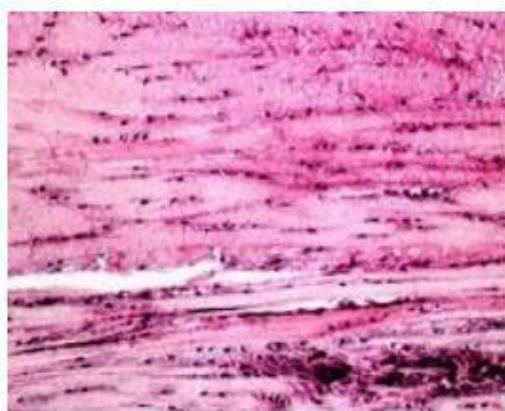
A cartilagem articular é distinta em sua capacidade de suporte de peso e fricção. Danos a esse tecido nas articulações podem prejudicar a função, levando à incapacidade [Gonzalez-Rodriguez, 2012; Chen et al., 2017].



Cartilagem Hialina: células organizadas em lacunas entremeadas na matriz extracelular



Cartilagem elástica: fibras elásticas e de colágeno na MEC



Cartilagem Fibroelástica: fibras grandes de colágeno na MEC.

Figura 1. Principais tipos de cartilagem [Olmedilla, 2015]

A estrutura histológica da cartilagem articular apresenta quatro camadas distintas, cada uma com características específicas que contribuem para suas funções biomecânicas (Figura 2). A camada superficial está localizada na superfície da cartilagem e é a mais fina, correspondendo a 10 a 20% da espessura total da cartilagem. É composta por condrócitos achatados, dispostos paralelamente à superfície articular. A MEC nesta camada possui alta concentração de fibras colágenas, principalmente colágeno tipo II. Essas fibras ajudam a fornecer resistência à tração e contribuem para a integridade estrutural da camada superficial [Bhosale & Richardson, 2008; Daou et al., 2022].

A camada de transição está localizada abaixo da superficial e apresenta

condrócitos de forma mais arredondada, fibras de colágeno finas, dispostas em direções oblíquas e perpendiculares à superfície, o que confere à cartilagem articular maior capacidade de absorver impactos e resistir às forças de cisalhamento durante o movimento. A concentração de proteoglicanos na matriz extracelular é mais elevada do que na camada superficial, proporcionando maior elasticidade e capacidade de compressão [Eyre, 2004; Bhosale & Richardson, 2008].

As fibras de colágeno na zona profunda são as maiores em diâmetro. Contém condrócitos dispostos em grupos isógenos, que são aglomerados de células derivadas da mesma célula progenitora. As fibras de colágeno são mais grossas e estão orientadas predominantemente na direção vertical, ajudando na transmissão de cargas e na resistência à compressão. A matriz extracelular é rica em proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que mantêm a hidratação da cartilagem e contribuem para suas propriedades mecânicas. Foi observado que células da zona profunda aderem e se espalham mais rapidamente nos arcabouços de meios de cultura [Eyre, 2004; Bhosale & Richardson, 2008].

Por último, a zona calcificada, é a camada mais profunda da cartilagem articular, próxima ao osso subcondral, e contém poucos condrócitos, em sua maioria inertes e embutidos em uma MEC calcificada. É a única zona com colágeno tipo X, que auxilia na mineralização e fornece ancoragem entre a cartilagem e o osso subcondral. A transição entre a cartilagem e o osso subcondral é gradual, permitindo uma transição suave das propriedades mecânicas entre esses tecidos [Eyre, 2004; Bhosale & Richardson, 2008].

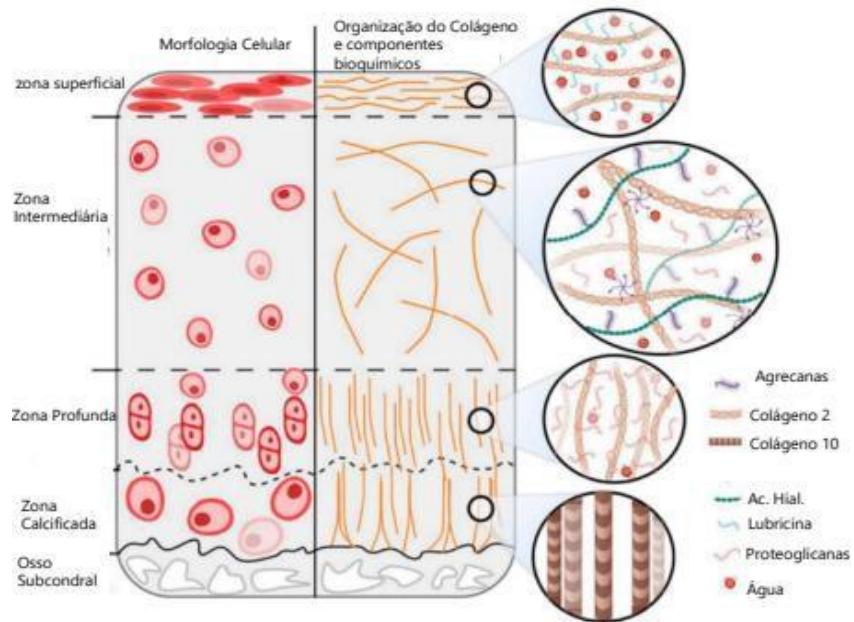


Figura 2. Camadas da cartilagem hialina e seus componentes bioquímicos [Daou et al., 2022]

A cartilagem articular é composta por uma variedade de colágenos, incluindo os tipos II, VI, IX, X e XI, que são os principais componentes da MEC e desempenham um papel fundamental nas propriedades de resistência à tração deste tecido. Conforme a cartilagem amadurece, a proporção de colágeno II em relação aos outros tipos aumenta significativamente, passando de 75% na cartilagem fetal para mais de 90% na cartilagem adulta [Eyre et al., 2006; Responde et al., 2007].

O peso total da cartilagem é predominantemente composto por água, que constitui de 70 a 80% da MEC. Por outro lado, o colágeno representa aproximadamente 50% do peso seco da cartilagem, desempenhando um papel crucial na resistência às forças de tração nas articulações [Becerra et al., 2010].

A cartilagem articular é caracterizada pela ausência de redes vasculares, neurais e linfáticas, além da presença limitada de células progenitoras locais. Além disso, é conhecida por apresentar altos níveis de inibidores de protease, o que pode dificultar o processo de reparo tecidual eficiente [Reddi, 1998; Vasita & Katti, 2006].

Devido a essas características, restaurar a função e a integridade da cartilagem articular após lesões traumáticas ou degenerativas torna-se um desafio significativo. A degeneração progressiva da cartilagem articular, culminando no

acometimento do osso subcondral, é conhecida como osteoartrite (OA). Esta condição afeta predominantemente indivíduos com mais de 50 anos, sendo que nos EUA, mais de 70% da população entre 55 e 70 anos é diagnosticada com essa doença [Johnson et al., 2012].

A classificação de Outerbridge, sistema utilizado para categorizar a gravidade das lesões da cartilagem articular, especialmente no joelho, classifica as lesões em quatro estágios, com base na observação artroscópica [Outerbridge, 2001] (Figura 3).

Grau 0	Cartilagem normal
Grau 1	Cartilagem amolecida e edemaciada
Grau 2	Defeito parcial (menos de 50%) / fragmentação com fissuras superficiais que não atingem o osso subcondral ou excedem 1,3 cm de diâmetro
Grau 3	Fragmentação e fissuras em área com diâmetro de mais de 1,3 cm (amolecimento e fibrilações)
Grau 4	Erosão da cartilagem articular com exposição do osso subcondral



Figura 3. Classificação de Outerbridge para lesões de cartilagem [apud Zhang et. al., 2014]

Após o acometimento do osso subcondral, várias classificações já são estabelecidas na literatura, entre elas a de Ahlbäck & Rydberg (1980) modificada por Keyes et al. (1992) (Figura 4).

Grau I	Redução do espaço articular
Grau II	Obliteração do espaço articular
Grau III	AP – desgaste do platô tibial < 5mm perfil – parte posterior do platô intacta
Grau IV	AP – desgaste de 5 a 10mm do platô tibial perfil – extenso desgaste da margem posterior do platô tibial
Grau V	AP – grave subluxação da tibia perfil – subluxação anterior da tibia > 10mm

Figura 4. Classificação de Ahlbäck & Rydberg, modificada por Keyes et al. para osteoartrose [Keyes et al., 1992]

Técnicas de reparo, como as microfraturas, que introduzem células na articulação, apresentam resultados clínicos imprevisíveis, pois produzem um tecido fibrocartilaginoso que tende a degenerar com o tempo [Steadman et al., 1997]. Na mosaicoplastia, tampões osteocondrais cilíndricos são colhidos de áreas da articulação afetada que não suportam carga e são inseridos no defeito osteocondral. Isso cria um "mosaico" de autoenxerto para preencher a lesão, embora o procedimento seja limitado pela disponibilidade de tecido no sítio doador [Brittberg et al., 1994; Andrade et al., 2016; Inderhaug & Solheim, 2019]

A terapia de implante autólogo de condrócitos (IAC) representa outra abordagem, onde uma biópsia de cartilagem saudável é retirada de um local doador, os condrócitos são cultivados em laboratório e depois reimplantados durante um procedimento cirúrgico. Os condrócitos, extraídos do tecido recuperado, são expandidos em cultura e posteriormente implantados em um segundo procedimento sob uma membrana periosteal (1^a geração) ou uma membrana artificial feita de colágeno tipo I e III (2^a geração), que é suturada à cartilagem adjacente ao defeito ou selada com cola de fibrina. O procedimento IAC com a adição de um arcabouço para o cultivo celular é chamado de implantação de condrócitos assistida por matriz (ICAM, 3^a geração), como no caso do já comercializado Hyalograft® [Pavesio et al., 2003; Marlovits et al., 2006; Mistry et al., 2017; Armoiry et al., 2019].

Recentemente, foi desenvolvida uma técnica de cultivo de condrócitos na qual, após serem retirados da cartilagem em um primeiro procedimento, os condrócitos são cultivados em laboratório e adquirem um formato esferoide sem a necessidade de um arcabouço. Este produto é chamado Spherox® e tem apresentado resultados promissores [Armoiry et al., 2019; Riedl et al., 2020].

Outros tipos de intervenções incluem: (i) transplante de aloenxerto osteocondral: envolve a substituição do defeito osteocondral com um enxerto de cartilagem e osso de um doador; (ii) osteotomias: procedimentos cirúrgicos que reposicionam os ossos para aliviar a pressão sobre a área danificada; e (iii) artroplastias: substituição parcial ou total da articulação por uma prótese artificial para restaurar a função e aliviar a dor [Brouwer et al., 2014; van Raaij et al., 2016; Zouzias & Bugbee, 2016]. A indicação cirúrgica depende de fatores como o nível de atividade do paciente, deformidade da articulação, condições clínicas, entre outros [Williams et al., 2010; Koch et al., 2011] (Figuras 5 e 6).

TRATAMENTOS CIRÚRGICOS DE LESÕES CONDRAIS

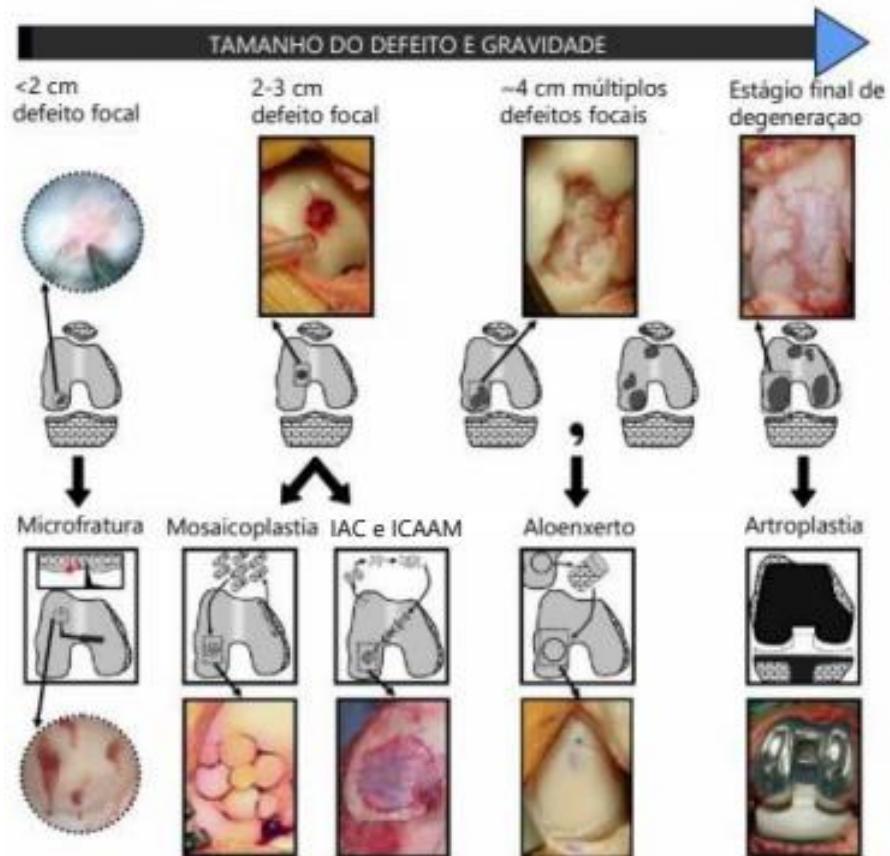


Figura 5. Opções de tratamento cirúrgico de acordo com o tamanho do defeito da cartilagem
[Koch et al., 2011; Williams et al., 2010]



Figura 6. Técnica Implantação de Condrócitos Autólogos Assistida por Matriz (ICAAM). (A) Lesão osteocondral em patela, (B) Desbridamento do defeito, (C) Membrana cultivada com condrócitos autólogos fixada com cola de fibrina no defeito osteocondral [Fonte: <https://www.maci.com>]

Nos casos de OA mais grave, sem melhora com outros tratamentos, a cirurgia definitiva é a artroplastia total de joelho. Embora apresente bons resultados, essa é uma cirurgia extremamente invasiva, com possíveis complicações de alta morbidade, como a soltura da prótese ou infecção dos implantes. Além disso, o material utilizado possui um custo muito elevado para o sistema de saúde, tornando necessária a pesquisa por novas opções [Wilson et al., 2019; Oliver et al., 2020; Tan et al., 2021; Olsen et al., 2023] (Figuras 7 e 8).

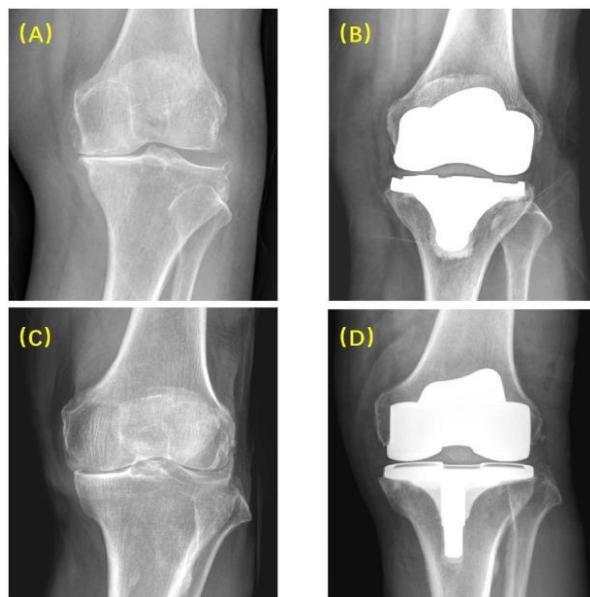


Figura 7. A e C: radiografias de dois casos de osteoartrose de joelhos avançada com indicação de artroplastia total. B e D: radiografias demonstrando resultado final da artroplastia com componentes tibial e femoral de liga metálica com cromo e cobalto e componente de polietileno entre eles [Tan et al., 2021]



Figura 8. Apresentados dois casos de complicações de artroplastia primária de joelho com soltura de componentes tibiais compostos de liga metálica de cromo e cobalto (A) e ao lado (B) as revisões cirúrgicas com necessidade da troca de prótese e adição de hastes femorais e tibiais [Oliver et al., 2020].

Como um campo em rápida expansão, a engenharia de tecidos pode oferecer soluções alternativas para o reparo e a regeneração da cartilagem articular através do desenvolvimento de substitutos biomiméticos de tecidos. Isso envolve a manipulação de uma variedade de tipos de células (como células-tronco, condrócitos, osteoblastos, células endoteliais, fibroblastos e células do músculo liso), o uso de arcabouços ou *scaffolds* para o cultivo celular (que podem ser biodegradáveis, feitos de materiais naturais ou sintéticos, polímeros e nanocompósitos), a aplicação de fatores bioativos (como fatores de crescimento e citocinas), e o uso de estímulos físicos (como estímulos mecânicos, elétricos, entre outros) [Hunziker, 2002; Becerra et al., 2010; Quinn et al., 2013].

Diferentes materiais podem ser utilizados como arcabouços para o cultivo laboratorial de condrócitos. Entre os mais comuns estão os polímeros como alginato, ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), polietilenoglicol (PEG), policaprolactona (PCL) e seus copolímeros. Esses materiais podem ser moldados em formatos tridimensionais que oferecem propriedades vantajosas para a cultura celular [Mueller-Klieser, 1997; Reddi, 1998; Zhang et al., 2009].

Há uma lacuna a ser preenchida na literatura com relação a técnicas que reproduzem a cartilagem hialina com sucesso e, nesse estudo, buscamos desenvolver microesferas de PLGA com características pertinentes à cultura celular e, consequentemente, um artifício visando futuras aplicações na osteoartrite.

2 OBJETIVO

Desenvolver microesferas do copolímero *poli (ácido láctico-co-glicólico)* (PLGA) para cultura celular, comparando dois protocolos com método de simples emulsão e evaporação de solvente.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa

Nas últimas décadas, a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa emergiram como campos inovadores dedicados à construção de substitutos biológicos capazes de imitar tecidos nativos para fins de diagnóstico, de pesquisa e para substituir ou regenerar tecidos danificados. Este esforço multidisciplinar combina princípios de biologia celular, engenharia e medicina para desenvolver soluções terapêuticas que visam melhorar a qualidade de vida dos pacientes [Frith et al., 2010; Berthiaume et al., 2011].

A engenharia de tecidos utiliza células vivas, materiais biocompatíveis e fatores bioquímicos (por exemplo, fatores de crescimento) e físicos (por exemplo, carga mecânica cíclica) adequados, bem como combinações dos mesmos, para criar estruturas semelhantes a tecidos naturais, com o objetivo final de implantar essas construções no corpo para reparar lesões ou substituir órgãos falhos. As funções críticas podem ser estruturais (por exemplo, ossos e cartilagem), relacionadas à barreira e ao transporte (por exemplo, pele e vasos sanguíneos) ou bioquímicas e secretoras (por exemplo, fígado e pâncreas) [Berthiaume et al., 2011].

A engenharia de tecidos também se aplica ao desenvolvimento de sistemas especializados de suporte de vida extracorpóreo contendo células (por exemplo, fígado e rim bioartificiais) e unidades de tecido que podem ser usadas para triagem diagnóstica. Além de aplicações clínicas, outros usos incluem testes de drogas para eficácia e toxicologia e estudos básicos sobre desenvolvimento de tecidos e morfogênese. O termo “medicina regenerativa” é frequentemente usado como sinônimo de engenharia de tecidos, embora a medicina regenerativa frequentemente implique o uso de células-tronco como fonte de células [Berthiaume et al., 2011].

A engenharia de tecidos, como campo moderno e estruturado, começou a tomar forma no final dos anos 1970 e início dos anos 1980, embora as raízes da criação de substitutos de pele sintéticos remontem a 1962. Neste período,

houveram avanços significativos na criação de produtos de pele de engenharia de tecidos que marcaram o início da prática moderna. Esses produtos foram os pioneiros no uso de técnicas modernas de cultivo celular e biomateriais para criar substitutos que poderiam ser implantados para tratar queimaduras e feridas. Durante a década de 1990, vários desses e outros produtos de engenharia de tecidos para pele e, posteriormente, cartilagem foram comercializados com sucesso. [Green & Kehinde, 1979; Herman et al, 2002; Berthiaume et al., 2011].

A demanda por abordagens de engenharia e regeneração de tecidos para cartilagem tem crescido em face da crescente prevalência de doenças articulares degenerativas (por exemplo, osteoartrite), à medida que a população em geral continua envelhecendo. As técnicas atuais para reparar lesões de cartilagem articular são diversificadas e se agrupam em três categorias principais: (a) técnicas baseadas em simulação de medula, como a Microfratura, (b) técnicas de transplante osteocondral, como o enxerto osteocondral autólogo e o transplante de enxerto osteocondral alogênico, e (c) técnicas de reparo baseadas em células, como o IAC, ICAAM e o uso de células-tronco mesenquimais (CTMs). Os tratamentos reparativos e regenerativos são relatados como eficazes no tratamento de defeitos condrais e subcondrais, mas não podem curar nem retardar a degeneração da cartilagem articular; portanto, estratégias de engenharia de tecidos foram introduzidas para superar essas limitações [Brittberg et al., 1994; Buckwalter & Mankin, 1998; Daou et al., 2022].

Um dos principais desafios na engenharia de tecido cartilaginoso é garantir um número adequado de células para preencher defeitos clinicamente relevantes. Os condrócitos, que são as células principais da cartilagem, representam apenas 5 a 10% do tecido cartilaginoso total. Devido à sua baixa proporção e capacidade limitada de proliferação, é necessário expandir esses condrócitos em laboratório antes de sua aplicação clínica. Para contornar a limitação do número de condrócitos, no início dos anos 2000, o uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) passou a ser uma alternativa promissora [Huey et al., 2012; Makris et al., 2015; Wang et al., 2020].

3.1.1 Reparo celular

Terapias baseadas em CTMs que integram tecnologias de engenharia de

tecidos e ciência de biomateriais são pilares fundamentais da ciência da medicina regenerativa. As CTMs são células pluripotentes encontradas em várias partes do corpo, como a medula óssea, o tecido adiposo e o cordão umbilical. Essas células possuem a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares, incluindo condrócitos, quando cultivadas sob condições técnicas apropriadas. O tecido adiposo em especial possui a vantagem de permitir a obtenção de grandes quantidades de CTMs. No entanto, a capacidade de diferenciação dessas células em condrócitos é reduzida [Afizah et al., 2007; Krisday et al., 2008].

Um estudo realizado com células adiposas demonstrou que infiltrações intra-articulares com essas células podem melhorar a dor e a função em pacientes com osteoartrite de joelho, mas podem não melhorar o estado crítico da cartilagem [Richardson et al., 2016]. Estudos *in vitro* mostraram que CTMs derivadas de medula óssea podem se diferenciar em várias linhagens mesenquimais, incluindo condrócitos, porém com expressão de substâncias características do tecido ósseo, como fosfatase alcalina e osteopontina [Pittenger et al., 1999; Lee et al., 2007; Wegener et al., 2010] (Figura 10).

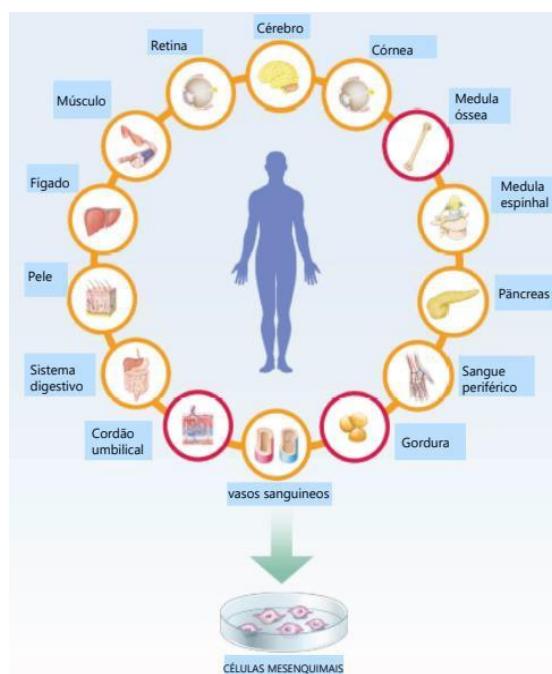


Figura 9. Diferentes sítios doadores de células mesenquimais no corpo humano [Nam et al., 2018].

3.1.2 Biomateriais

Biomaterial é qualquer material sintético que substitui ou restaura a função de tecidos do corpo e que mantém contato contínuo ou intermitente com os fluidos. Considerando que haverá contato com os fluidos, é essencial que o material apresente biocompatibilidade, não produza resposta biológica adversa, não induza efeito sistêmico, não seja tóxico, carcinogênico, antigênico ou mutagênico [Morais et al., 2007].

Independente da sua classificação, é importante ressaltar que, além de facilitar o transporte de nutrientes e oxigênio, o arcabouço deve obedecer a alguns requisitos (Tabela 1).

Tabela 1: Características gerais dos arcabouços para aplicação em engenharia tecidual [Pedrini et al. 2019]

Biocompatibilidade	<ul style="list-style-type: none">- Apresentar componentes em sua estrutura que não causem rejeição imunológica;- Os produtos de sua degradação não podem ser tóxicos.
Biodegradabilidade	<ul style="list-style-type: none">- Apresentar degradação controlada que complemente o crescimento tecidual, garantindo suporte suficiente;- Degradar por processos enzimáticos ou biológicos do hospedeiro;- Favorecer que as células produzam sua própria matriz extracelular.
Arquitetura	<ul style="list-style-type: none">- Apresentar poros interconectados que permitam a difusão e migração celular;- Apresentar porosidade suficiente para viabilizar o crescimento celular sem enfraquecer as propriedades mecânicas.
Propriedades mecânicas	<ul style="list-style-type: none">- Apresentar resistência elástica, compressiva e de fadiga comparáveis ao tecido hospedeiro;- Apresentar propriedades mecânicas que permitam que o arcabouço possa ser facilmente manipulado no ambiente clínico.

Os materiais poliméricos tornaram-se extremamente atrativos para uma gama de aplicações biomédicas. Um polímero amplamente explorado é o Poli(Ácido Láctico-Co-Glicólico) (PLGA), é biodegradável, biocompatível e copolímero aprovado pela FDA (U.S. Food and Drug Administration, EUA) e EMA (European Medicines Agency) [Frith et al., 2010; Habanjar et al., 2021].

O PLGA foi sintetizado pela primeira vez na década de 1970 por pesquisadores que buscavam criar materiais que pudessem ser biodegradados dentro do corpo humano sem causar reações adversas. O PLGA pode ser processado em qualquer formato e tamanho e permite liberação ajustável de drogas. Sua biodistribuição e farmacocinética seguem perfis não lineares e dose-dependentes [Salamana et al., 2015; Habanjar et al., 2021]. É geralmente sintetizado através da copolimerização por abertura do anel de ácido láctico (LA) e ácido glicólico (GA), sendo os produtos de sua degradação não tóxicos. É possível encapsular materiais orgânicos e inorgânicos em PLGA, como drogas de pequenas moléculas, vacinas, proteínas, bem como nanopartículas magnéticas [Mueller-Klieser, 1997; Wenzel et al., 2014].

Diferentes formas de PLGA podem ser obtidas variando a razão Poli(ácido láctico):Poli(ácido glicólico) (PLA:PGA) durante a polimerização, por exemplo, PLGA 50:50, que é frequentemente usado em nanotecnologia, tem uma composição de 50% de lactato e 50% de glicolato [Messina et al., 2004]. Os copolímeros de PLGA herdam as propriedades intrínsecas de seus monômeros constituintes, onde a razão PLA:PGA, juntamente com o peso molecular do polímero, influenciam sua hidrofobicidade, cristalinidade, propriedades mecânicas, tamanho e taxa de biodegradação [Messina et al., 2004; Li et al., 2010; Murata et al., 2015].

O PLGA tem se destacado como plataformas promissoras para a engenharia de tecidos, especialmente na regeneração da cartilagem articular. Tem sido amplamente utilizado na fabricação de arcabouços para cultivo celular devido às suas propriedades favoráveis, como a capacidade de controlar a liberação de fatores de crescimento e a integração com o tecido biológico, bem como excelentes propriedades, como resistência à tração e módulo de elasticidade. No entanto, o uso de PLGA na engenharia de alguns tecidos ainda é limitado devido à sua baixa osteocondutividade, à liberação de subprodutos ácidos, que aliena a infiltração celular e às suas propriedades mecânicas subótimas [Temenoff et al., 2000; Duncan et al., 2011].

Os materiais inorgânicos a serem combinados com PLGA muitas vezes determinam suas finalidades, assim como os agentes terapêuticos orgânicos (proteínas, DNA e medicamentos) que podem ser carregados na plataforma PLGA. Os materiais compostos multifuncionais baseados em PLGA permitem a

combinação de diferentes aplicações que resultam em diagnósticos e resultados terapêuticos aprimorados. Os materiais e nano compósitos de PLGA representam um passo à frente no campo da biomedicina e mostram uma grande promessa para novas melhorias nas áreas teranótica, terapêutica, diagnóstica e de engenharia de tecidos [Lee et al., 2007].

3.1.3 Cultura de células em arcabouço de três dimensões

A expansão celular em monocamada causa desdiferenciação dos condrócitos, que é caracterizada pela diminuição da síntese de proteoglicanas, da expressão de colágeno tipo II e aumento da expressão de colágeno tipo I [Richardson et al., 2016].

Os esferoides têm sido amplamente utilizados por sua aplicação simples, de alto rendimento, baixo custo, melhora de viabilidade e proliferação celular e mantêm a propriedade fenotípica intrínseca que refletem mais de perto o comportamento no tecido nativo [Habanjar et al., 2021].

Células dentro dos esferoides diminuem a expressão de vários marcadores de superfície, tornando-as menos propensas a desencadear uma resposta imune em comparação com células individuais [Frith et al., 2010].

Os esferoides também são ferramentas valiosas na compreensão e na modelagem experimental do câncer [Mueller-Klieser, 1997]. As células tumorais dentro do núcleo central do esferoide apresentam disponibilidade reduzida de oxigênio e nutrientes, refletindo um núcleo hipóxico e carente de nutrientes evidente nos tumores [Wenzel et al., 2014]. Neuroesferas exibem muitos processos observados no desenvolvimento cerebral, incluindo proliferação celular, migração e apoptose celular [Salama et a., 2015]. Cardioesferas de células progenitoras cardíacas exibem diferenciação aprimorada, secreção aumentada de matriz extracelular e, em alguns casos, podem mimetizar o tecido funcionalmente [Li et al., 2010; Messina et al., 2010]. Esferoides com células de tecido adiposo estimularam a regeneração da cartilagem e osso subcondral em minis porcos após um ano de implantação [Murata et al., 2015].

A engenharia de tecidos da cartilagem articular tem produzido resultados positivos e experimenta grandes avanços nos últimos anos, sendo considerada

uma alternativa promissora para replicar a estrutura e a função da cartilagem articular nativa [Daou et al., 2022].

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção de microesferas de PLGA

Dois protocolos bem estabelecidos na literatura foram adaptados tendo como principais diferenças o uso de agitador Ultra Turrex e o processo de sonicação para assegurar que as partículas estejam no diâmetro ideal para favorecer a cultura celular:

- *Protocolo 1:*

O método utilizado no Protocolo 1 foi o de simples emulsão com evaporação de solvente. Neste método, adaptado de Terukina et al. (2016) por Duek et al. (2017), 500mg de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) 80:20 (Mw = 417.829 g/mol) foram dissolvidos em 12mL de CHCl₃, em agitador magnético (DOX-AGIT).

A mistura foi vertida em 300mL de solução de poli (álcool vinílico) Aldrich® 0,25% (PVA) e então homogeneizada por 3 minutos a 10.000 rpm em mixer Ultra Turrex (T25, IKA). Na sequência, foi submetida a um sonicador (UP 200S, Hielscher), em intensidade 85% (equivalente a 180W), por 10 minutos (amostras sonicadas – DOX SONIC).

A emulsão obtida foi agitada lentamente por 24 horas para evaporação do solvente, centrifugada a 5000 rotações por minuto por 5 minutos e lavada com água destilada. As microesferas foram congeladas a -20°C por 24 horas, e liofilizadas por 24h a -100°C [Duek et al., 2017; Tekurina et al., 2016].

- *Protocolo 2:*

O método utilizado foi o de simples emulsão com evaporação de solvente, adaptado de Gabler et al. (2007). As microesferas foram produzidas dissolvendo PLGA 80:20 em CHCl₃. A esta solução polimérica foi adicionado o PVA 1%. A velocidade de agitação utilizada foi de 500 rpm em um agitador magnético (DOX-AGIT) por 18 horas para permitir a remoção completa do solvente por meio de evaporação. As microesferas foram lavadas em água deionizada e estéril e liofilizadas por 24h a -100°C (Figuras 11 e 12).



Figura 10. A- Mixer ultra Turrex, B- Sonicador, C- Liofilizador



Figura 11. A. Processo de polimerização de PLA + PGA, B. PLGA 80:20 pronto, C. Microesferas aglutinadas após processo de simples emulsão e evaporação de solvente.

4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das microesferas

A análise morfológica das microesferas de PLGA foi feita por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (EVO MA15-ZEISS, IB/UNICAMP). As amostras foram metalizadas em 15-30nm de ouro (Emitech K550) e visualizadas em aumentos variados (Figura 13). A análise dos tamanhos das microesferas produzidas foi realizada com auxílio do software Image J (National Institute of Health, EUA).



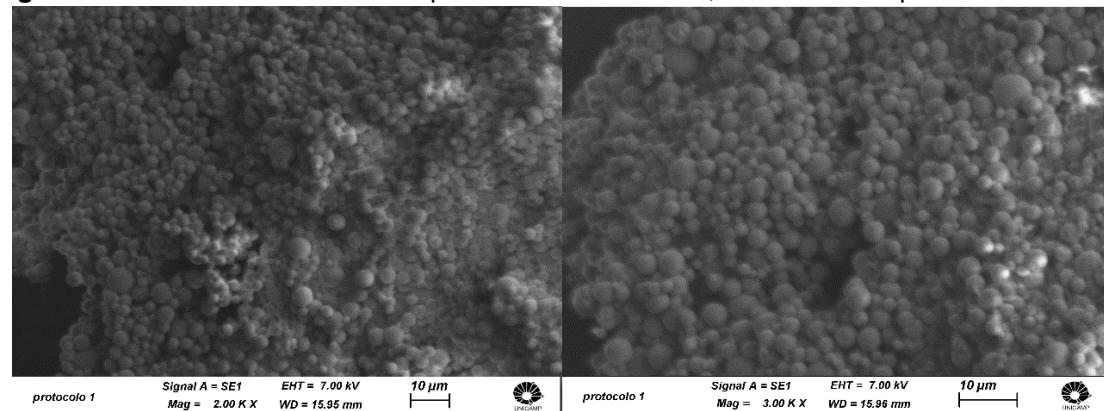
Figura 12: Microscópio Eletrônico de Varredura

5 RESULTADOS

5.1 Produção de microesferas de PLGA

Ao utilizar o método de simples emulsão com evaporação de solvente, obtendo partículas de aproximadamente 25 μ m, e submetendo as amostras à sonicação, as partículas produzidas no Protocolo 1 variaram de aproximadamente 0,25 até 9 μ ms (Figura 14).

Figura 13. Protocolo 1: método adaptado de Terukina et al, submetido ao processo em mixer Ultra



Turrex e sonicação apresentou microesferas com variação de 0,25 até 9 μ ms.

Como resultado do Protocolo 2, microesferas com diâmetros variando de 2,6 até 398,3 μ ms foram alcançadas, sendo a maioria entre 100 e 300 μ ms (Figura 14).

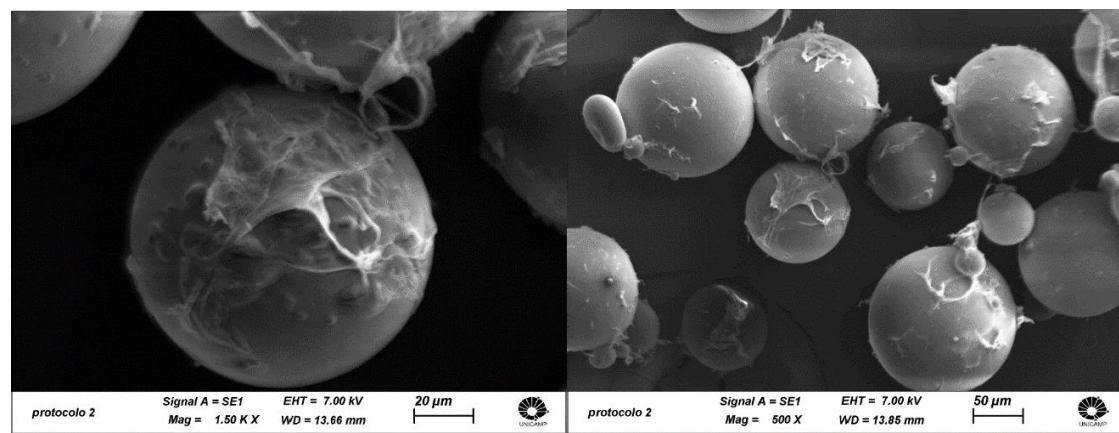


Figura 14. Protocolo 2: método de simples emulsão com evaporação de solvente adaptado de Gabler et al sem o uso de sonicação apresentou microesferas com variação de diâmetros entre 2,6 e 398,3 μ ms.

Assim, após avaliação dos dois protocolos utilizados, o Protocolo 2 foi o que produziu microesferas com melhores características para o cultivo celular.

6 DISCUSSÃO

As abordagens de engenharia tecidual têm o potencial de revolucionar o tratamento de lesões e doenças degenerativas da cartilagem articular, oferecendo soluções mais eficazes e menos invasivas em comparação com as técnicas tradicionais. Essas tecnologias podem melhorar a qualidade de vida dos pacientes, reduzindo a dor, restaurando a função articular e diminuindo a necessidade de procedimentos cirúrgicos mais invasivos, como a substituição total da articulação [Temenoff et al., 2000; Huey et al., 2012; Makris et al. 2015].

Os resultados do presente estudo mostraram que, ao utilizar o método proposto por Terukina et al. (2016) para obtenção de microesferas de PLGA pelo método de simples emulsão com evaporação de solvente, obtendo partículas de aproximadamente 25 μ m, porém submetendo as amostras à sonicação, as partículas produzidas no Protocolo 1 variaram de aproximadamente 0,25 até 9 μ ms. Como resultado do Protocolo 2, microesferas com diâmetros variando de 2,6 até 398,3 μ ms foram alcançadas, sendo a maioria entre 100 e 300 μ ms

Gabler et al. (2007) desenvolveram microesferas dissolvendo três polímeros PLGA diferentes: de 50:50 PLGA tipo "a" com um teor de monômero residual de 0,90% e viscosidade inherente (i.V.) de 0,84 dl/g, 50:50 PLGA tipo "b" com teor de monômero residual de 0,83 (i.V.: 0,69 dl/g) e 85:15 PLGA com teor de monômero residual de 1,20% (i.V.: 3,27 dl/g) em CHCl₃ com adição de álcool polivinílico 0,5%. Microesferas de diferentes tamanhos foram produzidas sendo que ambos PLGA 50:50 apresentaram menores diâmetros (entre 40-160 μ ms) enquanto o PLGA 85:15 apresentou maiores (60-330 μ ms). Não houve relação entre rotações por minuto durante a agitação e o tamanho da microesfera. A degradação foi estimada para todos os três polímeros medindo o peso seco. Durante o período de 80 dias, o PLGA 85:15 mostrou redução quase linear de 20% em peso, enquanto ambos os polímeros PLGA 50:50 mostraram redução de quase 70% em peso. Outra vantagem observada foi a maior adesão celular no PLGA 85:15 explicada pela maior quantidade de ácido láctico. A superioridade do PLGA 85:15 nesses quesitos corrobora com a escolha do presente estudo de utilizar o PLGA com proporção 80:20, assim como também utilizado por Duek et al. (2020) (Figura 15).

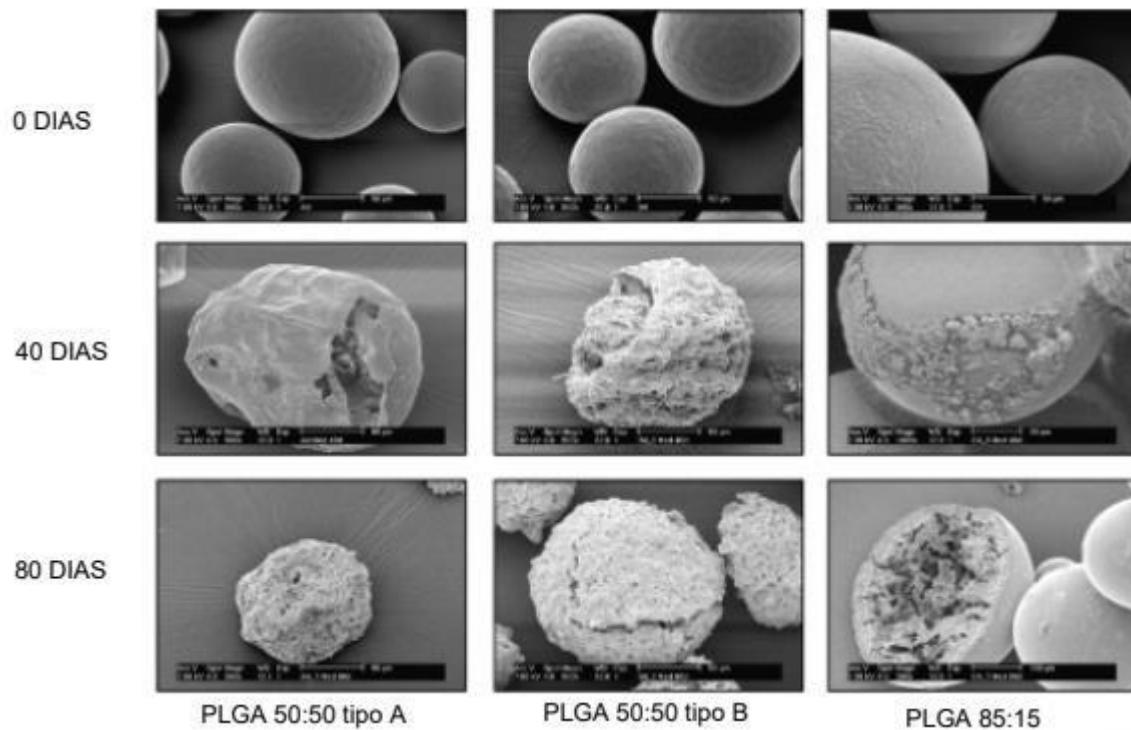


Figura 15. demonstra a degradação de esferas de PLGA em diferentes proporções de PLA e PGA em 0, 40 e 80 dias, confirmando melhores resultados na proporção de 85:15 [Gabler et al., 2007].

Já, Boukari et al. (1015) desenvolveram microesferas porosas e não porosas de PLGA de baixo, intermediário e alto peso molecular, preparadas usando o método de evaporação de solvente em dupla emulsão. O diâmetro médio das microesferas de baixo, médio e alto peso molecular foi de 33,0, 57,8 e 83,8 μms , respectivamente, enquanto o diâmetro médio das microesferas não porosas foi 52,6, 63,4 e 92,1 μms , respectivamente. Também foi observada maior degradação quanto menor o peso molecular do PLGA.

Thissen et al. (2006) relataram produção de microesferas de PLGA (85:15) de 47 a 210 μms e demonstraram que a cultura de condrócitos de ovelha mantiveram seu fenótipo diferente da cultura em camada única que mostrou diferenciação para fibroblastos. Kang et al. utilizaram microesferas de PLGA 50:50 cultivadas com condrócitos e as introduziram em defeitos de cartilagem de coelhos apresentando bons resultados na neoformação de tecido cartilaginoso hialino, porém não se sabe o comportamento na articulação do joelho em humanos já que,

conforme antes citado, apresenta velocidade maior de degradação e baixa adesão celular comparado à proporção 85:15 [Pavesio et al., 2003; Gabler et al., 2007].

Microesferas menores que 100 μ ms são relatadas por induzirem inflamação *in vivo*, enquanto microesferas maiores influenciam negativamente na diferenciação das células cultivadas [Gabler et al., 2007]. Um tamanho ideal relatado seria em diâmetros entre 100 e 200 μ ms. Além disso, uma distribuição estreita nos tamanhos é desejada para reprodução ideal das condições de cultivo [Fisher et al. 2004].

Apesar dos avanços promissores, a engenharia tecidual para a regeneração da cartilagem ainda enfrenta desafios significativos. A integração dos tecidos regenerados com o tecido cartilaginoso nativo, a durabilidade a longo prazo da cartilagem regenerada e a resposta imune do paciente são questões críticas que precisam ser abordadas. Além disso, a escalabilidade e a viabilidade econômica das terapias baseadas em engenharia tecidual devem ser aprimoradas para que esses tratamentos estejam amplamente disponíveis. No entanto, com a contínua pesquisa e inovação, é provável que a engenharia tecidual continue a evoluir e a proporcionar soluções cada vez mais eficazes para as doenças degenerativas da cartilagem articular [Daou et al., 2022]. A promessa de regenerar a cartilagem de maneira eficaz e duradoura traz novas esperanças para milhões de pacientes ao redor do mundo, marcando uma nova era na medicina regenerativa.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o modelo de microesfera de poli (ácido láctico-co-glicólico) como arcabouço para esferoide condrogênico (protocolo 2) foi superior na produção de microesferas para cultivo celular, quando comparado ao método utilizado no protocolo 1. Dadas as dificuldades fisiológicas associadas à regeneração da cartilagem hialina, o protocolo analisado pode representar uma alternativa promissora para futuras aplicações clínicas na osteoartrite.

REFERÊNCIAS

1. Afizah, H., Yang, Z., Hui, J. H., Ouyang, H. W., Lee, E. H. (2007). A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue engineering*, 13(4), 659–666.
2. Andrade, R., Vasta, S., Pereira, R., Pereira, H., Papalia, R., Karahan, M., Oliveira, J. M., Reis, R. L., Espregueira-Mendes, J. (2016). Knee donor-site morbidity after mosaicplasty - a systematic review. *Journal of experimental orthopaedics*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40634-016-0066-0>
3. Armoiry, X., Cummins, E., Connock, M., Metcalfe, A., Royle, P., Johnston, R., Rodrigues, J., Waugh, N., Mistry, H. (2019). Autologous Chondrocyte Implantation with Chondrosphere for Treating Articular Cartilage Defects in the Knee: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal. *PharmacoEconomics*, 37(7), 879–886.
4. Becerra, J., Andrades, J. A., Guerado, E., Zamora-Navas, P., López-Puertas, J. M., Reddi, A. H. (2010). Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 16(6), 617–627.
5. Berthiaume, F., Maguire, T. J., Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 403–430.
6. Bhosale, A. M., Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin*, 87, 77–95.
7. Boukari, Y., Scurr, D. J., Qutachi, O., Morris, A. P., Doughty, S. W., Rahman, C. V., Billa, N. (2015). Physicomechanical properties of sintered scaffolds formed from porous and protein-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres for potential use in bone tissue engineering. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 26(12), 796–811.
8. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331:889–95.

9. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine*, 331(14), 889–895.
10. Brouwer, R. W., Huizinga, M. R., Duivenvoorden, T., van Raaij, T. M., Verhagen, A. P., Bierma-Zeinstra, S. M., Verhaar, J. A. (2014). Osteotomy for treating knee osteoarthritis. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2014(12), CD004019.
11. Buckwalter JA, Mankin HJ. 1998. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr. Course Lect. 47:487–504.
12. Chen, S., Fu, P., Wu, H., Pei, M. (2017). Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell and tissue research*, 370(1), 53–70.
13. Daou, F., Cochis, A., Leigheb, M., Rimondini, L. (2022). Current Advances in the Regeneration of Degenerated Articular Cartilage: A Literature Review on Tissue Engineering and Its Recent Clinical Translation. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(1), 31.
14. Duek, E.A. de R., Almeida, A. L.M., Pirola, F.J.C., Françoso, M.P., Peña, S.S., Hausen, M.A., Komatsu, D., Nazato, V.S. (2020). Avaliação *in vitro* da biocompatibilidade de microesferas de Poli(L-ácido lático-co-ácido glicólico) contendo doxiciclina direcionada a aplicações periodontais. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, Sorocaba, São Paulo, 22:suppl.
15. Eyre D. R. (2004). Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clinical orthopaedics and related research*, (427 Suppl), S118–S122.
16. Eyre, D. R., Weis, M. A., Wu, J. J. (2006). Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?. *European cells & materials*, 12, 57–63.
17. Fischer, E. M., Layrolle, P., Van Blitterswijk, C. A., De Bruijn, J. D. (2003). Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. *Tissue engineering*, 9(6), 1179–1188.
18. Frith, J. E., Thomson, B., & Genever, P. G. (2010). Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties

- and increase therapeutic potential. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 16(4), 735–749.
19. Gabler, F., Frauenschuh, S., Ringe, J., Brochhausen, C., Götz, P., Kirkpatrick, C. J., Sittiger, M., Schubert, H., Zehbe, R. (2007). Emulsion-based synthesis of PLGA-microspheres for the in vitro expansion of porcine chondrocytes. *Biomolecular engineering*, 24(5), 515–520.
20. Gonzalez-Rodriguez, D., Guevorkian, K., Douezan, S., Brochard-Wyart, F. (2012). Soft matter models of developing tissues and tumors. *Science* (New York, N.Y.), 338(6109), 910–917.
21. Green, H., Kehinde, O. (1979). Culture of skin fibroblasts and keratinocytes. *Nature*, 281(5727), 310-312.
22. Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., Delort, L. (2021). 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12200.
23. Herman, A.R. (2002). The history of skin grafts. *J. Drugs Dermatol.* 1:298–301.
24. Huey, D. J., Hu, J. C., Athanasiou, K. A. (2012). Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* (New York, N.Y.), 338(6109), 917–921.
25. Hunziker E. B. (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and cartilage*, 10(6), 432–463.
26. Inderhaug, E., Solheim, E. (2019). Osteochondral Autograft Transplant (Mosaicplasty) for Knee Articular Cartilage Defects. *JBJS essential surgical techniques*, 9(4), e34.1-2.
27. Johnson, K., Zhu, S., Tremblay, M. S., Payette, J. N., Wang, J., Bouchez, L. C., Meeusen, S., Althage, A., Cho, C. Y., Wu, X., Schultz, P. G. (2012). A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science* (New York, N.Y.), 336(6082), 717–721.
28. Keyes, G. W., Carr, A. J., Miller, R. K., Goodfellow, J. W. (1992). The radiographic classification of medial gonarthrosis. Correlation with operation methods in 200 knees. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 63(5), 497–501.
29. Kisiday, J. D., Kopesky, P. W., Evans, C. H., Grodzinsky, A. J., McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D. (2008). Evaluation of adult equine bone marrow- and

- adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 26(3), 322–331.
30. Koch, T.G., Moroni, L., Leysi-Derilou, Y., Berg, L.C. (2011). Joint Cartilage Tissue Engineering and Pre-Clinical Safety and Efficacy Testing. tissue engineering for tissue and organ regeneration. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/18196>. Acesso em: 25 de maio de 2024.
31. Lee, K. B., Hui, J. H., Song, I. C., Ardany, L., Lee, E. H. (2007). Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(11), 2964–2971.
32. Li, T. S., Cheng, K., Lee, S. T., Matsushita, S., Davis, D., Malliaras, K., Zhang, Y., Matsushita, N., Smith, R. R., Marbán, E. (2010). Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(11), 2088–2098.
33. Makris, E. A., Gomoll, A. H., Malizos, K. N., Hu, J. C., Athanasiou, K. A. (2015). Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature reviews. Rheumatology*, 11(1), 21–34.
34. Marlovits S, Singer P, Zeller P, Mandl I, Haller J, Trattnig S. (2006). Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur. J. Radiol.* 57:16–23.
35. Marlovits, S., Zeller, P., Singer, P., Resinger, C., Vécsei, V. (2006). Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *European journal of radiology*, 57(1), 24–31.
36. Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M. V., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G., & Giacomello, A. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation research*, 95(9), 911–921.
37. Mistry, H., Connock, M., Pink, J., Shyangdan, D., Clar, C., Royle, P., Court, R., Biant, L. C., Metcalfe, A., Waugh, N. (2017). Autologous chondrocyte

- implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment (Winchester, England)*, 21(6), 1–294.
38. Morais, L. S. de; Guimarães, G. S.; Elias, C. N. (2007). Liberação de íons por biomateriais metálicos. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, 12, 6:48–53.
39. Mueller-Klieser W. (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *The American journal of physiology*, 273(4), C1109–C1123.
40. Mueller-Klieser W. (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *The American journal of physiology*, 273(4), C1109–C1123.
41. Murata, D., Tokunaga, S., Tamura, T., Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Fujiki, M., Nakayama, K., Misumi, K. (2015). A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free three-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 10, 35.
42. Nam, Y., Rim, Y. A., Lee, J., Ju, J. H. (2018). Current Therapeutic Strategies for Stem Cell-Based Cartilage Regeneration. *Stem cells international*, 8490489.
43. Oliver, G., Jaldin, L., Camprubí, E., & Cortés, G. (2020). Observational Study of Total Knee Arthroplasty in Aseptic Revision Surgery: Clinical Results. *Orthopaedic Surgery*, 12(1), 177–183.
44. Olmedilla, M.P. Tissue engineering techniques to regenerate articular cartilage using polymeric scaffolds. Diss. Universitat Politècnica de València, 2015.
45. Olsen, U., Lindberg, M. F., Rose, C., Denison, E., Gay, C., Aamodt, A., Brox, J. I., Skare, Ø., Furnes, O., Lee, K. A., Lerdal, A. (2023). Factors correlated with pain after total knee arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 18(3), e0283446.
46. Outerbridge R. E. (2001). The etiology of chondromalacia patellae. 1961. *Clinical orthopaedics and related research*, (389), 5–8.
47. Pavesio, A., Abatangelo, G., Borrione, A., Brocchetta, D., Hollander, A. P., Kon, E., Torasso, F., Zanasi, S., Marcacci, M. (2003). Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects:

- preliminary clinical findings. *Novartis Foundation symposium*, 249, 203–241.
48. Pedrini, F., Hausen, M. A., Duek, E. A. R. (2022). Optimized Method to Improve Cell Activity in 3D Scaffolds Under a Dual Real-Time Dynamic Bioreactor System. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2436, 127–134.
49. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–147.
50. Quinn, T. M., Häuselmann, H. J., Shintani, N., & Hunziker, E. B. (2013). Cell and matrix morphology in articular cartilage from adult human knee and ankle joints suggests depth-associated adaptations to biomechanical and anatomical roles. *Osteoarthritis and cartilage*, 21(12), 1904–1912.
51. Reddi A. H. (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature biotechnology*, 16(3), 247–252.
52. Reddi A. H. (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature biotechnology*, 16(3), 247–252.
53. Responde, D. J., Natoli, R. M., Athanasiou, K. A. (2007). Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering. *Critical reviews in biomedical engineering*, 35(5), 363–411.
54. Richardson, S. M., Kalamegam, G., Pushparaj, P. N., Matta, C., Memic, A., Khademhosseini, A., Mobasher, R., Poletti, F. L., Hoyland, J. A., Mobasher, A. (2016). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods (San Diego, Calif.)*, 99, 69–80.
55. Riedl, M., Vadalà, G., Papalia, R., Denaro, V. (2020). Three-dimensional, Scaffold-Free, Autologous Chondrocyte Transplantation: A Systematic Review. *Orthopaedic journal of sports medicine*, 8(9), 2325967120951152.
56. Salama, M., Lotfy, A., Fathy, K., Makar, M., El-Emam, M., El-Gamal, A., El-Gamal, M., Badawy, A., Mohamed, W. M., Sobh, M. (2015). Developmental neurotoxic effects of Malathion on 3D neurosphere system. *Applied & translational genomics*, 7, 13–18.
57. Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Singleton, S. B. (1997). Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results.

- Operative Techniques in Orthopaedics, 7(4), 300-304.
58. Tan, J., Zou, D., Zhang, X., Zheng, N., Pan, Y., Ling, Z., Tsai, T. Y., Chen, Y. (2021). Loss of Knee Flexion and Femoral Rollback of the Medial-Pivot and Posterior-Stabilized Total Knee Arthroplasty During Early-Stance of Walking in Chinese Patients. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 675093.
59. Temenoff, J. S., Mikos, A. G. (2000). Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21(5), 431-440.
60. Terukina, T., Naito, Y., Tagami, T., Morikawa, Y., Henmi, Y., Prananingrum, W., Ichikawa, T., Ozeki, T. (2016). The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration *in vitro* and *in vivo*: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 33, 136–142.
61. Thissen, H., Chang, K. Y., Tebb, T. A., Tsai, W. B., Glattauer, V., Ramshaw, J. A., Werkmeister, J. A. (2006). Synthetic biodegradable microparticles for articular cartilage tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 77(3), 590–598.
62. van Raaij, T. M., Reijman, M., Furlan, A. D., Verhaar, J. A. (2009). Total knee arthroplasty after high tibial osteotomy. A systematic review. *BMC musculoskeletal disorders*, 10, 88.
63. Vasita, R., Katti, D. S. (2006). Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 1(1), 15–30.
64. Wang, J., Zhou, L., Zhang, Y., Huang, L., Shi, Q. (2020). Mesenchymal stem cells - a promising strategy for treating knee osteoarthritis. *Bone & joint research*, 9(10), 719–728.
65. Wegener, B., Schrimpf, F. M., Bergschmidt, P., Pietschmann, M. F., Utzschneider, S., Milz, S., Jansson, V., Müller, P. E. (2010). Cartilage regeneration by bone marrow cells-seeded scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 95(3), 735–740.
66. Wenzel, C., Riefke, B., Gründemann, S., Krebs, A., Christian, S., Prinz, F., Osterland, M., Golfier, S., Räse, S., Ansari, N., Esner, M., Bickle, M., Pampaloni, F., Mattheyer, C., Stelzer, E. H., Parczyk, K., Prechtl, S., Steigemann, P. (2014). 3D high-content screening for the identification of

- compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Experimental cell research*, 323(1), 131–143.
67. Williams, G. M., Chan, E. F., Temple-Wong, M. M., Bae, W. C., Masuda, K., Bugbee, W. D., & Sah, R. L. (2010). Shape, loading, and motion in the bioengineering design, fabrication, and testing of personalized synovial joints. *Journal of biomechanics*, 43(1), 156–165.
68. Wilson, H. A., Middleton, R., Abram, S. G. F., Smith, S., Alvand, A., Jackson, W. F., Bottomley, N., Hopewell, S., Price, A. J. (2019). Patient relevant outcomes of unicompartmental versus total knee replacement: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 364, l352.
69. Zhang, C., Wei, X., Chen, C., Cao, K., Li, Y., Jiao, Q., Ding, J., Zhou, J., Fleming, B. C., Chen, Q., Shang, X., Wei, L. (2014). Indian hedgehog in synovial fluid is a novel marker for early cartilage lesions in human knee joint. *International journal of molecular sciences*, 15(5), 7250–7265.
70. Zhang, L., Hu, J., Athanasiou, K. A. (2009). The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Critical reviews in biomedical engineering*, 37(1-2), 1–57.
71. Zouzias, I. C., & Bugbee, W. D. (2016). Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee. *Sports medicine and arthroscopy review*, 24(2), 79–84.