

DM

# Nanopartículas de Colagénio para Terapias da Cartilagem Baseadas em Recursos Marinhos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Francisca Hevelyn Oliveira Macêdo Pereira Costa**

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

*A Nossa Universidade*

[www.uma.pt](http://www.uma.pt)

setembro | 2019



# **Nanopartículas de Colagénio para Terapias da Cartilagem Baseadas em Recursos Marinhos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Francisca Hevelyn Oliveira Macêdo Pereira Costa**

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTAÇÃO

Helena Maria Pires Gaspar Tomás  
Ana Rute de Azevedo Pina Neves



# **Nanopartículas de colagénio para terapias da cartilagem baseadas em recursos marinhos**

Dissertação apresentada à Universidade da Madeira em cumprimento dos requisitos para o grau de Mestre em Bioquímica Aplicada

Por Francisca Hevelyn Oliveira Macêdo Pereira Costa

Trabalho desenvolvido sob a supervisão da  
Professora Doutora Helena Maria Pires Gaspar Tomás e  
Doutora Ana Rute de Azevedo Pina Neves

Faculdade de Ciências Exatas e da Engenharia,  
Centro de Química da Madeira,  
Campus Universitário da Penteada

Funchal – Portugal

Setembro de 2019



## DECLARAÇÃO

O plágio consiste na apresentação, como sendo suas/seus e mesmo que tenha havido tradução, de ideias, opiniões, frases/textos, resultados ou conclusões de outros. A prática de plágio constitui uma grave violação da ética académica, além de poder levar à reprovação ou à retirada do grau, assim como a responsabilidade civil, criminal e disciplinar.

Assim, declaro por minha honra que a presente tese de mestrado é da minha exclusiva autoria, é original, e nela referenciei e citei todas as fontes utilizadas.

16/09/2019

Francisca Hevelyn Oliveira Macêdo Pereira Costa





# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	iii
<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Lista de siglas, acrónimos e abreviaturas</b> .....	xi
<b>Índice de figuras</b> .....	xiii
<b>Índice de tabelas</b> .....	xiv
<b>1. Introdução</b> .....	15
1.1 Cartilagem.....	15
1.2 Composição da cartilagem.....	16
1.3 Tipos de cartilagem .....	16
1.3.1 Cartilagem Articular .....	16
1.3.2 Cartilagem Elástica.....	21
1.3.3 Fibrocartilagem.....	22
1.4 Mecanismos de lesões na cartilagem articular.....	24
1.5 Principais doenças degenerativas da cartilagem articular .....	25
1.5.1 Osteoartrite .....	25
1.5.2 Artrite Reumatóide .....	27
1.6 Terapias atuais para a reparação da cartilagem articular .....	29
1.6.1 Penetração do osso subcondral.....	30
1.6.2 Enxertos periosteal e pericondrial .....	31
1.6.3 Transplante osteocondral autólogo.....	31
1.6.4 Transplante osteocondral alogénico.....	32
1.6.5 Transplante autólogo de condrócitos e de células mesenquimais estaminais .....	33
1.6.6 Matrizes ou <i>scaffolds</i> .....	35
1.6.7 Fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras.....	36
1.7 Nanotecnologia .....	37
1.7.1 O que é a nanotecnologia?.....	37
1.7.2 Nanotecnologia e a saúde .....	37
1.7.3 Nanotecnologia e terapias para a reparação da cartilagem .....	38
<b>2. Objetivos</b> .....	41
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	43
3.1 Materiais e reagentes para a produção de Nanopartículas de Colagénio .....	43
3.2 Células, meios de cultura e reagentes para ensaios celulares.....	43

3.3 Equipamentos .....	44
3.4 Síntese das Nanopartículas de Colagénio .....	44
3.5 Caracterização das Nanopartículas de Colagénio .....	45
3.6 Ensaio celulares .....	46
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>55</b>
4.1 Protocolo de síntese otimizado .....	55
4.2 Caracterização das Nanopartículas de Colagénio do protocolo otimizado .....	56
4.2.1. Tamanho hidrodinâmico .....	56
4.2.2 Índice de polidispersão .....	57
4.2.3 Potencial Zeta .....	58
4.2.4 Microscopia Eletrónica de Transmissão .....	59
4.3 Avaliação da citotoxicidade das Nanopartículas de Colagénio .....	60
4.4 Diferenciação condrogénica de hMSCs .....	61
4.4.1 Ensaio da Redução da Resazurina nas hMSCs em diferenciação .....	62
4.4.2 Avaliação qualitativa da diferenciação de hMSCs por coloração com Azul de Toluidina e Safranina-O/ <i>Fast Green</i> .....	62
4.4.3 Análise por RT-qPCR .....	67
<b>5. Conclusão e Trabalho Futuro</b> .....	<b>69</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>71</b>

## Agradecimentos

Neste trabalho de Mestrado, por meio de muito estudo, esforço, empenho e dedicação, pude enfrentar inúmeros desafios, medos e incertezas que encontrei ao longo da minha jornada. Apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne o contributo indispensável de várias pessoas. Desde o início do Mestrado e até mesmo da Licenciatura, contei com o apoio, incentivo e a confiança de inúmeras pessoas, que foram fundamentais para a realização deste sonho e a quem agradeço e dedico este projeto de vida.

Agradeço à minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Helena Tomás pela oportunidade de realizar este trabalho sob a sua orientação, por acreditar e investir em mim, pelos conselhos, pelas palavras de incentivo e motivação, por me fazer sair da zona de conforto para apresentar um trabalho em inglês e por toda ajuda durante o período de realização da minha Tese. Estou-lhe profundamente grata. Agradeço também a todos os professores que contribuíram para o meu percurso académico. Nunca me esquecerei deles.

Agradeço à minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Ana Rute Neves por me guiar, aconselhar, incentivar, ter sempre uma palavra amiga e um sorriso bondoso. Obrigada pela amizade, disponibilidade, paciência e, principalmente, pela confiança depositada em mim. Obrigada também por me fazer voar mais alto e alcançar meus objetivos. Minha conquista também é dela. Ela é uma pessoa espetacular, tanto profissionalmente como pessoalmente. Foi um prazer conhecê-la, conviver e trabalhar ao seu lado. Levá-la-ei na memória por onde for.

Agradeço especialmente ao Mestre Filipe Olim pelo seu apoio durante todo o trabalho. Obrigada pela infinita paciência (Haja paciência!), pela disponibilidade e dedicação, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar. Obrigada pela amizade e por deixar os dias no laboratório mais leves, alegres e coloridos. Sem a sua ajuda, eu não teria conseguido.

Agradeço à Professora Dr<sup>a</sup> Paula Castilho por ter me ajudado desde o primeiro contato com a Universidade da Madeira em 2009 e depois, enquanto diretora de Curso, durante a Licenciatura. Obrigada pelo conhecimento transmitido durante estes anos, por não creditar as cadeiras que fiz no Brasil (foi muito importante para o meu crescimento), pelos conselhos, incentivos, puxões de orelha, mas também por muitas risadas e momentos de descontração.

Agradeço às técnicas de laboratório Paula Andrade e Paula Vieira pelo apoio, amizade e disponibilidade em providenciar as ferramentas necessárias para a elaboração do meu trabalho.

Agradeço às minhas queridas amigas Fátima Mendes, Helena Chá-Chá e Rubina Maciel, a quem considero irmãs, e que sempre estiveram ao meu lado, mesmo nos momentos difíceis, apoiando-me, incentivando, enxugando as minhas lágrimas, alegrando-me e celebrando. Obrigada pelo acolhimento, sinceridade, honestidade, pelas boas risadas e pelos momentos inesquecíveis. Não importa o quão longe estivermos, nossa amizade será sempre a mesma. Sinto-me honrada em ser vossa amiga.

Agradeço especialmente à Andreia Luis, ao Onofre Agapito e à Sara Fernandes pela amizade, convivência e risadas durante toda esta jornada. É muito bom ter amigos como vocês. Também agradeço ao meu querido amigo Alex Faria (#EleNão), a todos os amigos da Universidade da Madeira e do CQM que me fizeram sentir em casa e que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho. Estimo cada um de vocês.

Agradeço também às estagiárias Fátima Moreira e Carolina Dantas por me ajudarem durante a realização do trabalho prático laboratorial.

Agradeço ao Presidente da Junta de Freguesia de Santa Maria Maior, Sr. Guido Marcelino de Mendonça Gomes, à DGES e ao Governo Português pela atribuição de uma bolsa de estudos durante todo o meu percurso académico. Por isso, estou eternamente grata.

Agradeço à minha família, especialmente, à minha mãe Rosângela e ao meu pai Helder, por me terem dado o dom da vida, por todo o sacrifício, pelo incentivo, pelas palavras de carinho e por me terem ensinado que o conhecimento é algo que ninguém jamais pode tirar. Espero ser, um dia, pelo menos um pouquinho da mulher que a minha mãe é. Tenho muito orgulho em ser vossa filha. Agradeço também ao meu padrasto Inácio por todo o apoio e incentivo, e também à minha irmã Luciana e à minha sogra Rosa.

Agradeço profundamente ao meu marido Isaque Marques pelo amor, companheirismo, apoio, compreensão, generosidade e alegria com que sempre me brindou, contribuindo para que eu pudesse chegar onde cheguei. Sem a sua ajuda, nem sempre a nossa Ana me deixaria raciocinar.

E claro, à minha querida filha, Ana Carolina, a quem amo incondicionalmente e que é a razão do meu viver. Obrigada por colorir e dar sentido a minha vida e, por fazer os meus dias valerem à pena. Espero, um dia, poder recompensá-la pelas horas de atenção e brincadeiras que lhe devo. Foi tudo por ela.

Finalmente, agradeço ao CQM por me providenciar as ferramentas e suporte para o desenvolvimento deste projeto de Mestrado.

Muito obrigada!

Este trabalho foi suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Projecto PEst-OE/QUI/UI0674/2019, CQM, fundos do Governo Português) e pelo programa Madeira 14–20 através dos projetos M1420-01-0145-FEDER-000008 - PROEQUIPRAM - Reforço do Investimento em Equipamentos e Infraestruturas Científicas na RAM (Universidade da Madeira) e M1420-01-0145-FEDER-000005 - Centro de Química da Madeira - CQM+ (ARDITI-Agência Regional para o Desenvolvimento da Investigação Tecnologia e Inovação). O trabalho também teve o apoio do programa Interreg Área Atlântico (projeto EAPA – 151/2016: BlueHuman).



## Resumo

A cartilagem articular é constituída por matriz extracelular e condrócitos, sendo ancorada no osso subcondral. O seu principal problema é a limitada capacidade de reparação relacionada com a sua falta de vascularização. Embora tenham sido testadas diversas metodologias para o tratamento da degeneração da cartilagem, a sua incompleta eficácia, bem como complicações associadas, torna necessário e urgente o desenvolvimento de novas técnicas para essa finalidade. Assim, a nanotecnologia apresenta-se como ferramenta com potencial aplicação no tratamento da cartilagem, nomeadamente pelo uso de nanopartículas capazes de transportar moléculas bioativas. Sendo o colagénio o principal constituinte da matriz extracelular cartilaginosa, o uso de colagénio proveniente de várias fontes, como organismos marinhos, tem sido investigado para regeneração cartilaginosa, dada a sua potencial biocompatibilidade.

Nesta tese de Mestrado são apresentados resultados preliminares relativamente à preparação de nanopartículas de colagénio de alforreca e tubarão azul visando sua futura aplicação como transportadores de fatores de crescimento para engenharia de tecido cartilaginoso. A preparação dessas nanopartículas foi otimizada, sendo estas caracterizadas por Espalhamento Dinâmico da Luz, medição de potencial Zeta e Microscopia Eletrónica de Transmissão. Posteriormente, realizaram-se ensaios de viabilidade e diferenciação celular com células estaminais mesenquimais humanas após exposição às nanopartículas de colagénio de ambas fontes. A diferenciação celular foi estudada por métodos histoquímicos e avaliação da expressão génica usando a técnica de RT-qPCR.

As partículas sintetizadas com colagénio de alforreca e tubarão azul apresentaram diâmetros hidrodinâmicos de, respetivamente,  $453 \pm 23$  nm e  $634 \pm 18$  nm. No entanto, na análise feita às partículas de colagénio de tubarão por microscopia de transmissão (amostras desidratadas), verificou-se que estas tinham forma elíptica e dimensões na gama 200-300 nm (eixo maior). Ambos os tipos de nanopartículas apresentaram potencial Zeta negativo e boa citocompatibilidade. Por outro lado, a presença das nanopartículas pareceu não afetar a diferenciação condroblástica das hMSCs.

**Palavras-chave:** nanopartículas, colagénio, cartilagem, regeneração.



## Abstract

Articular cartilage consists of an extracellular matrix and chondrocytes, anchored in the subchondral bone. Its main problem is the limited repair capacity due to the lack of vascularization. Although several methodologies for the treatment of cartilage degeneration have been tested, their incomplete efficacy, as well as the complications associated, make it necessary and urgent to develop new techniques for this purpose. Therefore, nanotechnology presents itself as a tool with potential application in the treatment of cartilage, namely by the use of nanoparticles capable of transporting bioactive molecules. As collagen is the main constituent of cartilaginous extracellular matrix, the use of collagen from various sources, including marine organisms, has been investigated for cartilaginous regeneration, given its potential biocompatibility.

In this Master thesis, preliminary results are presented regarding the preparation of jellyfish and blue shark collagen nanoparticles having in view their possible application as vehicles for the transport of growth factors in cartilage tissue engineering. The preparation of these nanoparticles has been optimized and they were characterized by Dynamic Light Scattering, Zeta potential measurement and Transmission Electron Microscopy. Subsequently, cell viability and differentiation assays were performed using human mesenchymal stem cells after exposure to jellyfish and blue shark collagen nanoparticles. Cell differentiation was studied by histochemical methods and gene expression using RT-qPCR.

The particles synthesized with jellyfish and blue shark collagen had hydrodynamic diameters of  $453 \pm 189$  nm and  $634 \pm 81$  nm, respectively. However, transmission microscopy analysis of shark collagen particles (dehydrated samples) showed that they were elliptical in shape and dimensions in the range 200-300 nm (long axis). Both types of nanoparticles showed negative Zeta potential and good cytocompatibility. On the other hand, the presence of nanoparticles did not seem to affect the chondroblastic differentiation of hMSCs.

**Keywords:** nanoparticles, collagen, cartilage, regeneration



## Lista de siglas, acrónimos e abreviaturas

**AA** Antibiótico e Antimicótico

**AINEs** Anti-inflamatórios não-esteróides

**Anti-CCPs** Anticorpos séricos de péptidos citrulinados cíclicos

**AR** Artrite reumatóide

**Arg-Gly-Asp** Complexo arginina-glicina-asparagina

**BMPs** *Bone Morphogenetic protein* / Proteínas Morfogenéticas Ósseas

**cDNA** Complementary DNA / DNA complementar

**CNPs** Collagen nanoparticles / Nanopartículas de colagénio

**CrmA** *Cytokine response modifier A* / Modificador da Resposta da Citocina A

**Cys** Cisteína

**DLS** *Dynamic Light Scattering* / Espalhamento Dinâmico da Luz

**DMARDs** *Disease-modifying anti-rheumatic drug* / Drogas anti-reumáticas modificadoras da doença

**DNA** Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico

**FACIT** *Fibril-associated collagens with interrupted triple helices* / Colagénios associados a fibrilas com tripla hélice interrompida

**FBS** *Fetal Bovine Serum* / Soro Bovino Fetal

**FGF-2** *Fibroblast Growth Factor-2* / Fator de Crescimento do Fibroblasto-2

**FPA** *Formaldehyde solution* / Solução de Formaldeído

**FRZB** *Frizzled Related Protein Gene* / Gene da Proteína Frizada

**GAPDH** Gliceraldeído-3-fosfato

**GAGs** Glicosaminoglicanos

**GDF5** *Growth Differentiation Factor 5 Gene* / Gene do Fator de Crescimento de Diferenciação 5

**Gly** Glicina

**HA** *Hyaluronic acid* / Ácido hialurónico

**hMSCs** Human Mesenchymal Stem Cells / Células mesenquimais estaminais humanas

**Hyp** Hidroxiprolina

**IGF-1** *Insulin-like Growth Factor* / Fator de Crescimento semelhante à insulina tipo 1

**IL-1 $\beta$**  Interleucina-1 $\beta$

**IL-6** Interleucina-6

**IL-8** Interleucina-8

**ITS** Complexo Insulina-Transferrina-Selénio

**MEC** Matriz extracelular

**MMPs** *Matrix metalloproteinases* / Metaloproteínas da matriz

**mRNA** Messenger RNA / Ácido ribonucleico mensageiro

**MSCs** *Mesenchymal stem cells* / Células estaminais mesenquimais

**NPs** Nanopartículas

**NO** *Nitric oxide* / óxido nítrico

**OA** Osteoartrite

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**ONU** Organização das Nações Unidas

**PAMAM** *Polyamidoamine* / Poli(amidoamina)

**PBS** *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* / Solução salina de Tampão Fosfato de *Dulbecco*

**PdI** *Polydispersity Index* / Índice de polidispersão

**PET** Politereftalato de etileno

**PGE2** Prostaglandina E2

**PLGA** *Poly(lactic-co-glycolic acid)* / Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

**PPS** *Poly(propylene sulphide)* / Poli (sulfureto de propileno)

**Pro** Prolina

**RNA** Ribonucleic acid / Ácido ribonucleico

**RNase** Ribonuclease

**RNaseH** Ribonuclease H

**RT-qPCR** *Reverse transcription - quantitative real time polymerase chain reaction* / Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

**Teflon** Politetrafluoretileno

**TEM** *Transmission Electron Microscopy* / Microscopia Eletrônica de Transmissão

**TGF** *Transforming Growth Factor* / Fator de Crescimento Transformador

**TNF- $\alpha$**  *Tumoral Necrosis Factor- $\alpha$*  / Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

**Tyr** Tirosina

**ZP** *Zeta Potential* / Potencial Zeta

**$\alpha$ -MEM**  *$\alpha$ -Minimum Essential Medium* / Meio Essencial Mínimo  $\alpha$

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – (a) Localização anatômica da cartilagem. (b) (c) (d) Tipos de cartilagem. ....	15
<b>Figura 2</b> - Estrutura geral da cartilagem articular ou hialina corada com H&E. ....	17
<b>Figura 3</b> - Diagrama e fotomicrografia da cartilagem hialina.....	17
<b>Figura 4</b> - Estrutura do colagénio. ....	20
<b>Figura 5</b> - Estrutura do proteoglicano. ....	21
<b>Figura 6</b> - Estrutura geral da cartilagem elástica .....	22
<b>Figura 7</b> - Fibrocartilagem corada com H&E .....	23
<b>Figura 8</b> - Comparação entre uma articulação normal e duas articulações com doenças degenerativas da cartilagem articular: osteoartrite e artrite reumatóide .....	25
<b>Figura 9</b> - Representação da técnica de microfratura .....	31
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática da técnica de mosaicoplastia. ....	32
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática da técnica de transplante autólogo de condrócitos. ...	33
<b>Figura 12</b> - Capacidade de diferenciação das MSCs.....	34
<b>Figura 13</b> - Esquema do protocolo de síntese otimizado.....	55
<b>Figura 14</b> - Diâmetro hidrodinâmico das CNPs de alforreca e tubarão azul. ....	57
<b>Figura 15</b> - Índice de polidispersão das CNPs de alforreca e tubarão azul. ....	58
<b>Figura 16</b> - Potencial Zeta das CNPs de alforreca e tubarão azul. ....	59
<b>Figura 17</b> - Morfologia das CNPs de tubarão azul por TEM .....	60
<b>Figura 18</b> – Viabilidade celular das hMSCs após exposição de 24 horas às CNPs de alforreca e tubarão azul.....	61
<b>Figura 19</b> - Viabilidade celular das hMSCs após exposição de 24 horas às CNPs de alforreca e tubarão azul durante o processo de diferenciação celular .....	62
<b>Figura 20</b> - Avaliação do teor de proteoglicanos pela coloração com Azul de Toluidina .....	65
<b>Figura 21</b> - Avaliação do teor de colagénio tipo II e proteoglicanos pela coloração com Safranina-O/Fast Green .....	66
<b>Figura 22</b> - Expressão génica de Colagénio II por RT-qPCR em hMSCs.....	67
<b>Figura 23</b> - Expressão génica de Agrecano por RT-qPCR em hMSCs .....	68

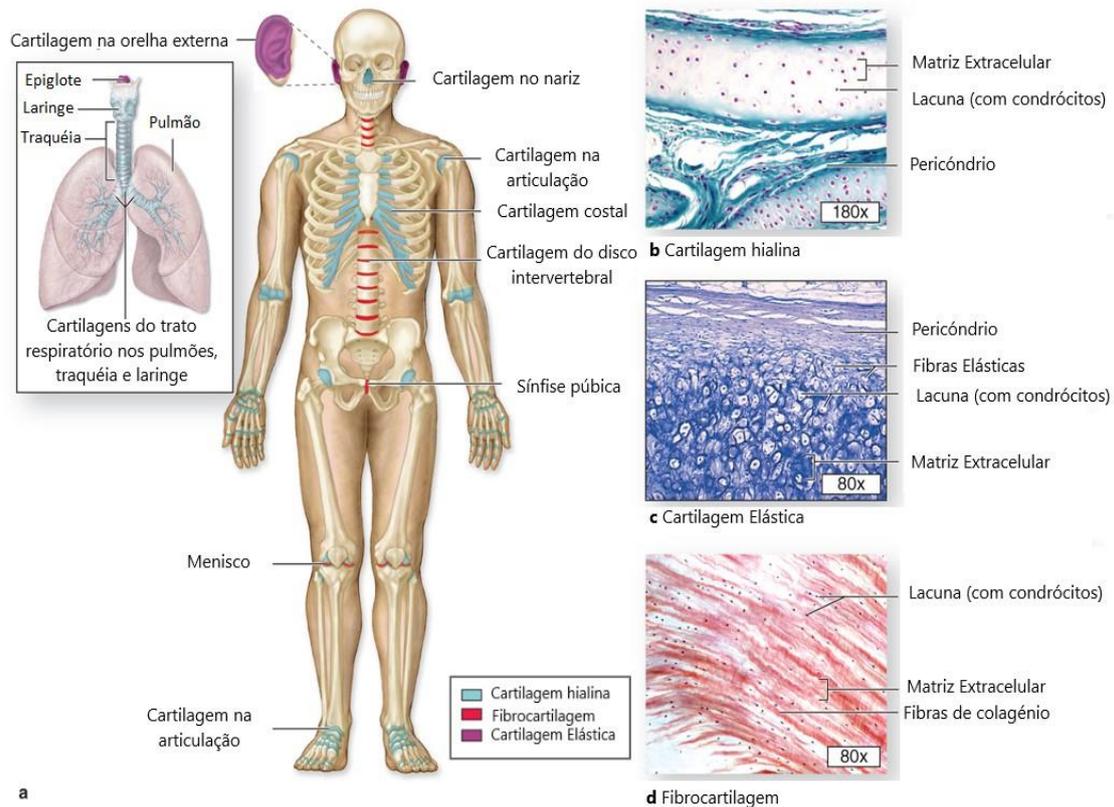
## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Classificação química das matrizes.....	35
<b>Tabela 2</b> - Protocolo de preparação da mistura de reação para RT-qPCR.....	52
<b>Tabela 3</b> - Sequência dos primers iniciadores utilizados na RT-qPCR.....	53

# 1. Introdução

## 1.1 Cartilagem

A cartilagem é um tipo de tecido conjuntivo com origem mesenquimal, caracterizado por ser avascular, aneural e alinfático [1,2]. É encontrada em várias partes do corpo, apresentando como funções principais a manutenção da forma, a sustentação dos tecidos moles, o suporte mecânico e o revestimento das superfícies articulares. Essas características permitem a absorção de colisões e contribuem para o deslizamento dos ossos nas articulações [3,4]. A cartilagem está presente na parede da traqueia, nas vias aéreas de maior calibre, na laringe, epiglote, nariz e trompas de Eustáquio, bem como nas costelas, externo, discos intervertebrais, sínfise púbica e articulações (**Figura 1-a**) [5].



**Figura 1 – (a)** Localização anatômica da cartilagem. **(b) (c) (d)** Tipos de cartilagem. Adaptado da referência [3].

## 1.2 Composição da cartilagem

A cartilagem é formada por células denominadas condrócitos e por uma matriz extracelular (MEC) densa que ocupa 95% do volume da cartilagem. Os condrócitos participam ativamente na produção, manutenção e reparação da matriz, estando localizados em cavidades aí existentes chamadas de lacunas [6,7].

As funções do tecido cartilaginoso dependem essencialmente da estrutura da MEC que é composta maioritariamente por água (70%), colagénios (principalmente tipo II, 70% do peso seco) e proteoglicanos (20% do peso seco). Desses 20% de proteoglicanos, 90% representam moléculas altamente carregadas negativamente, os glicosaminoglicanos (GAGs). O agrecano, também um proteoglicano, e o colagénio tipo II são responsáveis pela hidratação da cartilagem, bem como pela resistência à compressão e à deformação nas articulações [8–10]. As longas cadeias de ácido hialurónico (HA), existentes por toda a matriz, têm a finalidade de conectar especificamente o agrecano a proteínas para conseguir prender as moléculas de agrecano no interior da MEC. A elastina faz com que a cartilagem possua a flexibilidade adequada [5,11].

Por ser avascular, a composição da MEC é fundamental para a nutrição e a sobrevivência dos condrócitos. O alto teor de GAGs e fibras de colagénio tipo II na MEC possibilita a permuta de substâncias e nutrientes entre os capilares presentes no tecido conjuntivo adjacente (pericôndrio) e os condrócitos no interior da matriz cartilaginosa, fazendo com que o tecido se mantenha viável [6]. O tecido cartilaginoso que recobre a superfície dos ossos nas articulações móveis é desprovido de pericôndrio, sendo nutrido por meio do líquido sinovial das cavidades articulares [12].

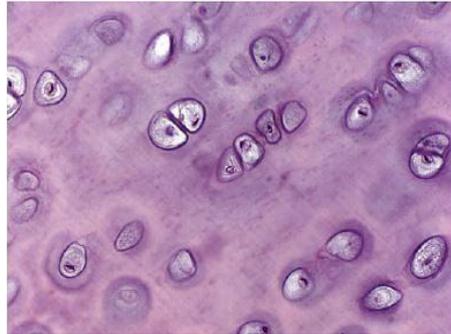
## 1.3 Tipos de cartilagem

São conhecidos três tipos de cartilagem: articular, elástica e fibrocartilagem. Os três tipos diferem em relação à abundância e distribuição dos tipos de colagénio e proteoglicanos que os compõem, originando diferenças no aspeto, propriedades mecânicas e características da matriz (**Figura 1-b, c, d**) [2,5,6,11,12].

### 1.3.1 Cartilagem Articular

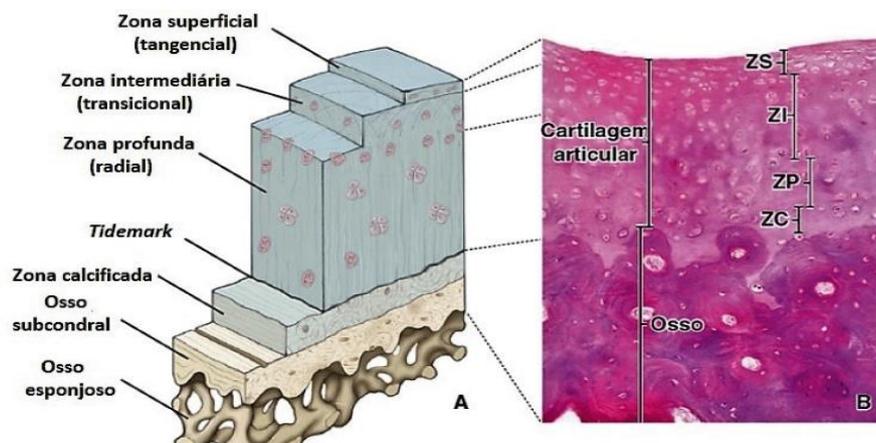
A cartilagem articular, também conhecida como hialina, dentre as três existentes, é a que ocorre com maior predominância no corpo humano (**Figura 2**) [1,6]. Ela é responsável por

fornecer uma superfície de deslizamento de baixa fricção, atuar como amortecedor de choque e minimizar os picos de pressões no osso subcondral [4]. É encontrada no nariz, traqueia, cartilagem costal e no recobrimento de articulações [1]. É composta por condrócitos e condroblastos, além de fibrilas de colagénio tipo II, GAGs, proteoglicanos e glicoproteínas multiadesivas. Estas moléculas ajudam a reter água dentro da MEC, sendo importantes na manutenção das suas propriedades mecânicas [5,6,12].



**Figura 2** - Estrutura geral da cartilagem articular ou hialina corada com H&E. Adaptado da referência [6].

A cartilagem articular é dividida em 4 zonas – superficial, intermédia, profunda e calcificada (**Figura 3**). Estas zonas distinguem-se pelo formato dos condrócitos, tipo de colagénio e quantidade de proteoglicanos [1,4,6,7]. Na zona superficial da cartilagem articular, os condrócitos secretam proteínas lubrificantes e colagénio tipo I. Os condrócitos da zona média secretam grandes quantidades de colagénio tipo II e proteoglicanos, pelo que esta zona é altamente enriquecida nestas duas moléculas. As duas zonas mais profundas - zona profunda e zona calcificada - mostram um arranjo de células e fibras de colagénio que é perpendicular ao osso subcondral. Nesta zona, a densidade celular é menor e os poucos condrócitos existentes são alongados. Além disso, a zona calcificada também desempenha um papel importante ao servir como uma interface entre o osso duro e a cartilagem mole.



**Figura 3** - Diagrama e fotomicrografia da cartilagem hialina. **A** – Organização da rede de colagénio e condrócitos nas várias zonas da cartilagem articular. **B** – Fotomicrografia da cartilagem articular normal de um adulto. (ZS) superficial, (ZI) zona intermediária, (ZP) zona profunda, (ZC) zona calcificada. Adaptado da referência [6].

## **Condrócitos**

Os condrocitos têm origem nas células estaminais mesenquimais (MSCs) e variam em forma, número e tamanho dependendo da sua localização. Representam 1 a 5% do volume da cartilagem articular e são nutridos por difusão através da matriz [4]. São células que se diferenciam durante a fase de desenvolvimento, mas que não se dividem em indivíduos adultos [7]. Apresentam-se de forma unitária ou agrupados, denominados grupos isógenos. Cada condrocito, além de sintetizar matriz cartilaginosa, colagénio, GAGs e proteoglicanos, tem a função de estabelecer um microambiente favorável para que o mesmo se mantenha fixo na própria matriz, impedindo assim qualquer migração para áreas vizinhas da cartilagem. São também considerados células com vidas longas e com baixo potencial para replicação, o que contribui para a capacidade limitada de cicatrização da cartilagem quando lesionada [7].

## **Matriz extracelular**

A MEC da cartilagem articular é altamente hidratada, com fluido tecidual à volta de 65 a 80% do peso total, proporcionando a difusão de pequenos metabolitos. O colagénio e os proteoglicanos correspondem ao resto do peso seco. Também são encontradas em menores quantidades outras classes de moléculas na MEC, como lípidos, fosfolípidos, glicoproteínas e proteínas não colagénicas [1,6].

## **Água**

De todos os componentes da cartilagem articular, a água é o que existe em maior quantidade, sendo responsável por até 80% do seu peso húmido [4]. Cerca de 30% dessa água está relacionada com o espaço intrafibrilar dentro do colagénio, apesar de que uma pequena percentagem estar inclusa no espaço intracelular. O fluxo de água entre a cartilagem e a superfície articular ajuda na lubrificação, bem como no transporte e distribuição de pequenos metabolitos e nutrientes aos condrocitos. Na cartilagem articular, quando a articulação está submetida a uma pressão, acontecem variações temporárias no teor de água durante o movimento da articulação. A capacidade de conseguir suportar pesos e a resposta a diferentes cargas de pressão estão relacionadas com o alto grau de hidratação, bem como com o movimento de água na matriz [4,6,13,14].

No decorrer da vida, a cartilagem passa por renovações internas constantes. Essas renovações dependem da capacidade dos condrócitos de detectar e responderem a modificações na sua composição. Além disso, a matriz age como transdutor de sinal para os condrócitos nela fixados. Conseqüentemente, são gerados sinais químicos, mecânicos e elétricos que auxiliam a direcionar a atividade de síntese dos condrócitos após aplicação de pressão sobre a cartilagem. Contudo, com o envelhecimento, há modificação na matriz e os condrócitos acabam por perder a capacidade de resposta a esses estímulos [6].

## Colagénio

O colagénio é a principal proteína estrutural na MEC, representando cerca de 60% do peso seco da cartilagem. A MEC é formada por 90 a 95% de colagénio tipo II que se apresenta em forma de fibrilas e fibras entrelaçadas com agregados de proteoglicanos [4,15,16]. Colagénios dos tipos I, IV, V, VI, IX e XI também aí podem ser encontrados em pequenas quantidades, auxiliando na formação e estabilização da rede de fibrilas de colagénio tipo II [1].

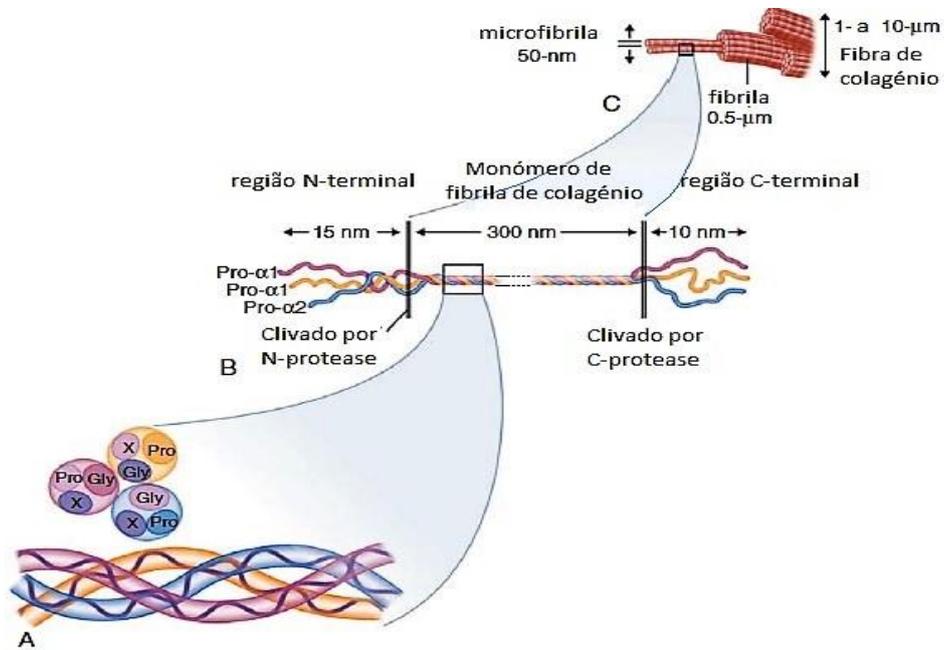
A molécula de colagénio tem cerca de 280 nm de comprimento por 1,5 nm de espessura, apresentando cabeça e cauda [6]. Um monómero simples de colagénio consiste em três cadeias polipeptídicas denominadas cadeias  $\alpha$ . Essas cadeias  $\alpha$  entrelaçam-se formando uma tripla hélice, alongada e dextrógira, interagindo por pontes de hidrogénio, interações intramoleculares de *van der Waals* e algumas ligações covalentes (**Figura 4**) [9,17].

O colagénio apresenta como característica distintiva um arranjo regular de aminoácidos em cada uma das três cadeias. A estrutura primária de cada cadeia é formada por sequências de aminoácidos que se repetem de glicina (Gly)-X-Y, sendo X e Y, muito frequentemente, a prolina (Pro) e a hidroxiprolina (Hyp). Assim, o aminoácido Gly corresponde a 1/3 do total de aminoácidos presentes [17,18].

A glicina possui apenas uma cadeia lateral de hidrogénio, assim facilitando a formação da tripla hélice de colagénio, uma vez que permite a proximidade entre cadeias e a sua ligação por pontes de hidrogénio [18]. O aminoácido hidroxilisina também é encontrado frequentemente no colagénio [6]. Pode-se, então, modificar a prolina e a lisina adicionando grupos hidroxilo, para formar a hidroxiprolina e hidroxilisina que estabilizam a tripla hélice pela formação de pontes de hidrogénio [1,17,18]. Estas hélices peptídicas agrupam-se formando fibras de colagénio que são estabilizadas por reticulação [17].

Há diferenças entre as cadeias  $\alpha$  que constituem a tripla hélice. Variam em relação ao tamanho (de 600 a 3000 aminoácidos), e com isso, podem ser formados vários tipos de

colagénio. Atualmente, foram reconhecidos pelo menos 42 tipos de cadeias  $\alpha$  codificadas por genes distintos e os seus *loci* mapeados em vários cromossomas diferentes. Presentemente, foram categorizados até 29 tipos diferentes de colagénio com base nas combinações das cadeias  $\alpha$  que eles apresentam [1,17].



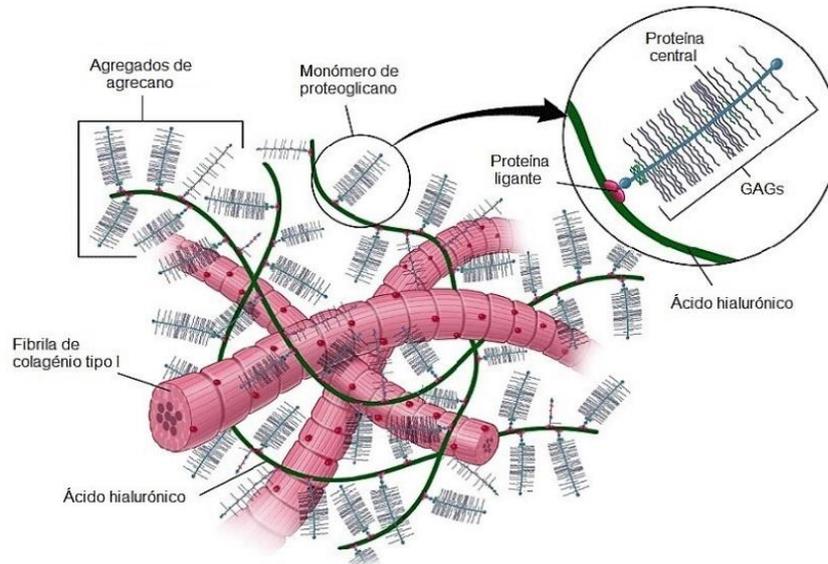
**Figura 4** - Estrutura do colagénio. (A) Apresenta 3 cadeias  $\alpha$  (nesse caso, pró-colagénio Pro- $\alpha$ 1, Pro- $\alpha$ 1 e Pro- $\alpha$ 2) contendo os aminoácidos glicina (Gly) e Prolina (Pro) para formar a conformação de tripla hélice. (B) Após sair da célula, as regiões C-terminal e N-terminal são removidas por proteases para formar o monómero de colagénio. (C) Os monómeros unem-se formando uma microfibrila, que, a seguir, é montada em fibrilas. As junções de várias fibrilas formam uma fibra de colagénio completa. Adaptado da referência [9].

## Proteoglicanos

Os proteoglicanos são o segundo maior grupo de macromoléculas constituintes da MEC, correspondendo a cerca de 10 a 15% do peso húmido. São formados por um núcleo de proteína com uma ou mais cadeias de GAGs lineares unidas por ligações covalentes (**Figura 5**). Essas cadeias de GAGs podem conter mais de 100 monossacáridos que se estendem a partir do núcleo proteico e que, devido a repulsão de carga, permanecem separados uns dos outros [9]. Os proteoglicanos promovem a turgidez da cartilagem e, no caso da cartilagem articular, conferem resistência a forças de compressão [19]. A cartilagem articular possui diferentes proteoglicanos que são indispensáveis para o funcionamento normal, entre eles, agrecano, decorina, biglicano e fibromodulina, sendo o agrecano o mais abundante [1].

O agrecano é um proteoglicano de elevado peso molecular (>200.000 kD) com núcleo proteico de cerca de 2000 aminoácidos, os quais estão ligados a 100 cadeias de sulfato de condroitina, 30 cadeias de sulfato de queratano e 50 cadeias de oligossacáridos [7,9]. O

agrecano é conhecido pela sua interação não covalente com o HA, o qual forma agregados de proteoglicanos via proteínas de ligação [1,6]. A estrutura desses agregados é influenciada pelo comprimento do HA, a proporção da proteína de ligação e o grau de processamento do agrecano [19]. A resistência à compressão da cartilagem articular está relacionada com as características destes agregados.



**Figura 5** - Estrutura do proteoglicano. À direita, um monômero de proteoglicano e sua ligação à molécula de ácido hialurônico. À esquerda, agregados lineares de agrecano e ácido hialurônico entrelaçados entre as fibrilas de colagênio. Adaptado da referência [6].

### 1.3.2 Cartilagem Elástica

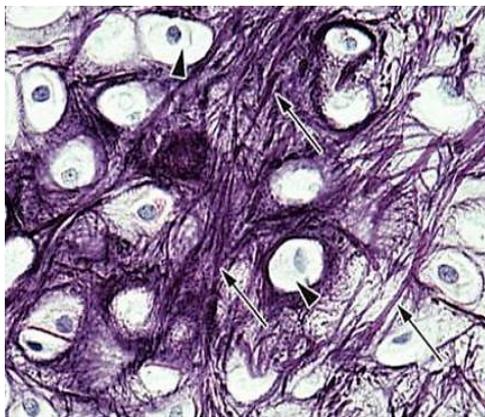
A cartilagem elástica é caracterizada pela presença de condroblastos, condrócitos, fibrilas de colagênio tipo II, fibras elásticas, lamelas elásticas e pela existência de elastina na sua matriz cartilaginosa (**Figura 6**). Costuma ser encontrada na orelha externa, nas paredes do meato acústico externo, na trompa de Eustáquio e epiglote da laringe. Nesses locais, a cartilagem é nutrida pelo pericôndrio que cresce por aposição e apresenta a vantagem de não se calcificar durante o processo de envelhecimento, sendo menos sujeita à degeneração [6,12,20].

As fibras elásticas são as maiores estruturas da MEC do tecido conjuntivo e apresentam as funções de elasticidade, resistência e flexibilidade em todos os tecidos elásticos [21–25]. Geralmente, são mais finas que as fibras colagênicas e formam uma rede tridimensional. Encontram-se entrelaçadas com as fibrilas de colagênio, limitando a distensibilidade do tecido e evitando o rompimento por estiramento em demasia. A estrutura da matriz elástica varia de acordo com os tecidos, sendo a sua função uma consequência da arquitetura, organização e composição [20]. As fibras elásticas consistem em dois componentes morfolologicamente

distintos: um núcleo central de elastina e uma rede circundante de microfibrilas de fibrilina [20,22,25–27].

A elastina é uma proteína insolúvel, pertencente ao grupo de proteínas mais hidrofóbicas conhecidas. É considerada o principal componente das fibras elásticas [20,22] e tem como precursor a tropoelastina [25]. Nos mamíferos, as fibras elásticas começam a formar-se durante o período fetal tardio e durante o desenvolvimento pós-natal, sem formação de novas fibras elásticas na fase adulta [28]. As fibras elásticas são consideradas estruturas celulares não renováveis mas, no caso de ocorrer uma lesão, inicia-se novamente o processo de produção da tropoelastina, sendo esta influenciada por fatores exógenos como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento transformador (TGF) e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) [23].

As microfibrilas de fibrilina são um componente importante das fibras elásticas uma vez que conferem extensibilidade e contribuem para a deformação elástica dos tecidos. Possuem de 10 a 12 nm de diâmetro e encontram-se adjacentes às células produtoras de elastina, paralelas ao longo do eixo da fibra em desenvolvimento de elastina [20]. São encontradas em tecidos elásticos como aorta, pulmões e também na pele [26,29,30]. São também imprescindíveis na homeostase dos tecidos por interagirem com o TGF, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e com recetores da superfície celular como integrinas e sindecanos [26,31].



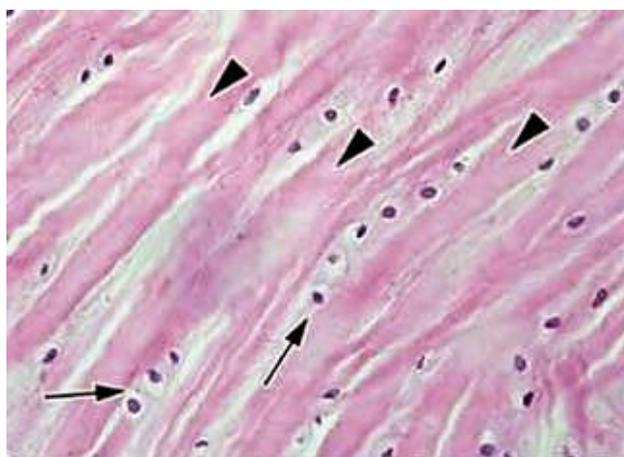
**Figura 6** - Estrutura geral da cartilagem elástica. (seta) fibras elásticas, (ponta de seta) condrócitos. Corado com Weigert. Referência [3].

### 1.3.3 Fibrocartilagem

A fibrocartilagem é um tecido avascular e aneural, sendo uma associação entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem articular. Está associada a resistência à compressão e tensões de corte. É encontrada, principalmente, nos discos intervertebrais, discos articulares

das articulações esternoclavicular e temporomandibular, sínfise púbica, meniscos, complexo triangular do punho e locais em que os tendões se inserem nos ossos [5,6]. É composta por condrócitos, fibroblastos, grandes quantidades de colagénio tipo I, mas também apresenta colagénio tipo II, além de proteoglicanos como agregcano e versicano em menor quantidade [32].

Os condrócitos estão espalhados entre as fibras de colagénio, em fileiras alongadas ou grupos isógenos e são muito semelhantes aos encontrados na cartilagem articular, mas com menor quantidade de matriz circundante (**Figura 7**) [5,6]. Assim como na cartilagem articular, a fibrocartilagem também sintetiza várias moléculas da MEC, não somente durante o desenvolvimento do tecido, mas no seu estado diferenciado. Entre essas moléculas estão o colagénio, proteoglicanos, proteínas e glicoproteínas não colagénicas que, como um todo, influenciam as propriedades físicas da MEC e constituem um reservatório de armazenamento de fatores de crescimento [32].



**Figura 7** - Fibrocartilagem corada com H&E, contendo fibras de colagénio (pontas das setas) e condrócitos enfileirados (setas). Referência [3].

O colagénio da fibrocartilagem pode ser classificado como fibrilar e não fibrilar. Os fibrilares incluem os tipos I, II, III, V, e XI e estão associados a 10 cadeias polipeptídicas. Os não fibrilares possuem vários subtipos, incluindo os colagénios associados a fibrilas com tripla hélice interrompida (FACIT), que ficam na superfície das fibrilas e os colagénios tipo IX, XII, XIV, XVI e XIX [32]. Devido à grande quantidade dessas fibras, tanto tipo I quanto tipo II, a MEC apresenta-se acidófila e esta é caracterizada pela ausência de pericôndrio, sendo nutrida pelo líquido sinovial [12]. As quantidades de colagénio podem variar de acordo com a localização da fibrocartilagem, o estágio de diferenciação tecidual, bem como a idade do indivíduo [32]. Um exemplo dessa variação ocorre nos idosos, onde é predominante a presença de colagénio do tipo II devido a atividade metabólica dos condrócitos que estão sempre a produzir e a libertar fibrilas de colagénio tipo II na matriz adjacente [6].

A MEC da fibrocartilagem é constituída também por agrecano e versicano [6]. O agrecano, como na cartilagem articular, está relacionado com a retenção de água na MEC durante a compressão. Mas, por possuir propriedades semelhantes a um gel, este pode permitir a imobilização de proteínas na MEC ou restringir as suas ações, bloqueando assim a sua atividade através de impedimento estérico, proteção de enzimas que degradam a matriz ou servir como reservatório para libertação prolongada. O versicano é secretado pelos fibroblastos e, tal como o agrecano, liga-se ao HA para formar agregados altamente hidratados, contribuindo assim, para o aumento da pressão por absorção de água. O versicano pode também estimular a proliferação celular, promover ou inibir a adesão celular e influenciar a forma da célula, melhorando a síntese da matriz pericelular [32].

#### 1.4 Mecanismos de lesões na cartilagem articular

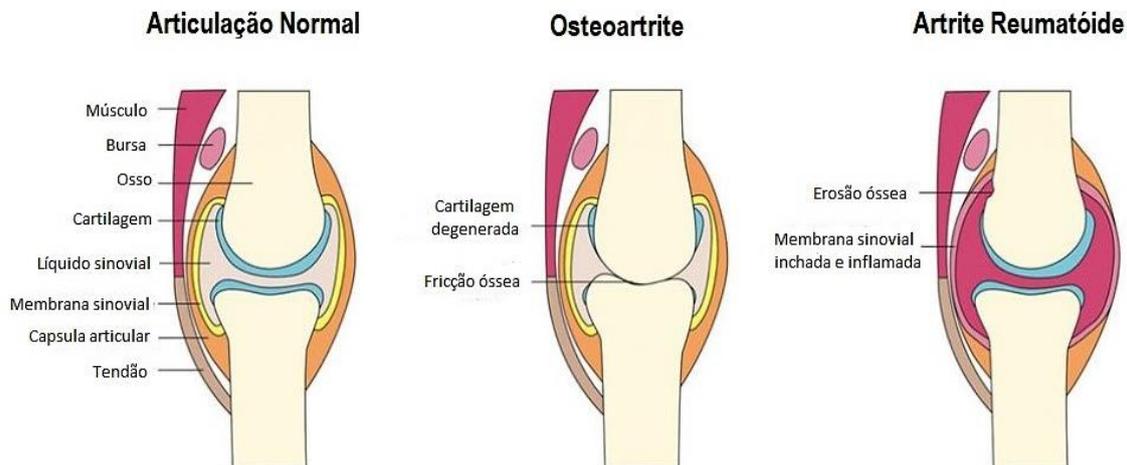
As lesões da cartilagem articular são consequências das forças aplicadas ao tecido. Elas diferem na extensão, tipo de dano tecidual e na resposta do tecido à lesão [33]. Para compreender os mecanismos das lesões é necessário avaliar como o tipo de força e a sua intensidade afetam a cartilagem articular [34,35]. Sabe-se que a MEC da cartilagem articular é formada em grande parte por água, além de colagénio e agrecano. O colagénio é responsável por conferir resistência à tração, enquanto que o agrecano dá ao tecido resistência à compressão, resistência e durabilidade [10,36]. A aplicação de forças na superfície da articulação induz o movimento do fluido na cartilagem articular e essa, por sua vez, amortece e dissemina as cargas pela cartilagem e osso subcondral. Se a força for aplicada de modo lento, o movimento do fluido possibilita a deformação da cartilagem e uma diminuição da força aplicada na estrutura da matriz. Se, pelo contrário, a força for aplicada bruscamente, como um choque inesperado ou uma torção, a estrutura da matriz suporta a maior parte da força. Caso a força aplicada seja muito intensa, há o rompimento da estrutura da matriz, ocasionando danos celulares e no osso subcondral [37].

Pode ocorrer uma lesão aguda no interior da cartilagem e na região subcondral da cartilagem calcificada sem que a superfície seja atingida [38]. Não se sabe, ainda, qual a intensidade e o tipo de força necessários para causar o dano condral e subcondral sem o rompimento aparente do tecido [37]. Mas, podem ocorrer alterações na matriz cartilaginosa e lesões nos condrócitos caso haja uma carga de impacto maior do que as cargas habituais. De facto, foi demonstrado que antes do início de lesão articular por força de impacto, há uma redução dos proteoglicanos e mudanças na sua organização. Essa diminuição de proteoglicanos

pode estar relacionada com a diminuição da síntese ou com o aumento da degradação das moléculas. A carência considerável de proteoglicanos da matriz faz com que haja uma diminuição na rigidez da cartilagem e um aumento da sua permeabilidade. Isto pode ocasionar uma carga maior na estrutura restante, ampliando a vulnerabilidade tecidual para novos danos. Essas lesões são responsáveis também por outras anormalidades na matriz, tais como: deformações da rede fibrilar de colagénio, inchaço da matriz e lesão nos condrócitos [33,38].

### 1.5 Principais doenças degenerativas da cartilagem articular

A cartilagem articular é uma estrutura avascular que, quando lesionada, se torna muito difícil de regenerar. Isso acontece porque essa lesão é seguida de necrose e não por um processo inflamatório como ocorre nos tecidos vascularizados [39]. O baixo potencial de auto-reparação da cartilagem articular está relacionado, portanto, com a falta de vasos sanguíneos e a ausência de replicação dos condrócitos. Assim sendo, o dano na cartilagem e os processos catabólicos são considerados irreversíveis [40]. A cartilagem articular, então, pode passar por várias modificações, o que pode levar à diminuição do teor celular e, posteriormente, à degradação da MEC e a doenças degenerativas (**Figura 8**) [40–43].



**Figura 8** - Comparação entre uma articulação normal e duas articulações com doenças degenerativas da cartilagem articular: osteoartrite e artrite reumatóide.

#### 1.5.1 Osteoartrite

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa da cartilagem articular associada principalmente ao envelhecimento [44,45], mas também à obesidade [46], traumas, inflamações, predisposição genética [47], género, densidade óssea e ao stress contínuo nas

articulações dos joelhos, quadril, ombros, mãos, pés e coluna [48]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que, mundialmente, 10% dos homens e 18% das mulheres acima dos 60 anos apresentem sintomas da doença, sendo que 80% dessas pessoas possuem limitação nos movimentos e 25% não consegue realizar tarefas do cotidiano [49]. De acordo com um estudo desenvolvido para doenças reumáticas em Portugal, entre 2011 e 2013, constatou-se que 24% da população apresenta OA, dentre essas, 12,4% corresponde a OA do joelho, 8,7% a OA da anca e 2,9% a OA da mão [50]. Conforme a Organização das Nações Unidas (ONU), até 2050, mais de 20% da população mundial será formada por pessoas com idade acima de 60 anos. Estimou-se, dentro dessa percentagem, que 15% terão OA sintomática e um terço dessas pessoas serão muito incapacitadas. Portanto, até 2050, 130 milhões de pessoas ao redor do mundo terão OA, das quais 40 milhões serão severamente incapacitadas pela doença [51].

As principais características da OA são a degradação da cartilagem articular, remodelação do osso subcondral, formação de osteófitos e diferentes graus de inflamação sinovial [2,40,48]. Estas características são derivadas do estímulo das cascatas de citocinas e produção de mediadores inflamatórios devido ao desequilíbrio metabólico e ao aparecimento de moléculas sinalizadoras de degradação na cartilagem [44,45,52]. Pacientes com OA apresentam condrócitos e células sinoviais que produzem elevados níveis de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . Por esta razão, há um decréscimo na produção de colagénio e agrecano [53] e um aumento de mediadores catabólicos como metaloproteinases da matriz (MMPs) e outras substâncias inflamatórias como interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (NO) [54]. Este último é responsável pela promoção da apoptose nos condrócitos, pelos processos catabólicos e, conseqüentemente, pela degeneração da MEC. Portanto, o envelhecimento prematuro e a apoptose são condições para detetar os condrócitos osteoartríticos [54,55].

Por ser um tecido avascular, as primeiras fases da doença são assintomáticas, fazendo com que o diagnóstico precoce seja dificultado. Por isso, é comum que os pacientes sejam diagnosticados com a doença quando esta se encontra já em fase mais avançada apresentando danos articulares extensos e irreparáveis. Os principais sintomas para diagnosticar a OA são: a dor intermitente nas articulações, inflamação, rigidez, crepitação, inchaço, perda de movimento e função. Muitas vezes, os sintomas estão associados a depressão e a distúrbios do sono que contribuem para a incapacidade e a diminuição da qualidade de vida do paciente [55,56]. O diagnóstico é feito por meio de exame físico, radiografia, ultrassons, ressonância magnética, tomografia computadorizada e artroscopia. No entanto, esses métodos possuem baixa sensibilidade e especificidade [55,56]. Atualmente, há um esforço na pesquisa de biomarcadores

(no sangue e na urina) para facilitar o diagnóstico precoce e tratamento da OA [57]. Apesar de terem sido identificadas algumas variantes genéticas, como o *loci* 7q22, que contém múltiplos genes potenciais (gene do fator de diferenciação de crescimento 5 (GDF5) e o gene da proteína frisada (FRZB)), os resultados não foram satisfatórios [58].

O tratamento para OA deve, então, focar-se em reduzir a dor, a rigidez e melhorar as capacidades funcionais, prevenindo também o progresso do dano articular e melhorando a qualidade de vida do paciente. Hoje em dia, o tratamento da OA consiste em três tipos: não farmacológico, farmacológico e cirúrgico. O tratamento não-farmacológico abrange a prática de exercícios físicos de baixo impacto como a caminhada, ciclismo ou natação para aumentar a força dos músculos e facilitar a perda de peso para pacientes obesos; fisioterapia para diminuir os sintomas e melhorar a amplitude dos movimentos, além de fortalecer e alongar a musculatura; uso de joelheiras e órteses para aliviar a dor e melhorar a função no caso da OA do joelho, bem como o uso de bengalas e andadores. O tratamento farmacológico consiste no uso de analgésicos, anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e opióides para o alívio da dor; injeção de esteróides por via intra-articular quando os pacientes apresentam uma dor intensa com inflamação local; injeção de HA para substituição do líquido sinovial de baixa viscoelasticidade. Já o tratamento cirúrgico, como a osteotomia, fusão articular ou a substituição da articulação, é indicado quando há dor debilitante, uma limitação maior dos movimentos e quando os tratamentos anteriores falham [2,55,56]. É importante salientar que o melhor tratamento para a OA, atualmente, é a associação do tratamento farmacológico com o não-farmacológico, com ênfase no incentivo para a adesão do tratamento não-farmacológico.

### 1.5.2 Artrite Reumatóide

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença autoimune inflamatória associada a incapacidade progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e custos socioeconômicos [59]. Ocorre em todas as idades e atinge, principalmente, a cartilagem articular, mas também os tecidos conjuntivos, músculos, tendões e tecido fibroso. A sua etiologia não está bem definida, mas está associada a fatores genéticos, ambientais, hormonais e ao estilo de vida [60,61]. De acordo com a OMS, a prevalência varia entre 0,3 e 1% da população mundial, sendo mais comum em mulheres e em países desenvolvidos [49]. Em Portugal, entre 2011 e 2013, verificou-se que 1% da população apresentou AR, sendo o sexo feminino o mais afetado numa proporção de 4:1 [50,62]. Devido à elevada incidência da AR no sexo feminino, várias teorias têm sido colocadas numa tentativa de explicar a relação do estrogénio e a patogenia. Grande

parte dessas teorias estão relacionadas com o papel do estrogênio no aumento da resposta imune. Alguns estudos demonstraram que o estrogênio pode ativar a produção do TNF- $\alpha$ , que é uma citocina importante na cascata inflamatória da AR [61].

A AR é prevalente nas articulações das mãos, pés, punhos, cotovelos, joelhos e tornozelos, sendo geralmente simétrica [63]. É caracterizada pela inflamação sinovial, hiperplasia (inchaço), produção de autoanticorpos, destruição da cartilagem e do osso, além de características sistêmicas incluindo pericardite, envolvimento pulmonar, neuropatia periférica, vasculite, anormalidades hematológicas, distúrbios psicológicos e esqueléticos [59,61], apresentando um risco de mortalidade de 60 a 70%. Distúrbios psicológicos, como a depressão, são comuns nos pacientes por causa dos *deficits* musculoesqueléticos, da perda de qualidade de vida, bem como da impossibilidade de trabalhar [63]. Assim sendo, portadores de AR carregam um fardo elevado tanto a nível pessoal quanto profissional, social e financeiro [64,65]. Estima-se que 20 a 70% das pessoas que trabalham no início da doença ficarão incapacitadas após 7 a 10 anos [63]. Isto contribui para o quadro de depressão devido às dificuldades económicas associadas aos custos médicos diretos, à impossibilidade de realizar as suas funções laborais e o sentido de participação na sociedade [62].

Os principais sintomas da AR são: hiperplasia, dor, febre, cansaço, fraqueza, fadiga, rigidez e aumento da temperatura nas articulações. O inchaço das articulações na AR está associado à inflamação da membrana sinovial devido à ativação imune, sendo caracterizada pela infiltração de leucócitos no espaço sinovial [59,61]. A destruição da cartilagem articular ocorre devido uma resposta tecidual forte quando os fibroblastos sinoviais apresentam uma forma invasiva, conjuntamente com o aumento do catabolismo dos condrócitos e da osteoclastogénese sinovial. Da mesma forma que na osteoartrite, há também na AR uma cascata de citocinas e quimiocinas (TNF, IL-6 e o fator estimulante de colónias de monócitos-granulócitos) no meio inflamatório do espaço sinovial, que induzem ou intensificam a resposta inflamatória, fazendo com que haja ativação de células endoteliais e atração de células imunológicas que se acumulam no espaço sinovial. A cartilagem é, então, danificada por efeitos catabólicos dos condrócitos em resultado da estimulação pelas citocinas e a sua matriz é degradada por MMPs e outras enzimas, o que pode levar a erosões ósseas [59,61,64].

O diagnóstico inicial para a AR é clínico com a verificação dos sintomas apresentados pelo paciente como a dor, inchaço de, no mínimo, três articulações em padrão simétrico e rigidez matinal superior a 30 minutos [62,66]. Não há um teste específico para diagnosticar a AR, mas pode ser realizado raio-X para observação das articulações ou erosões ósseas, além de ressonância magnética e ultrassons. Os exames laboratoriais iniciais devem conter uma

contagem completa de células sanguíneas, além de anticorpos séricos para peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCPs) incluídos com fator reumatóide e taxa de sedimentação das hemácias ou proteína C reativa. Como fator de exclusão de artrite infecciosa ou induzida por cristais, pode ser necessário a aspiração articular, sendo também essencial a realização de testes de função renal e hepática para a escolha do tratamento medicamentoso [60,61].

O tratamento para o paciente de AR é baseado na educação do paciente, terapia física e ocupacional, tratamento não-farmacológico, farmacológico e cirúrgico [60]. O paciente inicialmente é instruído em relação à doença, às mudanças no estilo de vida, bem como à prática de exercício físico e ao repouso que será necessário para a sua recuperação. É importante também a realização de fisioterapia para tentar manter a função articular e desacelerar a incapacidade, além de tratamento psicológico devido ao elevado índice de depressão nestes pacientes [62]. O tratamento farmacológico é feito com 3 classes terapêuticas: AINEs e glicocorticóides orais ou intra-articulares de dose baixa; drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs); e modificadores de resposta biológica (DMARDs biológicos) [60,61]. Os AINEs diminuem a dor, a rigidez e o inchaço nas articulações, melhorando a função física. Os glicocorticóides aliviam a dor e a inflamação das articulações e, quando usados precocemente, podem reduzir as erosões ósseas. No entanto, é desaconselhado o seu uso prolongado devido aos elevados efeitos colaterais apresentados. Os DMARDs convencionais contribuem para o controle da inflamação e promovem a redução do progresso do dano estrutural. Os DMARDs biológicos são fármacos mais recentes e atingem especificamente a cascata de citocinas, prevenindo a lesão da cartilagem e são usados quando os DMARDs convencionais são insuficientes [66]. Procedimentos cirúrgicos como a artroplastia, artrodese ou até mesmo implantes de silícones são indicados quando o tratamento farmacológico falha. Esses procedimentos são indicados no alívio da dor e para a incapacidade na AR, tendo vários graus de sucesso a longo prazo [61]. É essencial, portanto, um diagnóstico precoce e um tratamento inicial agressivo para controlar a inflamação, visando assim a melhoria das capacidades funcionais, diminuindo a co-morbilidade e aumentando a esperança média de vida [62].

## 1.6 Terapias atuais para a reparação da cartilagem articular

Sabe-se que a cartilagem articular apresenta uma baixa capacidade de reparação espontânea devido à falta de vascularização, nervos, tecido linfático, bem como à ausência de células progenitoras [67]. Com a constatação dessa limitação e com o entendimento dos mecanismos de lesão da cartilagem, houve um grande interesse na busca por métodos de

reparação e regeneração da cartilagem articular [10]. Apesar da extensa investigação realizada nos últimos trinta anos ter já conduzido a algumas técnicas que facilitam a formação de cartilagem em certas aplicações, ainda não foram alcançados progressos significativos nesta área [68]. Entre essas técnicas temos: a penetração do osso subcondral, enxertos periosteal e pericondrial, transplante osteocondral autólogo, transplante osteocondral alogénico, transplante autólogo de condrócitos e de células mesenquimais estaminais, bem como o uso de matrizes e fatores de crescimento/moléculas sinalizadoras [34,36,37,69–71].

#### 1.6.1 Penetração do osso subcondral

Alguns estudos demonstraram que as técnicas de penetração do osso subcondral promovem a formação de fibrocartilagem nas superfícies articulares das articulações sinoviais [72–74]. De facto, está reportado na literatura que a penetração do osso subcondral pode estimular o desenvolvimento de uma nova superfície de cartilagem [68]. Entre os métodos possíveis de serem usados estão: abrasão superficial da articulação, perfuração artroscópica e microfratura (**Figura 9**) [73,75–80]. O objetivo destas técnicas é a exposição do tecido cartilaginoso lesionado ao espaço subcondral e sua posterior estimulação. Estas intervenções levam a uma resposta espontânea de reparação, sendo baseada num sangramento induzido cirurgicamente nos espaços subcondrais-ósseos, seguido de formação de coágulos de fibrina que preenchem o defeito no osso e cobrem a superfície exposta [68]. Há, depois, migração de células mesenquimais indiferenciadas para o coágulo, que se dividem e diferenciam em condrócitos, regenerando assim a cartilagem [37,81].

A artroplastia Pridie por abrasão é feita com uma broca automatizada que atinge os vasos e é utilizada conjuntamente com o debridamento [82]. Esta técnica é paliativa, não curativa [71]. A perfuração induz o sangramento pela perfuração do osso subcondral [83,84]. A microfratura implica o debridamento do tecido lesionado até ao osso subcondral que, por meio de pequenos furos, é induzido ao sangramento [85]. A principal vantagem da microfratura é que ela pode ser realizada com um procedimento artroscópico minimamente invasivo [71]. Em grande parte dos casos, entre seis a oito semanas, há a formação de osso na área do dano ósseo e fibrocartilagem na área condral [34,86].

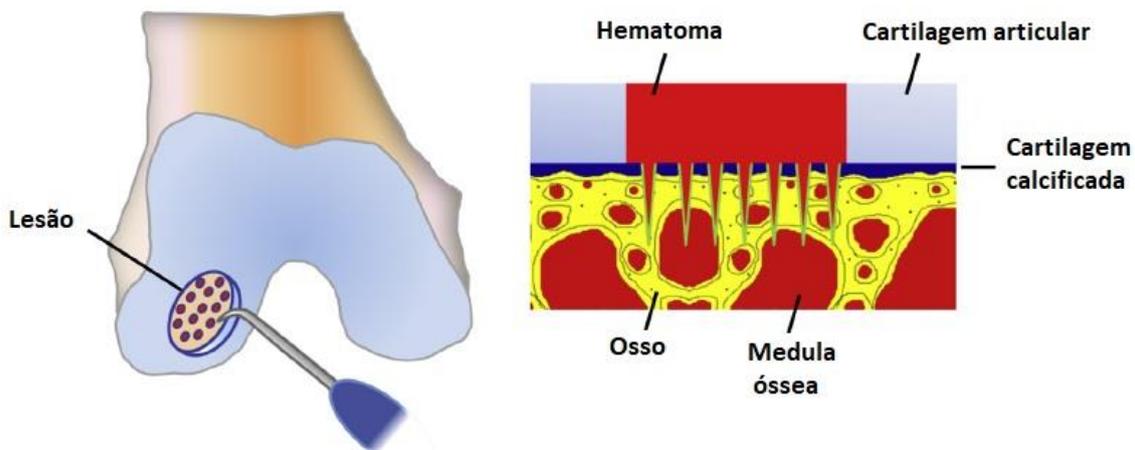


Figura 9 - Representação da técnica de microfratura. Adaptado da referência [68].

### 1.6.2 Enxertos periosteal e pericondrial

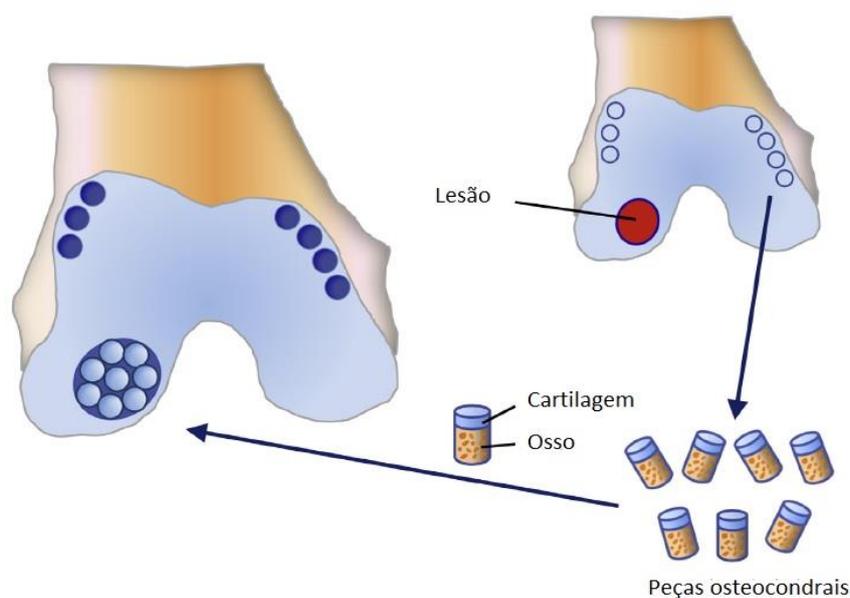
O transplante de enxertos periosteais e pericondriais para o tratamento de defeitos da cartilagem articular tem sido avaliado em ensaios clínicos com humanos e em modelos animais [37,70,76]. Alguns estudos mostraram, efetivamente, a formação de tecido semelhante à cartilagem após estas intervenções [71,87], sendo o periósteo o mais utilizado para o transplante, uma vez que é mais fácil a sua obtenção e disponibilidade.

O princípio desta técnica é baseado na observação da atividade condrogénica contínua e vitalícia da camada germinativa do tecido pericondrial ou periosteal que contêm células estaminais. Supõe-se, então, que a colocação de um enxerto deste tipo na base do defeito faz com que as atividades de proliferação e diferenciação tecidual sejam retomadas, o que resulta na formação de uma cartilagem reparada dentro do tecido lesionado [70].

### 1.6.3 Transplante osteocondral autólogo

O Transplante osteocondral ou "mosaicoplastia" tem sido muito utilizado para o tratamento do defeito osteocondral [88]. Neste tipo de transplante são usados enxertos autólogos para o tratamento de pequenos defeitos [71]. Nesta técnica, são removidas peças osteocondrais cilíndricas de locais da cartilagem articular onde não há suporte de peso que são depois transferidas para os defeitos debridados (**Figura 10**) [68,71,79,88]. Esse procedimento pode ser aberto ou artroscópico, com a vantagem de não ser dependente da proliferação de condrócitos ou diferenciação de células estaminais mesenquimais para restauração da cartilagem articular. Além disso, apresenta um baixo custo, pode ser realizado numa única

intervenção e não causa reações imunológicas [68]. Apesar das vantagens, esta técnica apresenta inconveniências, como por exemplo a lesão causada nos locais de origem do tecido a transplantar [68]. Os métodos de perfuração utilizados na remoção do tecido osteocondral podem também diminuir a viabilidade dos condrócitos [79,89]. Além disso, o tecido transplantado estará sujeito a novas situações de carga mecânica, o que pode gerar complicações. Portanto, apesar da mosaicoplastia ainda ser usada, não há ainda uma comprovação científica sólida para o benefício a longo prazo dos pacientes submetidos a essa técnica [90–92].



**Figura 10** - Representação esquemática da técnica de mosaicoplastia. Adaptado da referência [68].

#### 1.6.4 Transplante osteocondral alogénico

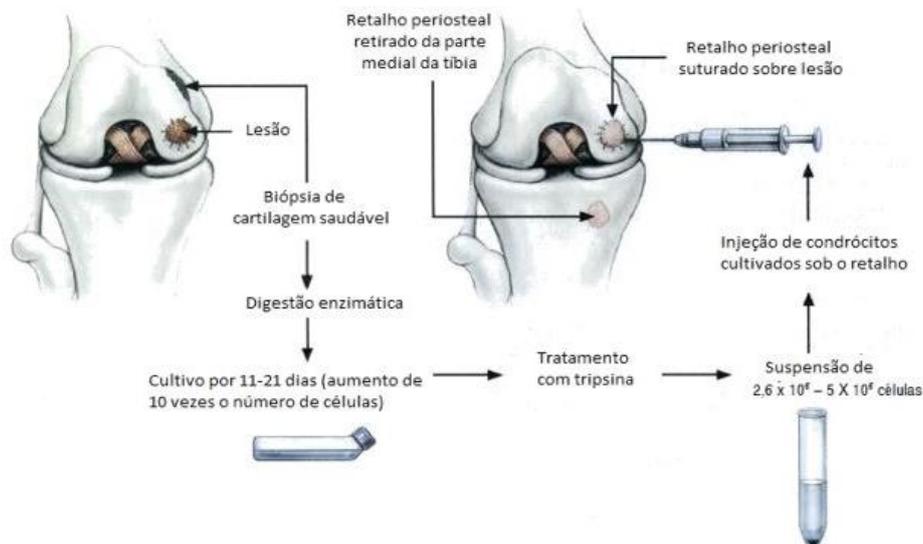
A substituição do tecido lesionado pode ser feita usando aloenxertos osteocondrais cadavéricos [68,70]. Esta técnica pode apresentar resultados benéficos em pacientes portadores de grandes defeitos osteocondrais como a osteonecrose, OA generalizada, e osteocondrite dissecante, mas apresenta a inconveniência de induzir problemas imunológicos [93,94]. Ensaios clínicos feitos com esta técnica demonstraram que as reações imunológicas são aparentemente mais leves em humanos do que em animais [68], tendo o sucesso clínico sido de 65 a 85%, mesmo após 10 anos de monitorização dos pacientes. Apesar deste nível de sucesso, há ainda desvantagens associadas ao uso desta metodologia na prática clínica devido à escassez de material doador, ao armazenamento de tecido congelado e à possibilidade da transmissão de doenças [70].

### 1.6.5 Transplante autólogo de condrócitos e de células mesenquimais estaminais

O transplante de condrócitos e células mesenquimais estaminais expandidos em cultura faz parte de uma estratégia para a reparação da cartilagem articular pela introdução de uma nova população celular em defeitos condrais e osteocondrais [34,95].

O transplante autólogo de condrócitos ocorre em duas etapas. Na primeira etapa é realizada uma biópsia da cartilagem, obtendo-se 3 ou 4 fragmentos de cartilagem. É realizada também uma colheita sanguínea venosa para a obtenção de soro para posterior proliferação celular. A seguir, em laboratório, é feita a digestão enzimática com enzimas proteolíticas para degradar os componentes da matriz extracelular, com o objetivo de isolar condrócitos viáveis a partir dos fragmentos obtidos pela biópsia. Posteriormente, é feita a cultura e proliferação celular desses condrócitos *in vitro*. Durante a proliferação celular é usado o soro retirado anteriormente do paciente, uma vez que o soro é uma fonte de hormonas e fatores de crescimento essenciais para as células em cultura. Na segunda etapa é feita a aplicação do concentrado de condrócitos dentro do defeito (**Figura 11**) [69,79,96,97].

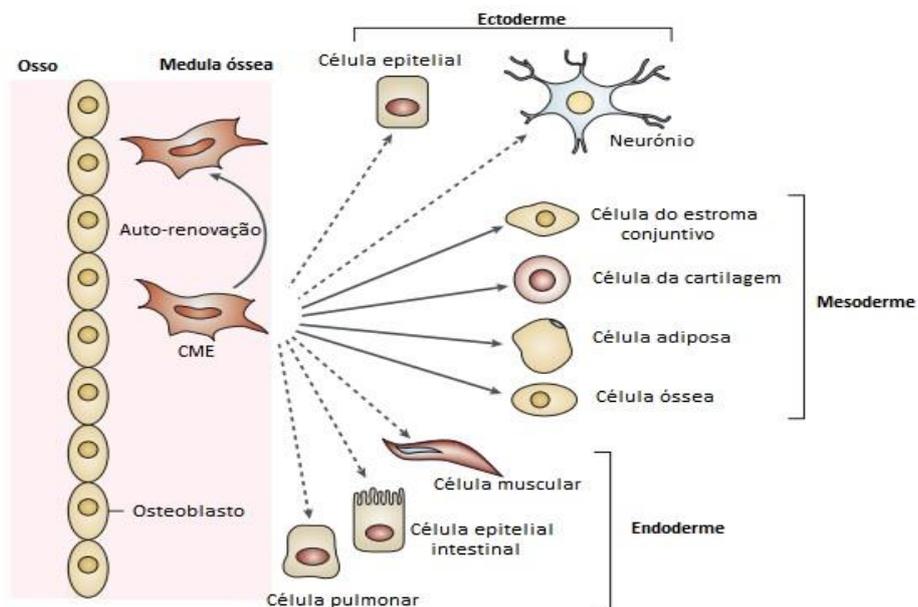
Em 1994, foi realizado o primeiro estudo clínico com esta técnica para o tratamento de lesões condrais extensas e os resultados obtidos foram satisfatórios. Desde então, este tipo de procedimento tem sido usado por todo o mundo [96]. Uma variante desta técnica consiste no denominado “transplante autólogo de condrócitos induzidos por matriz” [98] em que os condrócitos autólogos, ao invés de serem suspensos num fluido, são colocados numa matriz (ex: de colagénio ou de ácido hialurónico) [68]. Embora a taxa de sucesso seja elevada, há também desvantagens relacionadas com esta técnica, nomeadamente a necessidade de intervenção cirúrgica em duas ocasiões diferentes [67,68] e o risco aumentado de desenvolver OA [99,100].



**Figura 11** - Representação esquemática da técnica de transplante autólogo de condrócitos. Adaptação da referência [97].

Devido ao seu potencial condrogénico, bem como à sua capacidade de autorrenovação e acessibilidade [101], as MSCs também têm sido estudadas para uso no tratamento das lesões da cartilagem articular [102]. As MSCs são células multipotentes (**Figura 12**) que podem ser usadas como uma alternativa para a terapia da reparação da cartilagem uma vez que podem ser recolhidas e expandidas em cultura, por exemplo a partir da medula óssea, sem causar morte no sítio doador [86].

Embora as MSCs possam ser derivadas de vários tipos de tecidos (medula óssea, tecido adiposo, líquido ou membrana sinoviais), nem todas essas fontes têm o mesmo potencial de se diferenciarem na linhagem condrocítica. Em geral, o mecanismo específico de diferenciação destas células para a formação dos tecidos cartilagosos hialino, elástico e fibroso ainda não está completamente estabelecido [68,103].



**Figura 12** - Capacidade de diferenciação das MSCs. A figura demonstra a capacidade de auto-renovação (seta curva) e de diferenciação na linhagem mesodérmica (setas retas) das MSCs. A capacidade para transdiferenciação em células de outras linhagens (ectoderme e endoderme) é demonstrada pelas setas tracejadas. Adaptado da referência [103].

Foram feitos estudos *in vitro* e *in vivo* com as MSCs para avaliar as propriedades bioquímicas, histológicas e mecânicas da cartilagem articular [86,104]. Noutro estudo, um grande defeito de espessura da cartilagem articular foi tratado após a incorporação das MSCs num gel de colagénio que foi, posteriormente, transferido para a lesão e recoberto com um retalho periosteal autólogo [105]. Todavia, apesar do resultado positivo obtido, as biópsias revelaram a formação de fibrocartilagem. Como nenhum agente exógeno foi aplicado para induzir a diferenciação celular, foi concluído que para formar a cartilagem de hialina, por meio das MSCs, é necessário a presença de fatores de estimulação apropriados para induzir o processo de diferenciação [106,107].

### 1.6.6 Matrizes ou *scaffolds*

Nos tratamentos dos defeitos condrais que usem células e/ou fatores de crescimento, é geralmente necessária uma matriz artificial. As matrizes artificiais servem de suporte para a adesão celular (controlando também o comportamento celular) e como local para a imobilização de biomoléculas [37].

Desde a década de 60 que as matrizes têm sido utilizadas para o transporte de células na tentativa de reparação da cartilagem [108]. É necessário que esses materiais apresentem características específicas em termos de biocompatibilidade, propriedades mecânicas, arquitetura, porosidade, etc. Até à data, têm sido testados diversos tipos de matrizes, quer *in vitro*, quer *in vivo* para a reparação da cartilagem articular [79]. Essas matrizes podem ser classificadas de acordo com a sua natureza química (**Tabela 1**).

**Tabela 1** - Classificação química das matrizes. Adaptado da referência [68].

Polímeros baseados em proteínas	Polímeros baseados em carboidratos	Polímeros sintéticos	Combinação entre polímeros
Colagénio	Ácido polilático	PET (politereftalato de etileno)	Reticulação
Fibrina	Ácido poliglicólico	Teflon (politetrafluoroetileno)	Modulação química
Gelatina	Ácido hialurónico	Fibras de carbono	Modificação geométrica
	Agarose	Poliuretano	Combinação de matrizes
	Alginato	Ácido polibutírico	
		Polietilmetacrilato	

Uma matriz deve permitir a migração celular pelos seus interstícios, ser capaz de promover a adesão das células (podendo esta ser melhorada pelo acoplamento de péptidos específicos que promovem a adesão celular, como o péptido Arg-Gly-Asp (complexo arginina-glicina-asparagina), ser biocompatível e não induzir reações imunológicas adversas. Normalmente, a matriz também necessita de ser biodegradável, sendo capaz de ser substituída por componentes extracelulares fisiológicos. No tratamento da cartilagem articular, também podem ser usadas matrizes “vazias” que serão colonizadas pelas células do paciente.

Apesar de já haver uso clínico de alguns destes materiais [109], grande parte estão ainda a ser testados em ensaios pré-clínicos [110]. Além disso, materiais usados para reparar a

cartilagem, como o colagénio [111], a fibrina [112], o ácido hialurónico [113] e o polilactato [114] estão a ser otimizados na tentativa de os produzir em formato de nanofibras [115], para melhorar a sua porosidade [116], ou para os fabricar de forma a serem injetados [117]. As matrizes à base de materiais sintéticos são, em geral, preferíveis, por induzirem respostas imunitárias mais suaves e por serem mais facilmente modificadas do que as matrizes naturais [118].

#### 1.6.7 Fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras

O metabolismo da cartilagem articular é regulado por fatores de crescimento originários da cartilagem e do tecido e fluido sinovial circundante [119]. Os fatores de crescimento exercem influência nas células-alvo por interação com recetores específicos que desencadeiam respostas ao nível da proliferação, diferenciação e morte celular [120]. Os fatores de crescimento da insulina, principalmente o IGF-1, estimulam a síntese de proteoglicanos, colagénio tipo II e integrinas; além disso, bloqueiam a destruição da matriz extracelular e estimulam a adesão dos condrócitos à fibronectina e ao colagénio tipo II [121]. O TGF- $\beta$ 1 age como regulador nas células e induz a síntese de proteoglicanos da cartilagem e colagénio tipo II pelas células mesenquimais [122]. O fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) é um mitógeno para os condrócitos, ou seja, estimula a sua proliferação celular. Quando combinado com o TGF- $\beta$ 1, permite uma expansão eficiente dos condrócitos articulares mantendo a sua capacidade de diferenciação [123].

Atualmente, há vários estudos na área da engenharia da cartilagem, a qual combina matrizes, células e fatores de crescimento (ou outras moléculas sinalizadoras) [70]. Na maioria dos protocolos utilizados em engenharia de tecidos, o tipo celular escolhido é aplicado em conjunto com fatores de crescimento livres ou encapsulados. A eficácia dos fatores de crescimento na indução da condrogénese foi avaliada principalmente *in vitro* e, nalguns casos, *in vivo* [124,125]. Na literatura, podem ser encontrados vários estudos *in vitro*, como por exemplo: testes que envolveram combinações de matrizes, vários tipos de células e fatores de crescimento, incluindo matrizes colagénicas com células estromais provenientes da medula óssea e TGF- $\beta$ 1 [126]; ensaios com matrizes de agarose com condrócitos e FGF-2 [127]; estudos com matrizes fibrosas, condrócitos e IGF-1 [128]; ou testes com matrizes poliláticas com células pericondriais e TGF- $\beta$ 1 [129]. Há também estudos realizados *in vivo* que mostram as potencialidades desta abordagem e que, além disso, demonstram que a situação *in vivo* pode ser diferente da *in vitro* [68,130].

Um facto importante relacionado com a utilização de fatores de crescimento é que é aconselhada a sua inserção em transportadores adequados por forma a que sejam protegidos do meio ambiente e retenham a sua atividade biológica. Esta proteção pode, por exemplo, ser conferida através da utilização de nanomateriais.

## 1.7 Nanotecnologia

### 1.7.1 O que é a nanotecnologia?

A nanotecnologia é definida como a ciência envolvida na síntese, caracterização e aplicação de materiais projetados à escala nanométrica [131,132]. Os nanomateriais apresentam propriedades melhoradas e comportamentos novos relativamente aos materiais de que são feitos e que têm uma escala maior [133]. Estas novas propriedades devem-se à grande área de superfície dos nanomateriais relativamente ao seu volume, o que pode ocasionar uma maior reatividade química (ou seja, alguns materiais em maior tamanho são mais reativos quando produzidos à escala nanométrica) e afetar a resistência ou outras propriedades elétricas; o comportamento da matéria à nanoescala também pode ser dominado por efeitos quânticos, o que afeta o seu comportamento ótico, elétrico e magnético [134]. Na área da nanomedicina (nanotecnologia aplicada à medicina), os nanomateriais podem ser criados para promover a interação celular e tecidual ao nível molecular com um elevado grau de especificidade funcional [135], sendo projetados para atingir efeitos terapêuticos máximos com efeitos colaterais mínimos [136]. A nanotecnologia é considerada um campo multidisciplinar porque envolve diferentes ciências tradicionais como a química, física, biologia e engenharia, e apresenta extensas aplicações em vários domínios como: construção, engenharia, microeletrónica, meio ambiente, sustentabilidade, agricultura e saúde [131,132,134,135].

### 1.7.2 Nanotecnologia e a saúde

A nanotecnologia apresenta-se como uma ferramenta importante em aplicações biomédicas, tanto para o diagnóstico, como para o tratamento de doenças [131]. Neste contexto, a nanotecnologia é promissora na área da saúde, como por exemplo aplicada a sistemas de entrega de fármacos e genes, biomateriais, dispositivos biomédicos, biomarcadores fluorescentes, biossegurança, deteção de proteínas, sondagem da estrutura no DNA (ácido desoxirribonucleico), engenharia de tecidos, deteção de tumores, separação e purificação de

moléculas e células, realce por contraste em ressonância magnética, etc [135,136]. Dito isto, no caso dos nanosistemas de entrega, muitos fármacos que já tinham sido descartados devido à sua baixa biodisponibilidade e eficácia têm vindo novamente a ser reconsiderados para o tratamento de doenças, agora acoplados a nanomateriais [131]. Para atingir esse objetivo, é necessário a encapsulação do princípio ativo ou fármaco dentro das nanopartículas (NPs) ou a sua adsorção à superfície. No entanto, para estes nanosistemas, há que estudar a biocompatibilidade, biodegradabilidade e a velocidade de libertação controlada do fármaco protegido. É, no entanto, possível fazer um desenho racional das NPs para a entrega de fármacos de forma segura e eficiente. Como resultado, tem havido um progresso relativamente à biodisponibilidade e biodistribuição de fármacos pelo aumento da sua solubilidade aquosa e libertação específica direcionada. É, pois, necessário que o nanosistema aumente a permeabilidade do fármaco através das membranas biológicas e que conduza a uma distribuição controlada e específica do fármaco para atingir somente as células alvo, diminuindo assim os efeitos colaterais indesejados [131,137,138].

### 1.7.3 Nanotecnologia e terapias para a reparação da cartilagem

Alguns nanomateriais/NPs, com excelentes propriedades mecânicas e características biomiméticas, têm-se mostrado promissores para a reparação da cartilagem articular [139]. Kang *et al.* desenvolveram um sistema intra-articular de entrega de NPs de Kartogenina conjugado com quitosano e os resultados dos testes *in vitro* revelaram que essas NPs induziam a condrogénese em hMSCs (células mesenquimais estaminais humanas), enquanto que os ensaios *in vivo* revelaram que os ratos tratados com essas NPs apresentavam menor alteração degenerativa do que o controlo não tratado [140]. Li *et al.* usaram NPs de CrmA (Modificador de resposta da citocina A) e quitosano para testar a sua ação na expressão das MMPs nos condrócitos. Este estudo demonstrou que essas NPs inibem as MMPs, reduzindo a apoptose dos condrócitos e aumentando a resposta de reparação da cartilagem articular [141]. Geiger *et al.* utilizaram dendrímeros PAMAM (poliamidoamina) funcionalizados com polietilenoglicol para transporte de IGF-1 e os resultados mostraram que essas NPs reduziram a largura da degeneração da cartilagem em 60% em relação aos ratos não tratados em 4 semanas após a cirurgia [142]. Laroui *et al.* desenvolveram NPs poliláticas contendo ácido hialurónico e sulfato de condroitina para injeção em locais próximos das lesões e erosões da cartilagem. Os resultados *in vitro* demonstraram que as NPs não eram citotóxicas e que estas eram internalizadas para uma área intracitoplasmática das células [143]. Rothenfluh *et al.* criaram NPs de poli (sulfureto

de propileno) (PPS) para um alvo intra-articular, e os resultados mostraram que as NPs se ligavam especificamente ao colagénio tipo II da cartilagem articular [144]. Shi *et al.* usaram NPs de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) encapsuladas com kartogenina, embebidas num hidrogel de ácido hialurónico e os resultados mostraram que esse hidrogel era biocompatível e promovia a formação de tecido reparado de cartilagem hialina [145]. Campos *et al.* desenvolveram NPs de ouro conjugadas com curcumina para avaliar o potencial terapêutico em problemas no menisco e os resultados obtidos demonstraram que os animais tratados com as NPs tiveram uma menor gravidade nas lesões histológicas, o que permitiu a conclusão de que essas NPs eram um potencial nanofármaco para o tratamento da cartilagem articular [146]. Wang *et al.* prepararam NPs de quitosano e ácido hialurónico para a entrega de um curcuminóide e os resultados indicaram que essas NPs suprimiam a inflamação e a apoptose dos condrócitos em joelhos com osteoartrite [147]. Pan *et al.* elaboraram um gel de polivinil álcool com NPs de hidroxiapatite e HA e constataram que o comportamento viscoelástico desse material compósito era compatível com a da cartilagem articular, portanto, consideraram-no um excelente material terapêutico [148].



## 2. Objetivos

Os organismos marinhos são constituídos por materiais com várias propriedades e características que podem justificar a sua aplicação na área biomédica. Além disso, o desenvolvimento de novos biomateriais pode trazer benefícios económicos e ambientais por meio da exploração sustentável dos recursos marinhos naturais, bem como pela valorização de resíduos de origem marinha provenientes da indústria alimentar. Neste sentido, diferentes organismos aquáticos, têm vindo a ser utilizados como fontes de compostos que são isolados e transformados em produtos lucrativos para aplicações biomédicas, incluindo dispositivos controlados de entrega de fármacos e engenharia de tecidos [149].

Neste contexto, esta Tese de Mestrado teve como principal objetivo, através do uso de colagénio proveniente de fontes marinhas, em particular, da alforreca (*Rhizostoma pulmo*) e do tubarão azul (*Prionace glauca*), preparar e caracterizar nanopartículas de colagénio com vista à regeneração da cartilagem articular, por exemplo, servindo como veículos para fatores de crescimento (embora, nesta fase, não se tenham ainda efetuado estudos desta natureza).

Em maior detalhe, os objetivos específicos desta Tese de Mestrado foram:

- a) Otimização da preparação de NPs de colagénio de alforreca e tubarão azul pelo método de emulsão e reticulação;
- b) Caracterização das NPs de colagénio pela técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz, medição de potencial Zeta e Microscopia Eletrónica de Transmissão;
- c) Avaliação da viabilidade celular de hMSCs após exposição às NPs de colagénio (por via indireta, através da medição da atividade metabólica das células);
- d) Avaliação do efeito das NPs de colagénio na diferenciação condroblástica de hMSCs (por métodos qualitativos – através de métodos histoquímicos - e quantitativos – pela técnica de RT-qPCR).



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais e reagentes para a produção de Nanopartículas de Colagénio

Para a síntese de nanopartículas de colagénio (CNPs) foi utilizado colagénio tipo II de alforreca (*Rhizostoma pulmo*) cedido pela Jellagen© e colagénio tipo I de tubarão azul (*Prionace glauca*), cedido pelo Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC da Espanha. Foram ainda usados os seguintes reagentes: ácido acético (Sigma-Aldrich), hidróxido de sódio (EKA Pellets), Tween<sup>20</sup> (Sigma-Aldrich), parafina líquida (Sigma-Aldrich), glutaraldeído 25% (Sigma-Aldrich), peróxido de hidrogénio 30% (Merck), 2-Propanol (Sigma-Aldrich) e ácido ascórbico (Sigma). A água ultrapura utilizada em todas as experiências foi obtida através de um sistema de purificação Millipore Milli-Q com uma resistividade superior a 18,2 MΩ.cm (a 25 °C).

#### 3.2 Células, meios de cultura e reagentes para ensaios celulares

Nos ensaios celulares foram utilizadas hMSCs que foram obtidas de pequenos fragmentos de osso trabecular ricos em medula óssea de adultos saudáveis durante intervenções cirúrgicas após trauma, que de outra forma seriam descartadas, e com aprovação do comité de ética do Hospital Dr. Nélio Mendonça (Funchal). Para os ensaios biológicos, foram utilizados os seguintes materiais e reagentes: meio de cultura  $\alpha$ -Minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) (Gibco), antibiótico/antimicótico (AA, Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich), tripsina (Gibco), resazurina (Sigma-Aldrich), Insulina-Transferrina-Selénio (ITS, Gibco), ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich), piruvato de sódio 1% (Sigma-Aldrich), L-Prolina (Sigma-Aldrich), TGB- $\beta$ 1 (Sigma-Aldrich), dexametasona (Alfa Aesar), Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich), Safranina-O (Sigma-Aldrich), Fast Green (Sigma-Aldrich), solução de Paraformaldeído (PFA, Sigma-Aldrich), hematoxilina (Sigma-Aldrich), cloreto férrico (Sigma-Aldrich), ácido clorídrico (Carlo Erba), Tri Reagent® (Zymo Research), azul de tripano (Sigma-Aldrich), Triton-X 100 (Merck), etanol (Aga), frascos de cultura e placas de 24, 48 e 96 poços (VWR), iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step.

### 3.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica (Mettler Toledo AB204), placa de agitação com aquecimento (Heidolph 3001), banho termostático (Grant Y14, Grant Instruments Cambridge Ltd.), agitador vertical (Heidolph RZR 2041), ponta de ultrassons (VibraCell 72434, Bioblock Scientific), medidor de pH (pH-metro 691, MetröhM), incubadora (*DH Autoflow Automatic CO<sub>2</sub> Air Jacked Incubator*, Nuair), centrífuga (Sigma 3K30), câmara de fluxo laminar (*Labgard 425 Biological Safety Cabinet*, Nuair), liofilizador (FreeZone 4.5, Labconco), ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panalytical), leitor de microplaca (Perkin Elmer Victor 3), microscópio ótico invertido (Olympus CK40), microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE2000E) e purificador de água (*Milli-Q Direct 8 Water Purification*), Bio-Rad® iQ.

### 3.4 Síntese das Nanopartículas de Colagénio

A síntese das CNPs foi baseada no método de emulsão e reticulação de Kreuter *et al.* e Swatschek *et al.* [150,151] mas, como estes apresentavam partículas com tamanhos na ordem dos micrómetros, o seu protocolo foi adaptado e acrescentada a aplicação de ultrassons para tentar diminuir o tamanho das partículas de modo a obtê-las na escala nanométrica.

Durante a síntese inicial das CNPs foram testados vários parâmetros visando a otimização do protocolo de síntese e a diminuição do tamanho das partículas. Foi testada a dispersão do colagénio de alforreca em dois solventes diferentes, água destilada e ácido acético 0.1M; aplicação de agitação inicial (10 minutos e 24 horas), diferentes frequências de ultrassons (30 e 60 kHz) e utilização de diferentes temperaturas na dispersão inicial do colagénio (temperatura ambiente e 40 °C).

O protocolo otimizado consistiu nos seguintes passos: 30 mg de colagénio de alforreca/tubarão azul foram dispersos em 10 mL de água destilada e homogeneizados com agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente. Após este período, foi aplicado ultrassons a 60 kHz à solução de colagénio, com agitação magnética por 10 minutos. O pH foi ajustado para 9,5 com ácido acético 0.1M e NaOH 0.1M. Subsequentemente, foi repetida a aplicação dos ultrassons. Uma mistura consistindo em 1,17 g de Tween<sup>20</sup> e 29,41 g de parafina líquida foi adicionada à dispersão de colagénio. A mistura foi emulsionada por 10 minutos com agitação vertical de 1000 rpm. Os ultrassons foram aplicados novamente e em seguida a emulsão foi agitada constantemente com agitação magnética. De maneira a iniciar o reticulação entre as cadeias de colagénio, foi adicionado 1,41 mL de solução de glutaraldeído 25 %. Após 12

minutos de reação, foi adicionado 1,88 mL de peróxido de hidrogênio. Essa preparação foi agitada por mais 15 minutos, e diluída com a adição de 11,76 mL de 2-Propanol a 100%. Em seguida, para as lavagens, a emulsão foi centrifugada (30 minutos a 10444g). A parte lipídica foi descartada, e o sedimento foi ressuscitado em 2-Propanol 50%. Subsequentemente, a suspensão foi centrifugada novamente e o passo de limpeza foi repetido. O sedimento obtido foi ressuscitado numa solução aquosa de ácido ascórbico 4%. A suspensão foi aquecida a 75°C por 30 minutos para destruir quantidades residuais de substâncias oxidantes. A mistura foi homogeneizada com agitação magnética por 12 horas à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada e procedeu-se à lavagem das CNPs com água destilada e com centrifugação entre lavagens (30 minutos a 10444g). Posteriormente, as CNPs foram congeladas, liofilizadas e caracterizadas. É de salientar que a síntese foi feita sempre em triplicado.

### 3.5 Caracterização das Nanopartículas de Colagénio

Neste trabalho experimental, as CNPs foram caracterizadas para confirmar a sua formação e morfologia, bem como o seu diâmetro, índice de polidispersão e potencial Zeta.

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) é muito usada para determinar a distribuição de tamanho de pequenas partículas em suspensão ou solução. É baseada na incidência de um feixe de laser numa solução coloidal, onde parte da luz é dispersa, resultando em flutuações da intensidade da luz dispersa. Essa flutuação está relacionada com o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas que estão sob o efeito do movimentos brownianos, ou seja, têm um movimento aleatório [152]. Uma partícula grande movimenta-se mais lentamente, logo o sinal recebido traduzir-se-á num diâmetro de partícula maior. É importante salientar que os dados obtidos fornecem informação de tamanhos da população de partículas em cada solução de amostra e não informações sobre cada partícula [153]. Assim sendo, é possível estabelecer a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das partículas por meio de uma fórmula matemática, denominada de equação de Stokes-Einstein [152]. O índice de polidispersão (PDI) fornece informações sobre a heterogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas numa amostra. Uma das limitações do DLS é que ele não funciona tão bem com amostras polidispersas, porque os objetos maiores podem espalhar mais luz e podem esconder as partículas menores [154]. O potencial Zeta (ZP) é o potencial eletrocinético em dispersões coloidais, sendo um parâmetro importante relativamente à estabilidade da dispersão. Depende não somente da partícula, mas também do solvente. É baseado num princípio eletroforético, onde há a aplicação de um campo elétrico através da dispersão e as partículas são atraídas para

o elétrodo de carga oposta. A velocidade da partícula no campo é definida como mobilidade eletroforética e o ZP está relacionado com essa mobilidade. Um alto ZP indica maior estabilidade e dispersão, enquanto que um ZP baixo indica menor estabilidade e agregação das partículas [155].

As CNPs recém sintetizadas foram caracterizadas à temperatura ambiente, determinando o seu diâmetro hidrodinâmico, Pdl e ZP. Após a liofilização, o sedimento final obtido foi ressuspenso em água destilada para uma concentração final de 5mg/mL e para a leitura foi utilizado um fator de diluição de 1:10 para todos os parâmetros. Pelo menos 3 medições repetidas em cada amostra foram feitas para verificar a repetibilidade dos resultados.

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é uma técnica valiosa para a completa caracterização físico-química de nanopartículas recém-sintetizadas por causa da sua alta resolução. O seu fundamento é baseado na incidência de um feixe de elétrons com alta voltagem que interage com a amostra enquanto a atravessa, criando uma imagem 2D [156]. É necessário que o TEM possua um sistema de vácuo para evitar a colisão de elétrons com as moléculas do ar. Além disso, as amostras devem ter um tamanho ultra-fino e necessitam de ser fixadas e desidratadas devido ao sistema de vácuo. Devem também ser “coradas” para um melhor contraste e visualização [157].

Para análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão, 10 µL das amostras foram montadas em grades de níquel de malha revestida por película Formvar/carbono (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) e deixadas por 2 min. O líquido em excesso foi removido com papel de filtro e contrastou-se a amostra com 10 µL de acetato de uranil por 10 segundos. A visualização foi realizada em um JEOL JEM 1400 TEM a 120kV (Tóquio, Japão). As imagens foram gravadas digitalmente usando uma câmara digital CCD Orious 1100W Tóquio, Japão, no HEMS/i3S da Universidade do Porto.

### 3.6 Ensaio celulares

#### Cultura celular

Primeiramente foi feito o descongelamento das células hMSCs criopreservadas. Depois de centrifugadas (8 min a 2000 rpm), as células foram distribuídas por frascos de cultura com 20 mL de meio de cultura *α-Minimum essential medium* (α-MEM), enriquecido com 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico (AA) e 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) – referido como “meio completo” a partir de agora. As células foram incubadas numa estufa a

37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas foi verificado se as células tinham aderido à placa. O meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana até que o número desejado de células fosse alcançado e antes de atingir a confluência máxima nas placas.

Após a verificação da adesão e crescimento celular pelo microscópio ótico invertido, foi realizada a tripsinização das células. Para isso, o meio de cultura foi removido, a cultura foi lavada com 10 mL de PBS e foi adicionado 4 mL de solução de tripsina. Os frascos foram colocados na estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 5 minutos. Após as células se destacarem da parede dos frascos, foi adicionado 8 mL de meio completo para parar a ação da tripsina. Depois a suspensão foi homogeneizada e foi realizada a contagem celular. Para a contagem foi necessário colocar, num *ependorf*, 100 µL da suspensão celular e 100 µL do reagente azul de tripano para marcar as células mortas. Em seguida, colocou-se essa mistura num hemocitómetro (câmara de Neubauer) e foi feita a contagem do número de células.

### Teste da viabilidade celular pelo Ensaio da Redução da Resazurina

A citotoxicidade das CNPs foi avaliada por meio do Ensaio da Redução da Resazurina. Este é um teste quantitativo, baseado na avaliação da atividade metabólica celular. A resazurina, um corante azul não fluorescente, é adicionado à cultura celular e, quando convertido a resorufina, passa a ser rosa e emite fluorescência. Essa reação ocorre por meio de enzimas nas mitocôndrias, sendo efetuada apenas pelas células viáveis. Portanto, a quantidade de resorufina presente será diretamente proporcional ao número de células viáveis. A quantificação da viabilidade celular por este teste apresenta vantagens, nomeadamente: rapidez, sensibilidade, eficácia e baixo custo. Além disso, mantém as células intactas, permitindo outras análises em simultâneo, como mRNA (ácido ribonucleico mensageiro), citogenética, apoptose, entre outras. O grau de redução foi quantificado por fluorimetria em leitores de microplacas pois, quando reduzida, a resorufina emite fluorescência a 595 nm [158]. Assim sendo, a viabilidade celular foi determinada como uma percentagem em relação às células não expostas (controlo). Para essa finalidade, as hMSCs foram expostas a diferentes concentrações de CNPs (0, 10, 100, 200, 500 e 1000 µg/mL) por 24 h.

As hMSCs foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço com meio completo  $\alpha$ -MEM (perfazendo 200 µL/poço), e depois foram colocadas na incubadora a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio foi substituído por 200 µL de meio completo  $\alpha$ -MEM com as CNPs nas concentrações de 0, 10, 100, 200, 500 e 1000 µg/mL. Para ter um controlo positivo e negativo, alguns poços não foram expostos às CNPs. Para

os poços do controlo positivo, ao invés de colocar meio de cultura, foi colocado 200 µL de uma solução de 1% de Triton-X 100 e, para os poços do controlo negativo, foi adicionado 200 µL de meio completo. As placas foram incubadas na estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Após as 24 horas de exposição, o meio de cultura celular contendo as CNPs ou só o meio de cultura celular sem as CNPs (controlo negativo) e a solução de Triton-X 100 (controlo positivo) foram removidos e 200 µL de meio completo α-MEM fresco com 10% (v/v) de uma solução de resazurina a 0,1 mg/mL foi adicionado a cada poço. As células foram incubadas por 3 horas na estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, 100 µL do meio, de cada poço, foi transferido para uma placa de 96 poços opaca e a fluorescência foi medida usando um leitor de microplacas, com  $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ . Todas as amostras foram analisadas em quadruplicado.

### Ensaio de diferenciação condrogénica de hMSCs

A medula óssea é a fonte mais comum para o isolamento de células hMSCs adultas. Por terem uma alta capacidade de diferenciação, essas células tornam-se ideais para analisar a possível influência das nanopartículas de colagénio no processo de diferenciação condrogénica. Estas células não são transformadas nem imortalizadas, são células primárias, podendo ser cultivadas durante várias semanas [159,160].

A diferenciação *in vitro* das hMSCs depende das condições de cultura. A diferenciação osteogénica das hMSCs pode ser desencadeada pela exposição a suplementos específicos como dexametasona, ácido ascórbico e β-glicerofosfato. Para a linhagem adipócita é preciso dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina e indometacina [161]. Finalmente, para a diferenciação condrogénica, é necessário a exposição a um meio contendo dexametasona, ascorbato-2-fosfato, ITS, L-prolina, piruvato de sódio e TGF-β1 [107]. A dexametasona é um componente importante para a diferenciação condrogénica. Quando em combinação com o TGF-β1, a dexametasona tem mostrado potencial para a regulação positiva dos marcadores condrogénicos [162]. O TGF-β1 é indutor da condrogénese em MSCs embrionárias, sendo responsável pela estimulação de atividades anabólicas em células do tecido conjuntivo. Além disso, também aumenta a síntese de DNA nas culturas de condrócitos, aumenta a expressão de colagénio tipo II e a acumulação de proteoglicanos específicos [163]. O ácido ascórbico é essencial como um cofator enzimático que adiciona grupos hidroxilo à prolina e lisina no pró-colagénio. Portanto, quando não há ácido ascórbico não se consegue formar uma estrutura

helicoidal com as cadeias de colagénio, e a secreção de colagénio tipo I na MEC fica comprometida [164]. O complexo de ITS pode prevenir a desdiferenciação de condrócitos articulares em cultura de monocamada e promover a formação de cartilagem de alta qualidade quando combinada com outros fatores de crescimento, além disso, pode regular a proliferação e a síntese de matriz dos condrócitos [165]. A L-prolina estabiliza a tripla hélice do colagénio e promove a diferenciação. O piruvato de sódio é a fonte de energia e inibe a citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogénio. [166]. A capacidade das hMSCs se diferenciarem está relacionada com a sua multipotência, no entanto, essas características não são mantidas indefinidamente e as hMSCs envelhecem com a extensiva subcultivação *in vitro*, perdendo o seu potencial proliferativo e de diferenciação [161].

Para a condrogénese, hMSCs de passagem 3 (p3) foram cultivadas em 10 placas de 24 poços na densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço com meio completo  $\alpha$ -MEM (perfazendo 1mL/poço), e depois foram incubadas na estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. A placa foi dividida ao meio, onde 12 poços ficaram destinados ao meio negativo constituído por meio  $\alpha$ -MEM, 1% ITS, 1% AA, 1  $\mu$ M de ascorbato-2-fosfato, 1% de piruvato de sódio, e 12 poços para o meio positivo que era constituído pelos mesmos suplementos do meio negativo com adição de  $10^{-7}$ M de dexametasona e 10 ng/mL de TGB- $\beta$ 1. Após as 24 horas, o meio foi removido e substituído por 250  $\mu$ L dos meios negativo e positivo contendo as CNPs na concentração de 100  $\mu$ g/mL (concentração selecionada após o ensaio com a resazurina) e, em seguida, foram incubadas na estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Como as CNPs foram sintetizadas em ambiente não estéril, antes da incubação, foram submetidas a 20 minutos sob luz UV para esterilização. Para o controlo negativo, houve somente a substituição do meio, sem acrescentar as CNPs. Após esse período, o meio contendo as CNPs foi removido e trocado por meio negativo e positivo. As células foram cultivadas por 19 dias e o meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana. A diferenciação celular das hMSCs foi estudada aos dias 7, 14 e 19 após o início das culturas celulares.

### **Avaliação da diferenciação condrogénica de hMSCs por métodos qualitativos**

As células hMSCs demoram cerca de 2 a 3 semanas para sofrerem a diferenciação condrogénica sob as condições descritas anteriormente. Quando elas se diferenciam, produzem uma grande quantidade de matriz extracelular que é composta, principalmente, de colagénio tipo II e agrecano. A expressão desses compostos pode ser usada como um marcador da diferenciação condrogénica das hMSCs. No início da diferenciação, as células apresentam

colagénio tipo I e nenhuma outra molécula específica da cartilagem. Geralmente, o colagénio tipo II começa a ser detetado a partir do 5º dia da diferenciação, e no 14º dia costumam ser encontrados colagénio tipo II e IX, além de agrecano e proteínas de ligação [167].

### Coloração por Azul de Toluidina

A coloração com azul de toluidina pode ser usada como um procedimento para a avaliação histológica da condrogénese. O azul de toluidina é um corante catiónico altamente seletivo para a deteção de proteoglicanos devido à sua afinidade para os grupos sulfato dos proteoglicanos [168,169]. As células aparecem coradas com o citoplasma a azul claro e os núcleos a um azul mais escuro. A matriz extracelular aparece a rosa claro ou violeta. Para o ensaio com o azul de toluidina, as células foram fixadas com 500 µL de uma solução de PFA 4%, lavadas com PBS e depois com água destilada. O corante azul de toluidina (0,04% em acetato de sódio 0.1M, pH 4) foi adicionado e incubado por 10 minutos, no escuro à temperatura ambiente. Após esse tempo, o corante foi removido, as placas foram lavadas três vezes com água destilada, foi adicionado 500 µL do corante *Fast Green* (0,02% em água destilada) e incubado por 3 minutos, no escuro à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas 2 vezes com água destilada. As placas foram observadas no microscópio ótico invertido.

### Coloração por Safranina-O/*Fast Green*

A Safranina-O é um corante básico catiónico que também cora proteoglicanos embora com tons de laranja/vermelho. A intensidade da coloração da Safranina-O é normalmente proporcional ao conteúdo destes compostos na amostra embora isso possa não suceder na presença de *Fast Green* [170]. O corante *Fast Green* é usado para a coloração de proteínas, sabendo-se, no entanto, que se pode ligar também a outras moléculas; normalmente, usa-se o *Fast Green* apenas como agente de contraste na amostra (origina uma coloração verde). Para o ensaio com a Safranina-O/*Fast Green*, as células foram fixadas com 500 µL de uma solução PFA 4%, lavadas com PBS e depois com água destilada. Em seguida, 500 µL da solução do reagente *Weigert Iron Hematoxylin* (Cloreto de ferro aquoso em 37% de HCl e hematoxilina 1% em etanol 80%) foi adicionada e incubada por 5 minutos. Após esse período, o reagente foi removido e as placas foram lavadas quatro vezes com água destilada. Depois foi feita uma lavagem com etanol acídico 1% (HCl 37% em etanol 70%) e três lavagens com água destilada. Foi adicionado 500 µL do corante *Fast Green* (0,02% em água destilada) e incubou-se por 1 minuto. Após esse tempo,

foi feita uma lavagem com ácido acético glacial 1% (1% de ácido acético glacial em etanol 70%). Em seguida, foi adicionado 500 µL da solução de Safranina-O 1% (1% em água destilada) e incubou-se por 30 minutos, fazendo, por último, uma lavagem com etanol 95%. As placas foram observadas no microscópio ótico invertido.

## Avaliação da diferenciação condrogénica de hMSCs por métodos quantitativos

A diferenciação condrogénica pode ser avaliada fazendo uma análise da síntese de mRNA para detetar a expressão de genes relacionados com a condrogénese, nomeadamente: colagénio tipo II e do proteoglicano agregano.

## Análise da síntese de mRNA por RT-qPCR

A reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) representa uma ferramenta poderosa para a deteção e quantificação de mRNA. É uma técnica muito utilizada por causa da sua alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e amplo intervalo de quantificação. Nesta técnica, há a transcrição do mRNA em DNA complementar (cDNA) por meio da transcriptase reversa, e depois o cDNA é então usado como cadeia modelo para a reação de qPCR [171].

A RT-qPCR pode ser efetuada em ensaios de um passo ou de dois passos. Em ensaios com um passo, são combinados num único tubo a transcrição reversa e o PCR, ou seja, são usadas a transcriptase reversa em conjunto com uma DNA polimerase. Esse tipo de ensaio usa apenas *primers* de sequências específicas. Em ensaios com dois passos, a transcrição reversa e o PCR são feitos em tubos separados, com diferentes tampões otimizados, condições de reação e estratégias com *primers*. No ensaio com dois passos podem ser utilizadas três abordagens diferentes para iniciar as reações de cDNA: *primers* oligoméricos (dT), *primers* aleatórios ou *primers* de sequência específica. Geralmente, é utilizada uma mistura com *primers* oligoméricos (dT) e *primers* aleatórios. Os *primers* ligam-se à cadeia modelo de mRNA e fornecem um ponto de partida à enzima transcriptase reversa [172].

A transcriptase reversa é a enzima que forma o cDNA a partir do RNA. Algumas enzimas apresentam atividade de RNase (ribonuclease), ou seja, conseguem degradar a cadeia de RNA no híbrido RNA-DNA após a transcrição. Se a enzima não apresentar a atividade de RNase, uma RNaseH pode ser acrescentada para melhorar a eficiência da qPCR. Para a RT-qPCR, é essencial escolher uma transcriptase reversa que possua alta estabilidade térmica. Isso possibilita que a

síntese de cDNA seja realizada em temperaturas mais altas, o que assegura uma transcrição bem-sucedida de RNA com altos níveis de estrutura secundária, a manutenção da sua atividade completa durante toda a reação e a produção de maiores rendimentos de cDNA [172].

A técnica funciona da seguinte maneira: é feita a extração do mRNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza o cDNA correspondente a cada cadeia de RNA e, em seguida, é iniciado a qPCR. Na qPCR há a amplificação de um local específico do cDNA por meio de uma DNA polimerase termoestável, no qual dois oligómeros específicos atuam como *primers* e um fluoróforo atua como emissor de luz. Durante os ciclos da qPCR no termociclador, o fluoróforo liga-se às cadeias duplas do cDNA recém sintetizadas e emite fluorescência proporcional à quantidade de cDNA presente e, por meio de uma análise do gráfico emitido, é possível quantificar a amostra inicial [172].

Neste estudo, utilizando a tecnologia baseada em RT-qPCR, o perfil de expressão gênica de colagénio tipo II e do proteoglicano agrecano foi avaliado durante o processo de diferenciação condrogénica de hMSCs.

Para esse ensaio, num ambiente sem RNase e asséptico, foi adicionado 193 µL do reagente Tri Reagent® diretamente aos poços das placas com hMSCs. A placa foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, o conteúdo de cada poço foi transferido para *ependorfs* que foram centrifugados por 10 minutos, com 12000xg a 4 °C. Os sobrenadantes foram removidos e passados para outros *ependorfs*, e ambos foram congelados a -80 °C, para posterior extração.

Para o RT-qPCR foi utilizado o protocolo do kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step em ambiente estéril. Os volumes dos reagentes utilizados encontram-se na **Tabela 2**.

**Tabela 2** - Protocolo de preparação da mistura de reação para RT-qPCR.

Componente	Volume por 10 µL de reação	Concentração final
iTaq™ Universal SYBR® Green mistura de reação	5 µL	1x
Transcriptase reversa iScript	0,125 µL	1x
<i>Primers forward e reverse</i>	Variável*	300 nM
RNA	Variável*	20 ng/µL

H <sub>2</sub> O Livre de nuclease	Variável*	---
<b>Volume total da mistura de reação</b>	10 µL	---

\* Os volumes dos *primers*, de RNA e de H<sub>2</sub>O variaram de acordo com a quantidade de RNA presente em cada amostra.

Foram analisadas as expressões dos seguintes genes: colagénio tipo II (COL2A1) e agrecano. A desidrogenase Gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) foi usada como controlo. As sequências de *primers* iniciadores estão listadas na **Tabela 3** [173]. A reação inicial da transcrição reversa foi realizada por 10 min a 50°C e depois foi feita a reação de PCR por 1 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de amplificação (10 seg a 95°C e 30 seg a 60°C). O PCR foi realizado em duplicado.

**Tabela 3** - Sequência dos *primers* iniciadores utilizados na RT-qPCR.

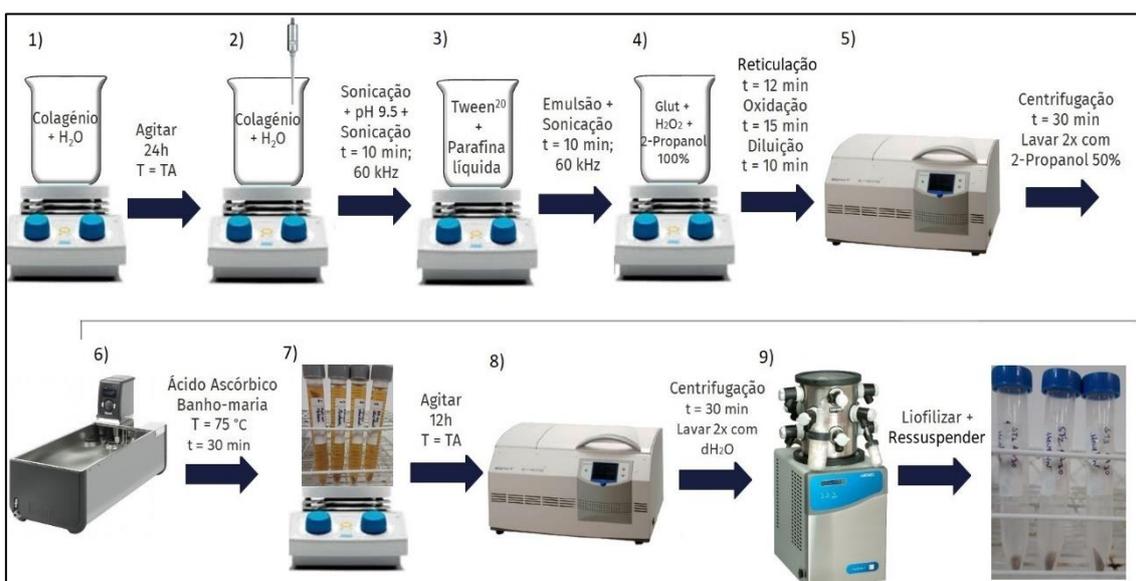
Gene	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do produto (em pares de base)
<b>Colagénio II</b>	5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3'	79
	5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'	
<b>Agrecano</b>	5'-TGCATTCCACGAAGCTAACCTT-3'	84
	5'-GACGCCTCGCCTTCTTGAA-3'	
<b>GAPDH</b>	5'-AGAAAAACCTGCCAAATATGATGAC-3'	126
	5'-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3'	



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Protocolo de síntese otimizado

O método de emulsão e reticulação do colagénio já foi descrito anteriormente para a síntese de micropartículas de colagénio [156]. Neste método, faz-se uma emulsão seguida de reticulação com o glutaraldeído, um reagente capaz de formar ligações químicas estáveis entre as cadeias do colagénio. No presente trabalho, usando o colagénio de alforreca (*Rhizostoma pulmo*), esse método foi otimizado relativamente ao uso do solvente (ácido acético 0.1 M vs água), condições de agitação iniciais (10min vs 24h), aplicação de ultrassons (30kHz vs 60 kHz) e uso de diferentes temperaturas (temperatura ambiente vs 40°C), com o objetivo de tentar diminuir o tamanho das partículas e obtê-las na escala nanométrica. Depois de otimizado, o método de síntese foi aplicado ao colagénio de alforreca e tubarão azul (*Prionace glauca*) para a obtenção das NPs que, posteriormente, foram usadas em ensaios de viabilidade e diferenciação celular. Finalizado o processo de otimização dos vários parâmetros de síntese, o protocolo selecionado consistiu na utilização da água como solvente, com agitação inicial por 24h para a dispersão do colagénio, seguindo-se, após a dispersão, o ajuste de pH e a preparação da emulsão, a aplicação de ultrassons a 60 kHz por 10 minutos, sendo o processo efetuado a temperatura ambiente. O protocolo otimizado da síntese das CNPs está representado na **Figura 13**, e contém 9 passos.



**Figura 13** - Esquema do protocolo de síntese otimizado. 1) Dispersão. 2) Ultrassons e ajuste de pH. 3) Emulsão e ultrassons. 4) Reticulação e Oxidação. 5) Centrifugação e lavagens. 6) Estabilização das NPs. 7) Homogeneização. 8) Centrifugação e lavagens. 9) Liofilização.

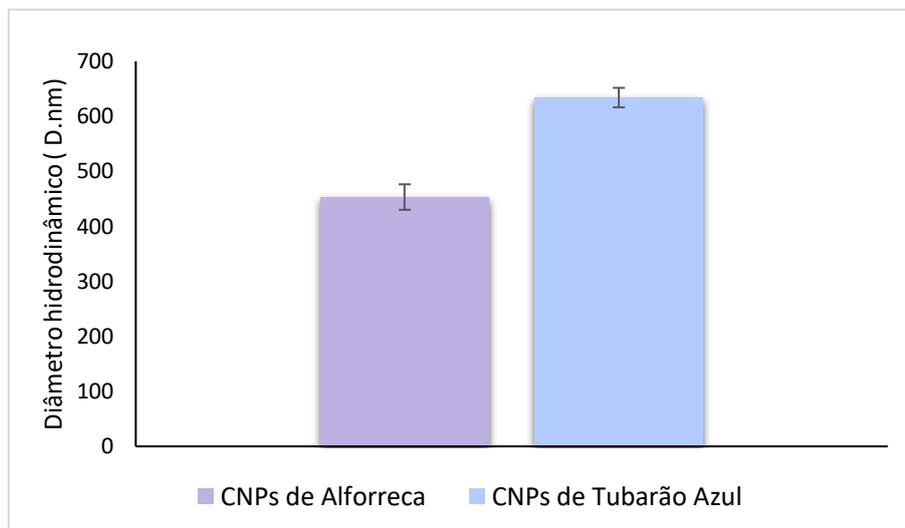
O primeiro passo, consiste na dispersão da amostra de colagénio na água com agitação inicial de 24 horas à temperatura ambiente. No segundo passo, é realizada a aplicação de ultrassons com 60 kHz por 10 minutos, seguido do ajuste do pH para 9,5, e de ultrassons nas mesmas condições anteriores. No terceiro passo é feita a emulsão com o agente emulsionante Tween<sup>20</sup> e a parafina líquida, que é a fase gordurosa, por 10 minutos, seguida de ultrassons nas condições anteriores. No quarto passo é feita a reticulação das cadeias de colagénio com a adição do glutaraldeído com duração de 12 minutos de reação. É adicionado o peróxido de hidrogénio que atua por 15 minutos como um agente oxidante interrompendo a reação de reticulação, e em seguida é feita a diluição com a adição do 2-propanol 100%. O quinto passo consiste em centrifugações de 30 minutos e lavagens com 2-propanol 50% para remover os vestígios do agente oxidante. No sexto passo há adição de uma solução de ácido ascórbico ao sedimento obtido na centrifugação, onde este é aquecido a 75 °C em banho-maria por 30 minutos. O sétimo passo é a agitação por 12 horas da mistura com ácido ascórbico à temperatura ambiente. O oitavo passo consiste em centrifugações de 30 minutos e lavagens com água destilada para remover os vestígios dos reagentes e obtenção das CNPs. O nono passo é o congelamento, a liofilização e a ressuspensão das CNPs sintetizadas. De entre as várias condições experimentais estudadas, este protocolo foi o que conduziu a tamanhos de partículas mais pequenos usando a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz.

## 4.2 Caracterização das Nanopartículas de Colagénio do protocolo otimizado

### 4.2.1. Tamanho hidrodinâmico

As partículas foram sintetizadas em triplicado com o colagénio de alforreca e de tubarão azul nas condições otimizadas. O objetivo era identificar se haveria diferenças nos diâmetros hidrodinâmicos das partículas quando usado colagénio proveniente de espécies diferentes.

As amostras foram analisadas por meio de DLS e os resultados provenientes da média de três ensaios independentes de cada colagénio mostraram que as partículas sintetizadas com o colagénio de alforreca e tubarão azul apresentavam, respetivamente,  $453 \pm 23$  nm e  $634 \pm 18$  nm (**Figura 14**) de diâmetro hidrodinâmico.



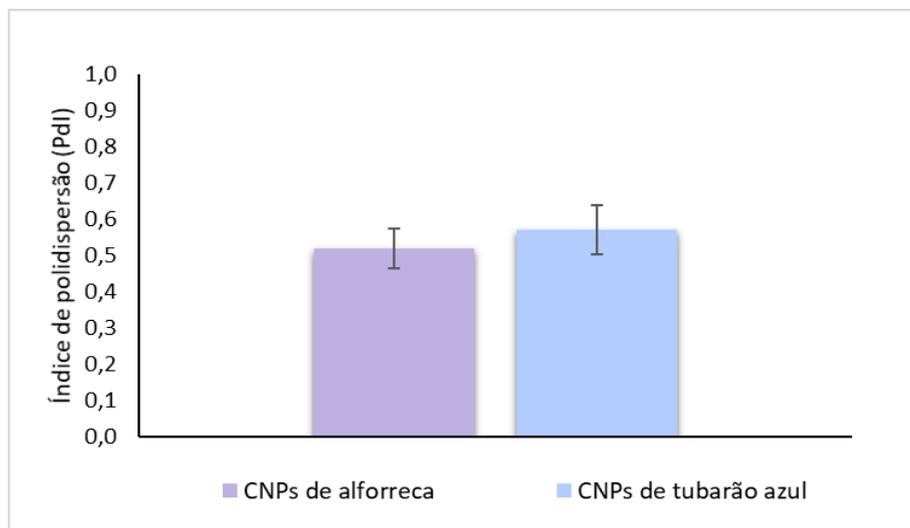
**Figura 14** - Diâmetro hidrodinâmico das CNPs de alforreca e tubarão azul.

Os nanossistemas usados para a terapia de doenças da cartilagem articular devem ultrapassar um ambiente complexo, que inclui uma matriz extracelular densa, o líquido sinovial no espaço da articulação e a libertação rápida na sinóvia circundante. NPs pequenas (<100 nm) conseguem penetrar mais profundamente na cartilagem, mas também podem ser rapidamente eliminadas da articulação, enquanto que NPs maiores apresentam uma menor penetração na cartilagem, mas podem ser aí retidas mais facilmente. Além disso, NPs com diâmetros maiores possibilitam o transporte de uma maior quantidade de compostos e uma libertação prolongada dos mesmos. Estes compostos podem ainda ser transportados para as zonas mais profundas da cartilagem [139,144]. Embora os resultados obtidos correspondam a CNPs com tamanhos que se aproximam da escala micrométrica, estes sistemas podem, no entanto, ainda ser considerados como candidatos para terapias de regeneração da cartilagem. Não devemos esquecer que o diâmetro hidrodinâmico de uma partícula é sempre superior ao seu diâmetro real.

#### 4.2.2 Índice de polidispersão

A caracterização do índice de polidispersão (Pdl) é essencial na caracterização de NPs para avaliar a homogeneidade das amostras em termos do seu tamanho. O Pdl das CNPs de alforreca e tubarão azul foi obtido no decorrer das medições de diâmetro hidrodinâmico por DLS. Os resultados provenientes da média de três ensaios independentes de cada colagénio mostraram que o Pdl das CNPs de alforreca e tubarão azul era, respetivamente,  $0,5 \pm 0,1$  e  $0,6 \pm 0,1$  (**Figura 15**). Estes resultados demonstraram a existência de heterogeneidade nos

diâmetros hidrodinâmicos das CNPs de alforreca e tubarão azul. Uma baixa dispersão de tamanhos seria desejável para a sua aplicação biológica, no entanto, tendo-se repetido várias vezes a síntese das partículas e não havendo melhorias em termos de índice de polidispersão, resolveu-se na mesma continuar os estudos iniciados, os quais se devem considerar como estudos preliminares.

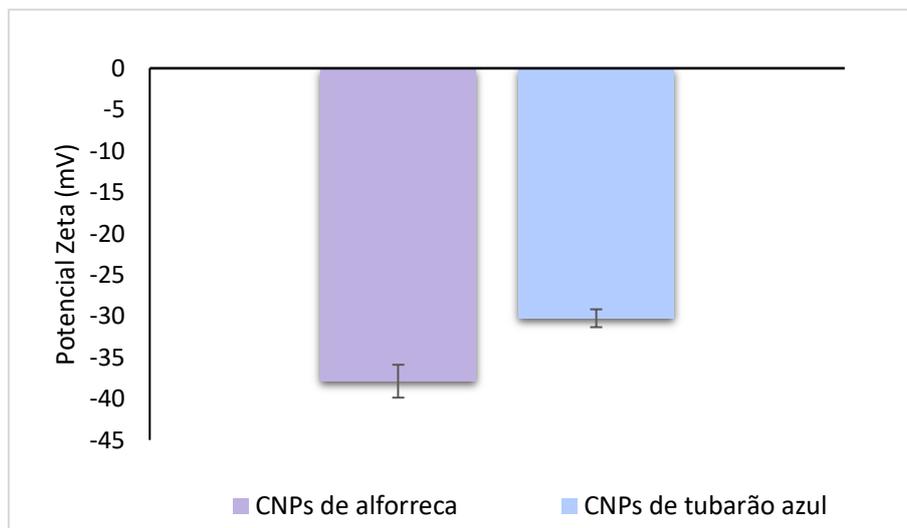


**Figura 15** - Índice de polidispersão das CNPs de alforreca e tubarão azul.

#### 4.2.3 Potencial Zeta

O potencial Zeta (ZP) está relacionado com a carga superficial das partículas, sendo um parâmetro fundamental associado à estabilidade de uma suspensão, pois mede a magnitude da repulsão ou da atração eletrostática das cargas entre partículas. Essa medição fornece informações sobre as causas da dispersão ou agregação das partículas.

Os resultados provenientes da média de três ensaios independentes relativos a cada colagénio mostraram que o ZP das CNPs de alforreca e tubarão azul eram, respetivamente,  $-38 \pm 2$  mV e  $-30 \pm 1$  mV (**Figura 16**).

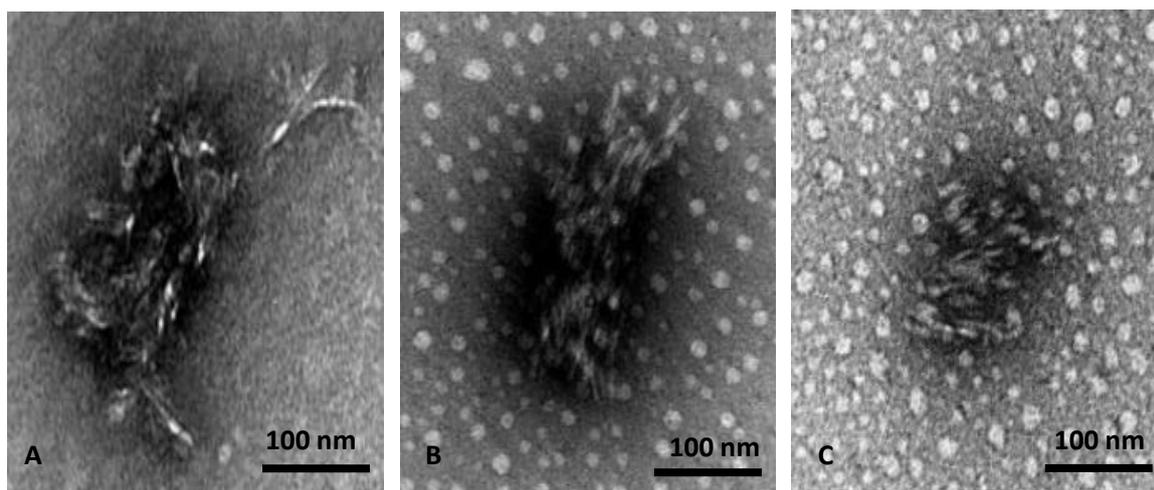


**Figura 16** - Potencial Zeta das CNPs de alforreca e tubarão azul.

Esses resultados demonstraram que as CNPs alforreca e tubarão azul apresentaram potenciais Zeta bastante negativos. Isso significa que existirá bastante repulsão entre as partículas em solução por possuírem carga elevada, portanto, ocasionando uma menor agregação e uma maior estabilidade da suspensão.

#### 4.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

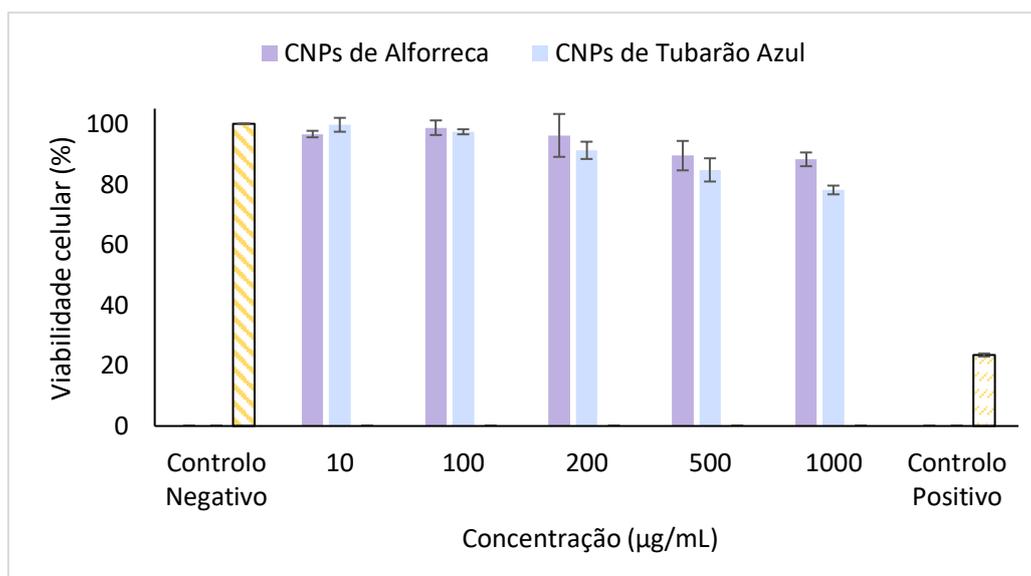
As CNPs de tubarão azul foram analisadas por TEM. As imagens obtidas mostram que CNPs de tubarão azul sintetizadas pelo método de emulsão e reticulação com ultrassons apresentam uma forma elíptica com dimensões do eixo maior na gama de 200 - 300 nm (**Figura 17**). Na figura 17, em A, é ainda possível observar que o colagénio mantém a sua conformação de tripla hélice. Em B e C, é possível notar alguma heterogeneidade nas CNPs formadas (tal como anteriormente expresso pelo valor de PDI determinado na medição do diâmetro hidrodinâmico), uma morfologia de elipse e ainda a presença de pequenas esferas brancas de gordura ao redor da partícula que podem ser vestígios da parafina líquida usada na síntese. O tamanho das CNPs obtidas por DLS é maior que o do TEM, uma vez que o DLS determina o diâmetro hidrodinâmico de uma NP que inclui a sua esfera de hidratação composta por água, iões e contra-iões. Por outro lado, é possível que as CNPs preparadas aumentem bastante de volume quando existe água presente.



**Figura 17** - Morfologia das CNPs de tubarão azul por TEM. A: CNP preparada em ácido acético. B: CNP preparada em água. C: CNP preparada em água.

### 4.3 Avaliação da citotoxicidade das Nanopartículas de Colagénio

A **Figura 18** mostra a citotoxicidade das CNPs de alforreca e tubarão azul determinada em hMSCs, em função da concentração e após um período de exposição de 24 horas. Os resultados são apresentados como uma percentagem da viabilidade celular em relação ao controlo (células não expostas às CNPs). A viabilidade celular foi correlacionada com a atividade metabólica das células por meio do Ensaio da Redução da Resazurina. Neste ensaio, as células metabolicamente ativas são capazes de converter uma molécula não fluorescente, a resazurina, num composto fluorescente, resorufina, enquanto que as células não viáveis não possuem essa capacidade. Devido à permeabilidade dos compostos na membrana, a resazurina pode entrar nas células e ser reduzida nas mitocôndrias, enquanto o produto dessa redução, a resorufina, pode deixar a célula através da membrana plasmática e se acumular no meio de cultura fora da célula [158]. Então, após a exposição das células às nanopartículas de colagénio por 24 horas, o reagente resazurina foi adicionado às células e deixado a incubar por 3 horas. Depois, o sinal de fluorescência proveniente do meio foi medido usando um leitor de microplacas.



**Figura 18** – Viabilidade celular das hMSCs após exposição de 24 horas às CNPs de alforreca e tubarão azul. Os resultados são provenientes da média e do correspondente desvio padrão relativo a três ensaios independentes com seis repetições para cada concentração.

Analisando a **Figura 18**, pode-se observar que, na gama de concentrações testadas, as CNPs de alforreca e tubarão azul apresentaram baixa citotoxicidade mesmo nas concentrações mais altas de CNPs, onde se obteve ainda 80% de viabilidade celular. Esses dados indicam que as CNPs sintetizadas apresentam uma boa citocompatibilidade *in vitro*, o que pode estar relacionado com a carga negativa das partículas.

Com base nestes resultados, a concentração de 100 µg/mL de CNPs foi utilizada para os ensaios de diferenciação celular, uma vez que esta corresponde a uma concentração não tóxica.

#### 4.4 Diferenciação condrogénica de hMSCs

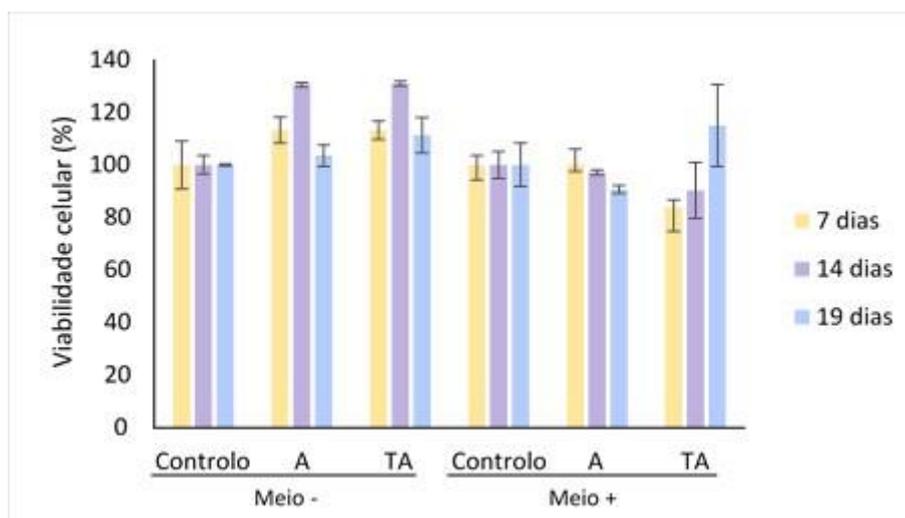
As MSCs têm a capacidade de se diferenciar em vários tecidos após a estimulação por certos fatores de crescimento e condições de cultura. O desenvolvimento de sistemas *in vitro* de condrogénese tem sido essencial para o reconhecimento dos fatores proteicos que podem promover a diferenciação em condrócitos a partir de MSCs adultas e melhorar a reparação da cartilagem *in vivo* [174].

Johnstone *et al.* demonstraram que a condrogénese é induzida nas MSCs quando cultivadas num meio definido contendo dexametasona e TGF-β1 [107]. Neste sistema, é criada uma matriz extracelular característica da cartilagem, contendo proteoglicanos e colagénio tipo II [107]. Têm, também, sido feitos outros estudos para elucidar o potencial condrogénico de outros fatores de crescimento, incluindo TGF-β2, TGF-β3, BMP-2, BMP-6 e IGF-1 [159,175–178].

Neste trabalho, as hMSCs foram incubadas com as CNPs de alforreca e tubarão azul por um período de 24 horas e cultivadas com (Meio +) e sem (Meio -) TGF- $\beta$ 1 e dexametasona por 19 dias, com o intuito de estudar o seu efeito na condrogénese. As células foram avaliadas relativamente à sua viabilidade (pelo Ensaio da Redução da Resazurina), e também foi verificada a diferenciação celular por métodos qualitativos e quantitativos aos dias 7, 14 e 19 do processo de diferenciação.

#### 4.4.1 Ensaio da Redução da Resazurina nas hMSCs em diferenciação

Na **Figura 19** é possível observar que durante os dias 7, 14 e 19 do processo de diferenciação, o valor mais baixo de viabilidade celular obtido foi de 80%, o que significa que as CNPs de alforreca e tubarão azul não apresentaram citotoxicidade ao longo do tempo, independentemente da presença, ou não, de TGF- $\beta$ 1 e dexametasona no meio.



**Figura 19** - Viabilidade celular das hMSCs após exposição de 24 horas às CNPs de alforreca e tubarão azul durante o processo de diferenciação celular, nos dias 7, 14 e 19. A: CNPs de alforreca. TA: CNPs de tubarão azul. Controlo: sem CNPs. Os resultados são provenientes da média e do correspondente desvio padrão relativo de um ensaio independente com seis repetições para cada concentração.

#### 4.4.2 Avaliação qualitativa da diferenciação de hMSCs por coloração com Azul de Toluidina e Safranina-O/*Fast Green*

As culturas celulares realizadas na presença das CNPs de alforreca e tubarão azul em meio com (Meio +) e sem (Meio -) TGF- $\beta$ 1 e dexametasona foram estudadas por métodos histoquímicos através do uso de Azul de Toluidina e Safranina-O/*Fast Green*. A coloração de tecidos cartilagosos e condrogénicos com o Azul de Toluidina é um procedimento bem estabelecido para a avaliação histológica. Por ser um corante catiónico, apresenta afinidade para

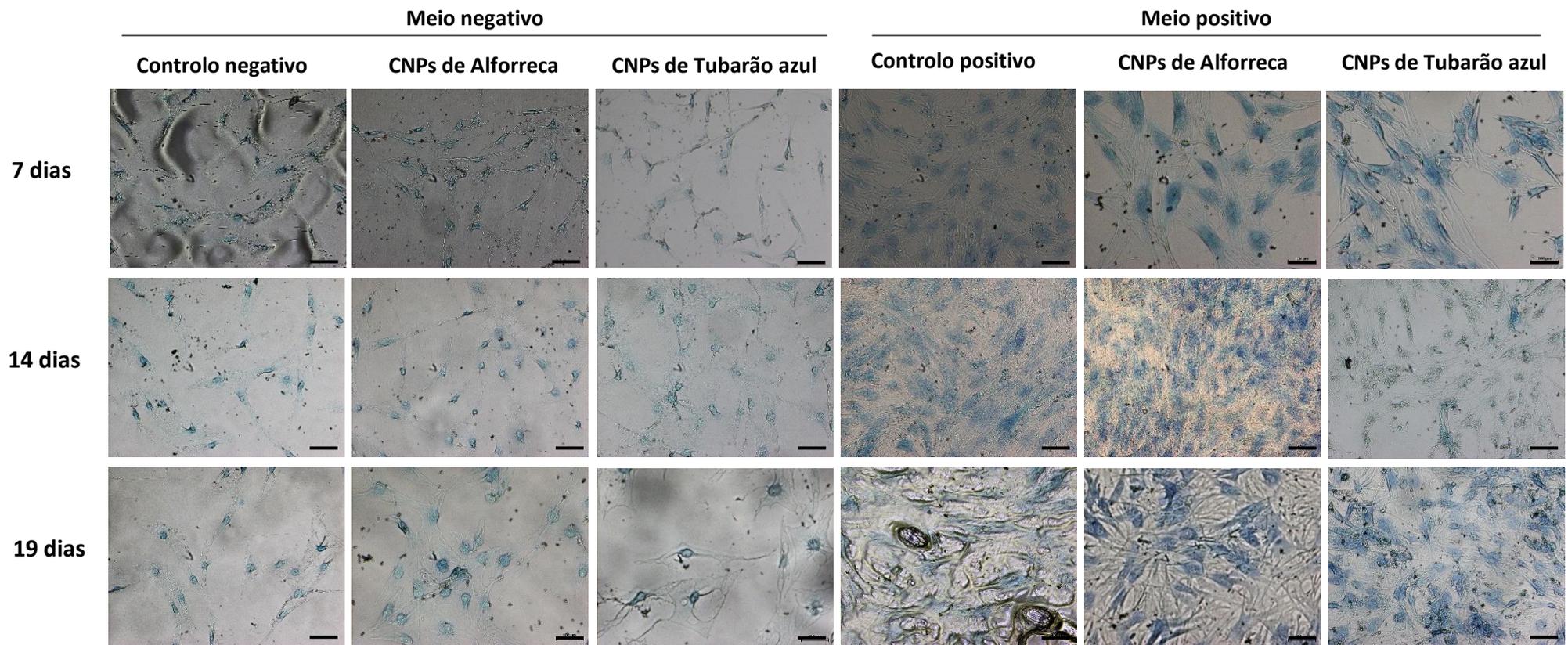
as cargas negativas dos grupos sulfato dos proteoglicanos. A coloração com este corante é metacromática, aparecendo o citoplasma celular a azul claro e os núcleos a um azul mais escuro, enquanto que a matriz extracelular aparece normalmente a rosa claro ou violeta. O corante Safranina-O também é um corante catiónico que se liga aos proteoglicanos, apresentando variações nos tons de vermelho. A intensidade da Safranina-O pode ser, regra geral, correlacionada com o conteúdo de GAGs, embora a presença de outros corantes que com ela competam para a ligação a essas moléculas possa interferir no processo [179]. O *Fast Green* é habitualmente usado em conjunto com a Safranina-O sobretudo para se obter um contraste na imagem (as zonas sem proteoglicanos aparecem a verde). Neste trabalho, as análises histoquímicas foram apenas usadas para uma avaliação qualitativa do processo de condrogénese que se desenrolou *in vitro*.

Os resultados dos estudos histoquímicos estão resumidos na **Figura 20** e na **Figura 21** para a coloração com Azul de Toluidina e Safranina-O/*Fast Green*, respetivamente. É possível observar que, em ambos os casos, as células que passaram pelo processo de diferenciação em meio positivo proliferaram mais do que as células que passaram pelo processo em meio negativo. Este resultado é bastante interessante e, muito provavelmente, deve-se à presença do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1. A família de fatores de crescimento TGF- $\beta$  tem sido muito estudada no que respeita ao seu efeito no comportamento celular. De facto, a literatura mostra que este fator de crescimento pode ter um efeito pró-proliferativo nas células, dependendo do tipo celular em questão e da sua concentração no meio de cultura [180].

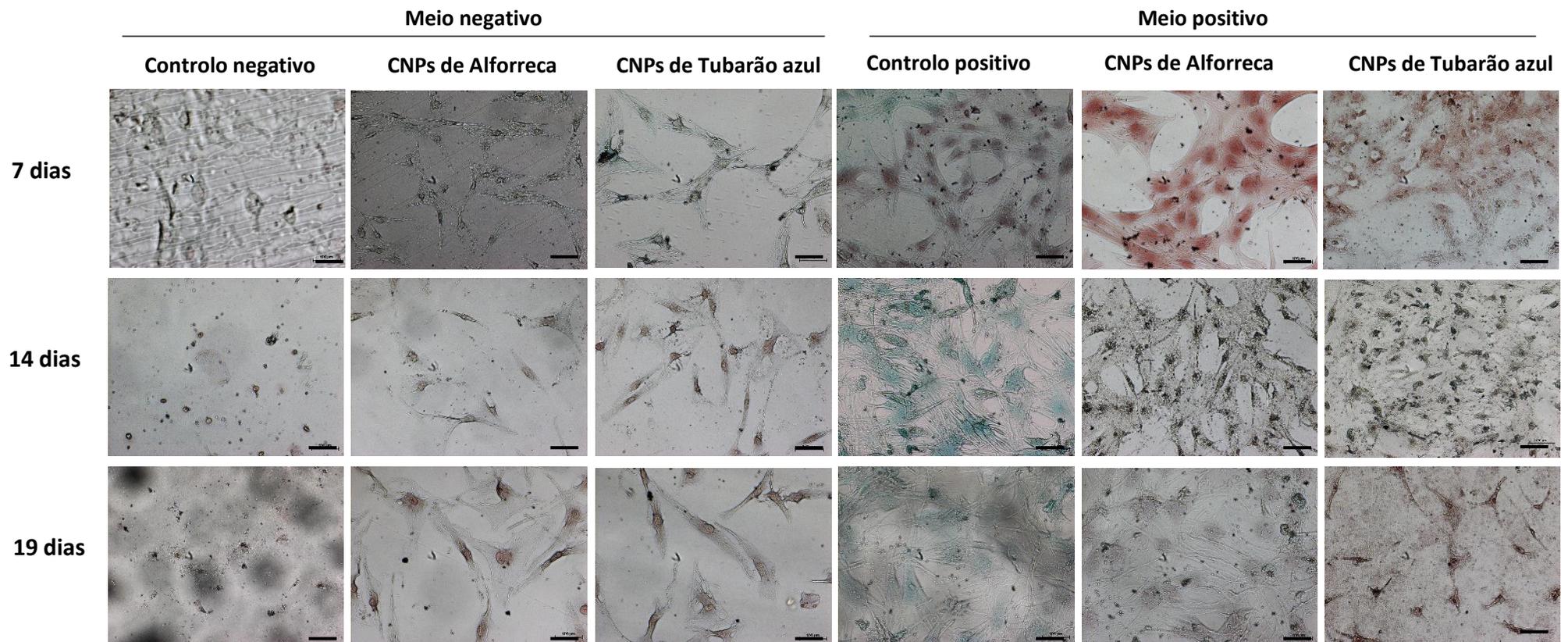
Na Figura 20 relativa à coloração com Azul de Toluidina, em termos gerais, é notório o aumento na extensão da coloração azul com a introdução de TGF- $\beta$ 1 e dexametasona no meio de cultura (Meio +). Esta coloração assinala que há maior produção de proteoglicanos pelas células. Este resultado não é de estranhar já que este é um meio indutor da diferenciação celular condroblástica. O mesmo acontece com a coloração com Safranina-O (Figura 21), neste caso notando-se apenas um ligeiro aumento na tonalidade laranja/vermelha das culturas celulares quando se muda do Meio (-) para o Meio (+). Na realidade, as experiências histoquímicas não são muito conclusivas quanto à extensão do processo de diferenciação que ocorreu em cultura, nomeadamente até no que respeita à evolução ocorrida ao longo do tempo (dos 7 aos 19 dias). Contudo, é claro que a presença das CNPs de alforreca e tubarão azul não influenciam negativamente o processo de diferenciação celular, ou seja, este ocorre mesmo na sua presença.

A dificuldade de interpretar as imagens das experiências histoquímicas poderá dever-se, de facto, a uma limitada diferenciação celular devido à cultura das células estar a ser feita em condições 2D. Normalmente, um sistema em 3D apresenta melhores resultados em

condrogénese por criar um microambiente mais favorável para a proliferação e diferenciação celular [181].



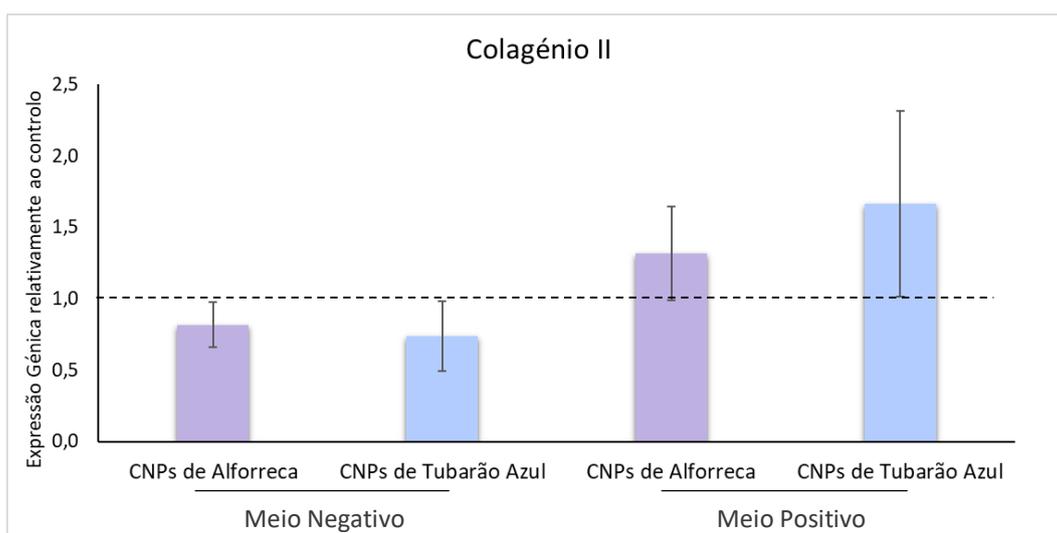
**Figura 20** - Avaliação do teor de proteoglicanos pela coloração com Azul de Toluidina em hMSCs com CNPs de alforreca e tubarão azul durante a condrogênese nos dias 7, 14 e 19. Escala de 100  $\mu$ m



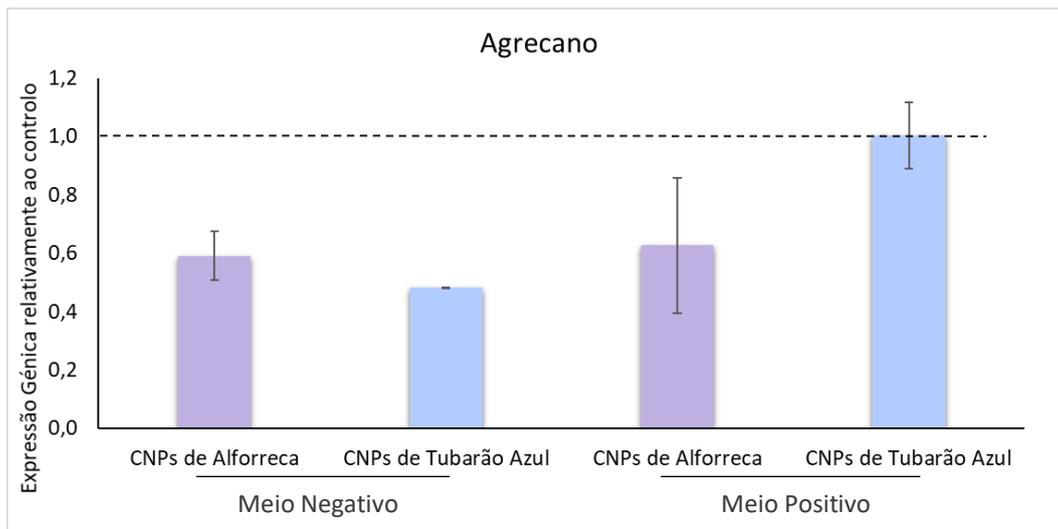
**Figura 21** - Avaliação do teor de colagénio tipo II e proteoglicanos pela coloração com Safranina-O/*Fast Green* em hMSCs com CNPs de alforreca e tubarão azul durante a condrogénese nos dias 7, 14 e 19. Escala de 100  $\mu$ m.

#### 4.4.3 Análise por RT-qPCR

A expressão de determinados genes pelas células pode dar uma medida quantitativa da extensão da sua diferenciação. Neste trabalho, estudou-se por RT-qPCR a expressão génica do agregcano (um tipo de proteoglicano) e do colagénio do tipo II que são biomoléculas características do tecido cartilaginoso. A análise da expressão destes dois genes nas células cultivadas na presença das CNPs (de ambos os organismos) foi realizada em relação à expressão desses genes em células não expostas às CNPs, ou seja, as respetivas experiências de controle (quantificação relativa, tendo o gene da GAPDH sido usado como referência e o método de Livak usado nos cálculos). As **Figura 22** e **Figura 23** mostram, então, gráficos em que os resultados aparecem como o número de vezes em que a expressão génica do colagénio II e do agregcano é maior relativamente ao valor determinado para a experiência controle (valores superiores a 1 significam que há maior expressão dos genes relativamente ao controle; valores inferiores a 1 significam que há uma menor expressão dos genes relativamente ao controle).



**Figura 22** - Expressão génica de Colagénio II por RT-qPCR em hMSCs que passaram pelo processo de diferenciação na presença de CNPs de alforreca e tubarão azul, em meio com (Meio +) e sem (Meio -) TGF- $\beta$ 1 e dexametasona.



**Figura 23** - Expressão génica de Agrecano por RT-qPCR em hMSCs que passaram pelo processo de diferenciação na presença de CNPs de alforreca e tubarão azul, em meio com (Meio +) e sem (Meio -) TGF- $\beta$ 1 e dexametasona.

Assim, pela análise dos gráficos, vemos que a expressão de colagénio tipo II e agrecano não é afetada de forma significativa com a presença das CNPs relativamente ao controle, em particular quando o processo de diferenciação ocorre num meio contendo TGF- $\beta$ 1 e dexametasona (Meio +), ou seja, indutor da diferenciação. Os dados provenientes da análise por RT-qPCR são, assim, concordantes com os obtidos pela avaliação qualitativa colorimétrica com Azul de Toluidina e Safranina-O/Fast Green, na medida em que mostram que as CNPs não impedem a diferenciação celular condroblástica.

## 5. Conclusão e Trabalho Futuro

O objetivo principal desta Tese de Mestrado foi a criação de nanosistemas para futura entrega de fatores de crescimento em aplicações de engenharia de tecido cartilaginoso. Para o efeito, foi utilizado colagénio proveniente de fontes marinhas, como a alforreca (*Rhizostoma pulmo*) e o tubarão azul (*Prionace glauca*), e a síntese das NPs ocorreu por meio de um método de emulsão e reticulação com posterior recurso a ultrassons. As partículas sintetizadas com o colagénio de alforreca e tubarão azul apresentaram diâmetros hidrodinâmicos de, respetivamente,  $453 \pm 23$  nm e  $634 \pm 18$  nm. No entanto, na análise feita às partículas de colagénio de tubarão por microscopia de transmissão (amostras desidratadas), verificou-se que estas tinham uma forma elíptica e que apresentavam dimensões na gama 200-300nm (eixo maior). Ambos os tipos de CNPs apresentaram um potencial Zeta negativo e boa citocompatibilidade. Por outro lado, a presença das CNPs pareceu não impedir a diferenciação condroblástica das hMSCs.

De acordo com os resultados apresentados, as CNPs de alforreca e tubarão azul produzidas são promissoras para o tratamento da cartilagem articular, uma vez que possuem uma boa biocompatibilidade, baixa citotoxicidade quando aplicados nas hMSCs e ainda possibilitam a diferenciação celular condrogénica com uma grande viabilidade celular.

No futuro, pretende-se utilizar colagénio hidrolisado (com menor peso molecular) por forma a tentar diminuir o tamanho das nanopartículas e, após a realização de testes de caracterização físico-química e biológica idênticos aos efetuados no presente trabalho, pretende-se ainda testar os sistemas para a encapsulação e entrega nas hMSCs do fator de crescimento IGF-1 que tem sido apontado como tendo efeitos anabólicos a nível da cartilagem.



## 6. Referências Bibliográficas

1. Fox AJS, Bedi A, Rodeo A S. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition and Function. *Sport Heal Orthop*. 2009;1:461–8.
2. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix Biol*. 2018;71–72:51–69.
3. Junqueira L, Carneiro J. Cartilage. In: Mescher AL, editor. *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas*. 14th ed. McGraw-Hill Education; 2016. p. 129–37.
4. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*. 2008;87:77–95.
5. Ham AW, Cormack DH. Tendones, ligamentos y cartílago. In: *Tratato de Histología*. 8ª Ed. Interamericana; 1975. p. 410–537.
6. Ross MH, Pawlina W. Connective Tissue and Cartilage. In: *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 158–217.
7. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage: biomechanics, structure, functions and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays*. 1995;17:1039–48.
8. Wachsmuth L, Söder S, Fan Z, Finger F, Aigner T. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol*. 2006;21:477–85.
9. Loeser RF. Connective tissue structure and function. In: Goldman L, Schafer AI, editors. *Goldman's Cecil Medicine*. 24th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. p. 1895–900.
10. Buckwalter A. Articular Cartilage: Injuries and Potential for Healing. *J Orthop Sport Phys Ther*. 1998;28:192–202.
11. Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, et al. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*. 2002;50:1049–58.
12. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Cartilaginoso. In: Affonso J, Dionysio MF, editors. *Histologia Básica Texto & Atlas*. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 126–30.
13. Maroudas A, Wachtel E, Grushko G, Katz EP, Weinberg P. The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage. *BBA - Gen Subj*. 1991;1073:285–94.
14. Linn FC, Sokoloff L. Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. *Arthritis Rheum*. 1965;8:481–94.
15. Vazquez-Portalatin N, Kilmer CE, Panitch A, Liu JC. Characterization of Collagen Type I and II Blended Hydrogels for Articular Cartilage Tissue Engineering. *Biomacromolecules*. 2016;17:3145–52.
16. Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, Laverty S, Mwale F, Kojima T, et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:78–82.
17. Gorgieva S, Kokol V. Collagen- vs Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. In: Pignatello R, editor. *Biomaterials Applications for*

- Nanomedicine. InTech; 2011. p. 18–52.
18. Szpak P. Fish bone chemistry and ultrastructure: Implications for taphonomy and stable isotope analysis. *J Archaeol Sci.* 2011;38:3358–72.
  19. Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cells Mater.* 2006;12:92–101.
  20. Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Adv Protein Chem.* 2005;70:437–61.
  21. Yeo GC, Keeley FW, Weiss AS. Coacervation of tropoelastin. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;167:94–103.
  22. Kozel BA, Rongish BJ, Czirok A, Zach J, Little CD, Davis EC, et al. Elastic Fiber Formation: A Dynamic View of Extracellular Matrix Assembly Using Timer Reporters. *J Cell Physiol.* 2006;207:87–96.
  23. Wise SG, Weiss AS. Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:494–7.
  24. Sun Q, Zhang L, Xu T, Ying J, Xia B, Jing H, et al. Combined use of adipose derived stem cells and TGF- $\beta$ 3 microspheres promotes articular cartilage regeneration in vivo. *Biotech Histochem.* 2018;93:1–9.
  25. Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem.* 1998;258:1–18.
  26. Thomson J, Singh M, Eckersley A, Cain SA, Sherratt MJ, Baldock C. Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;89:109–17.
  27. Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev.* 2007;81:229–40.
  28. Yanagisawa H, Davis EC. Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:1084–93.
  29. Kielty CAYM, Sherratt MJ, Marson A, Baldock C. Fibrillin microfibrils. *Adv proteins Chem.* 2005;70:405–36.
  30. Kielty CM. Fell-Muir Lecture: Fibrillin microfibrils: structural tensometers of elastic tissues? *Int J Exp Pathol.* 2017;98:172–90.
  31. Piha-Gossack A, Sossin W, Reinhardt DP. The evolution of extracellular fibrillins and their functional domains. *PLoS One.* 2012;7:2–4.
  32. Benjamin M, Ralphs JR. Biology of Fibrocartilage Cells. *Int Rev Cytol.* 2004;233:1–45.
  33. Buckwalter JA. Mechanical Injuries of Articular Cartilage. *Iowa Orthop J.* 1992;12:50–7.
  34. Buckwalter JA. Articular Cartilage Injuries. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;402:21–37.
  35. Martin JA, Brown T, Heiner A, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology.* 2004;41:479–91.
  36. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology.* 2000;37:129–40.
  37. Buckwalter JA, Marsh JL, Brown T, Amendola A, Martin JA. Articular Cartilage Injury. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, editors. Principles of Tissue Engineering. Fourth Edi. Elsevier; 2014. p. 1253–1266.

38. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, et al. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. 2000;381:205–12.
39. Kessler MW, Grande DA. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis*. 2008;4:28–32.
40. Vinatier C, Guicheux J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann Phys Rehabil Med*. 2016;59:139–44.
41. Henry M. Kronenberg. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003;423:332–6.
42. Melrose J, Shu C, Whitelock JM, Lord MS. The cartilage extracellular matrix as a transient developmental scaffold for growth plate maturation. *Matrix Biol*. 2016;52–54:363–83.
43. Caine D, DiFiori J, Maffulli N. Physeal injuries in children’s and youth sports: Reasons for concern? *Br J Sports Med*. 2006;40:749–60.
44. Valdes AM, Stocks J. Osteoarthritis and Ageing. *EMJ*. 2018;3:116–23.
45. Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology*. 2002;3:257–64.
46. Pacca DM, De-campos GC, Zorzi AR, Chaim EA, De-miranda JB, Constantino G. Prevalência de dor articular e osteoartrite na população obesa brasileira. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2018;31:1–4.
47. Krasnokutsky S, Attur M, Palmer G, Samuels J, Abramson SB. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2008;16:6–8.
48. Junker S, Frommer KW, Krumbholz G, Tsiklauri L, Gerstberger R, Rehart S, et al. Expression of adipokines in osteoarthritis osteophytes and their effect on osteoblasts. *Matrix Biol*. 2017;62:75–91.
49. OMS. Chronic diseases and health promotion. Disponível em <https://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>. 2019. Acedido em 26/05/2019.
50. Sociedade Portuguesa de Reumatologia. EpiReumaPt. Disponível em <https://www.spreumatologia.pt/noticias/epireumapt/73>. 2014. Acedido em 29/05/2019.
51. Organização das Nações Unidas. World population to 2300. Disponível em <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/trends/WorldPop2300final.pdf>. 2004. Acedido em 30/05/2019.
52. Rezende MU, Campos GC, Pailo AF. Conceitos atuais em osteoartrite. *Acta Ortop Bras*. 2013;21:120–2.
53. Lotz MK. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:1–9.
54. Pelletier J, Martel-pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an Inflammatory Disease Potential Implication for the Selection of New Therapeutic Targets. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1237–47.
55. Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011;377:2115–26.
56. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ*. 2006;332:639–42.

57. Felson DT, Lohmander LS. Whither osteoarthritis biomarkers? *Osteoarthr Cartil.* 2009;17:419–22.
58. Meulenbelt I. Osteoarthritis year 2011 in review: genetics. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20:218–22.
59. McInnes IB, Schett G. Mechanism of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365:2205–19.
60. Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. *Am J Med.* 2007;120:936–9.
61. Shah A, St. Clair EW. Rheumatoid Arthritis. In: Jameson JL, Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 20th ed. McGraw-Hill Education; 2018. p. 2527–40.
62. Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa: Programa Nacional Contra as Doenças Reumáticas. *Direção Geral da Saúde.* 2004;12/DGCG.
63. Arthritis Foundation. Arthritis by the Numbers. *Arthritis Found.* 2017;1–70.
64. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2016;388:2023–38.
65. Cutolo M, Kitis GD, van Riel PLCM. Burden of disease in treated rheumatoid arthritis patients: Going beyond the joint. *Semin Arthritis Rheum.* 2014;43:479–88.
66. Sociedade Portuguesa de Reumatologia. Como se trata? [Internet]. 2013.
67. Vilela CA, Correia C, Oliveira JM, Sousa RA, Espregueira-Mendes J, Reis RL. Cartilage Repair Using Hydrogels: A Critical Review of in Vivo Experimental Designs. *ACS Biomater Sci Eng.* 2015;1:726–39.
68. Hunziker EB, Lippuner K, Keel MJB, Shintani N. An educational review of cartilage repair: precepts & practice - myths & misconceptions - progress & prospects. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23:334–50.
69. Dhinsa BS, Adesida A. Current Clinical Therapies for Cartilage Repair, their Limitation and the Role of Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012;7:143–8.
70. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr Cartil.* 2001;10:432–63.
71. Beris AE, Lykissas MG, Papageorgiou CD, Georgoulis AD. Advances in articular cartilage repair. *Injury.* 2005;36:14–23.
72. Erggelet C, Vavken P. Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint – A golden standard? *J Clin Orthop Trauma.* 2016;7:145–52.
73. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Oper Tech Orthop.* 1997;7:300–4.
74. Gudas R, Stankevičius E, Monastyreckiene E, Pranys D, Kalesinskas RJ. Osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint in athletes. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2006;14:834–42.
75. Levy AS, Lohnes J, Sculley S, LeCroy M, Garrett W. Chondral delamination of the knee in soccer players. *Am J Sports Med.* 1996;24:634–9.

76. Buckwalter JA, Lohmander S. Operative treatment of osteoarthritis: current practice and future development. *J Bone Jt Surg*. 1994;76A:1405–8.
77. Mithoefer K, Williams RJ, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, et al. The Microfracture Technique for the Treatment of Articular Cartilage Lesions in the Knee. *J Bone Jt Surg Am*. 2005;87:1911–20.
78. Erggelet C, Mandelbaum BR. Operative Treatment of Articular Cartilage Defects. In: Volkert G, Elster P, editors. *Principles of Cartilage Repair*. 1st ed. Alemanha: Springer; 2008. p. 44–60.
79. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW, Roughley PJ, Lee C. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cells Mater*. 2005;9:23–32.
80. Nakajima H, Goto T, Horikawa O, Kikuchi T, Shinmei M. Characterization of the cells in the repair tissue of full-thickness articular cartilage defects. *Histochem Cell Biol*. 2002;109:331–8.
81. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Jt Surg Am*. 1993;75A:532–53.
82. Akizuki S, Yasukawa Y, Takizawa T. Does arthroscopic abrasion arthroplasty promote cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation? A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone. *Arthroscopy*. 1997;13:9–17.
83. Beiser I, Kanat I. Subchondral bone drilling: a treatment for cartilage defects. *J Foot Surg*. 1990;29:595–601.
84. Gao L, Goebel LKH, Orth P, Cucchiaroni M, Madry H. Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. *Dis Model Mech*. 2018;11:1–12.
85. Sledge SL. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. *Clin Sport Med*. 2001;20:365–77.
86. Goldberg A, Mitchell K, Soans J, Kim L, Zaidi R. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: A systematic review. *J Orthop Surg Res*. 2017;12:1–31.
87. Carranza-Bencano A, Perez-Tinao M, Ballesteros-Vazquez P, Armas-Padron JR, Hevia-Alonso A, Martos Crespo F. Comparative study of the reconstruction of articular cartilage defects with free costal perichondrial grafts and free tibial periosteal grafts: An experimental study on rabbits. *Calcif Tissue Int*. 1999;65:402–7.
88. Hangody L, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: Ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2003;85:25–32.
89. Quinn TM, Grodzinsky AJ, Hunziker EB, Sandy JD. Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants. *J Orthop Res*. 1998;16:490–9.
90. Tibesku CO, Szuwart T, Kleffner TO, Schlegel PM, Jahn UR, Van Aken H, et al. Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J Orthop Res*. 2004;22:1210–4.
91. Baumbach K, Petersen JP, Ueblacker P, Schröder J, Göpfert C, Stork A, et al. The fate of

- osteochondral grafts after autologous osteochondral transplantation: A one-year follow-up study in a minipig model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2008;128:1255–63.
92. Kock NB, Hannink G, van Kampen A, Verdonschot N, van Susante JLC, Buma P. Evaluation of subsidence, chondrocyte survival and graft incorporation following autologous osteochondral transplantation. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2011;19:1962–70.
  93. Gross AE. Cartilage resurfacing: Filling defects. *J Arthroplasty.* 2003;18:14–7.
  94. Zouzas IC, Bugbee WD. Osteochondral allograft transplantation in the knee. *Sports Med Arthrosc.* 2016;24:79–84.
  95. Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;367:147–55.
  96. Barreto RB, Pécora JR, Gobbi RG, Rezende MU, Camanho GL. Transplante Autólogo de Condrócitos. *Acta Ortop Bras.* 2011;19:219–25.
  97. Brittberg M, Lindahl A, Nilson 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.
  98. Jones CW, Willers C, Keogh A, Smolinski D, Fick D, Yates PJ, et al. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation in sheep: Objective assessments including confocal arthroscopy. *J Orthop Res.* 2008;26:292–303.
  99. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 2002;18:730–4.
  100. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu F-P, Martin TD, Spector M. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *J Orthop Res.* 2000;18:790–9.
  101. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16:381–90.
  102. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2:373–82.
  103. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:726–36.
  104. Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Its Clinical Applications. *Yonsei Med J.* 2004;45:41–7.
  105. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15:226–31.
  106. Shintani N, Hunziker EB. Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: Influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. *Eur Cells Mater.* 2011;22:302–20.
  107. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998;238:265–72.
  108. Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated

- chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J bone Jt surgery*. 1968;50:184–97.
109. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc*. 2009;17:561–77.
  110. Kerker JT, Leo AJ, Sgaglione NA. Cartilage Repair: Synthetics and Scaffolds. *Sport Med Arthrosc*. 2008;16:208–16.
  111. Chajra H, F Rousseau C, Cortial D, C Ronzière M, Herbage D, Mallein-Gerin F, et al. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. *Biomed Mater Eng*. 2008;18:S33-45.
  112. Ahmed TAE, Dare E V., Hincke M. Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14:199–215.
  113. Weidenbecher M, Henderson JH, Tucker HM, Baskin JZ, Awadallah A, Dennis JE. Hyaluronan-based scaffolds to tissue-engineer cartilage implants for laryngotracheal reconstruction. *Laryngoscope*. 2007;117:1745–9.
  114. Pulliainen O, Vasara AI, Hyttinen MM, Tiitu V, Valonen P, Kellomäki M, et al. Poly-L-D-Lactic Acid Scaffold in the Repair of Porcine Knee Cartilage Lesions. *Tissue Eng*. 2007;13:1347–55.
  115. Li WJ, Chiang H, Kuo TF, Lee H., Jiang C. Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3:1–10.
  116. Ikeda R, Fujioka H, Nagura I, Kokubu T, Toyokawa N, Inui A, et al. The effect of porosity and mechanical property of a synthetic polymer scaffold on repair of osteochondral defects. *Int Orthop*. 2009;33:821–8.
  117. Funayama A, Niki Y, Matsumoto H, Maeno S, Yatabe T, Morioka H, et al. Repair of full-thickness articular cartilage defects using injectable type II collagen gel embedded with cultured chondrocytes in a rabbit model. *J Orthop Sci*. 2008;13:225–32.
  118. Oseni AO, Crowley C, Boland MZ, Butler PE, Seifalian AM. Cartilage tissue engineering: the application of nanomaterials and stem cell technology. In: Eberli D, editor. *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*. InTech; 2011. p. 233–66.
  119. van den Berg WB, van der Kraan PM, Scharstuhl A, van Beuningen HM. Growth Factors and Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;391:244–50.
  120. Forriol F. Growth factors in cartilage and meniscus repair. *Injury*. 2009;40:S12–6.
  121. Tumia NS, Johnstone AJ. Regional regenerative potential of meniscal cartilage exposed to recombinant insulin-like growth factor-I in vitro. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86-B:1077–81.
  122. Marini RP, Martin I, Stevens MM, Langer R, Shastri VP. FGF-2 enhances TGF- $\beta$ 1-induced periosteal chondrogenesis. *J Orthop Res*. 2004;22:1114–9.
  123. Vincent T, Hermansson M, Bolton M, Wait R, Saklatvala J. Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:8259–64.
  124. Freyria AM, Mallein-Gerin F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Injury*. 2012;43:259–65.

125. van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van Den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: Relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthr Cartil.* 2002;10:631–7.
126. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME. A recombinant human TGF- $\beta$ 1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res.* 1999;250:485–98.
127. Weisser J, Rahfoth B, Timmermann A, Aigner T, Bräuer R, Von der Mark K. Role of growth factors in rabbit articular cartilage repair by chondrocytes in agarose. *Osteoarthr Cartil.* 2001;9:48–54.
128. Fortier LA, Lust G, Mohammed HO, Nixon AJ. Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res.* 1999;17:467–74.
129. Douchis JS, Goomer RS, Harwood FL, Khatod M, Coutts RD, Amiel D. Chondrogenic phenotype of perichondrium-derived chondroprogenitor cells is influenced by transforming growth factor-beta 1. *J Orthop Res.* 1997;15:803–7.
130. Hunziker EB, Driesang IMK, Morris EA. Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:171–81.
131. Neves AR, Reis S. Importance and Application of Nanotechnology for Improving Existing Therapy. In: Neves AR, Reis S, editors. *Nanoparticles in Life Sciences and Biomedicine.* 1st ed. Pan Stanford Publishing; 2018. p. 3–6.
132. Kelsall RW, Hamley IW, Geoghegan M. Generic methodologies for nanotechnology: classification and fabrication. In: Kelssa R, Hamley I, Geoghegan M, editors. *Nanoscale Science and Technology.* 1st ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd; 2005. p. 1–54.
133. Jr CPP, Owens FJ. Introduction. In: Jr CPP, Owens FJ, editors. *Introduction to Nanotechnology.* 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2003. p. 1–7.
134. Rathod KB, Patel MB, Parmar PK, Kharadi SR, Patel P V., Patel KS. Glimpses of current advances of nanotechnology in therapeutics. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3:8–12.
135. Saini R, Saini S, Sharma S. Nanotechnology: The future medicine. *J Cutan Aesthet Surg.* 2010;3:32.
136. Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg Neurol.* 2004;61:216–20.
137. Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano.* 2009;3:16–20.
138. Zhang LG, Li J, Lee JD. Nanotechnology for cartilage and bone regeneration. In: Webster TJ, editor. *Nanomedicine Technologies and Applications.* 1st ed. The George, Washington University, USA: Woodhead Publishing; 2012. p. 571–98.
139. Brown S, Pistiner J, Adjei IM, Sharma B. Nanoparticle Properties for Delivery to Cartilage: The Implications of Disease State, Synovial Fluid, and Off-Target Uptake. *Mol Pharm.* 2019;16:469–79.
140. Kang ML, Ko JY, Kim JE, Im G II. Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration. *Biomaterials.* 2014;35:9984–94.

141. Li HJ, Xu XF, Gong M, Qiu B. Chitosan-p CrmA nanoparticles protect against cartilage degradation of osteoarthritis in a rabbit model. *Int J Clin Exp Med*. 2018;11:11619–30.
142. Geiger BC, Wang S, Padera RF, Grodzinsky A., Hammond PT. Cartilage-penetrating nanocarriers improve delivery and efficacy of growth factor treatment of osteoarthritis. *Sci Transl Med*. 2018;10:1–13.
143. Hamed L, Laurent G, Michèle L, François S., Pierre G, Patrick N, et al. Hyaluronate-Covered Nanoparticles for the Therapeutic Targeting of Cartilage. *Biomacromolecules*. 2007;8:3879–85.
144. Rothenfluh DA, Bermudez H, Neil CPO, Hubbell JA. Biofunctional polymer nanoparticles for intra-articular targeting and retention in cartilage. *Nat Mater*. 2008;7:1–7.
145. Shi D, Xu X, Ye Y, Song K, Cheng Y, Di J, et al. Photo-cross-linked scaffold with kartogenin-encapsulated nanoparticles for cartilage regeneration. *ACS Nano*. 2016;10:1292–9.
146. Campos WNS, Marangoni VS, Sonogo DA, Andrade MA, Colodel EM, de Souza RL. Synthesis and characterization of gold nanoparticles combined with curcumin and its effect on experimental osteoarthritis in mice. *Osteoarthr Cartil*. 2015;23:A397.
147. Wang J, Wang X, Cao Y, Huang T, Song DX, Tao HR. Therapeutic potential of hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for the delivery of curcuminoid in knee osteoarthritis and an in vitro evaluation in chondrocytes. *Int J Mol Med*. 2018;42:2604–14.
148. Pan Y, Xiong D, Gao F. Viscoelastic behavior of nano-hydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel biocomposites as an articular cartilage. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19:1963–9.
149. Silva TH, Alves A, Ferreira BM, Oliveira JM, Reys LL, Ferreira RJF, et al. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *Int Mater Rev*. 2012;57:276–306.
150. Kreuter J, Muller W, Swatschek D, Schatton W, Schatton M. Method for isolating sponge collagen and producing nanoparticulate collagen, and the use thereof. United States Patent Application Publication. USA; 0032601 A1, 2003.
151. Swatschek D, Schatton W, Muller WEG, Kreuter J. Microparticles derived from marine sponge collagen (SCMPs): preparation, characterization and suitability for dermal delivery of all- trans retinol. *Eur J Pharm Biopharm*. 2002;54:125–33.
152. Ramos AP. Dynamic Light Scattering Applied to Nanoparticle Characterization. In: Róz AL, Ferreira M, Leite FL, Jr ONO, editors. *Nanocharacterization Techniques*. 1st ed. Ribeirão Preto: Elsevier Inc.; 2017. p. 99–110.
153. Chaves LL, Vieira AC, Ferreira D, Sarmiento B, Reis S, Lima SAC. Nanocarriers as a Strategy for Oral Bioavailability Improvement of Poorly Water-Soluble Drugs. In: Neves AR, Reis S, editors. *Nanoparticles in Life Sciences and Biomedicine*. 1st ed. Pan Stanford Publishing; 2018. p. 9–44.
154. Palmieri V, Lucchetti D, Gatto I, Maiorana A, Marcantoni M, Maulucci G, et al. Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool. *J Nanoparticle Res*. 2014;16:2–8.
155. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337–51.

156. Klang V, Valenta C, Matsko NB. Electron microscopy of pharmaceutical systems. *Micron*. 2013;44:45–74.
157. Joshi M, Bhattacharyya A, Ali SW. Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. *Indian J Fibre Text Res*. 2008;33:304–17.
158. Borra RC, Lotufo MA, Gagiotti SM, Barros FM, Andrade PM. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Histol Braz Oral Res Braz Oral Res*. 2009;23:255–62.
159. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143–7.
160. Sengstock C, Diendorf J, Epple M, Schildhauer TA, Köller M. Effect of silver nanoparticles on human mesenchymal stem cell differentiation. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5:2058–69.
161. Solchaga LA, Penick KJ, Weter JF. Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Tips and Tricks. In: Vemuri MC, Chase LG, Rao MS, editors. *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*. 1st ed. Frederick: Humana Press; 2011. p. 253–78.
162. Jakobsen RB, Østrup E, Zhang X, Mikkelsen TS, Brinchmann JE. Analysis of the effects of five factors relevant to in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells using factorial design and high throughput mRNA-profiling. *PLoS One*. 2014;9:e96615.
163. Wescoe KE, Schugar RC, Chu CR, Deasy BM. The role of the biochemical and biophysical environment in chondrogenic stem cell differentiation assays and cartilage tissue engineering. *Cell Biochem Biophys*. 2008;52:85–102.
164. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:1.
165. Liu X, Liu J, Kang N, Yan L, Wang Q, Fu X, et al. Role of insulin-transferrin-selenium in auricular chondrocyte proliferation and engineered cartilage formation in Vitro. *Int J Mol Sci*. 2014;15:1525–37.
166. Tang X, Fan L, Pei M, Zeng L, Ge Z. Evolving concepts of chondrogenic differentiation: History, state-of-the-art and future perspectives. *Eur Cells Mater*. 2015;30:12–27.
167. Williams CG, Kim TK, Taboas A, Malik A, Manson P, Elisseeff J. In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Tissue Eng*. 2003;9:679–88.
168. Bergholt NL, Lysdahl H, Lind M, Foldager CB. A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage*. 2018;10:370–4.
169. Sridharan G, Shankar A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16:251.
170. Hyllested JL, Veje K, Ostergaard K. Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage-A review. *Osteoarthr Cartil*. 2002;10:333–43.
171. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques*. 1999;26:112–25.
172. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. *A-Z of*

- quantitative PCR. La Jolla, CA, USA: International University Line (IUL); 2004. p. 87–112.
173. Zhang L, Su P, Xu C, Yang J, Yu W, Huang D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: A comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett*. 2010;32:1339–46.
  174. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, Betz O, et al. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther*. 2005;12:219–28.
  175. Mackay AM, Beck, S C, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pitternger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 1998;4:415–28.
  176. Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284:411–8.
  177. Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, et al. BMP-2 induction and TGF- $\beta$ 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem*. 2001;81:284–94.
  178. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001;268:189–200.
  179. Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'Driscoll S, et al. Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage. *Tissue Eng*. 2006;12:2141–9.
  180. Zhang Y, Alexander PB, Wang XF. TGF- $\beta$  family signaling in the control of cell proliferation and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9:1–22.
  181. Betriu N, Sancho LR, Semino CE. Culturing mammalian cells in three-dimensional peptide scaffolds. *J Vis Exp*. 2018;136:1–6.



## FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

PEst-OE/QUI/UI0674/2019



Project M1420-01-0145-FEDER-000005-CQM†

