



# AVALIAÇÃO DE MORTE PROGRAMADA DE CÉLULAS

Fotos e ilustrações cedidas pelos autores  
Apoio: CNPq

## Comparação do Índice Apoptótico Progressivo em cultura de Condrócitos

### INTRODUÇÃO

Em todo mundo são gastos milhares de dólares todos os anos em tratamentos para reduzir sintomas de doenças sem cura efetiva. Os problemas ortopédicos que atingem em sua maioria idosos, são de grande importância econômica para a sociedade, pois requerem muitas intervenções cirúrgicas. Essas intervenções muitas vezes não obtêm os resultados bons esperados em longo prazo. Uma das formas para reduzir os gastos e melhorar a qualidade de vida do paciente, quanto a possíveis rejeições e incômodos com próteses, são os auto-transplantes, que se caracterizam pela retirada de material autólogo e, após a realização de cultura celular em laboratório, o re-implante<sup>1</sup>. Estas considerações se aplicam, entre outras, a transplantes de cartilagem em pacientes que apresentam doenças como a osteoartrite e a artrite reumatóide. Estas são doenças degenerativas, sem cura efetiva, apenas com tratamento sintomático e paliativo.

Os tratamentos que vêm sendo desenvolvidos, mais recentemente, envolvem a terapia celular. Esta terapia consiste em produzir a cartilagem articular "in vitro" para realização de transplantes autólogos, com a finalidade de regenerar o tecido lesado. A produção de tecido "in vitro" se faz a partir de células do próprio paciente e, como não há incompatibilidade imunológica, as chances de rejeição são extremamente reduzidas<sup>2</sup>.

Uma das formas de se realizar um transplante autólogo é utilizar condrócitos retirados da cartilagem do paciente. Os condrócitos devem ser cultivados em matriz tridimensional (scaffolds) para não perderem seu fenótipo, durante três a quatro semanas, e depois, transplantado para a área lesada<sup>3</sup>. Estudos anteriores demonstraram que o fenótipo dessa cartilagem teve alta variação, obtendo-se cartilagem do tipo hialina, fibrocartilagem e os dois tipos juntos<sup>4</sup>. Embora se verifique uma variação de fenótipo, a maioria dos transplantes feita em outras demonstrações aponta sucesso em cerca de 80%<sup>5</sup>. Esta taxa poderia ser melhorada se estudos induzisse não só a produção de matriz extracelular para formação do tecido, mas também a proliferação celular dos condrócitos, até porque, essas células estão sendo cultivadas em ambiente estranho, e podem apresentar morte celular precoce.



**Ilustração 01:** Pérola de alginato de sódio com células (aumento 20X)

Ainda assim, este tipo de transplante é contra-indicado em paciente com lesões provocadas por osteonecrose, condrocalcinose, osteoartrite, artrite reumatóide e meniscectomia total<sup>6</sup>.

Nos últimos três anos, com o avanço na tecnologia de células-tronco, um segundo tipo de cultivo celular vem sendo testado. Ele consiste em cultivar células-tronco mesenquimais e diferenciá-las em condrócitos. Essas células mesenquimais (ou células do estroma medular – CTMs) estão presentes na medula óssea em



**Ilustração 02:** Formação de grupos isógenos pelos condrócitos cultivados dentro da pérola de alginato de sódio

baixíssima quantidade (0,01% a 0,001% do total de mononucleares) e são capazes de serem diferenciadas (dependendo do ambiente local e estímulos tróficos) em condrócitos, osteoblastos, adi-

**Gabrielle Reinoldes Bizarria GUILHERME**  
Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Médica – gabrielle\_rbg@yahoo.com.br

**Aparecida Vitória de Gonçalves SOUZA**  
Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Médica – FMB-UNESP  
vitoriagsouza@yahoo.com.br

**Andrei MOROZ**  
Mestrando do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Médica – FMB-UNESP  
andreimoroz@terra.com.br

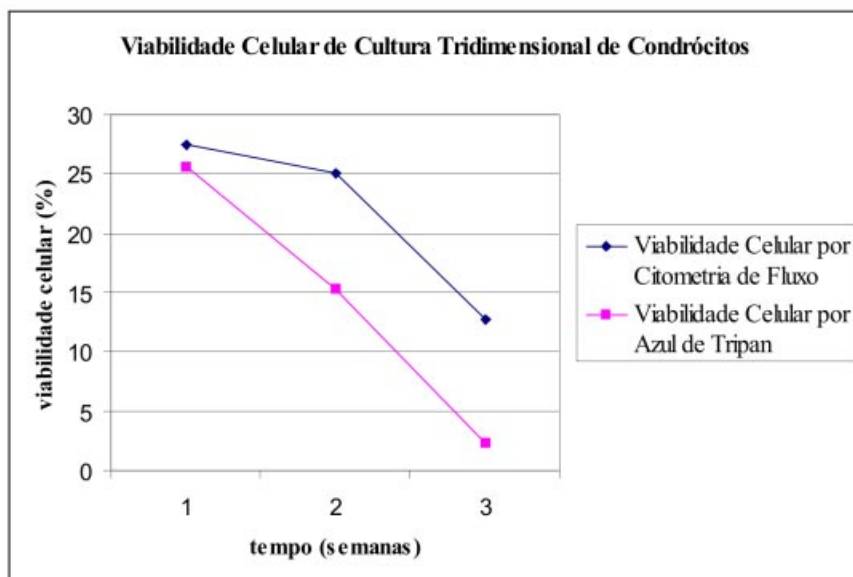
**Priscila MURADOR - Ms**  
Pesquisadora do Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina – UNESP  
pmurador@fmb.unesp.br

**Renata Aparecida de Camargo BITTENCOURT - Ms**  
Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ortopedia – FMB-UNESP  
Rencourt2000@yahoo.com.br

**Marjorie de Assis GOLIM – Dra**  
Pesquisadora do Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina – UNESP  
citometria@fmb.unesp.br

**Rosana ROSSI-FERREIRA – Profa. Dra.**  
Docente do Departamento de Ciências Biológicas – FC-UNESP – Bauru  
rossi@fc.unesp.br

**Elenice DEFFUNE – Profa. Dra.**  
Docente do Departamento de Urologia – FMB-UNESP – Botucatu  
ed12@fmb.unesp.br



**Gráfico 01:** Média das viabilidades celulares de cultura de condrocitos em pérola de alginato (tridimensional) durante 3 semanas de cultivo. Linha azul: viabilidade celular feita por citometria de fluxo e marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Linha rosa: viabilidade celular feita por corante de viabilidade (azul de tripan) e Câmara de Neubauer

pócitos e miócitos <sup>7</sup>.

A dificuldade existente nesta técnica é expandir as CTMs em laboratório para obtenção de cultura homogênea e facilitar a sua diferenciação em outros tipos celulares. Infelizmente, na literatura, é difícil de achar trabalhos básicos sobre isolamento, expansão e caracterização das CTMs, e a base do conhecimento sobre essas células que possuem pro-

balho, foi utilizada a matriz tridimensional de alginato de sódio. Essas células foram cultivadas em laboratório sem estímulo de proliferação como é descrito na literatura. Assim, observando a viabilidade celular em cultura tridimensional e a progressão de morte celular por apoptose podemos avaliar se essas células tem condições de serem re-implantadas em lesões de tecido cartilaginoso

Momento	Anexina V	Iodeto de Propídeo	Anexina V + PI
1ª semana	65,33%	36,56%	31,48%
2ª semana	64,76%	43,74%	37,77%
3ª semana	61,09%	73,58%	37,83%

**Tabela 01:** Análise das médias de expressão de anexina V e iodeto de propídeo nas culturas durante 3 semanas de cultivo

priedades muito intrigantes, é deixada de lado. A maioria trata sobre as possíveis diferenciações e transplantes.

O estudo da apoptose (morte celular programada) é importante pois, esse fenômeno pode ser desencadeado por estímulos diversos, presentes ou ausentes na cultura celular, como: hormônios ou fatores tróficos, toxinas, competição negativa entre as células, etc. Assim, ao analisarmos a extensão da progressão da apoptose, podemos corrigir a cultura com o que estiver faltando ou sobrando para as células.

Para o cultivo de condrocitos, neste tra-

balho, foi utilizada a matriz tridimensional de alginato de sódio. Essas células foram cultivadas em laboratório sem estímulo de proliferação como é descrito na literatura.

Para o cultivo de CTMs em monocamada, avaliamos dados básicos que, também, faltam na literatura como viabilidade celular ao longo da cultura, progressão do crescimento das CTMs durante a cultura de células mononucleadas do sangue de medula óssea, e a progressão da morte celular por apoptose.

Além de avaliar os índices de apoptose nas culturas celulares, ainda foi possível, ainda, comparar, duas técnicas de

viabilidade celular (1) a técnica mais amplamente utilizada para observação de viabilidade celular que consiste em usar o corante de viabilidade celular azul de Tripán junto com a Câmara de Neubauer; (2) e a técnica por marcação com anexina V (conjugada com FITC - isotiocianato) e iodeto de propídeo com posterior análise por Citometria de Fluxo.

## MATERIAL E MÉTODOS

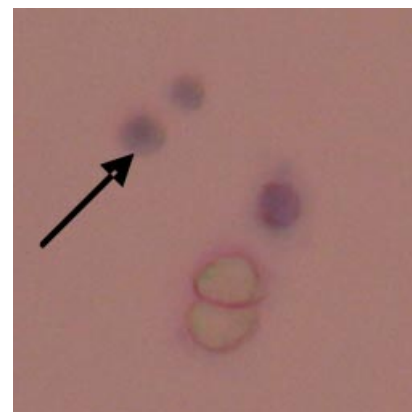
A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e os animais utilizados estavam sob cuidados no Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

### Coleta da cartilagem e processamento

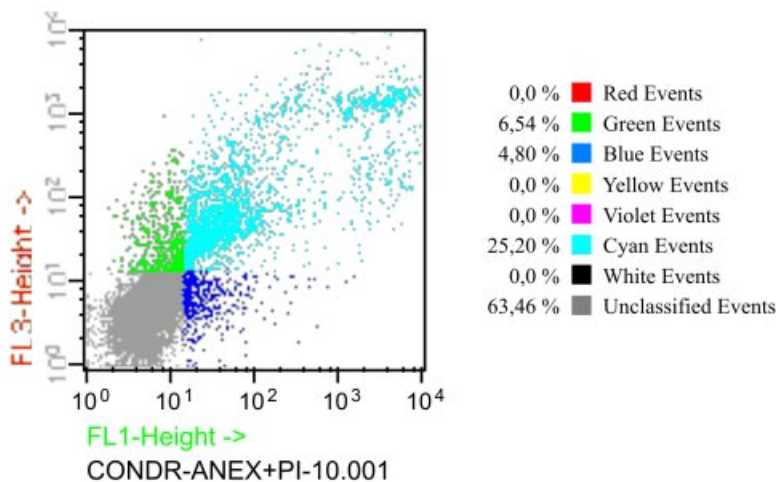
foram coletadas raspas de tecido cartilaginoso de coelhos machos. As amostras passaram por processamento em laboratório para destruição da matriz extracelular e liberação dos condrocitos. A digestão do tecido foi feita com incubação a 37°C por 45 minutos com tripsina a 0,25%, após a retirada da tripsina, foi feita nova incubação com hialuronidase na mesma condição anterior e por último, após a remoção da hialuronidase, o tecido foi incubado com colagenase tipo I em estufa a 37°C por 18 horas.

### Inclusão dos condrocitos em pérola de alginato

fez-se necessário o uso de matriz tridimensional para o cultivo de condrocitos, para esses não perderem seu fenótipo. Optou-se pelo hidrogel de alginato de sódio para realização de matriz tridimensional pois é um material reabsorvível, podendo ser re-implantado diretamente nos organismos. Para isto foi preparado uma solução de alginato de sódio 1,2% em cloreto de cálcio a 155mM. O pellet celular de condrocitos foi ressuspenso na solução de alginato de sódio e colocado em uma seringa de



**Ilustração 03:** Viabilidade celular por azul de tripan em Câmara de Neubauer. Células não viáveis estão coradas em azul



**Ilustração 04:** Condrócitos marcados com anexina V (FL1) e iodeto de propídeo (FL3). Em azul e ciano temos expressão de anexina V; em verde e ciano temos expressão de iodeto de propídeo, e somente o ciano representa a coexpressão de anexina V e iodeto de propídeo. A maior parte da cultura em cinza são as células que não expressaram os marcadores, sendo consideradas células viáveis. Ao lado, temos a legenda que mostra a porcentagem de cada cor (isto é cada expressão)

1mL. Foi feito o gotejamento da solução da seringa em cloreto de sódio a 55mM para a formação das pérolas de alginato. Essas foram cultivadas em meio DMEM Dulbecco's Modified Eagle Media Meio - GIBCO® suplementado com F-12 Nutrient Mixture (Ham) - GIBCO®, com troca a cada dois dias.

**Dissolução da pérola de alginato para liberação de condrócitos:** as pérolas de alginato foram incubadas a temperatura ambiente com citrato de sódio a 165mM por uma hora. Após centrifugação, o pellet celular formando foi ressuspenso em meio de cultura.

**Coleta de medula óssea e processamento:** foi retirado 5 mL de medula ós-



**Ilustração 05:** Aumento 20X. Três semanas de cultivo (após segunda passagem) das células mononucleadas da medula óssea. Na microscopia de luz contrastada observa-se o aumento da formação de colônias celulares (nos círculos).

sea da crista ilíaca de coelhos machos (com heparina para não coagular). O sangue foi processado em laboratório tendo suas células mononucleadas separadas por Ficoll-hypaque® densidade 1.077g/mL como descrito no protocolo de ZAGO e COVAS, 2006. As células mononucleadas foram cultivadas em frascos de 25cm<sup>2</sup> com meio Knockout-DMEM - GIBCO®.

**Tripsinização das culturas:** para “soltar” as CTMs que aderiram a placa, foi feito digestão enzimática com tripsina a 0,25% durante 2 minutos.

**Viabilidade celular por azul de tripan:** foram coletadas amostras de células e misturado (v:v) com azul de tripan 0,2%. A mistura foi colocada na Câmara de Neubauer para contagem celular.

**Viabilidade celular por marcação com anexina-V e iodeto de propídeo:** foi utilizado o KIT “ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT I” - BD Pharmingen™ e a marcação das células foi feita de acordo com as especificações do fabricante. A leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCALIBUR BD® e a análise em software PAINT-A-GATE da BD®.

**Marcação das CTM com anti-vimentina:** A vimentina é um componente intracelular de caracterização das CTM, portanto sua marcação é de extrema significância. A permeabilização celular foi feita com saponina a 1% por 15 minutos

a temperatura ambiente. Após a remoção da saponina por centrifugação, foi colocado o anticorpo monoclonal anti-vimentina e depois um anticorpo secundário conjugado com FITC. A leitura foi feita por citometria de fluxo FACSCALIBUR BD® e a análise em software PAINT-A-GATE da BD®.

## RESULTADOS

**Cultivo de condrócitos em pérolas de alginato:** Na cultura em pérola de alginato de sódio (ilustração 01), os condrócitos não perderam seu fenótipo, continuando como células ovaladas que formam grupos isógenos (ilustração 02).

**Viabilidade Celular e Progressão da Apoptose em Cultura Tridimensional de Condrócitos:** A viabilidade celular foi analisada por dois métodos (1) por marcação com anexina V e iodeto de propídeo analisadas por Citometria de Fluxo; e (2) usando-se o corante de viabilidade celular azul de Tripan com análise pela Câmara de Neubauer.

Em ambas as análises, podemos perceber diminuição da taxa de viabilidade celular (gráfico 01).

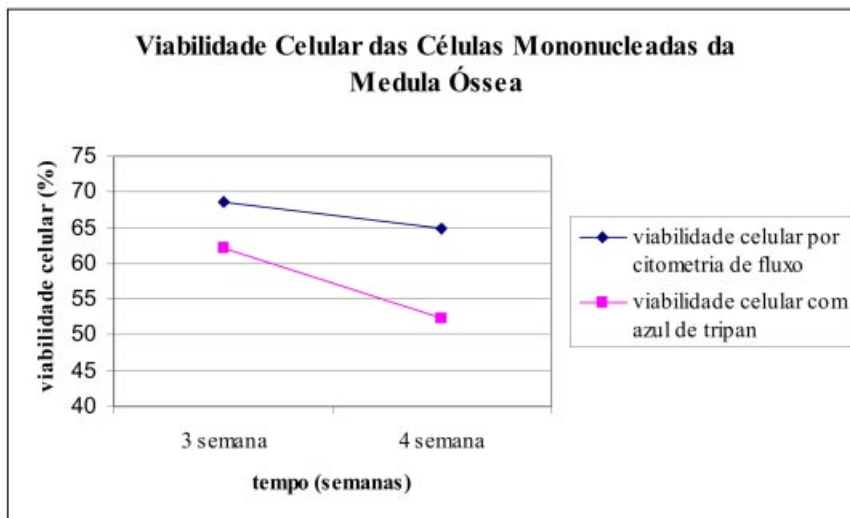
Para confrontar as duas metodologias de avaliação da viabilidade celular utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Não houve diferença significativa dos testes para  $p < 0,05$ .

A progressão da apoptose foi analisada através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo, com análise por citometria de fluxo. Foi observado que os níveis de marcação com anexina V caíram conforme o tempo de cultivo, enquanto os níveis de iodeto de propídeo aumentaram. A coexpressão de ambos também sofreu leve aumento (tabela 01) Isso indica diminuição da quantidade de células morrendo por apoptose e aumento de células em apoptose tardia ou necrose.

A ilustração 03 mostra o padrão da análise feita por corante de viabilidade celular Azul de Tripan. As células não viáveis, isto é com membrana plasmática não íntegra, absorvem o corante tornando-se azuis. Nas viáveis, ocorre o contrário.

No controle do padrão da análise por citometria de fluxo com marcação positiva para anexina V (FL1) e iodeto de propídeo (FL3) e a coexpressão de ambos estão presentes na ilustração 04.

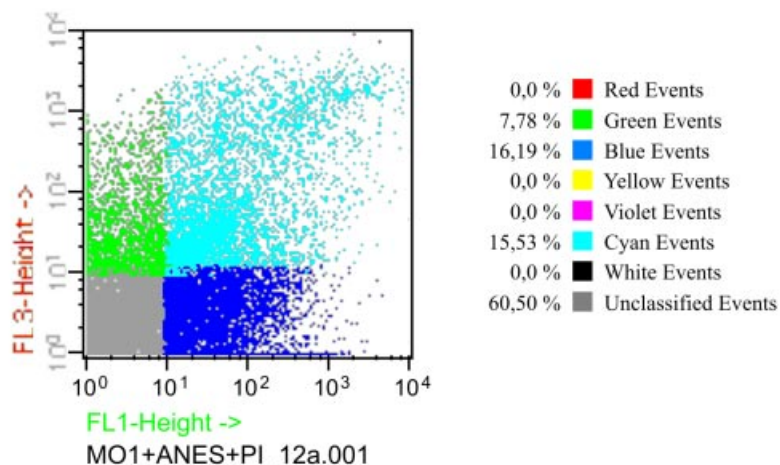
**Cultivo de células mononucleadas:** Depois de processadas em laboratório, as culturas de células mononucleadas da medula óssea foram mantidas em cultura por 4 semanas. Devido a baixa concentração inicial (máximo de  $20,2 \times 10^3$  cels/ml), na primeira e segunda semana



**Gráfico 02:** Média das viabilidades celulares de cultura de células mononucleadas da medula óssea durante 4 semanas de cultivo. Linha azul: viabilidade celular feita por citometria de fluxo e marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Linha rosa: viabilidade celular feita por corante de viabilidade (azul de tripan) e Câmara de Neubauer

Momento	Anexina V	Iodeto de Propídeo	Anexina V + PI
3ª semana	22,10%	22,48%	9,58%
4ª semana	25,75%	20,49%	14,89%

**Tabela 02:** Análise das médias de expressão de anexina V e iodeto de propídeo nas culturas durante 2 semanas de cultivo



**Ilustração 06** Células mononucleadas marcadas com anexina V (FL1) e iodeto de propídeo (FL3). Em azul e ciano temos expressão de anexina V; em verde e ciano temos expressão de iodeto de propídeo, e somente o ciano representa a coexpressão de anexina V e iodeto de propídeo. A maior parte da cultura em cinza são as células que não expressaram os marcadores, sendo consideradas células viáveis. Ao lado, temos a legenda que mostra a porcentagem de cada cor (isto é cada expressão)

de cultivo, é impossível realizar qualquer tipo de teste a respeito de viabilidade celular, progressão de apoptose ou quantidade de CTM presente na amostra. Mesmo assim, conseguimos observar a progressão da cultura por microscopia de luz contrastada (ilustração 05: três semanas de cultura).

A viabilidade celular das células mononucleadas também foi analisada pelos dois métodos descritos. Em ambas as análises, pode-se perceber diminuição da taxa de viabilidade celular (gráfico 02).

Para confrontar as duas metodologias de avaliação da viabilidade celular utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Não houve diferença significativa dos testes para  $p < 0,05$ .

A progressão da apoptose foi analisada através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo, sendo que, os níveis de marcação com anexina V aumentaram conforme o tempo de cultivo, enquanto os níveis de iodeto de propídeo diminuíram. A coexpressão de ambos também sofreu leve aumento (tabela 02) Isso indica diminuição da quantidade de células morrendo por apoptose e aumento de células em apoptose tardia ou necrose.

O controle do padrão da análise por citometria de fluxo com marcação com anexina V (FL1), iodeto de propídeo (FL3) e a coexpressão de ambos estão presentes na ilustração 06.

A quantidade de CTM na cultura de células mononucleadas da medula óssea foi analisada por marcação da vimentina com o anticorpo anti-vimentina. Parte-se do princípio, utilizando a literatura, que existe na medula óssea 0.01% de CTM (tabela 03). Nesta análise, observa-se um grande crescimento até a terceira semana e na semana seguinte uma redução do número de CTM nas culturas. Podemos observar um aumento na viabilidade celular das CTM nas duas últimas semanas de cultura (ilustração 07). A progressão da apoptose foi analisada através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo com análise por citometria de fluxo (tabela 04).

Observou-se que os níveis de marcação com anexina V, iodeto de propídeo e a coexpressão de ambos diminuiu (embora considerados não significantes para  $p < 0,05$ ). Isso indica diminuição da quantidade de células morrendo por apoptose e diminuição de células em apoptose tardia ou necrose.

O controle do padrão da análise por citometria de fluxo com marcação por anti-vimentina está na ilustração 08.

A marcação positiva com anexina V (FL1), iodeto de propídeo (FL3) e a coexpressão de ambos estão presentes na ilustração 09.

**Tabela 03:** Análise das médias de expressão positiva de anti-vimentina nas culturas durante 2 semanas de cultivo:

Momento	Quantidade de CTM nas culturas
Coleta	0,01%
3ª semana	22,80%
4ª semana	20,87%

## DISCUSSÃO

A cultura em gel de alginato de sódio, embora não tenha proporcionado a proliferação celular, possibilitou a formação de matriz pericelular com colágeno tipo II (resultado não mostrado). Por não ser o ambiente próprio dos condrócitos, essas células apresentaram ao longo da cultura diminuição de suas viabilidades celulares, tanto pelo método de marcação com anexina V e iodeto de propídeo quando analisados tanto por citometria de fluxo, quanto com o corante

o meio (hidrogel) ao qual essas células estão sendo expostas. Os mais prováveis fatores de interferência são: dificuldade do meio de cultura e nutrientes em chegar as células dentro do alginato de sódio, dificuldade das toxinas celulares liberadas saírem do gel, falta de estímulo de crescimento, como o TGF $\alpha$  ou problemas de manipulação durante a coleta e processamento da cartilagem. Para essa cultura, o índice apoptótico comprova que as células, se re-implantadas com a finalidade de corrigir defeitos no tecido cartilaginoso, não atingiram seus objetivos, uma vez que com a

caz quanto os marcadores de morte celular por citometria de fluxo, não permite identificar aquelas células que estão entrando em processo apoptótico.

Pelos resultados aqui apresentados, sugerimos que os testes de viabilidade celular devem ser feitos sempre durante o cultivo de condrócitos em matriz tridimensional. E sempre que a viabilidade celular diminuir, sugere-se fazer a curva de morte celular, principalmente por apoptose, para tentar corrigir os erros do cultivo.

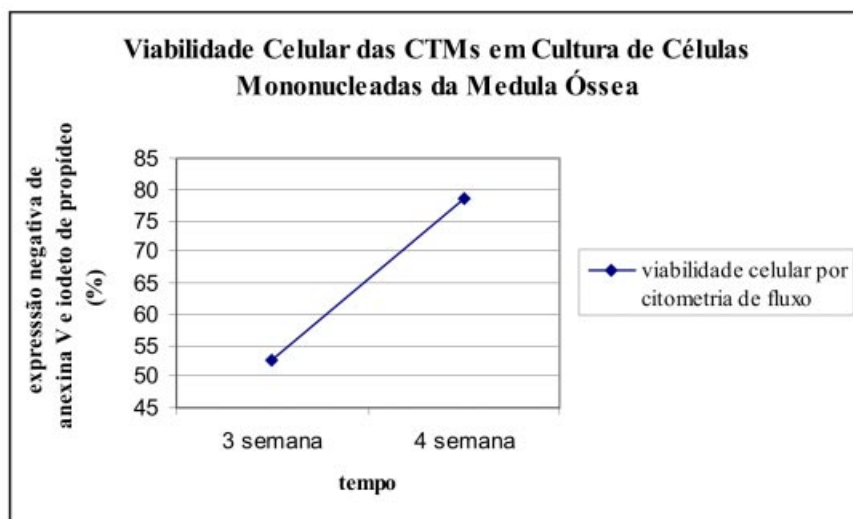
Já a cultura em monocamada de células mononucleadas da medula óssea proporcionou a proliferação celular, e o aumento das CTMs no cultivo.

A diminuição da viabilidade total das células em cultura, e o aumento da apoptose (confirmada pelo aumento da marcação com anexina V) se mostram compatíveis. A partir do momento em que o meio de cultura usado serve para estimular o crescimento das CTM, é compreensível que vejamos diminuição da competição negativa proporcionada pelas células mononucleadas através da diminuição da viabilidade total das células. Ao mesmo tempo, a progressão do aumento da apoptose confirma tal resultado.

A proliferação máxima das CTM ocorreu durante a terceira semana de cultivo, após terceira passagem. Essa proliferação celular está de acordo com a diminuição da morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose, observadas através da diminuição progressiva da marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Na quarta semana observou-se uma menor expressão de vimentina pelas células em cultura. Essa expressão diminuída pode estar relacionada com perda de fenótipo pelas células (o que ocorre devido ao número de passagens) e não com a morte das células, pois não há indício de aumento dos marcadores de morte celular na quarta semana. A partir da observação do grau de apoptose celular dessa cultura, sugere-se que a diferenciação celular ocorra na terceira semana, ponto em que as CTMs são em sua maioria homogêneas e o índice de apoptose/morte celular está diminuindo consideravelmente.

Tal perda de fenótipo das CTMs vem sido amplamente estudada e discutida na literatura como nos relatos de Javazon, E. (2004). Por um lado as passagens (repiques) com tripsina estimulam o crescimento, e por outro, ao estimular a taxa de proliferação, estimula também mutações no DNA celular o que pode levar a perda do fenótipo pela célula e diminuição da atividade das telomerasas – enzimas responsáveis por manter os telômeros celulares com tamanho suficiente para a célula não entrar em senescência.

A pesquisa de CTMs elevou-se, somente, nos últimos quatro anos, e ainda é difícil achar trabalhos coerentes, principalmente, em relação a caracterização e expansão dessas células. Por falta de informação base (o que está começando a ser produzido e divulga-



**Ilustração 07:** Média da viabilidade celular de cultura de CTM duas últimas semanas de cultivo. Linha azul: viabilidade celular feita por citometria de fluxo e marcação com anexina V e iodeto de propídeo

de viabilidade (azul de Tripan) na Câmara de Neubauer. A diminuição da viabilidade coincidiu com a alta incidência de morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose, pois no final da cultura observamos mais de 60% de apoptose precoce, 73% de necrose e 35% de apoptose tardia ou necrose secundária. Quanto a progressão da apoptose, embora tenha diminuído pouco durante o cultivo, ainda se apresentou alta ao final deste, nos fazendo considerar

viabilidade baixa e grau de morte celular alto elas seriam incapazes de regenerar lesões. A avaliação dos parâmetros analisados neste trabalho deve ser refeita durante a realização de novo cultivo celular em outros materiais hidrogéis, ou num alginato de sódio de menor concentração, assim como colocar junto ao meio, fatores de crescimento extras.

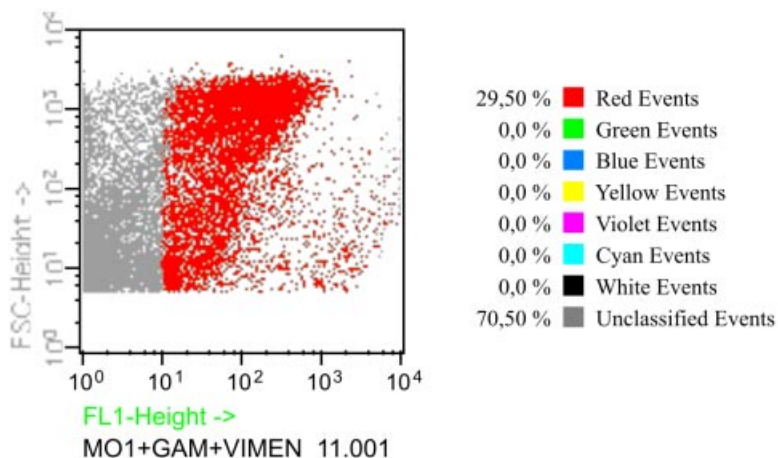
O método pelo azul de tripan, embora neste estudo tenha se mostrado tão efi-

**Tabela 04:** Análise das médias de expressão de anexina V e iodeto de propídeo nas culturas durante 2 semanas de cultivo.

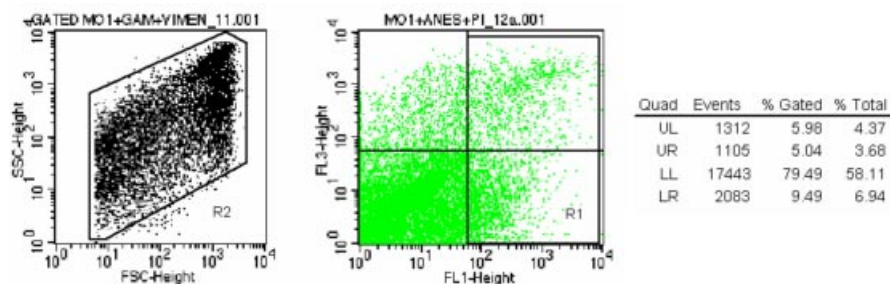
Momento	Anexina V	Iodeto de Propídeo	Anexina V + PI
3ª semana	26,10%	14,29%	12,71%
4ª semana	15,38%	6,90%	9,58%

do por necessidade de entenderem as CTMs antes de diferenciá-las) é difícil correlacionar os resultados deste trabalho com a literatura. Os principais trabalhos com CTM na literatura indicam que fizeram a contagem celular (pelos mais variados métodos) mas raramente expõe

os resultados em seus artigos, e muitos deles não diferenciam as CTMs das outras células mononucleadas durante a contagem celular, levando em consideração somente a confluência de células na placa de cultura vistas por microscopia de luz – Bonab, M.M. *et al.* (2006),



**Ilustração 08:** Cultura de células mononucleadas da medula óssea, e as CTMs estão marcadas com anti-vimentina (FL1). Ao lado, temos a legenda que mostra a porcentagem da expressão de anti-vimentina (29,50%)



**Ilustração 09** CTMs marcadas com anexina V (FL1) e iodeto de propídeo (FL3). Na esquerda temos somente as CTMs que foram marcadas com anti-vimentina, neste quadro distribuídas por tamanho x granulicidade. Ao meio encontra-se a marcação das CTMs do “gate” R2 com anexina V e iodeto de propídeo. Do lado esquerdo temos a legenda do quadrante do meio (UL = up left, UR = up right, LL = low left, LR = low right) onde se lê que 58,11% das células estão viáveis, 6,94% expressa somente anexina V, 4,37% expressão somente iodeto de propídeo e 3,68% coexpressa anexina V e iodeto de propídeo

Shahdadfar, A. (2006).

Pelos resultados aqui apresentados, sugerimos que os testes de viabilidade celular devem ser feitos sempre durante o cultivo de CTMs para verificar o auge da homogeneidade do cultivo e a baixa morte celular.

## BIBLIOGRAFIA

- CARVALHO, A.C.C. Células-Tronco: a medicina do futuro. **Ciênc. Hoje**. São Paulo, v.29, p. 27-31, 2001
- GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby Imunologia**. Quarta ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora REVINTER Ltda., 2002. p 517-526.
- BENTLEY, G.; MINAS, T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. **Br. Med. J.**, London, v.10, 2001. Disponível em <http://www.bmj-pt.com>
- ROBERTS, S.; McCALL, I.W.; DARBY, A.J.; MENAGE, J.; EVANS, H.; HARRISON, P. E.; RICHARDSON, J.B. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. **Arthritis Res. Ther.** v. 5, p. 60-72, 2003
- WROBE, R. R. Articular cartilage injury and autologous chondrocyte implantation. **Phys. Sportsmed.**, Minneapolis, v. 28, 2000. Disponível em: <http://www.physsportsmed.com.issues>
- KLINIKUM LEVERKUSEN TRAUMATOLOGY & ORTHOPEDIC SURGERY. **Autologous chondrocyte implantation**. Levekusen, 2000. Disponível em: [http://www.Unflchirurgie.com/english/autologous\\_chondrocyte\\_implant.htm](http://www.Unflchirurgie.com/english/autologous_chondrocyte_implant.htm). Acesso em: 28 abr. 2003
- MARTIN, I.; PADERA, R. F.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FREED, L.E. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stroma cells into cartilaginous and bone-like tissues. **J. Bone Joint Surg.**, Boston, v. 16, p. 181-189, 1998
- ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A nova fronteira da medicina**. Primeira ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p.35-48
- JAVAZON, E.; BEGGS, K.; FLAKE, A. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging *Experimental Hematology* v.32, p. 414-425, 2004
- BONAB, M. *et al.* Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biology**, v.7:14 doi:10.1186/1471-2121-7-14, 2006
- SHAHADDFAR, A. *et al.* In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability **Stem Cells** v. 23, p.1357-1366, 2005.