



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

actaortopedicabrasileira@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e
Traumatologia
Brasil

Camargo Bittencourt, Renata Aparecida de; Rosa Pereira, Hamilton; Felisbino, Sérgio Luís; Rossi
Ferreira, Rosana; Reinoldes Bizarria Guilherme, Gabrielle; Moroz, Andrei; Deffune, Elenice
Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato
Acta Ortopédica Brasileira, vol. 17, núm. 4, 2009, pp. 242-246
Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65713432011>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

CULTURA DE CONDRÓCITOS EM ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL: HIDROGEL DE ALGINATO

CHONDROCYTE CULTURES IN TRI-DIMENSIONAL SCAFFOLD: ALGINATE HYDROGEL

RENATA APARECIDA DE CAMARGO BITTENCOURT¹, HAMILTON ROSA PEREIRA¹, SERGIO LUIS FELISBINO², ROSANA ROSSI FERREIRA¹, GABRIELLE REINOLDES BIZARRIA GUILHERME¹, ANDREI MOROZ¹, ELENICE DEFFUNE¹

RESUMO

Objetivos: O presente estudo teve como objetivo cultivar condrócitos retirados da articulação do joelho de coelhos encapsulados em hidrogel de alginato (HA) e caracterizar a produção de matriz extracelular (ECM). **Métodos:** A cartilagem articular foi removida do joelho de coelhos, com três a seis meses, fragmentada em pedaços de 1mm e submetida à digestão enzimática. Uma concentração de 1×10^6 céls/mL foram ressuspensas em uma solução de alginato de sódio a 1,5% (w/v), em seguida fez-se o processo de gelatinização em CaCl_2 (102 mM), permitindo a formação do HA e cultivo em meio DMEM-F12 durante quatro semanas. A distribuição das células e a ECM foram acessadas através das secções histológicas coradas com azul de toluidina hematoxilina e eosina (HE). **Resultados:** Houve um aumento no número e na viabilidade dos condrócitos durante as quatro semanas de cultura. Através das análises histológicas dos HAs corados com azul de toluidina e HE foi possível observar a distribuição definida dos condrócitos no hidrogel, assemelhando-se a grupos isógenos e formação de matriz territorial. **Conclusão:** Este estudo demonstrou a eficiência do HA como arcabouço para ser usado na cultura de condrócitos, constituindo uma alternativa no reparo de lesões na cartilagem articular.

Descritores: Cartilagem articular. Condrócitos. Alginato. Hidrogel. Regeneração. Engenharia tissular.

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to culture chondrocytes from knee joint cartilage of rabbits encapsulated in alginate hydrogel (HA) and to characterize the production of extracellular matrix (ECM). **Methods:** Joint cartilage was obtained from rabbits' knees, three to six months old, fragmented into 1-mm pieces and submitted to enzymatic digestion. A concentration of 1×10^6 cells/mL were re-suspended into a 1.5% (w/v) sodium alginate solution, followed by gel formation process with CaCl_2 (102 mM), allowing HA to build for culturing it into a DMEM-F12 medium for four weeks. The distribution of cells and ECM were assessed from histological slices stained toluidine blue and hematoxyline-eosin (HE). **Results:** There was an increase of the number and viability of the chondrocytes during the four weeks of culture. By assessing the histological sections stained with toluidine blue and HE, we could note the definitive distribution of chondrocytes in the hydrogel, similarly to isogenous groups and territorial matrix formation. **Conclusion:** In this study, the alginate was shown to be an effective scaffold for use in chondrocytes culture, constituting an alternative for repairing joint cartilage defects.

Keywords: Articular Cartilage. Chondrocytes. Alginate. Hydrogel. Regeneration. Tissue engineering.

Citação: Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Ferreira RR, Guilherme GRB, Moroz A et al. Cultura de condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. Acta Ortop Bras. [online]. 2009; 17(4):242-6. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Ferreira RR, Guilherme GRB, Moroz A et al. Chondrocyte cultures in tri-dimensional scaffold: alginate hydrogel. Acta Ortop Bras. [online]. 2009; 17(4):242-6. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Uma vez danificada, a cartilagem não repara espontaneamente, provavelmente devido à baixa eficiência de reparo da rede de colágeno, já que a deficiência das proteoglicanas é reversível.¹ Estima-se que cerca de um milhão de pessoas por ano necessitam de tratamento relacionado a defeitos em cartilagens, principalmente as das articulações do joelho.² Estudos experimentais têm mostrado que há um declínio na atividade de crescimento da cartilagem com o aumento da idade. No entanto, a engenharia de tecidos oferece novas oportunidades para restauração funcional e estrutural do tecido lesionado.³

Na literatura, relata-se que os condrócitos necessitam de um arcabouço em três dimensões (3D) para crescerem e preservarem a morfologia e produção de componentes de matriz próprios de condrócitos quando em cultura celular.⁴ Caso contrário, quando cultivados em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente de cultura, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características morfológicas e passam a produzir componentes de matriz fibroblásticas como colágeno tipo I.⁵⁻⁷ Para se conseguir a produção de um tecido cartilaginoso funcional, é crucial evitar a desdiferenciação dos condrócitos durante o processo de engenharia de cartilagem.⁸

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1 - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

2 - Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu, Laboratório de Cultura Celular, Hemocentro - UNESP - São Paulo - Brasil.

Endereço de Correspondência: Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Hemocentro, Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: rentcourt2000@yahoo.com.br

Trabalho recebido em 20/02/08 aprovado em 23/04/08

A cultura de condrócitos em um arcabouço tridimensional baseia-se em cultivar tais células em uma matriz artificial, biodegradável, que possa suportar o crescimento da cartilagem durante alguns meses, enquanto os condrócitos e a matriz se estabelecem. O princípio consiste em produzir células através da matriz para implantá-las num defeito articular. A matriz degrada gradualmente em 8 a 10 semanas após o implante de cartilagem.⁹

Recentemente, uma variedade de matrizes como hidrogel e polímeros sintéticos, têm sido investigadas para a expansão dos condrócitos "in vitro" para o reparo da cartilagem lesada. Tais matrizes incluem: arcabouços à base de colágeno: gel de colágeno tipo I e II, esponjas de colágeno tipo II, ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídeos e alginato.^{10,11}

A cultura de condrócitos em hidrogel de alginato constitui o método mais indicado para o isolamento destas células.¹² O alginato é um polissacarídeo linear (n - ácido gulurônico - ácido manurônico), aniônico, capaz de gelatinizar-se de maneira reversível, na presença de cálcio ou outros cátions divalentes.^{13,14}

A vantagem deste polissacarídeo polimerizado é a sua constituição atóxica, biocompatível e injetável em modelos animais. Os condrócitos encapsulados em alginato não aderem à matriz, facilitando a sua recuperação depois de cultivados, permitindo o estudo da expressão protéica e genética. Através deste método, consegue-se manter a expressão do fenótipo diferenciado, restaurar condrócitos não diferenciados e formar uma matriz extracelular similar à encontrada na cartilagem articular.^{12,15}

O presente estudo teve como objetivo cultivar condrócitos encapsulados em hidrogel de alginato, caracterizar a produção de matriz extracelular (ECM) do tecido produzido *in vitro* para que possivelmente este hidrogel possa ser usado em implantes autólogos visando a regeneração da cartilagem articular lesada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os meios de cultura utilizados foram: DMEM:Ham's F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (1:1), meio Ham's F12, soro bovino fetal (SBF), antibióticos: 10U/ml de penicilina G, 10µg/ml de estreptomicina e 25µg/ml de anfotericina B, tripsina 0,25%/EDTA, colagenase tipo I, todos obtidos da GIBCO® Invitrogen Corporation. Ácido Algínico Sal Sódio de Baixa Viscosidade obtido de Macrociști sp, hialuronidase, ácido ascórbico todos da Sigma®. Cloreto de cálcio dihidratado (Fluka®) e cloreto de sódio (LABSYNTH®).

Animais

Foram utilizados neste estudo 10 coelhos da raça Botucatu com 3 a 6 meses de idade. Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/ Kg) administrado nas veias central ou marginal da orelha. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu segundo o protocolo nº 345.

Isolamento dos Condrócitos

A cartilagem articular foi removida do côndilo femoral, fragmentada em pedaços de ± 1mm e submetida a digestão da matriz extracelular com as seguintes enzimas: tripsina (0,25%), hialuronidase (2mg/mL) por 45 minutos cada enzima e colagenase tipo I (0,45%) a 37°C por 16 horas.

Cultura dos Condrócitos em Hidrogel de Alginato

Após a digestão enzimática a suspensão de células foi filtrada em filtro de nylon de 70 µm, centrifugada, e as células foram ressuspendidas a uma densidade de 1x10⁶ céls/mL em uma solução de alginato de sódio a 1,5% (w/v). A suspensão de células em algi-

to não polimerizado foi colocada em uma seringa de 10 cc equipada com uma agulha de 21 g, e posteriormente foi dispensada da seringa por gotejamento dentro da solução de gelatinização (CaCl₂ - 102 mM) com moderados movimentos magnéticos, permitindo a polimerização do alginato durante 10 minutos até formar os "hidrogéis". A solução de gelatinização foi desprezada, e os "hidrogéis" foram lavados 3 vezes em 5 vol. de NaCl a 0,15 M. Os hidrogéis foram cultivados em meio DMEM-F12 suplementado com ácido ascórbico (50 µg/mL) e 10% de SBF. A cultura foi mantida em estufa de 37° C em uma atmosfera úmida a 5% de CO₂ e 95% de ar durante quatro semanas. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

Recuperação dos condrócitos após cultura em hidrogel

A recuperação dos condrócitos do hidrogel para acessar a viabilidade celular foi realizada através da dissolução do hidrogel em citrato de sódio (155mM), por 20 minutos em estufa de 37°C. Posteriormente foi realizada a centrifugação da amostra e diluição na solução de azul de tripano.

Contagem e Viabilidade Celular

A contagem de células e determinação da viabilidade celular foi realizada utilizando a câmara de Neubauer. O número de células vitais foi determinado pela técnica de exclusão de células não vitais coradas por solução de azul de tripano, seguindo as recomendações de Freshney, 2001.¹²

Análises Morfológicas

Análises morfológicas das células foram realizadas rotineiramente utilizando microscopia de fase em microscópio invertido (Axiovert 200 - Carl Zeiss). As culturas celulares foram fotografadas semanalmente.

Caracterização da Matriz Extracelular

Para avaliar a produção dos componentes da matriz extracelular, as amostras foram fixadas em formaldeído a 4%, passadas por soluções crescentes de álcool (70%, 95% e 100%), incluídas em resina Historesina™ - Leica e posteriormente seccionadas no micrótomo da marca Leica. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina a 0,3%, pH 3.65 e Hematoxilina e Eosina (HE).

RESULTADOS

Isolamento dos condrócitos

Houve dificuldades na padronização da digestão enzimática da cartilagem articular. Nos primeiros ensaios fazia-se a digestão sob agitação utilizando duas enzimas: tripsina e colagenase tipo I, conseguia-se uma baixa celularidade e viabilidade, média 60%. Após tentativas de padronização, conseguiu-se determinar o uso de três enzimas para o processo de digestão: tripsina, hialuronidase e colagenase em concentrações e tempos distintos, usando o modelo estático de digestão. Obteve-se uma viabilidade celular superior a 90% na maioria das amostras digeridas pelo último protocolo. Em todas coletas conseguiu-se obter amostras de cartilagens pesando entre 170mg e 475 mg. (Tabela 1)

Cultura de Condrócitos

Quando foram realizadas culturas em monocamadas os condrócitos após 12 horas de cultura aderiram à placa de Petri, formando colônias de células com morfologia fibroblastóide, indicando a perda do seu fenótipo arredondado. (Figura 1A e 1B) Os condrócitos desdiferenciados apresentam inicialmente longos filopódios. Após uma semana de cultura observou-se a confluência celular na placa de cultura com morfologia fibroblastóide. (Figura B)

Tabela 1 – Valores de peso das biópsias do tecido cartilaginoso, número inicial de células e viabilidade inicial.

Peso da Biópsia (mg)	Número Inicial de Células/mm ³	Viabilidade Inicial
221	1.6x10 ⁵	99%
300	1.8 x10 ⁵	94%
391	1.0 x10 ⁵	63%
475	1.9 x10 ⁵	97%
402	2.8 x10 ⁵	93%
326	3.7 x10 ⁵	92%
473	2.8 x10 ⁵	99%
170	5 x10 ⁵	96%
234	6 x10 ⁵	84%
288	1.2 x10 ⁵	94%

Obteve-se 40 hidrogéis de alginato em uma média de 400 mg de cartilagem articular coletada. Cada hidrogel apresentava 3mm de diâmetro. (Figura 2) Após a polimerização do hidrogel de alginato foi possível observar no microscópio a distribuição homogênea dos condrócitos em cada hidrogel. (Figura 1C) Os condrócitos permaneceram com a morfologia esférica semelhante á cartilagem nativa (Figura 1C e 1D) quando comparados à cultura em monocamada (Figura 1A e 1B), mantendo-se fixo no polímero. Já nos primeiros dias de cultura a presença de aglomerados celulares nas pérolas de alginato, demonstrou a intensa divisão celular, assemelhando-se aos grupos isógenos da cartilagem hialina em formação. (Figura 1D) Ao acessar a viabilidade celular sema-

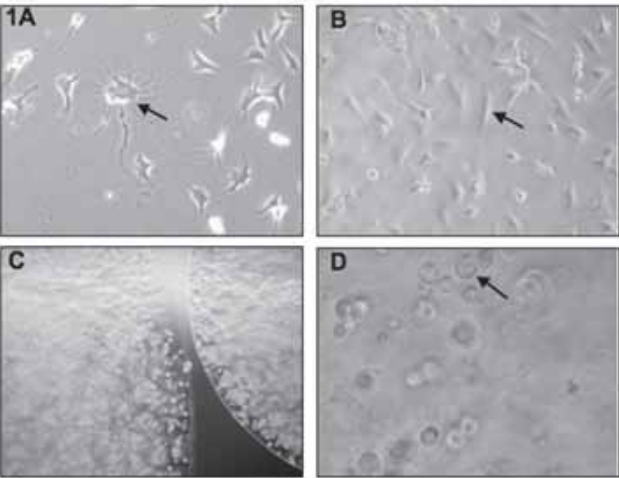


Figura 1 – Fotomicrografia de contraste de fase. (A) Cultura de condrócitos em monocamada. Observar células alongadas e com muitos prolongamentos (seta) (Aumento 1.000x). (B) Cultura em monocamada, confluyente após 2 semanas em cultura, apresentando condrócitos com morfologia fibroblastóide (seta) (Aumento 1.000x). (C) Cultura de condrócitos em hidrogel de alginato. A seta indica a delimitação do hidrogel de alginato de característica translúcida. No interior dos hidrogéis de alginato, observar inúmeras estruturas esféricas e arredondadas esbranquiçadas que representam a alta celularidade no início da cultura (Aumento 100x). (D) Observar o fenótipo arredondado dos condrócitos (seta) no interior do hidrogel de alginato (Aumento 1.000x).

nalmente das pérolas de alginato com azul de tripano, pode-se confirmar o aumento da celularidade e a manutenção da viabilidade ao comparar com o número de células iniciais.(Figura 3) Na quarta semana de cultura observou-se por microscopia a alta celularidade em relação à primeira semana e todas os hidrogéis estavam intactos, além da retenção do fenótipo arredondado dos condrócitos.

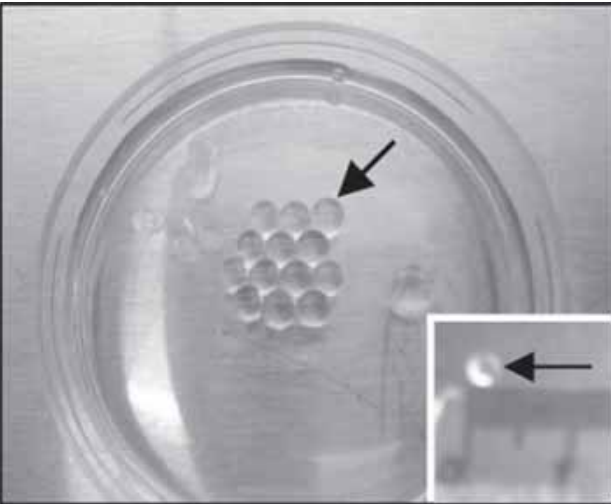


Figura 2 – (A) Várias esferas de hidrogel de alginato após gelatinização (seta). (B) Uma esfera de hidrogel de alginato com ~3mm de diâmetro (seta).

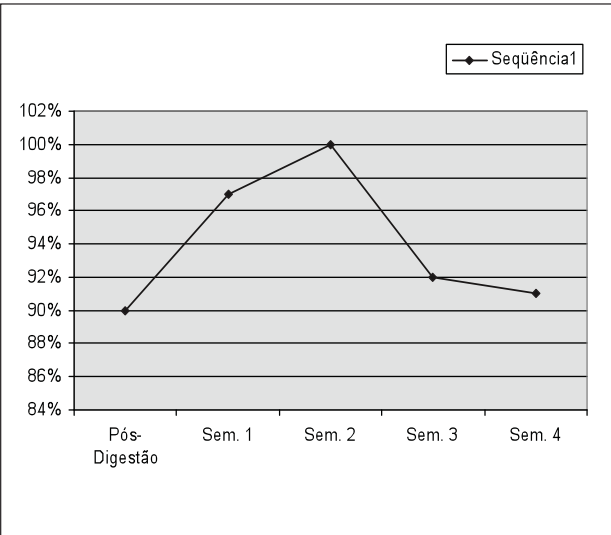


Figura 3 – Viabilidade dos condrócitos cultivados em hidrogel de alginato por 4 semanas

Caracterização da Matriz Extracelular

A Figura 4A apresenta uma visão ampla de todo hidrogel de alginato corado com azul de toluidina onde demonstra a alta celularidade e a distribuição de forma organizada dos condrócitos dentro do hidrogel.

Nas secções histológicas (Figura 4B e 4C) foi possível observar uma coloração mais intensa nas áreas da matriz pericelular e/ou territorial ao redor dos condrócitos denominando-os de grupos de condrócitos (grupos isógenos). Na Figura 4B esta bem evidente a formação da matriz pericelular com formação da lacuna ao redor dos condrócitos e a retenção da morfologia arredondada semelhante ao do tecido cartilaginoso nativo. Na Figura 4C observou-se um grupo de condrócitos com alta celularidade indicando a multiplicação dessas células no hidrogel, com produção de matriz pericelular e territorial, conforme corado com azul de toluidina. A matriz pericelular e territorial corada com azul de toluidina revelou a produção de proteoglicanas, componente principal desta região.

Conforme demonstrado na Figura 4D, secções coradas com HE, demonstraram não haver a produção da matriz interterritorial, e sim os condrócitos presos em suas lacunas produzindo matriz pericelular e territorial.

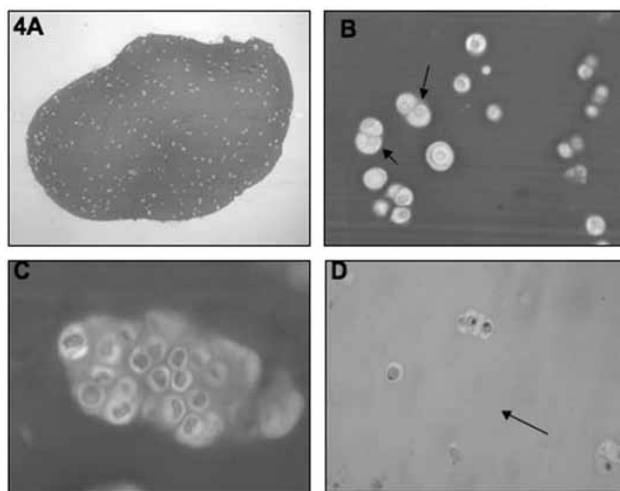


Figura 4 – Análise histológica da cultura de condrócitos em hidrogel de alginato. (A, B e C) coloração com azul de toluidina, (D) coloração com HE. (A) Corte histológico do hidrogel de alginato inteiro, mostrando a distribuição uniforme dos condrócitos no hidrogel (Aumento 25x). (B) Evidência da formação da matriz pericelular e interterritorial (seta) (Aumento 1.000x). (C) Grupos de condrócitos em divisão (Grupos isógenos) (Aumento 1.400x). (D) Ausência de matriz territorial (seta) (Aumento 1.000x).

DISCUSSÃO

A engenharia de tecidos representa um método promissor para a construção de enxertos condrogênicos autólogos dentro da cirurgia ortopédica reconstrutiva. A existência de várias matrizes e fatores de crescimento específicos proporciona a produção de tecido cartilaginoso *in vitro* e *in vivo*.

Os condrócitos são células que necessitam de cultivo tri-dimensional, para a manutenção do seu fenótipo original, pois em monocamadas estas células desdiferenciam, produzindo componentes da matriz como o colágeno tipo I característico da fibrocartilagem e não da cartilagem hialina, portanto, sendo consequência de alteração da expressão gênica.³ Quando se trabalha com cartilagem articular, o interesse é somente tecido

cartilaginoso hialino, pois em um implante articular a produção de colágeno tipo I, indica fibrose, ou seja, a transformação do tecido hialino em fibroso.

A matriz de alginato pode ser utilizada tanto em implantes como em estudos da condrogênese, fato importante para o entendimento da fisiologia do tecido cartilaginoso.¹⁰

De acordo com Masuda¹⁷, a cultura de condrócitos em alginato estabiliza por até oito meses, o fenótipo condrocítico dessas células. No presente artigo demonstramos resultados de 4 semanas de cultura, mas em outros experimentos conseguimos cultivar condrócitos por até 4 meses sem a perda do fenótipo desta célula.

A concentração do alginato influencia muito no metabolismo da célula e difusão dos componentes necessários provenientes do meio de cultura. A melhor concentração encontrada em todo experimento foi 1,5%, tendo sido usada 1,0%, 1,2%, 1,5% e 2%. Outro fator importante é que o preparo do alginato deve ser realizado no dia, pois em experimentos usando alginato preparado em dias anteriores demonstrou a perda da consistência do gel e formação de grupo células alongadas, adquirindo fenótipo fibroblástico. Um estudo realizado por Domm et al.¹⁸ demonstrou em seus experimentos que o tipo de alginato pode influenciar na cultura de condrócitos, fato este também observado neste trabalho.

O tecido cartilaginoso consiste de condrócitos distribuídos de maneira esparsa envolvidos por matriz extracelular (ECM). Os condrócitos são responsáveis pela manutenção da ECM e consequentemente do tecido cartilaginoso. A ECM pode ser dividida em compartimentos pericelular, territorial e interterritorial, contendo colágeno tipo II e a proteoglicana agregana.³ O hidrogel de alginato foi eficiente na manutenção do fenótipo dos condrócitos, na proliferação celular, na produção de matriz pericelular e territorial, no entanto, foi considerado ineficiente do ponto de vista de produção de matriz interterritorial.

Muitos pesquisadores têm usado o hidrogel de alginato como arcabouço de sustentação dos condrócitos para implante em articulações lesadas em modelos animais. A vantagem desse hidrogel é a sua propriedade atóxica e a sua utilização de maneira injetável. Tal arcabouço pode ser injetado juntamente com os condrócitos *in situ*, permitindo a sua gelatinização com cloreto de cálcio no local da lesão.^{3,15} O alginato é degradado por vias enzimáticas no próprio tecido em duas subunidades monoméricas: ácido glicurônico e ácido manurônico.

Neste estudo foi possível obter dados *in vitro* do hidrogel de alginato. Para aplicação clínica do hidrogel de alginato, será necessária a realização de implantes em áreas pré-lesionadas nas articulações do joelho, usando como modelo animal coelhos, para confirmação da sua eficiência na produção de tecido cartilaginoso hialino *in vivo*, o que de fato constitui a próxima fase deste estudo.

CONCLUSÃO

A cultura de condrócitos em hidrogel de alginato demonstrou alta celularidade e um aumento na produção de matriz pericelular e territorial quando comparada a interterritorial.

O hidrogel de alginato constituiu um eficiente arcabouço de sustentação e cultura de condrócitos, mantendo seu fenótipo arredondado, assemelhando-se a cartilagem nativa, sendo um importante arcabouço para uso em implante articular.

REFERÊNCIAS

1. Lafeber FP, van Roy H, Wilbrink B, Huber-Bruning O, Bijlsma JW. Human osteoarthritic cartilage is synthetically more active but in culture less vital than normal cartilage. *J Rheumatol*. 1992;19:123-9.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920-6.
3. Goessler UR, Hörmann K, Riedel F. Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (Review). *Intern J Mol Med*. 2004;13: 505-13.
4. Yang IH, Kim, Su-Hyang, Kim, YH, Sun, HJ, Kim SJ, Lee JW. Comparison of phenotypic characterization between alginate bead and pellet culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J*. 2004;45:891-900.
5. Benya P, Shaffer J. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982; 30:215-24.
6. Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger, PC, McPherson, JM, Tubo R. Expression of a stable articular phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop. Res*. 1998;16:207-16.
7. Mandl EW, Van Der Veen SW, Verhaar JAN, Van Osch GJVM. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng*. 2004;10:109-18.
8. Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat* 2004;205:229-37.
9. Bentley G, Minas T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. *Br. Med. J.*, London, v. 10, 2001. [cited 22 may 2003]. Available from: URL: <http://www.bmj-pt.com>
10. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*. 2000;21:795-801.
11. Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S et al. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99:9996-10001.
12. Freshney RI. Specialized cells. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4th. ed. New York: Wiley-Liss; 2000. p.367-70.
13. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci*. 1994;107:17-27.
14. Mulder L. Cell adhesion on alginate scaffolds for tissue engineering of aortic valve – a review. *Faculty Biomedical Engineering, Eindhoven University of Technology*. 2002; 22-34.
15. Park K, Huang J, Azar F, Jin Ri L, Min Byoung-Hyun, Han DK et al. Scaffold free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair – in vitro and in vivo study. *Artif Organs*. 2006;30:586-96.
16. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 3rd. ed. New York: Wiley-Liss; 2001.
17. Masuda K, Sah RL, Hejna MJ, Thonar EJ. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res*. 2003;21: 139-48.
18. Domm C, Schünke M, Steinhagen J, Freitag S, Kurz B. Influence of various alginate brands on the redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate bead culture under high an low oxygen tension. *Tissue Eng*. 2004;10:1796-1805.