

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa – PROPEP
Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional -
Biotrans

Isis Côrtes Teixeira da Silva

Engenharia de cartilagem a partir de esferoides de células-tronco/estromais de
tecido adiposo humano

Duque de Caxias

2017

Isis Côrtes Teixeira da Silva

**Engenharia de cartilagem a partir de
esferoides de células-tronco/estromais
de tecido adiposo humano**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional em
Biomedicina Translacional, da
UNIGRANRIO / INMETRO / UEZO
como requisito para obtenção do
título de Mestre

Orientadores:
Prof^a. Leandra Santos Baptista
Prof. Jose Mauro Granjeiro

Duque de Caxias

2017

S586e Silva, Isis Côrtes Teixeira da.

Engenharia de cartilagem a partir de esferoides de células-tronco/
estromais de tecido adiposo humano / Isis Côrtes Teixeira da Silva. - Duque
de Caxias, 2017.

124 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande
Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2017.

“Orientadora: Profa. Leandra Santos Baptista”.

“Orientador: Prof. Jose Mauro Granjeiro”.

Bibliografia: f. 101-122

1. Ciências Biomédicas. 2. Tecido adiposo. 3. Condrogênese. 4.
Esferoides. 5. Cartilagem. 6. Célula-tronco. I. Baptista, Leandra Santos.
II. Granjeiro, Jose Mauro. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy” IV. Título

Isis Côrtes Teixeira da Silva

Engenharia de cartilagem a partir de esferoides de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional em
Biomedicina Translacional, da
UNIGRANRIO / INMETRO / UEZO
como requisito para obtenção do
título de Mestre

Aprovado em 24 de maio de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Gutemberg Alves
Universidade Federal Fluminense

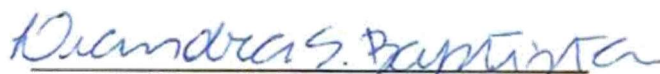
Profa. Michelle Botelho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Plinio Senna
Universidade do Grande Rio

Às treze horas do dia vinte e quatro de maio do ano de 2017, Sala de aula 3 do Prédio 6, 2º andar – Campus Xerém/Inmetro realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado intitulada “Engenharia de cartilagem a partir de esferoides de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano”, de autoria de **Isis Côrtes Teixeira da Silva**, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans, sob a orientação da Professora Dra. Leandra Santos Baptista e Professor Dr. José Mauro Granjeiro. A sessão foi aberta pelo Prof. Dr. Plínio Mendes Senna, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof.^a Dr.^a Leandra Santos Baptista (orientadora), Prof. Dr. Gutemberg Gomes Alves e Prof.^a Dr.^a Michelle Botelho Caarls. Em seguida passou a palavra à candidata para apresentação de sua dissertação. Após apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores, e suas respostas consideradas satisfatórias.

O presidente declarou a mestranda **Isis Côrtes Teixeira da Silva**, APROVADA, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas em acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – Biotrans. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, onde foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 24 de maio de 2017.

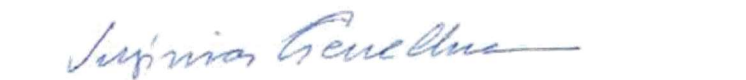

Prof.^a Dr.^a Leandra Santos Baptista
INMETRO
Orientadora


Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
INMETRO
Orientador


Prof. Dr. Plínio Mendes Senna
Universidade do Grande Rio
Presidente


Prof. Dr. Gutemberg Gomes Alves
Universidade Federal Fluminense


Prof.^a Dr.^a Michelle Botelho Caarls
Universidade Federal do Rio de Janeiro


Prof.^a Virginia Genelhu de Abreu
Coordenadora Geral do Programa
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser meu grande guia. Aos meus pais, Deusimar e Sônia, ao meu irmão, Yuri e ao meu noivo, Jair, por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Leandra, por acreditar em mim para que eu fizesse parte do grupo desde minha iniciação científica. Por estar sempre acessível e disponível para seus orientandos e estar sempre presente em nossa rotina de laboratório. Agradeço, principalmente, por se preocupar sempre com nosso crescimento e amadurecimento científico e por todos os conselhos ao longo desses anos.

Ao meu orientador, professor Jose Mauro Granjeiro, por proporcionar a oportunidade de participar deste projeto e pelas discussões científicas pertinentes ao trabalho.

A todos do grupo, Karina, Mayra, Anderson, Renata, Letícia, Gabriela, Guilherme, Thais, por auxiliarem na execução de alguns experimentos, por se prontificarem a ajudar e contribuir para que este trabalho pudesse ser realizado. Além disso, muito obrigada a todos por tornarem essa jornada mais leve e por permitirem uma rotina mais alegre!

Ao professor Kleber, muito obrigada por disponibilizar seu tempo para me ensinar e auxiliar em experimentos e por intermediar a utilização dos equipamentos no laboratório de fisiologia endócrina no Instituto de Biofísica.

À coordenadora geral da pós-graduação em Biomedicina Translacional, professora Virginia Genelhu e à coordenadora professora Carina Boghossian. Aos secretários, Luana e Allan, por estarem sempre disponíveis a resolverem questões relacionadas à pós-graduação sempre de maneira muito eficiente.

Aos funcionários, alunos, técnicos da Bioengenharia do INMETRO. Em especial, ao Dr Paulo Emílio e ao Dr Antônio Saraiva por auxiliarem na execução de experimento e utilização de equipamentos.

Aos funcionários do NUMPEX, Brunno Verçoza e Aline, por sempre poder contar com vocês para nos ajudar com nossa rotina nos auxiliando sempre.

Aos funcionários do Banco de Células do Rio de Janeiro, Antônio Monteiro, Nívea, Bruno, Guilherme, Rafaela e Thaísa. Obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar!

Ao Dr. César Claudio-da-Silva e ao Dr. Marcelo Aniceto por intermediarem a coleta de amostras de lipoaspirado.

Às professoras Mônica e Adriana pelo suporte nos experimentos *in vivo* via instituição Universidade Federal Fluminense.

Ao Dr Celso Santanna, obrigada por disponibilizar seu tempo para revisar o presente trabalho e por todas as sugestões atribuídas a esta dissertação.

Aos professores que gentilmente aceitaram participar da banca desta dissertação.

Aos doadores que se voluntariaram com as amostras para realização deste estudo.

À FAPERJ pelo auxílio financeiro.

A minha família, principalmente, por me amarem incondicionalmente e por mudarem muitas rotas de suas vidas por mim! Por compreenderem minha ausência e por serem meu refúgio em muitos momentos! Ao meu noivo, Jair, por fazer de tudo para me ver realizada. Obrigada por apoiar meus sonhos e por me compreender sem que as explicações se façam necessárias. Minhas conquistas sempre terão muito de vocês!

A Deus, pelo dom da vida. Sua presença e força sempre me capacitam para tudo aquilo que me destina!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. Madre Teresa de Calcuta

“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?” Salmos 116:12

RESUMO

DA SILVA, Isis Côrtes Teixeira. **Engenharia de cartilagem a partir de esferoides de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano**. Duque de Caxias, 2017. Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2017.

O presente estudo propõe desenvolver uma metodologia para produção de esferoides de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano (ASC), a partir da automontagem de células em sistema livre de arcabouço passível de escalonamento, induzidos para via condrogênica. As ASC foram obtidas de amostras de lipoaspirado. Para produção dos esferoides as ASC foram semeadas na superfície não aderente da agarose micromoldada e após 24 horas os esferoides já apresentaram completa compactação. Os esferoides foram mantidos *in vitro* durante 21 dias em meio de cultura normal ou em meio de indução condrogênica, contendo TGF- β 3 (fator de crescimento transformante) e dexametasona. A avaliação da viabilidade celular revelou que as células dos esferoides de ASC e os esferoides de ASC induzidos para via condrogênica apresentaram cerca de 90% de viabilidade. A análise da esfericidade dos esferoides após 21 dias de cultivo mostrou uma variação relativamente baixa entre os diâmetros maior e menor. Os esferóides de ASC induzidos apresentaram maior secreção de fatores da família TGF- β , envolvidos na via de diferenciação condrogênica. A secreção de interleucinas, IL-6 e IL-8, foi similar para ambas as condições, com decaimento ao longo dos 21 dias de cultivo. Os esferoides de ASC induzidos apresentaram aumento progressivo dos *master genes* de diferenciação condrogênica - Sox5, Sox6 e Sox9. A análise de imunohistoquímica revelou a presença de N-caderina, colágeno II e VI, agrecana e sulfato de condroitina e vimentina. Para formação de um construído para entrega de células, os sferoides de ASC induzidos foram associados às nanofibras de policaprolactona (PCL). O implante do construído na região subcutânea de camundongos revelou que os esferoides de ASC induzidos permaneceram retidos no mesmo local após 28 dias e com resposta inflamatória moderada. As análises para confirmar o fenótipo condrocítico dos esferoides implantados ainda serão realizadas. Portanto, concluímos que foi possível produzir esferoides de ASC com alta viabilidade celular, com homegeneidade no tamanho e esfericidade estáveis ao longo de 21 dias e a diferenciação condrogênica foi confirmada ao longo da cinética de indução. Com base nos resultados, os esferoides de ASC apresentaram-se promissores para aplicação no campo da engenharia de tecidos.

Palavras-chaves: Tecido adiposo, condrogênese, esferoides, cartilagem, célula-tronco.

ABSTRACT

DA SILVA, Isis Côrtes Teixeira. **Cartilage engineering from spheroids of human adipose-derived stromal/stem cells**. Duque de Caxias, 2017. Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2017.

The present study proposes to develop a methodology for the production of spheroids from human adipose-derived stromal/stem cells (ASC), from of the self-assembly of cells in scaffold-free system that is amenable to scaling, induced to the chondrogenic pathway. ASCs were obtained from liposuction samples. For the production of spheroids of the ASCs were seeded on the nonadherent surface of the micromolded agarose and after 24 hours the spheroids already presented complete compaction. The spheroids were maintained *in vitro* for 21 days in normal culture medium or in chondrogenic induction medium containing TGF- β 3 (transforming growth factor) and dexamethasone. The evaluation of cell viability revealed that the cells from ASC spheroid and induced ASC spheroids to the chondrogenic pathway presented about 90% viability. The analysis of the sphericity of the spheroids after 21 days of cultivation showed a relatively low variation between the largest and smallest diameter. The induced ASC spheroids presented higher secretion of TGF- β family factors, involved in the chondrogenic differentiation pathway. The secretion of interleukins, IL-6 and IL-8, was similar for both conditions, with decay throughout the 21 days of culture. The induced ASC spheroids showed progressive increase of master genes of chondrogenic differentiation - Sox5, Sox6 and Sox9. Immunohistochemical analysis revealed the presence of N-cadherin, collagen II and VI, aggrecan and chondroitin sulfate and vimentin. For formation of a construct for cell delivery, the induced ASC spheroids were associated with polycaprolactone (PCL) nanofibers. The implant of the built in subcutaneous region of mice revealed that the induced ASC spheroids remained retained in the same place after 28 days and with moderate inflammatory response. As analyzes to confirm the chondrocyte phenotype of the implanted spheroids will still be performed.. Therefore, we conclude that it was possible to produce ASC spheroids with high cell viability, with homogeneity in size and sphericity stable over 21 days, and chondrogenic differentiation was confirmed throughout the induction kinetics. Based on the results, the ASC spheroids were promising for application in the field of tissue engineering.

Keywords: Adipose tissue, chondrogenesis, spheroids, cartilage, stem cell.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio dos esferoides de ASC e dos esferoides de ASC induzidos para via condrogênica	34
Tabela 2. Quantificação da expressão de CD34, CD73, CD90 e CD105 das esferas controle e induzida e da monocamada	52
Tabela 3. Quantificação da expressão de CD90 e marcação de 7AAD	54
Tabela 4. Quadro de resultados gerais representado por sistema de cruzes	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7AAD: 7-Aminoactinomicina D

ANOVA: Análise de variância

ASC: *Adipose-Derived Stromal Cells* (Células Estromais Derivadas de Tecido Adiposo)

Bapx1/Nkx3.2: *bagpipe homeobox homolog 1/NK3 homeobox 2*

BMP: *Bone morphogenetic proteins* (proteínas morfogenéticas ósseas)

Caco: Cacodilatode sódio

CBA: *cytometric beads array*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CFU: *Colony-forming unit-fibroblasts* (Unidades formadoras de colônias)

CO₂: Gás carbônico

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose* (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco-baixa glicose)

EDTA: *Ethylene Diamine TetrAcetic Acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF: *Fibroblast growth factors* (fator de crescimento de fibroblastos)

FSC: *Foward Scatter* (Espalhamento Frontal)

GAG: Glicosaminoglicanos de ligação

HE: Hematoxilina e Eosina

HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

ICRS: *International Cartilage Repair Society*

IFATS: *International Federation for Adipose Therapeutics*

IFATS: *International Federation for Adipose Therapeutics* (Federação Internacional de Terapêutica de Tecido Adiposo)

IL: Interleucina

ISCT: *International Society for Cellular Therapy*

ITS: Insulina, Transferrina e Selênio

MEC: Matriz extracelular

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MSC: Mesenchymal stem cell (célula tronco mesenquimal)

PBS: Phosphate buffered saline (salina de fosfato tamponada)

PCL: policaprolactona

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PPRA- γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gama* (Proliferador de peroxissomas ativado por receptor gama)

PS: *Penicilinand Streptomycin* (Penicilina e Estreptomicina)

RNA: *Ribonucleicacid* (Ácido ribonucleico)

RPM: Rotação por minuto

RT-PCR: *Reverse transcriptase-polymerasechainreaction* (Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa)

Runx2: *Runt-related transcription factor 2*

SFB: Soro fetal bovino

SMAD: *Mothers against decapentaplegic homolog*

Sox: *Sex determining region Y-box*

SSC: *Sides catter* (Espalhamento lateral)

SVF: *Stromal-Vascular Fraction* (Fração Estromal-Vascular)

TA: Temperatura ambiente

TAB: tecido adiposo branco

TGF-beta: *Transforming Growth Factor- beta* (Fator de Crescimento transformante- β)

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)

Wnt: *Wingless-type MMTV integration site family*)/ β -catenina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diferenciação de MSC	3
Figura 2. Diferenciação temporal da condrogênese	7
Figura 3. Diferenciação de MSC para a via condrogênica	9
Figura 4. Etapas das principais etapas do desenvolvimento da cartilagem articular	11
Figura 5. Morfologia da cartilagem articular associadas à suas propriedades mecânicas	13
Figura 6. Fases de diferenciação condrogênica	17
Figura 7. Esquema proposto de como o TGF-β3 atua na condrogênese ..	19
Figura 8. Presença do TGF-β na cartilagem articular desde o início da diferenciação	20
Figura 9. Etapas da produção da agarose micromoldada	33
Figura 10. Etapas de preparo das nanofibras presas às inserções	44
Figura 11. Procedimentos do implante dos esferóides de ASC associados a nanofibra de PCL na região subcutânea de camundongos	46
Figura 12. Etapas de preparo da agarose micromoldada em 3D Petri Dish®	47
Figura 13. Etapas de produção dos esferóides em agarose micromoldada	49
Figura 14. Medição do diâmetro de esferóides controle e induzidos ao longo de 21 dias	48
Figura 15. Análise da expressão de CD34, CD73, CD90 e CD105 em esferóides de ASC, esferóides de ASC induzidos e ASC em monocamada em terceira passagem	51
Figura 16. Comparação do tamanho celular de ASC cultivadas em monocamada e após serem mantidas em cultivo tridimensional	52
Figura 17. Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo e por marcação citoplasmática e nuclear em células de esferóide após 21 dias de cultivo	54

Figura 18. Análise histológica de esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias.....	56
Figura 19. Dosagem de citocinas no sobrenadante do cultivo de esferóides de ASC controle e induzidos para via condrogênica.....	57
Figura 20. Dosagem de TGF- β 1, - β 2 e - β 3 no sobrenadante do cultivo de esferóides de ASC controle e induzidos para via condrogênica	59
Figura 21. Ensaio de resistência mecânica dos esferóides de ASC em comparação com os esferóides de ASC induzidos após ao longo dos 21 dias de cultivo	60
Figura 22. Análise da expressão de mRNA de <i>master genes</i> por PCR em tempo real	62
Figura 23. Composição de colágeno I em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução.....	64
Figura 24. Composição de colágeno II em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução.....	65
Figura 25. Composição de colágeno VI em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução	66
Figura 26. Gráficos semi-quantitativos da marcação de colágenos em esferóides induzidos.....	67
Figura 27. Composição de sulfato de condroitina em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução.....	68
Figura 28. Composição de agrecana em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução.....	69
Figura 29. Gráficos semi-quantitativos da marcação de componentes de MEC em esferóides induzidos.....	70
Figura 30. Composição de vimentina em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução.....	71
Figura 31. Composição de N-caderina em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução.....	72
Figura 32. Gráficos semi-quantitativos da marcação de moléculas de adesão em esferóides induzidos	73
Figura 33. MEV de esferóides de ASC induzidos para via condrogênica .	74
Figura 34. Ensaio de fusão de esferóides induzidos	77

Figura 35. Associação dos esferoides de ASC induzidos em nanofibras de PCL	78
Figura 36. Imagens macroscópicas dos esferoides associados à nanofibra de PCL após 3, 14 e 28 dias.....	79
Figura 37. Análise de HE e tricromo de Masson de esferoides associados à nanofibras e implantado na região subcutânea de camundongos após 3 dias	80
Figura 38. Análise de HE e tricromo de Masson de esferoides associados à nanofibras e implantado na região subcutânea de camundongos após 14 dias.....	81
Figura 39. Análise de HE e tricromo de Masson de esferoides associados à nanofibras e implantado na região subcutânea de camundongos após 28 dias.....	82
Figura 40. Desenhos esquemáticos das etapas da diferenciação condrogênica observadas na indução de ASC <i>in vitro</i> durante a cinética de 21 dias	98

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	1
1.1.2 Tecido adiposo branco subcutâneo como fonte de MSC	3
1.2 DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA	6
1.2.1 Diferenciação condrogênica da cartilagem articular	9
1.3 REGULADORES TRANSCRIPCIONAIS NA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA	14
1.4 FATORES DE CRESCIMENTO E REGULADORES PARACRINOS NA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA	17
1.5 CARTILAGEM ARTICULAR: COMPOSIÇÃO	22
1.6 DEFEITOS NA CARTILAGEM E TRATAMENTOS PARA DANOS DA CARTILAGEM	24
1.7 CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE CARTILAGEM EM SISTEMA LIVRE DE ARCABOUÇO	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 PACIENTES	31
4.2 ISOLAMENTO DAS SVF DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO	31
4.3 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS ASC	32
4.3.1 Cultivo bi-dimensional	32
4.3.2 Metodologia para biofabricação da agarose micromoldada	32
4.3.3 Cultivo tridimensional – Esferóides	33
4.4 MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS DOS ESFEROIDE	34
4.5 ANÁLISE FENOTÍPICA E DE VIABILIDADE DOS ESFEROIDES	34
4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO: FIXAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS	36
4.7 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)	36

4.8 PERFIL DE SECREÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS	37
4.8.1 Quantificação da secreção de citocinas	37
4.8.2 Quantificação da secreção de TGF-β1, -β2, -β3	38
4.9 ENSAIO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS ESFEROIDES DE ASC E DOS ESFEROIDES DE ASC INDUZIDOS.....	39
5. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS mRNA POR PCR EM TEMPO REAL	39
5.1 ANÁLISES DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
5.2 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DA COLORAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA	41
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	42
5.4 ENSAIO DE FUSÃO DOS ESFEROIDES INDUZIDOS	42
5.5 ENSAIO DE ASSOCIAÇÃO DOS ESFEROIDES DE ASC INDUZIDOS ÀS NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA (PCL)	43
5.6 IMPLANTE NA REGIÃO SUBCUTÂNEA DE CAMUNDONGOS DOS ESFEROIDES ASSOCIADOS ÀS NANOFIBRAS.....	44
6. RESULTADOS.....	47
6.1 PRODUÇÃO DA AGAROSE MICROMOLDADA E DOS ESFEROIDES DE ASC	47
6.2 ESFEROIDES DE ASC RECELARAM DIFERENÇAS NO FENÓTIPO E NO TAMANHO CELULAR EM RELAÇÃO AS ASC CULTIVADAS EM MONOCAMADA	50
6.3 ESFEROIDES PRODUZIDOS POR AGAROSE MICROMOLDADA APRESENTAM ALTA VIABILIDADE CELULAR COM AUSÊNCIA DE CENTROS NECRÓTICOS NOS ESFEROIDES DE ASC INDUZIDOS.....	53
6.4 ESFEROIDES DE ASC POSSUEM DIFERENÇAS NO PERFIL DE SECREÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS E DE FATORES DE CRESCIMENTO QUANDO COMPARADO COM OS ESFEROIDES DE ASC INDUZIDOS PARA A VIA CONDRÓGENICA	57
6.5 COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA MECÂNICA ENTRE OS ESFEROIDES DE ASC E OS ESFEROIDES DE ASC INDUZIDO.....	60
6.6 ESFEROIDES DE ASC APRESENTAM VARIAÇÕES NA EXPRESSÃO DE MASTER GENES AO LONGO DA INDUÇÃO CONDRÓGENICA.....	61

6.7 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE ESFEROIDES DE ASC INDUZIDOS PARA A VIA CONDROGÊNICA.....	73
6.8 ENSAIO DE FUSÃO E ASSOCIAÇÃO DE ESFEROIDES DE ASC INDUZIDOS À NANOFIBRA DE POLICAPROLACTONA.....	77
7. DISCUSSÃO	83
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
9. CONCLUSÃO	100
10. REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO I - FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEP	123
ANEXO II - FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEUA.....	124

1. INTRODUÇÃO

A cartilagem articular em indivíduos adultos possui um limitado potencial de regeneração e seus defeitos frequentemente progridem para osteoartrite. A osteoartrite trata-se de uma enfermidade multifatorial, que afeta diversas estruturas no ambiente articular (Litwic et al., 2013; Martel-Pelletier, et al., 2016). Desta forma, tem sido cada vez mais requerido alternativas que visem regenerar tecidos danificados de maneira funcional. A engenharia de tecidos tem sido um campo de grande interesse, visto que apresenta potencial para melhorar a terapia da cartilagem articular, uma vez que visa reparar, regenerar e/ou melhorar a funcionalidade da cartilagem articular lesada (Liu et al., 2017).

Os condrócitos configuram a principal fonte de células utilizada em engenharia de cartilagem, sendo normalmente isoladas do tecido de cartilagem articular. Essas células têm sido amplamente utilizadas para tratamento de defeitos na cartilagem (Phulle et al., 2016). No entanto, os condrócitos são derivados de uma fonte de células em comum, as células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *Mesenchymal Stem Cell*) (Caplan et al., 1991), e diferente dos condrócitos adulto, as MSC podem ser facilmente obtidas e encontradas em diversos tecidos no organismo adulto (Kobolak et al., 2016).

Neste contexto, as MSC têm sido consideradas como uma importante ferramenta no campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa, principalmente, devido seu potencial em se diferenciar em múltiplas linhagens (Zuk et al., 2002). Além disso, as MSC têm sido descritas como capazes de secretar moléculas com ação bioativa que estão envolvidas, principalmente, em processos de reparo tecidual (Gnecchi et al., 2008). Tais moléculas estão presentes em diversas etapas biológicas fundamentais para aplicação em protocolos no campo de regeneração tecidual, incluindo proliferação celular, diferenciação, sinalização, adesão (Tran e Damaser, 2014).

1.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As MSC podem ser isoladas de uma variedade de tecidos, como medula óssea (Pittenger et al., 1999), membrana sinovial (De Bari et al., 2001a), periósteo (Nakahara et al., 1991; De Bari et al., 2001), osso (Sottile et al., 2002), músculo (Mastrogiacomo

et al., 2005), tecido adiposo (Zuk et al., 2001; Baptista et al., 2009), cordão umbilical humano (Sarugaser et al., 2004). As MSC tornaram-se uma potencial fonte de células para estratégias terapêuticas, principalmente devido a sua capacidade intrínseca de se auto renovar em um estado indiferenciado, ou seja, são capazes de gerar cópias idênticas de si mesmas através da divisão mitótica, que pode ocorrer durante toda vida do organismo adulto. Além disso, são capazes de se diferenciar em um ou mais tipos de células especializadas no organismo adulto dependendo do seu potencial de diferenciação (Kolf et al., 2007) (**Figura 1A**).

No entanto, é fundamental considerar que as MSC de diferentes tecidos não são necessariamente idênticas e podem apresentar diferenças funcionais distintas (Strioga et al., 2012; Wegmeyer et al., 2013), ou seja, as características celulares das MSC vão depender do seu tecido de origem. Desta forma, diferentes fontes de MSC requerem protocolos específicos para se diferenciarem em determinados tipos celulares.

Além das diferentes características das MSC observadas entre as diversas fontes de tecidos, estudos indicam que as MSC da mesma fonte de tecido também representam uma mistura heterogênea de células-tronco multipotentes, visto que essa diferença também pode ocorrer dentro da população de MSC (Muraglia et al., 2000; Bianco et al., 2001; Baksh et al., 2004). Essa heterogeneidade de MSC está principalmente relacionada com a presença de células em diferentes estágios de diferenciação. Portanto, as MSC da mesma fonte de tecido possuem diferentes potenciais para diferenciarem em múltiplas linhagens, podendo se diferenciar em até quatro tipos celulares distintos (Baksh et al., 2004) (**Figura 1B**).

Desta forma, as MSC são definidas como sendo uma população heterogênea de células multipotentes capazes de se diferenciarem em diferentes tipos celulares de linhagens mesodermas, tais como adipócitos, osteócitos, fibroblastos e condrócitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Zvaifler et al., 2000; Campagnoli et al., 2001; Erices et al., 2000) (**Figura 1A**).

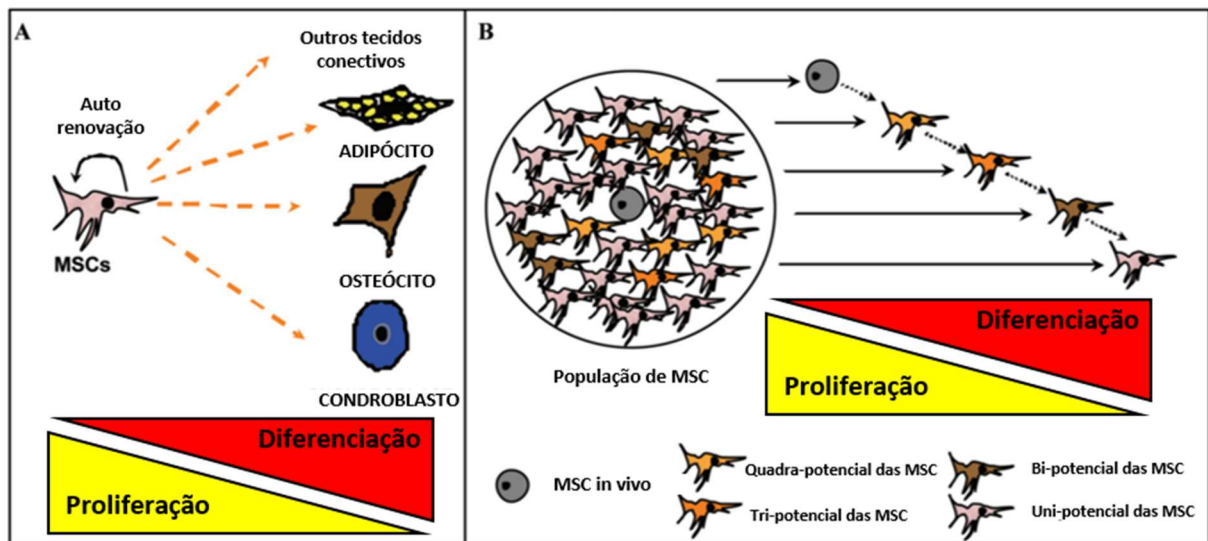


Figura 1. Diferenciação de MSC. As MSC são capazes de se diferenciar em distintos tipos de células da linhagem mesodermal e além disso possuem o potencial de se auto renovarem e quando expostas à um determinado ambiente essas células são estimuladas a se comprometerem com uma determinada via de diferenciação (**A**). Modelo proposto, alternativo ao modelo de diferenciação das MSC, que relata que a MSC apresenta uma população heterogênea de células com diferentes potenciais de diferenciação (**B**) (Baksh et al., 2004).

Estudos têm mostrado que MSC derivadas do tecido adiposo configuram uma atrativa fonte de células para engenharia de cartilagem *in vitro* e *in vivo* (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002; Gimble et al., 2003; Im, 2005; Jin et al., 2007; Zhu et al., 2008). Porém, apesar das MSC de tecido adiposo já ter sido utilizada em vários ensaios clínicos (Gir et al., 2012; Feisst et al., 2015), poucos utilizam a abordagem da engenharia de tecidos.

1.1.2 Tecido adiposo branco subcutâneo como fonte de MSC

O tecido adiposo branco (TAB) subcutâneo é derivado do mesênquima e apresenta um suporte estromal que pode ser facilmente isolado para manipulação *in vitro*. O TAB é composto por adipócitos maduros uniloculares e por uma fração estromal-vascular (SVF, do inglês *Stromal-Vascular Fraction*) (Trayhurn et al., 2007). Essas duas grandes frações podem ser fisicamente separadas após centrifugação do tecido digerido com collagenase, visto que a fração dos adipócitos fica flutuante (Rodbell et al., 1964) e as células da SVF se sedimentam (Cousin et al., 2006).

A SVF do TAB subcutâneo é composta por uma mistura heterogênea de células, como progenitoras endoteliais, fibroblastos, células sanguíneas, macrófagos,

pré-adipócitos e MSC (Peterson et al., 2005; Corselli et al., 2010; Gimble et al., 2011). Portanto, a SVF pode ser separada em dois compartimentos distintos, um estromal e um hematopoético (Cousin et al, 2006; Baptista et al, 2007).

A seleção das MSC e das demais células da SVF, ocorre por aderência ao plástico. As células aderentes da SVF do tecido adiposo subcutâneo, durante muito tempo, foram denominadas como sendo MSC. No entanto, como relatado anteriormente, as MSC possuem características intrínsecas que são determinadas pelo seu local de origem. Desta forma, a Federação Internacional de Terapêutica de Tecido Adiposo (IFATS, do inglês *International Federation for Adipose Therapeutics*) e a Sociedade internacional para Terapia Celular (ISCT, do inglês *International Society for Cellular Therapy*) estabeleceram uma nomenclatura para as células aderentes da SVF de tecido adiposo, a qual passou a ser denominada como ASC (*Adipose-Derived Stromal/Stem Cells*, Células-Tronco/Estromais Derivadas de Tecido Adiposo) (Bourin et al, 2013). Portanto, ficou determinado que toda população de células estromais isoladas da SVF do tecido adiposo que fossem aderentes ao plástico seriam nomeadas como ASC.

O TAB subcutâneo é capaz de se expandir ao longo da vida adulta. Essa dinâmica observada no TAB é mediada pela presença de células vasculares e não-vasculares, como as ASC, que detém a capacidade de se diferenciar e conduzir o aumento do tecido (Strem et al, 2005).

Estudos têm documentado que 1 grama de TAB pode render cerca de 2×10^6 células, sendo 10% referente às ASC (Aust et al., 2004; Oedayrajsingh-Varma et al., 2006; Zhu et al., 2008; Baptista et al., 2009). Por outro lado, aspirados da medula óssea rendem, em média, 6×10^6 células nucleadas/mL e obtém-se apenas 0,001 a 0,01% de MSC (Pittenger et al., 1999). Além disso, foi encontrado 10 vezes mais unidades formadoras de colônias (*CFU-F*, do inglês *colony-forming unit-fibroblasts*), de ASC quando comparado com MSC de medula óssea (Zhu et al., 2012). Outro benefício das ASC é a potencial fonte de células tronco/estromal autólogas que pode ser facilmente obtida a partir de depósitos de tecido adiposo subcutâneo, através, por exemplo, de procedimentos de lipoaspiração, que é uma técnica minimamente invasiva (Zuk et al., 2001). Desta forma, as ASC têm sido proposta como uma alternativa à utilização das MSC de medula óssea para aplicações clínicas.

Além disso, a *ISCT* e *IFATS* estabeleceram alguns critérios para a caracterização das ASC. Os critérios propostos são: (1) aderência a plástico, (2) expressar um padrão de perfil imunofenotípico e (3) multipotencialidade para as linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica (Bourin et al., 2013).

As ASC, assim como as MSC, também representam uma população celular heterogênea (Zuk et al., 2002; Baer e Geiger, 2012, Baer et al., 2014). Noer e colaboradores (2006) e Schellenberg e colaboradores (2011) mostraram essa heterogeneidade dentro da população de ASC. Desta forma, não existe um marcador de superfície único para ASC. Porém, já foi relatado que estas células compartilham alguns marcadores de superfície das MSC. O perfil de marcação estabelecido pela *ISCT* e *IFATS* inclui marcadores primários positivos (com mais de 80%) - CD90 (Thy-1), CD105 (endoglina), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD44 (receptor de ácido hialurônico), CD29 (β 1-integrina), CD13 (aminopeptidase-N), CD146 (molécula de adesão celular do melanoma) – marcadores secundários positivos - CD10 (neprilisina), CD26 (dipeptidil peptidase-4), CD48d (α 4-integrina), CD49e (α 5-integrina), CD36 (Translocase de ácido graxo) - e marcadores primários negativos (menos que 2%) - CD31 (Molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas), CD45 (leucócito relacionado ao antígeno-antígeno D) e marcadores secundários negativos - CD3 (co-receptor de célula T), CD11b (α 6-integrina), CD49F (α M-integrina) e CD106 (proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM-1). Já a expressão do CD34 é compartilhada com progenitores endoteliais e sua presença na população de ASC vai depender do cultivo celular (Bourin et al., 2013).

Apesar do estabelecimento de um padrão para os marcadores de superfície, pode ocorrer variações principalmente devido ao método de cultivo, ao número de passagem, bem como a padronização do isolamento. Estudos mostraram que a expressão de CD34 apresenta marcação positiva durante as primeiras passagens, seguido de um decaimento da expressão ao longo das passagens (Baptista, 2008; Baer et al., 2014, Tsuji, et al., 2014). Além disso, foi relatado que o perfil de marcação também pode apresentar variação no cultivo 2D quando comparado com o cultivo 3D ou o encontrado *in vivo* (Gimble et al., 2011).

Diversos estudos têm demonstrado a plasticidade das ASC, que apresenta potencial de diferenciação para as linhagens adipogênica, osteogênica, condrogênica e miogênica (Zuk et al., 2001; Mizuno et al., 2002; Zuk et al., 2002; Gimble e Guilak,

2003A; Gimble e Guilak, 2003B; Jack et al., 2005; Strem et al., Fraser et al., 2006; Rodriguez et al., 2006; Lee et al., 2006; Baptista et al., 2009; Baptista et al., 2013). No entanto, o uso clínico de ASC como produto engenheirado requer extensa caracterização tanto *in vitro* como *in vivo* para assegurar a sua multipotencialidade.

1.2 DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA

A condrogênese é uma etapa primordial do desenvolvimento esquelético no período embrionário. Nesse processo as células mesenquimais se condensam (Thorogood e Hinchliffe, 1975), formando aglomerados de células, que é propiciado através da expressão de moléculas de adesão (Hall e Miyake, 2000), como a N-caderina (DeLise et al., 2000, Youssef et al., 2011). Esse processo é seguido da diferenciação e maturação das células, onde as células mesenquimais localizadas no centro da condensação celular se diferenciam em condrócitos e as células da periferia formam o pericôndrio (Caplan and Pechak, 1987). A proliferação dos condrócitos e intensa produção de matriz leva ao aumento da cartilagem. Os condrócitos localizados no centro do molde da cartilagem param de proliferar, sofrem hipertrofia e passam então a secretar colágeno do tipo X (Poole, 1991).

Condrócitos hipertróficos estão envolvidos principalmente com a produção de matriz mineralizada e com a secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), que atua de maneira a atrair vasos sanguíneos (Ferrara et al., 2003). A secreção do VEGF desencadeia a invasão de capilares sanguíneos, que induz a apoptose dos condrócitos hipertróficos. A invasão vascular também propicia uma porta de entrada para osteoprogenitores, que se diferenciam em osteoblastos e estabelecem o centro de ossificação primária com o intuito de gerar o osso trabecular (Maes et al., 2010). Por fim, a matriz cartilaginosa gerada pelos condrócitos passa a ser utilizada como molde para os osteoblastos e para os vasos sanguíneos que invadiram o molde de cartilagem com o intuito de estabelecer uma matriz óssea a partir deste arcabouço (Cancedda, 1995) (**Figura 2**).

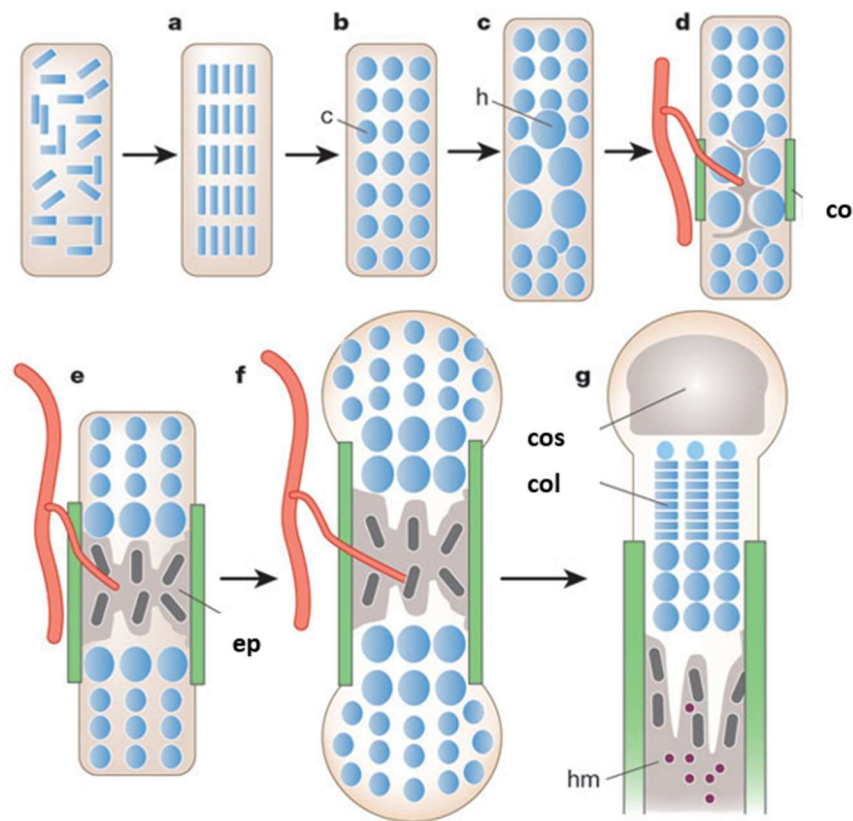


Figura 2. Diferenciação temporal da condrogênese. Células mesenquimais se agregam e sofrem condensação (A). As células condensadas diferenciam-se em condrócitos (B). Os condrócitos localizados no centro da condensação param a proliferação e assumem um fenótipo hipertrófico (C). As células adjacentes aos condrócitos hipertróficos tornam-se osteoblastos, formando um colar de osso (co). Condrócitos hipertróficos atraem os vasos sanguíneos, produzem matriz mineralizada e posteriormente entram em apoptose (D). Osteoblastos acompanham a invasão vascular e formam a camada esponjosa primária (ep) (E). O osso é alongado pela proliferação dos condrócitos. Os osteoblastos atuam como precursores do osso trabecular (F). Na extremidade do osso, o centro de ossificação secundária (cos) é formado devido a hipertrofia dos condrocitos, invasão vascular e atividade osteoblástica. A placa de crescimento localizada abaixo do centro secundário de ossificação forma colunas ordenadas de condrócitos em intensa atividade de proliferação (col). Medula hematopoética (hm) (G) (Henry M. Kronenberg, 2003).

Interessantemente, os condrócitos da cartilagem articular mantêm seu fenótipo e não se diferenciam em condrócitos hipertróficos, exceto em condições patológicas (Kawaguchi et al., 2008; Brondello et al., 2010; Steck et al., 2009; Chen et al., 2013). Assim, enquanto os condrócitos que compõem a placa de crescimento da ossificação endocondral apresentam-se completamente dinâmicos e transitórios, os condrócitos da cartilagem articular parecem apresentar um caminho de diferenciação mais conservador. Tem sido sugerido a possibilidade da existência de subpopulação de

células progenitoras com diferentes origens e destino de desenvolvimento (Dy et al., 2012; Kan et al., 2013).

As células condroprogenitoras podem apresentar origens distintas devido sua localização embrionária. As células da crista neural podem se diferenciar em progenitores osteocondral e posteriormente em células condroprogenitoras que darão origem a cartilagem craniofacial como a cartilagem condilar mandibular (hialina, fibrocartilagem), cartilagem do septo nasal (hialina) e da orelha externa (elástica). Os precursores paraxial mesodermal darão origem as células do esclerótomo e posteriormente se diferenciam em células condroprogenitoras que originarão a cartilagem axial, como cartilagem no disco intervertebral (fibrocartilagem) e a cartilagem costal (hialina). Precursores do mesoderma lateral darão origem as células mesenquimais e posteriormente as células condroprogenitoras que será responsável pela formação da cartilagem apendicular, como cartilagem articular (hialina), menisco (fibrocartilagem) e tendão (fibrocartilagem) (Naumann et al., 2002; Revisado por Somoza et al., 2013).

Logo, é possível notar que a cartilagem hialina pode ser proveniente de diferentes origens, sendo sua especificação funcional determinada pela sua localização. Além disso, é sugerido que a cartilagem hialina pode ser influenciada por sinais fisiológicos, físicos e mecânicos específicos de diferentes locais. Desta forma, os fatores ambientais parecem influenciar a determinação da cartilagem. Assim, a classificação da cartilagem pode ser determinada por diferenças moleculares e estruturais (Naumann et al., 2002). Entretanto, detalhes a respeito do controle e formação da cartilagem ainda não são bem compreendidos. A capacidade das MSC de seguir na via de diferenciação da ossificação endocondral foi confirmada por diversos autores (Mackie et al., 2007; Ghosh et al., 2009; Wuelling et al., 2010; Long et al., 2013). Porém, existem muitas dúvidas em relação a diferenciação das MSC em condroprogenitores. Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de entender quais mecanismos e fatores são requeridos para diferenciação das MSC nos diversos tipos de cartilagem (**Figura 3**).

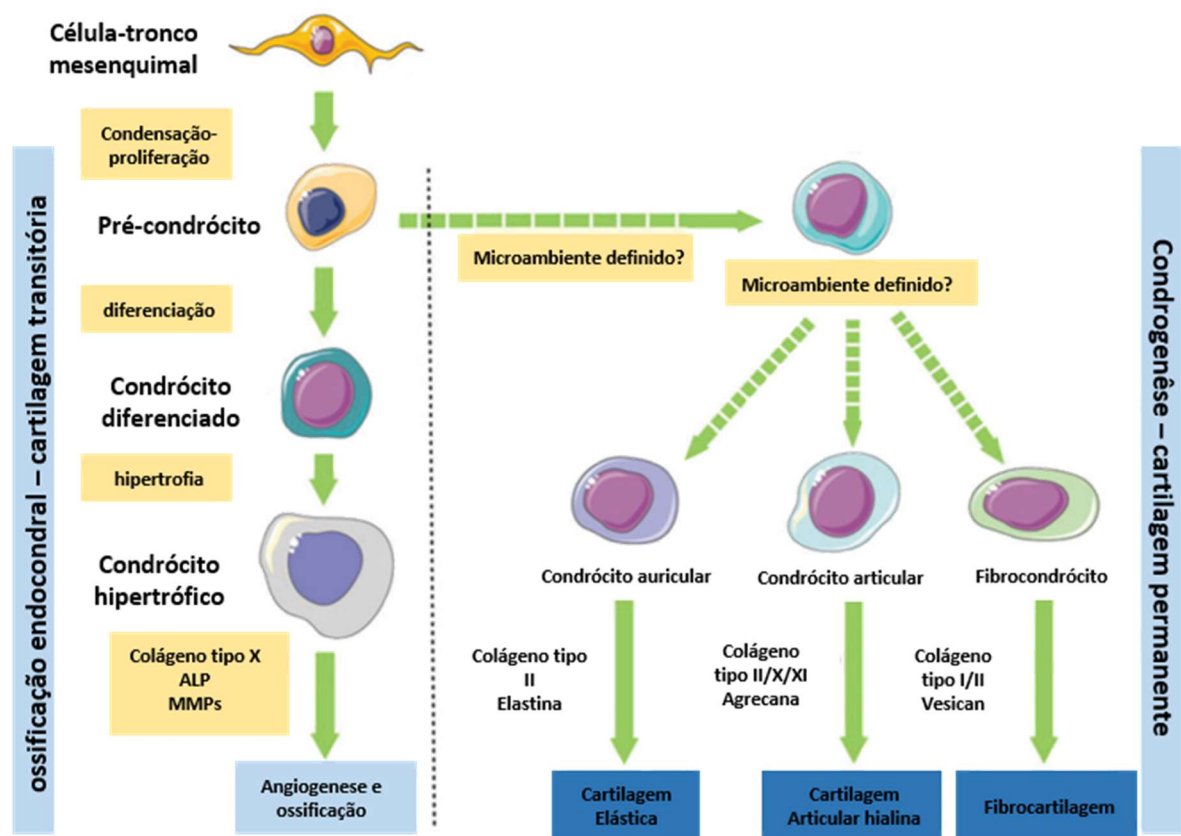


Figura 3. Diferenciação de MSC para a via condrogênica. A diferenciação condrogênica da cartilagem transitória da ossificação endocondral apresenta uma sequência de eventos já bem compreendida. No entanto, conhecimentos a respeito do ambiente requerido para diferenciação de condrócitos auricular, articular e fibrocondrócitos ainda estão sendo estudados (Somoza et al., 2013).

1.2.1 Diferenciação condrogênica da cartilagem articular

O primeiro indicio da formação das articulações é o aparecimento de células mesenquimais compactadas e achatadas nos locais de junções. A localização dessas células foi denominada como interzona, uma vez que elas interrompem a cartilagem primária em regiões de junções, gerando um intervalo entre as articulações. A interzona origina a camada articular dos ossos longo no organismo adulto e foi demonstrado que a remoção dessas células localizadas nas extremidades de junção resultou na desestabilização das articulações ao longo do tempo (Holder et al., 1977). Os condrócitos que se desenvolvem a partir da condensação mesenquimal e participam da ossificação endocondral, são denominados como transitórios. Como abordado anteriormente, ainda não se sabe se essas células da interzona, que

originam a cartilagem articular, são derivadas de pré-condrócitos locais, ou se há uma migração de células mesenquimais para o local da articulação, ou ainda, se ocorre uma combinação das duas populações de células (Pacifici et al., 2000, Archer et al., 2003).

Em resumo, o desenvolvimento da cartilagem articular tem início com a condensação mesenquimal, apresentando uma distribuição de células homogênea (**Figura 4A**) (Holder et al., 1977; Mitrovic et al., 1978; Hinchliffe et al., 1980; DeLise et al., 2000). Porém, pouco tempo depois torna-se ocupada por um compartimento intermediário denso com a presença de células achatadas e bastante compactadas entre si, sendo este o local da futura articulação, e dois outros compartimentos paralelos um ao outro com as células mais espaçadas. A interzona é composta por células mesenquimais que se organizam através de junções do tipo *gap* (Archer et al., 2003). No entanto, as células presentes na condensação mesenquimal adjacente à região da interzona são estimuladas a se diferenciarem em condrócitos e a produzirem matriz cartilaginosa a qual posteriormente utilizada como arcabouço para o esqueleto (**Figura 4B**). Posteriormente, os condrócitos da interzona se organizam em cada extremidade epifisária (**Figura 4C**), e começam a moldar o local da articulação a partir de processos morfogenéticos (**Figura 4D**), originando os condrócitos articulares, bem como outros componentes da articulação, incluindo a cápsula sinovial (**Figura 4D**) (Pacifici et al., 2000; Pacifici et al., 2006; Decker et al., 2016).

Estudo realizado recentemente relatou que esses compartimentos são compostos por células com diferentes fenótipos e destinos e a análise do perfil transcricional revelou que as células da articulação do joelho de embrião de camundongos apresentam genes associados com a formação da articulação nas células que compunham o compartimento intermediário. Enquanto que genes associados a maturação da cartilagem, assim como genes relacionados a hipertrofia foram altamente expressos pelas células situadas nos compartimentos adjacentes (Jenner et al., 2014). Portanto, ficou evidente que as células do compartimento intermediário deram origem à cartilagem articular, provavelmente representando as células da interzona, em contrapartida as células do compartimento externo foram destinadas à ossificação endocondral.

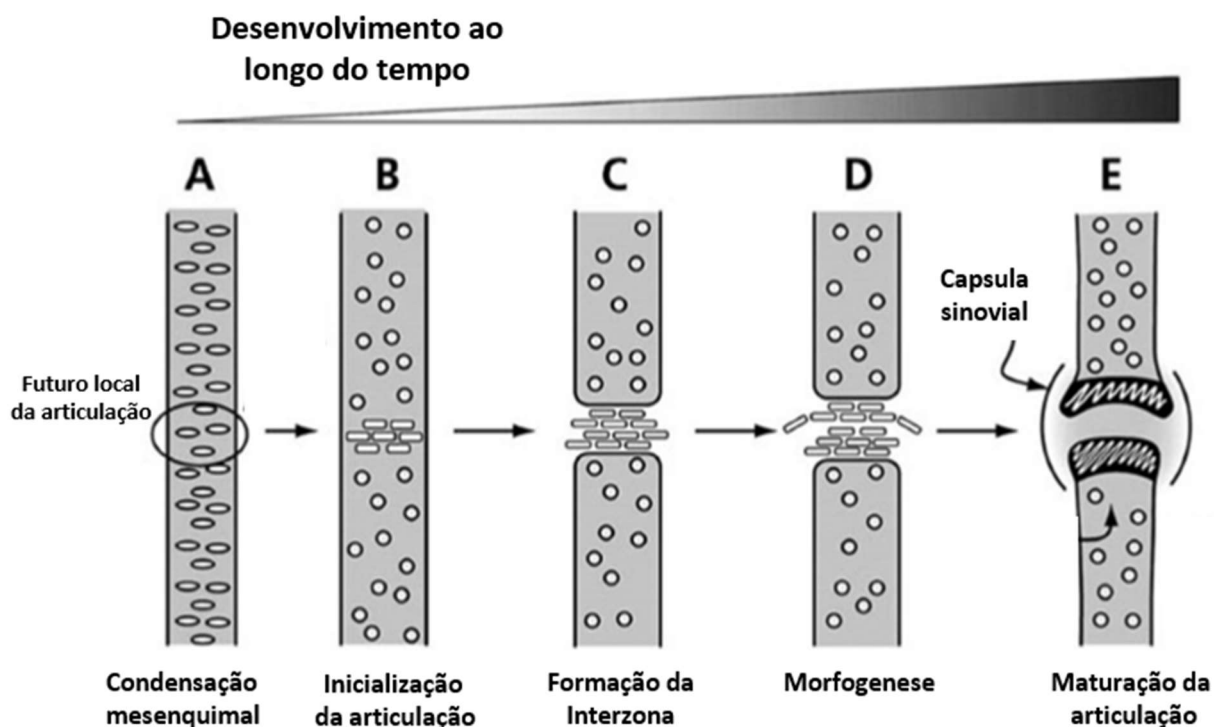


Figura 4. Etapas das principais etapas do desenvolvimento da cartilagem articular. Condensação mesenquimal (A). Diferenciação das células mesenquimais em um elemento cartilaginoso ininterrupto e empilhamento das células com uma morfologia mais achatada no local da interzona (B). Formação da interzona (C). Diferenciação interzonal em uma camada intermediária e duas camadas condrogênicas. A interzona e o seu tecido cartilaginoso epifisário adjacente moldam a articulação em uma configuração tridimensional requerida a partir de um processo morfogenético (D). Desenvolvimento dos condrócitos com todos os componentes requeridos para uma articulação madura, tais como a cartilagem articular e cápsula (E). Pacifici et al., 2006.

A cartilagem articular madura apresenta-se organizada em zonas, que é dividida em uma camada superficial, uma camada intermediária e uma camada profunda. Essas distinções entre as zonas são avaliadas em termo de organização e tamanho celular, orientação das fibras de colágeno, forma e função da célula, bem como a composição da matriz extracelular (Buckwalter et al., 1998; Hasler et al., 1999; Mankin et al., 2000). A zona superficial da cartilagem madura consiste em células com tamanho pequeno com morfologia alongada inseridas dentro de uma fina camada de matriz extracelular composta principalmente por colágeno do tipo II. Onde as fibras apresentam-se paralelas à superfície articular e apresenta baixo conteúdo de proteoglicanos, essa composição garante a elevada rigidez e capacidade de distribuir a carga recebida sobre a superfície e, portanto, proteger as camadas mais profundas. A zona intermediária é composta por condrócitos grandes com morfologia

arredondada e, na maioria das vezes, apresentam-se organizados em colunas. Esses condrócitos também produzem moléculas de matriz da cartilagem, tais como colágeno do tipo II e agrecana. No entanto, nesta zona, as fibras de colágeno apresentam-se dispostas aleatoriamente. Essa camada tem como função de garantir a resistência biomecânica do tecido graças a elevada concentração de proteoglicanos (Hunziker et al., 1992; Marcel et al., 1992). Os condrócitos da zona profunda apresentam-se maiores e dispostos perpendicularmente à superfície articular, desencadeando maior resistência às forças compressivas e estão em contato direto com o osso subjacente (Hunziker et al., 1997; Huber et al., 2000; Pearle et al., 2004; Onyekwelu et al., 2009; Rebekah et al., 2015) (**Figura 5**).

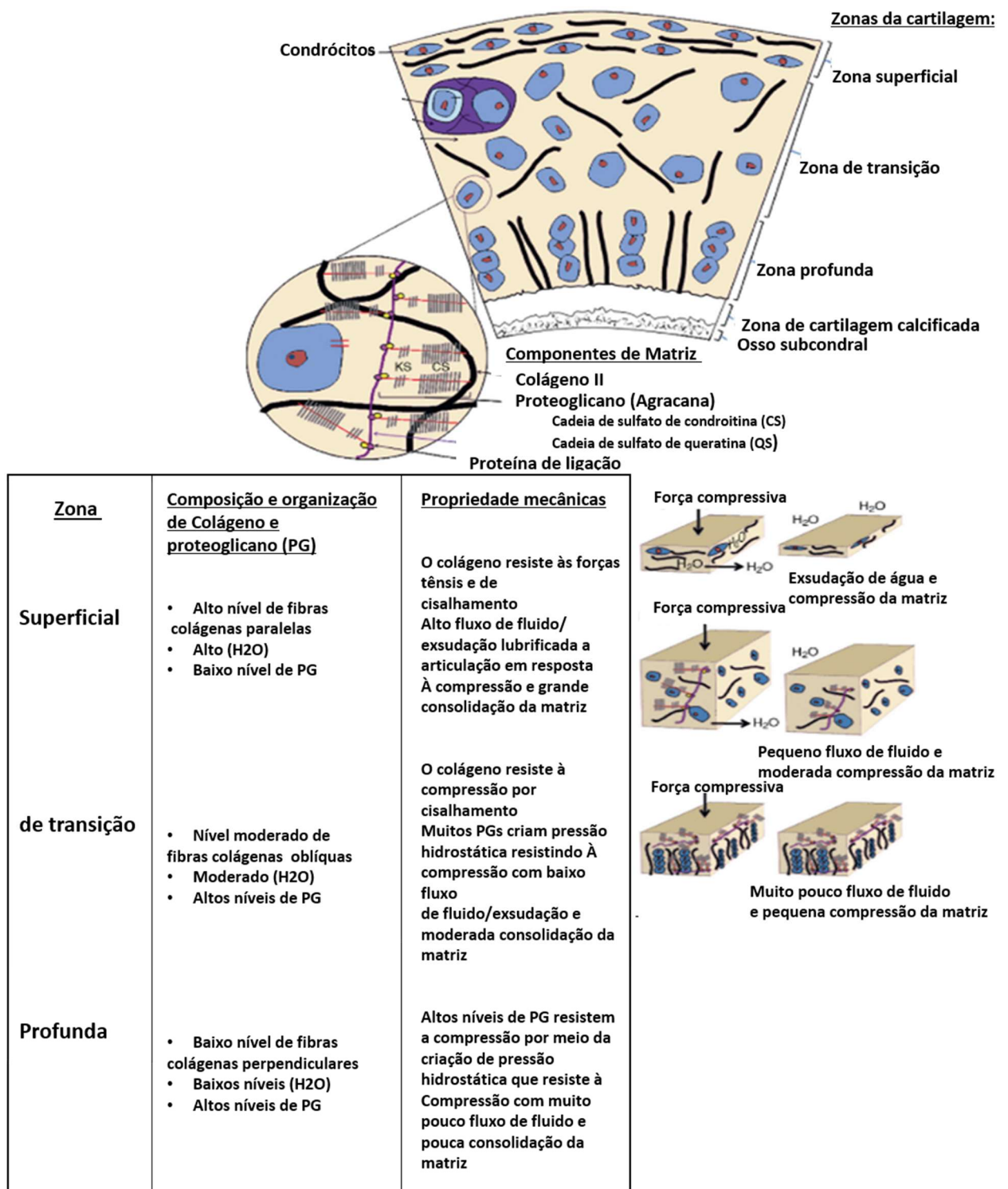


Figura 5. Morfologia da cartilagem articular associadas às suas propriedades mecânicas.
Scott et al., 2015.

1.3 REGULADORES TRANSCRIPCIONAIS NA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA

Decodificar os mecanismos celulares e moleculares que direcionam a condrogênese é um pré-requisito para decifrar as causas de vários tipos de doenças que acometem os seres humanos e gerar conhecimento para desenvolvimento de tratamentos. Uma dessas doenças é a condrodisplasia que é desencadeada por malformação esquelética e pode ser letal no período perinatal ou resultar em nanismo (Bonafe et al., 2015). Em contrapartida, a osteoartrite é caracterizada pela degeneração progressiva da cartilagem articular (Allen et al., 2015).

Como abordado anteriormente, embora a cartilagem das placas de crescimento apresentem-se em constante alteração durante o crescimento fetal e pós-natal a cartilagem articular apresenta remodelação bastante limitada no organismo adulto. Isso ocorre pois os destinos de diferenciação dos condrócitos são influenciados por muitos fatores regulatórios. Todos os tipos de células co-expressam milhares de genes ubíquos e centenas de genes específicos de uma determinada via de diferenciação. Muitos estudos são realizados com o intuito de compreender esses programas de transcrição que dirigem a especificidade de cada tipo celular. Há três décadas atrás a expressão do fator de transcrição *MyoD* mostrou-se suficiente para diferenciar células-tronco mesenquimais em mioblastos (Lassar et al., 1986). A partir desta descoberta surgiu o pensamento de que o comprometimento de uma célula para determinada via de diferenciação é dirigido por um fator de transcrição mestre (*master transcription factors*) que garante que a célula seja direcionada para se diferenciar em um tipo celular específico. Posteriormente, a presença do *Runx2* (*Runt-related transcription factor 2*) foi identificada como sendo o fator transcrição mestre para diferenciação osteogênica (Komori et al., 1997; Takeda et al., 2001; Yoshida et al., 2004).

O fator de transcrição mestre da condrogênese veio à luz com a descoberta de mutações heterozigotas dentro e ao redor do locus genético do *Sox9* que causam a síndrome da malformação do esqueleto humano, que é denominada como Displasia Campomélica. A descoberta da doença foi um marco para mostrar que a expressão de *Sox9* (*SRY-(sex determining region Y)-box9*) é fundamental para formação adequada

da cartilagem e de outras estruturas e desencadeou muitos estudos mostrando sua importância na condrogênese (Foster et al.; Wagner et al., 1994).

Embiões quiméricos de camundongos derivados de uma mistura de células-tronco pluripotente Sox9^{+/+} e Sox9^{-/-} revelou que as quimeras mutadas negativamente para Sox9 apresentaram-se incapazes de diferenciação para linhagem condrogênica. A falha na diferenciação condrogênica ocorreu pois a ausência de Sox9 impossibilitou a condensação pré-cartilaginosa, desencadeando o deslocamento dessas células para a periferia da condensação ou morte celular. Além disso, resultou em cartilagem mineralizada e zonas de condrócitos hipertróficos. Enquanto que as células Sox9^{+/+} apresentaram o processo normal de condensação (Bi et al., 1999; Akiyama et al., 2002). Curiosamente, apesar do Sox9 ser altamente expresso em toda placa de crescimento fetal, durante o período pós-natal, o Sox9 não é expresso em condrócitos hipertróficos, sendo expresso apenas em condrócitos proliferativos (Wright, Hargrave et al. 1995; Ng, Wheatley et al. 1997).

Henry e colaboradores mostraram que quando o Sox9 é inativado em condrócitos articulares de camundongos adultos Sox9^{fl/fl}AcanCreER ocorre uma grande perda de proteoglicanos específicos deste tecido cartilaginoso, no entanto, parece não afetar a rede de colágeno (Henry et al., 2012). A partir dessas evidências, acredita-se que o Sox9 é fundamental para garantir a estabilidade normal da cartilagem no organismo adulto. E que o drástico decaimento do Sox9 pode contribuir expressivamente para instabilidade dos condrócitos.

Existem outros reguladores transcricionais que participam de maneira a controlar a diferenciação condrogênica, como o Bapx1/Nkx3.2 (bagpipe homeobox homolog 1/NK3 homeobox 2). Interessantemente, a Bapx1/Nkx3.2 atua juntamente com o Sox9 e são capazes de induzir a expressão um do outro, com papel fundamental de sustentar a diferenciação condrogênica. O Bapx1/Nkx3.2 atua como um repressor transcricional do principal fator de transcrição responsável por desencadear a hipertrofia de condrócitos, o Runx2 (fator de transcrição relacionado ao runt 2). O Bapx1/Nkx3.2 é um gene expresso durante a diferenciação condrogênica, mas é perdido quando os condrócitos tornam-se hipertróficos (Church et al., 2005; Provot et al., 2006; Yamashita et al., 2009).

A determinação do destino dos condrócitos, assim como a sua manutenção também é regulada pelo fator extrínseco Wnt (*wingless-type MMTV integration site*

family)/ β -catenina. A sinalização via Wnt/ β catenina é capaz de desencadear a inibição da diferenciação de condrócitos e também a expressão do Sox9 (Guo et al., 2004; Hartmann et al., 2001). A expressão do ligante Wnt é observada em torno da condensação mesenquimal na condrogênese. No entanto, sua atividade é regulada negativamente na diferenciação condrogênica devido a alta expressão de Sox9 (Day et al., 2005). Uma vez que o Sox9 interage com a β -catenina e promove sua fosforilação e degradação, prevenindo, portanto, a diferenciação osteoblástica ou hipertrófica dos condrócitos (Ryu et al., 2002; Akiyama et al., 2004; Day et al., 2005; Akiyama et al., 2008; Topol et al., 2009). Portanto, um dos mecanismos desencadeado pela expressão de Sox9 para manutenção e diferenciação dos condrócitos é a inibição da atividade da sinalização anticondrogênica causada pela Wnt/ β catenina. O Sox9 também é capaz de dirigir a repressão de genes que são expressos em condrócitos hipertróficos, tais como o colágeno do tipo X e VEGFA (Hattori et al., 2010; Leung et al., 2011).

Durante a diferenciação condrogênica o Sox9 dirige a transcrição Sox5 e Sox6, que são eficientes fatores de transcrição envolvidos principalmente no estímulo a expressão de importantes componentes de matriz extracelular, tais como colágeno do tipo II e agrecana (Lefebvre et al., 1997; Lefebvre et al., 1998; Lefebvre et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Han et al., 2008). O Sox5 e Sox6 apresentam uma estrutura bastante semelhante e são co-expressos juntamente com o Sox9 em condrócitos. Diferentemente do Sox9, o Sox5 e Sox6 apresentam funções bastante similares na célula (Smits et al., 2001; Dy et al., 2010).

Homo/heterodímeros de Sox5 e Sox6 se ligam fortemente próximo ao Sox9 agindo como intensificadores específicos da cartilagem. O Sox5 e Sox6 ligam-se preferencialmente a pares de motivos de Sox orientados na mesma direção, potencializando a transativação através do fortalecimento da ligação de Sox9 a locais específicos (Liu et al. 2015). Portanto, as três proteínas Sox são referidas por muitos autores como trio Sox mestre da condrogênese.

Yang e colaboradores realizaram, recentemente, a transfecção de um retrovírus expressando Sox9 em ASC. A partir deste estudo foi observado o aumento na produção de colágeno do tipo II e de proteoglicanos (Yang et al., 2011b). A co-transfecção de ASC com o trio Sox induziu a diferenciação em células com o fenótipo condrocítico, tanto *in vitro* como *in vivo* (Yang et al., 2011a). Mostrando, portanto, que

o Sox9 é um fator requerido para garantir a eficiência da diferenciação condrogênica a partir de ASC.

1.4 FATORES DE CRESCIMENTO E REGULADORES PARACRINOS NA DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA

Os fatores de crescimento são mediadores solúveis prescindíveis para desencadear processos celulares. As diferentes morfologias e funções da cartilagem ao longo da vida são suportadas pelas diferenças na proliferação e diferenciação de condrócitos, fortemente controladas por muitas citocinas e suas vias de sinalização intracelular. Desta forma, o direcionamento das MSC para via condrogênica é controlada por mecanismos de sinalização. Diversos hormônios participam deste processo, como hormônio de crescimento, glicocorticoide e insulina. Importantes mediadores solúveis incluem a superfamília do fator de crescimento transformante-beta (TGF- β), proteína morfogênica do osso (BMP), Wnts, *Indian Hedgehog* e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Gao et al., 2013; Pan et al, 2009) (**Figura 6**).

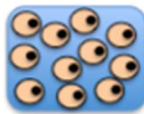
Etapas da diferenciação	Marcadores de Matriz extracelular	Marcadores regulatórios		Fatores de crescimento e diferenciação
Células mesenquimais condrogênica	<i>Col1a1</i>	<i>Sox9, Runx2</i>		Shh, TGF- β
Pré-condrócitos	<i>Ncam1, Tnc</i>	<i>Sox9, Sox5, Sox6</i>		TGF- β Wnt-3A, Wnt7A FGF-2,4,8,10 BMP-2,4,7
Condrócito inicial	<i>Col2a1, Acan, Crt1</i>	<i>Sox9, Sox5, Sox6</i>		IGF-1 FGF-2/ FGFR2 BMP-2,4,7,14
Condrócito colunar	<i>Col2a1, Acan, Crt1 Comp, Crtm</i>	<i>Sox9, Sox5, Sox6</i>		FGF-18,FGFR-3 BMP-2,7
Condrócito pré-hipertrófico	<i>Col2a1, Acan, Crt1 Comp, Crtm</i>	<i>Pthr1, Ihh</i>		VEGF FGF-2,FGF-R1 Wnt14/ β -catenin
Condrócito hipertrófico	<i>Col10a1</i>	<i>Runx2, Runx3</i>		
Condrócito terminal	<i>Mmp13, Spp1</i>	<i>Runx2, c-Maf</i>		

Figura 6. Fases de diferenciação condrogênica. Representação esquemática dos estágios da diferenciação dos condrócitos e dos fatores transcrição e fatores de crescimento envolvidos nesta via. Modificado de Lefebvre e Smits (2005).

A superfamília TGF- β tem como principal função manter a homeostase da cartilagem e prevenir a diferenciação inapropriada dos condrócitos. As isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) são capazes de direcionar a diferenciação de MSC para a via condrogênica (Chimal-Monroy et al., 1996; Chimal-Monroy et al., 1997; Ferguson et al., 2004; Ferguson et al., 2000; Lorda-Diez et al., 2009). A superfamília TGF- β tem sido relacionada como uma das principais proteínas envolvidas na inicialização da diferenciação condrogênica, participando desde os primeiros estágios de direcionamento das MSC em condrócitos. As três isoformas do TGF- β sinalizam principalmente através do receptor Smad (R-Smad, *Receptor regulated Smad*) fosforilados, que por sua vez se combinam a fatores co-transcricpcionais e regulam a expressão de genes específicos (Feng et al., 1998; Lagna et al., 1996). Além de direcionar as MSC para linhagem condrogênica, a indução com TGF- β inibe a miogênese, bem como a adipogênese (Kingsley, 1994).

O TGF- β estimula a produção de matriz extracelular pelas MSC (Moses et al., 1996). Sendo considerado um potente indutor da síntese de colágeno do tipo II e de proteoglicano (Vinatier et al., 2009). Em contrapartida, mantém a expressão de colágeno tipo I bastante reduzida, revelando, portanto, a tendência do TGF- β em manter o fenótipo da cartilagem hialina de condrócitos derivados de MSC (Roman-Blas et al., 2007). Além disso, tem sido reportado que o TGF- β induz a expressão de Sox9 (Kawakami et al., 2006) e que o tratamento com TGF- β aumenta a viabilidade de condrócitos diferenciados de MSC de maneira proeminente (Bian et al., 2011) (**Figura 7**).

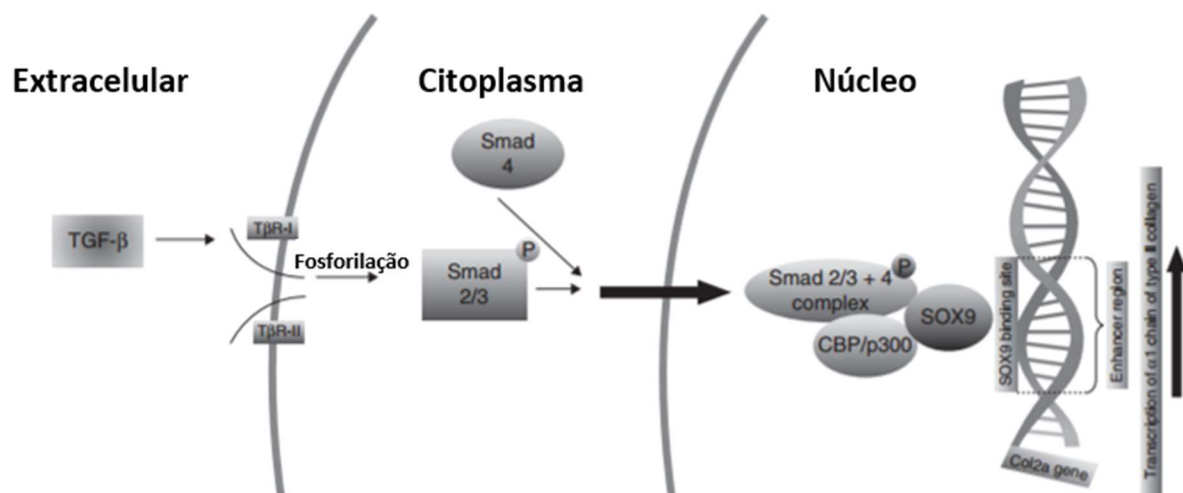


Figura 7. Esquema proposto de como o TGF-β3 atua na condrogênese. TGF-β ativa o receptor TβR-I (TGF-β type I receptor) e forma um complexo receptor-ligante, juntamente com o TβR-II. A ativação do TβR-I fosforila a Smad2 e Smad3 intracelular, que por sua vez se ligam a co-ativadores CBP/p300 a fim de formar um complexo. Esse complexo é transferido para o núcleo e se associa com o Sox9 na região intensificadora do colágeno II, desencadeando a regulação genica. Tang et al., 2009.

O TGF-β1 tem mostrado ser um fator indutor da condensação de MSC nos estágios iniciais da condrogênese em estudos realizados *in vitro*. Essa indução é desencadeada pela regulação positiva de N-caderina e fibronectina (Song et al., 2007; Tuli et al., 2003). Portanto, o TGF-β1 inicia o processo de diferenciação condrogênica de MSC (Tuli et al., 2003). Sendo capaz de induzir a expressão de genes importantes no início da diferenciação, tais como colágeno do tipo II e agregana (Zhang et al., 2004). O TGF-β2 e TGF-β3 parecem ser ainda mais eficazes na condensação de MSC, gerando maiores níveis de glicosaminoglicanos (Barry et al., 2001).

Em contrapartida, na cartilagem pós-natal o TGF-β atua de maneira a inibir a diferenciação hipertrófica de condrócitos. Nessa fase, o TGFβ1 age principalmente como inibidor de diferenciação dos condrócitos em estágio inicial de hipertrofia em explantes sinoviais de bovinos (Shintani et al., 2013). O tratamento com TGF-β1 resulta na inibição de colágeno do tipo X, VEGF, MMP13 e osteocalcina (Zhang et al., 2004). Já o TGF-β3 inibe a diferenciação terminal de condrócitos diferenciados de MSC (Mueller et al., 2010; Muller e Tuan, 2008). Assim, a superfamília de TGF-β atua de maneira a induzir a diferenciação condrogênica desde a condensação de MSC até a diferenciação condrogênica, e além disso, reprime a diferenciação hipertrófica dos condrócitos (**Figura 8**).

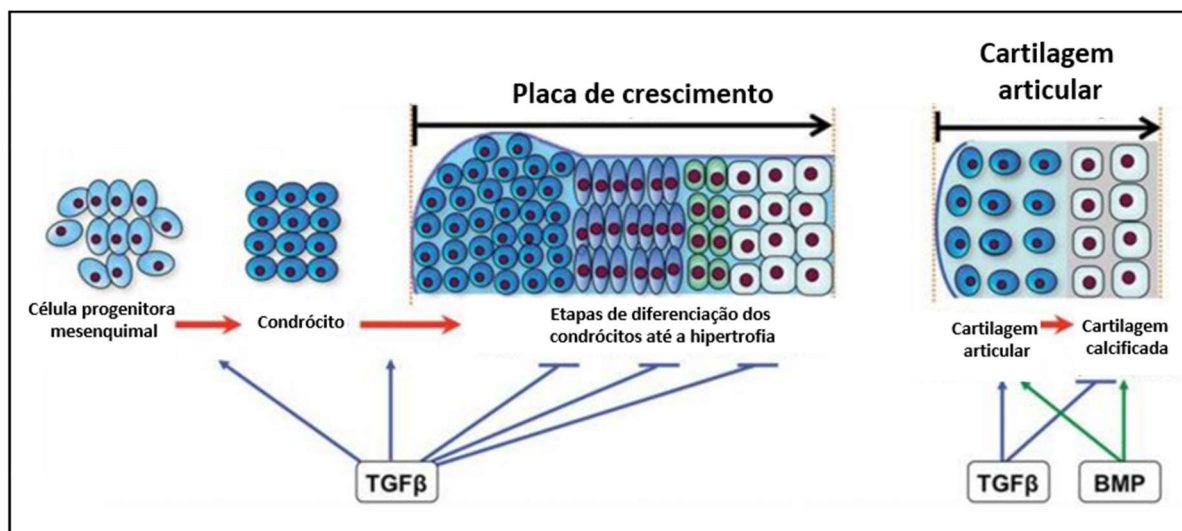


Figura 8. Presença do TGF- β na cartilagem articular desde o início da diferenciação. Durante o desenvolvimento da cartilagem o TGF- β promove a condensação das células mesenquimais e induz a diferenciação dos condrócitos. O TGF- β mantém os condrócitos em um estado quiescente, com o intuito de prevenir a proliferação das células e inibir a hipertrofia. Em contrapartida, o TGF- β antagoniza a sinalização de BMP para prevenir a calcificação e expressão de colágeno X e MMP13. Wang et al., 2014.

A capacidade de diferenciação condrogênica de ASC, *in vitro*, utilizando fatores de crescimento da família TGF- β já foi demonstrada por diversos autores (Merceron et al., 2011; Lin et al., 2005; Ye et al., 2009; Liu et al., 2010; Jung et al., 2009; Mehlhorn et al., 2009; Jin et al., 2007; Yoon et al., 2012; Erickson et al., 2002). Porém, diversos estudos têm utilizado outros fatores para compor o meio condrogênico com o intuito de garantir uma diferenciação eficaz, tais como ácido ascórbico (Lin et al., 2005; Ye et al., 2009; Liu et al., 2010; Yoon et al., 2012; Jung et al., 2010), dexametasona (Erickson et al., 2002; Jung et al., 2010; Merceron et al., 2011; Liu et al., 2010; Jung et al., 2009) e ITS (insulina, transferrina e selênio) (Mehlhorn et al., 2009; Erickson et al., 2002; Jung et al., 2010). O glicocorticoide dexametasona desempenha um importante papel no direcionamento da diferenciação de MSC em condrócitos, principalmente por induzir a expressão de Sox9 (Locker et al., 2004). Além disso, a dexametasona inibe a proliferação dos condrócitos da placa de crescimento pela inibição do hormônio do crescimento, impedindo, portanto, a hipertrofia dos condrócitos (Jux, Leiber et al. 1998).

Lin e colaboradores identificaram uma população dentro da SVF do tecido adiposo que expressam simultaneamente PPRA- γ (*Peroxisome proliferator-activated*

receptor gama) (gene mestre de diferenciação adipogênica) e Runx2. Este estudo revelou que quando essa população de células era diferenciada em adipócitos o PPAR- γ deslocava-se do citoplasma para o núcleo, enquanto que o Runx2 permanecia no citoplasma. Em contrapartida, o inverso ocorria quando essa população de células era estimulada para via osteogênica, o Runx2 se deslocou do citoplasma para o núcleo, enquanto que o PPAR- γ permaneceu no citoplasma (Lin et al., 2008). Havendo, portanto, uma interessante relação entre os genes, sendo confirmado por outros autores (Enomoto et al., Heim et al., 2004; 2004, Backes et al., 2006). Desta forma, quando as ASC perdem seu potencial em se diferenciar para via adipogênica, e sob estímulos necessários, são capazes de se diferenciar tanto para via condrogênica, como osteogênica. Uma vez que, apesar do Runx2 ser o principal gene relacionado com a hipertrofia dos condrócitos e ser o gene mestre da diferenciação osteoblástica, estudos mostram que o Runx2 participa da diferenciação inicial da condrogênese, mais precisamente na etapa da condensação mesenquimal (Stricker et al., 2002; Flores et al., 2006) (**Figura 6**).

No entanto, diversos eventos moleculares estão envolvidos nessas etapas de diferenciação. Desta forma, muitos estudos ainda precisam ser realizados para entender melhor os mecanismos, bem como os fatores indutores envolvidos nesses processos de comprometimento com a via condrogênica.

Diversas citocinas pró-inflamatórias têm sido associadas com doenças inflamatórias e degenerativas da articulação. A presença de interleucina (IL)-6 e 8 foi encontrada em níveis aumentados em fluidos sinoviais e soros de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide (Kaneko et al., 2000). No entanto, outros autores demonstram seu envolvimento em mecanismos de regeneração através do recrutamento de MSC endógena para o local do tecido lesionado. Estudos mostraram que diversas citocinas são capazes de desencadear o recrutamento de MSC e induzir a regeneração celular (Sukegawa et al., 2012; Lee et al., 2012). Park e colaboradores demonstraram que a IL-8 é capaz de reforçar a regeneração da cartilagem através do recrutamento de MSC de medula óssea para o local da lesão (Park et al., 2015).

Apesar da IL-6 ser amplamente associada como uma citocina com propriedades pró-inflamatória (Smolen et al., 2013), atualmente já se sabe que a IL-6 também pode exercer uma atividade anti-inflamatória em certas patologias. Estudo revelou que, na lesão pulmonar, a IL-6 endógena desempenha um papel anti-

inflamatório crucial tanto nas respostas agudas locais como em nível sistêmico, onde atua de maneira a controlar o nível de citocinas pró-inflamatórias (Xing et al., 1998). A IL-6 também apresenta atividade anti-inflamatória em determinadas doenças, tal como a artrite reumatoide (Smolen et al., 2013).

Portanto, à luz de novos conhecimentos, sabe-se que a atuação da IL-6 não se restringe somente ao sistema imunológico, mas atua também em outros eventos, tais como, proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas, tumorigenese, diferenciação de células neurais (Naka et al., 2002). Portanto, a função pró- ou anti-inflamatória da IL-6 está intrinsecamente associada ao ambiente que está inserido, bem como o tipo celular e o órgão de atuação.

A IL-6 produzida pelas MSC age como um fator autocrino/paracrino atuando de maneira a exercer efeitos proliferativos e antiapoptóticos (Pricola et al., 2009). Além disso, já tem sido relatado a influência da IL-6 na condrogênese, uma vez que foi observado que a IL-6 estimula a expressão de proteínas de matriz do tecido cartilaginoso (Namba et al., 2009). A adição de IL-6 em meio condrogênico para diferenciação de MSC revelou aumento na expressão de colágeno II, agrecana e colágeno do tipo X. Interessantemente, as ASC são capazes de produzir constantemente grandes quantidades de IL-6 e IL-8 em condições normais, sem a presença de nenhum fator estimulador (Banas et al., 2008; Silva et al., 2015). Desta maneira, a produção de IL-6 por ASC pode aumentar a eficiência da diferenciação condrogênica.

Muitos estudos buscam compreender melhor quais fatores solúveis podem estar envolvidos com a diferenciação condrogênica a partir de MSC e em que momento da diferenciação condrogênica estão envolvidos.

1.5 CARTILAGEM ARTICULAR: COMPOSIÇÃO

As superfícies de deslizamento da articulação sinovial são revestidas pela cartilagem articular, um tipo especializado de cartilagem hialina, que assegura a eficiência mecânica do movimento. Nas condições fisiológicas a cartilagem articular proporciona uma superfície lisa e de baixo atrito entre as superfícies deslizantes, e é capaz de suportar forças intensas e repetitivas, reduzindo assim forças diretas sobre o osso subcondral (Buckwalter et al., 1990b). Tipicamente, a cartilagem articular é desprovida de vasos sanguíneos, assim esse tecido se desenvolve em um ambiente

de hipóxia, e essa baixa tensão de oxigênio mantém-se reduzida por toda a vida. Desta forma, os condrócitos recebem tanto oxigênio, como nutrição por difusão a partir do fluido sinovial através do osso subcondral adjacente e da matriz extracelular (Schenk, 1986).

Os condrócitos são bastante especializados e constituem apenas 1-5% do volume da cartilagem articular, sendo responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular (Chen, 1999). As propriedades biológicas e mecânicas, na qual a cartilagem articular é designada, dependem da interação entre os condrócitos e a matriz extracelular (MEC) que mantém o tecido.

A matriz extracelular determina as propriedades específicas da cartilagem hialina articular. A composição fluida, em uma cartilagem normal, representa cerca de 80% do peso total (Mow, 1992). O peso remanescente é composto principalmente por colágenos (12-21%), proteoglicanos (6-10%) e outras glicoproteínas (2-3,5%) (Moreira-Teixeira, 2011).

O colágeno é a macromolécula estrutural mais abundante da MEC e representa cerca de 60% do peso seco da cartilagem. Sendo o colágeno do tipo II o tipo predominante, apresentando cerca de 95% de todo colágeno da MEC. Na cartilagem articular, o colágeno do tipo II forma uma rede de colágeno com fibras e fibrilas entrelaçadas a agregados de proteoglicanos. Adicionalmente, o colágeno do tipo IX e XI ajudam a manter a forma e a estabilizar essa rede de colágeno do tipo II (Fassler et al., 1994; Li et al., 1995; Nakata et al., 1993; Vikkula et al., 1995). Os colágenos do tipo VI, XI, XII também estão presentes na MEC da cartilagem articular, no entanto, contribuem em menor proporção (Eyre, 2002).

Os proteoglicanos são essenciais para o funcionamento normal da cartilagem articular. Sendo esta composta por uma variedade de proteoglicano como agrecana, decorina, biglicana e fibromodulina. Dentre estes, a agrecana representa o principal e mais abundante proteoglicano (Knudson et al., 2001). A agrecana é caracterizado por formar um complexo macromolecular pela sua capacidade de interagir com a hialurona via glicosaminoglicanos de ligação (GAGs), como sulfato de condroitina e queratina (Buckwalter et al., 1990b). Tais características são fundamentais para garantir a eficiência da cartilagem articular.

1.6 DEFEITOS NA CARTILAGEM E TRATAMENTOS PARA DANOS DA CARTILAGEM

Estudo realizado em 993 paciente, sendo 612 homens e 381 mulheres, com idade mediana de 35 anos, submetidos a 1005 artroscopias de joelhos por um período de 6 meses e avaliado de acordo com a *International Cartilage Repair Society* (ICRS) revelou patologia na cartilagem articular em 66%, 11% apresentaram lesão em toda a espessura da cartilagem do joelho e 20% apresentaram lesão focal na cartilagem (Aroen et al., 2004).

Outro estudo revelou que em 31.000 procedimentos de artroscopia 63% estavam relacionadas com defeitos na cartilagem (Curl et al., 1997). Apesar da grande incidência, ainda não existem tratamentos eficazes para tratamento da cartilagem articular. Lesões na cartilagem articular são comumente observadas durante o fim da fase adulta, na quarta década de vida. Tanto pequenos traumas repetitivos, como ferimentos graves podem levar ao aparecimento da osteoartrite (Buckwalter et al., 1990a). Desta forma, nas últimas décadas, têm-se investigado maneiras para reparar ou regenerar a superfície articular após injúria ou degeneração da cartilagem a fim de restaurar ou reestabelecer a função normal do tecido e a integridade estrutural.

Em 1994, começou a busca para tratamento de defeitos de cartilagem utilizando condrócitos autólogos, onde os pioneiros foram Peterson e Brittberg. O método utilizado por Peterson e Brittberg consistiu no transplante de condrócitos autólogos sob uma aba de periósteo. Apesar da oficialização da técnica de transplante autólogo, aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sua taxa de confiabilidade ainda é muito variável. O baixo sucesso da técnica pode ser explicado, em parte, pela diminuição da qualidade e do número de condrócitos associados ao envelhecimento.

Durante os anos 2000, a utilização de arcabouços associados a condrócitos, desencadeou a segunda geração de transplantes autólogo de condrócitos (Steinwachs e Kreuz, 2007).

A terceira geração de transplantes autólogos de condrócitos é baseada no uso dessa mesma fonte celular para geração de esferoides teciduais, denominado condroesferas. Os esferoides teciduais apresentam diversas vantagens, como a possibilidade de estabelecer interações com as células vizinhas através de moléculas de adesão, a partir de um mecanismo denominado como auto-arranjo. Assim, o uso

de esferoides associados a arcabouços configura a transição entre a segunda e terceira geração. Atualmente, a principal proposta de produto terapêutico da empresa alemã co.don® AG tem sido as condroesferas. Essa empresa atua, principalmente, nas áreas de engenharia de tecidos e de medicina regenerativa e teve o estudo de reparo de lesões na cartilagem articular iniciado em 2010 e atualmente encontra-se na fase III (NCT 01222559, clinicaltrials.gov) e o pedido para autorização para utilização das condroesferas comercialmente no mercado da União Europeia foi recentemente submetido.

1.7 CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE CARTILAGEM EM SISTEMA LIVRE DE ARCABOUÇO

No organismo humano, a maioria das células crescem em um ambiente tridimensional, onde o arranjo espacial das células, incluindo matriz extracelular, impacta diretamente a forma como estes componentes interagem uns com os outros e com seu microambiente. Por sua vez, esse microambiente torna-se propício para que seja desencadeado processos como proliferação, diferenciação e vários outros eventos celulares (Breslin et al., 2013).

Desta forma, estratégia em sistema livre de arcabouço para produção de tecido tridimensional tem ganhado importância nos últimos anos. Principalmente devido a habilidade de algumas células em se agregarem e formarem um microtecido tridimensional (Moscona A e Moscona H, 1952; SVORONOS et al., 2014). Sendo assim, tais alternativas como bioprodução de estruturas tridimensionais na ausência de uma superfície de fixação ou de um arcabouço tem sido cada vez mais estudada para aplicação em engenharia de tecidos. Determinados tipos celulares, na ausência de uma superfície de fixação, são capazes de estabelecer interações com as células vizinhas através de moléculas de adesão, a partir de um processo denominado como auto-montagem (Duguay et al., 2003; Tejavibulya et al., 2011). Onde ao final deste processo ocorre a formação de uma estrutura tridimensional denominada de esferoide.

O processo de auto-montagem é impulsionado por moléculas de adesão superficial, tais como caderina e conexons, que atuam juntamente com a força de contração que é mediada pelo citoesqueleto. Esses eventos mimetizam as etapas

da embriogênese, morfogênese e organogênese (Foty et al., 1996; Dean et al., 2008; Youssef et al., 2011; Bao et al., 2011). Nesse processo a interação célula-célula é intensificada, aumentando, portanto, a comunicação celular e maximizando a função celular (Ofel et al., 2008; Desroches et al., 2012).

No entanto, uma real desvantagem das técnicas atuais para geração de esferoides reside no fato de serem técnicas não-escalonáveis, ou seja, não há a possibilidade de produção de centenas de esferóides. Mais recentemente foi demonstrado que células podem ser semeadas em superfícies não aderentes de dispositivos microfabricados (micromoldes). Essa técnica abre portas para novas aplicações dos cultivos de esferóides, tais como a formação de enxertos complexos de tecidos a partir da fusão de centenas de esferóides, pois diferente das demais técnicas permite o escalonamento e a robotização da etapa da semeadura das células ao dispositivo microfabricado. A fusão de centenas de esferóides sob a superfície de arcabouços tridimensionais permite, por sua vez, a formação de enxertos complexos de microtecidos autógenos (Beachley et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

O custo social da saúde no Brasil deverá enfrentar, nas próximas décadas, um crescimento populacional onde a evolução do perfil demográfico poderá desencadear um aumento progressivo da idade média das populações humana. Levando em consideração a esse aumento de expectativa de vida na população mundial e brasileira, a incidência de patologias relacionadas com a senilidade tem aumentado expressivamente. Devido ao aparecimento de doenças relacionadas com o envelhecimento, gera-se a necessidade de garantir cada vez mais a qualidade da vida a um custo e carga social aceitáveis (Miranda et al., 2016).

Existem patologias que estão, principalmente, atreladas a este aumento populacional, como o desequilíbrio entre degradação-reparação da cartilagem articular após uma lesão ou processo de degeneração. Uma vez que o potencial de reparo da cartilagem articular madura é limitado. Essa limitação ocorre principalmente devido ao baixo número de células presente neste tecido, assim como a limitada capacidade que os condrócitos têm de migrar, proliferar e de produzir matriz cartilaginosa para revestimento da área lesionada. Com o envelhecimento a capacidade de reparo da cartilagem articular é ainda mais limitada devido a diminuição de componentes de matriz deste tecido (Vrahas et al., 2004, Lotz et al., 2013). Essa limitada capacidade de reparo da cartilagem articular é relatada desde 1743, onde o anatomista William Hunter fez a seguinte observação: *“Desde Hipócrates à atualidade é universalmente aceito que a cartilagem ulcerada é um problema e que, uma vez destruída, não se regenera”* (Hunter et al., 1743)."

Defeitos na cartilagem articular frequentemente levam ao desenvolvimento de doenças degenerativas, que na ausência de tratamento, progridem para osteoartrite. A osteoartrite afeta diretamente a qualidade de vida, uma vez que, desencadeia perda da mobilidade e leva a limitação de execução das atividades cotidianas. Por este motivo, a osteoartrite tem sido descrita como uma das patologias que mais desencadeia o afastamento do trabalhador do seu exercício profissional. Além disso, resulta em altos custos para tratamento e tem sido abordado como a forma mais prevalente de doenças musculoesqueléticas do mundo (Who, 2002; Felson, 2004).

Estima-se que cerca de 15% da população mundial é afetada pela osteoartrite, o que gera um impacto socioeconômico para a sociedade, assim como para o

indivíduo (Buckwalter et al., 2004). Nos Estados Unidos os gastos com tratamento para osteoartrite é em torno de 60 bilhões de dólares por ano (Buckwalter et al., 2004; Felson, 1995; Brown et al., 2006). No entanto, ainda não existem métodos eficazes para prevenir o aparecimento da osteoartrite, nem ao menos para abrandar sua progressão ou estimular a regeneração da cartilagem articular lesionada. Além disso, os tratamentos sintomáticos proporcionam um limitado benefício e alto custo, além de não resultar em cura efetiva (Losina et al., 2016).

Neste contexto, existe uma crescente busca por alternativas capazes de gerar a estabilização ou até mesmo a reversão do quadro de lesão da cartilagem articular. Assim, a medicina regenerativa tem ganhado merecido destaque por oferecer alternativas terapêuticas sofisticadas e multifatoriais, visando regenerar de maneira funcional o tecido lesado ou totalmente perdido. Em detalhes, estas intervenções buscam criar condições ideais para o reparo e a substituição de tecidos lesados, fornecendo os elementos celulares requeridos, fatores de proliferação e de diferenciação celular, assim como as estruturas supramoleculares (arcabouços) que providenciam a organização espacial plenamente funcional de novos tecidos gerados (Colombo et al., 2016).

Sendo assim, a proposta do presente projeto é a geração de esferóides, em sistemas livre de arcabouço, biofabricados a partir de agarose micromoldada não aderente.

Para elaboração do construído de macrotecido, os esferóides foram semeados em nanofibras de policaprolactona (PCL) com o intuito de promover a adesão da centena de esferóides às matrizes de nanofibras, permitindo a sua completa fusão e formação de tecido de cartilagem *in vitro*.

A estratégia adotada neste trabalho tem como objetivo criar tecido de cartilagem no formato e tamanho necessário para o tratamento de lesões articulares. A metodologia proposta neste estudo agrega as vantagens de uma técnica que é passível de escalonamento a partir de dispositivos micromoldados. A proposta aqui apresentada reside em utilizar uma fonte de células-tronco de tecido adiposo humano. Vale ressaltar que as células-tronco de tecido adiposo configuram como uma fonte de células autóloga clinicamente relevante, devido ao fácil acesso ao tecido adiposo no momento de coleta e a abundância da amostra. Além de apresentarem significativo potencial de proliferação *in vitro*. E, ainda, devido sua natureza indiferenciada

possuem capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares da linhagem mesodermal como adipogênica, condrogênica e osteogênica (Zuk et al., 2002; Baptista, 2009), através de mecanismos de diferenciação celular.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para produção de esferoides de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano (ASC), a partir da automontagem de células em sistema livre de arcabouço passível de escalamento, induzidos para via condrogênica

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização da formação de esferoides de células-tronco de lipoaspirado humano em agarose micromoldada, com alta viabilidade celular e homogeneidade na distribuição do diâmetro.
- Investigar a capacidade de diferenciação dos esferoides de ASC a partir da detecção de moléculas de matriz extracelular, quantificação de genes e fatores de crescimento relacionados à via de diferenciação condrogênica.
- Associação dos esferoides de ASC induzidos às nanofibras de PCL, como etapa inicial para a formação de tecidos e órgãos de maior complexidade.
- Implantação dos esferoides de ASC induzidos associados à nanofibra de PCL em camundongos.

4. METODOLOGIA

4.1 PACIENTES

Os procedimentos realizados neste trabalho foram realizados conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ e estão registrados no protocolo 145/09 (Anexo).

As amostras de lipoaspirado foram obtidas de doadores hígidos e os critérios de exclusão considerados para este estudo foram: doença crônica e/ou inflamatória, idade abaixo de 18 e acima de 65 anos, pacientes que tenham sido submetidos à cirurgia bariátrica, presença de Diabetes Mellitus tipo 2, pacientes obesos.

Para realização deste estudo utilizamos amostras de 3 doadores.

4.2 ISOLAMENTO DA SVF DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO

O isolamento da SVF do tecido adiposo foi realizado a partir do método mecânico estabelecido pelo grupo (Baptista et al., 2009). Em resumo, o lipoaspirado de tecido adiposo foi transferido para um tubo cônico de 50 mL contendo o mesmo volume do tampão de dissociação ACK (Lonza, São Paulo, Brasil). O tubo foi posteriormente agitado com o auxílio de um vortex durante um minuto, por três vezes. O tecido adiposo foi então incubado por 15 minutos a uma temperatura de 37°C em banho maria. A suspensão obtida foi filtrada em malha de nylon com poro de 150 µm, seguido de centrifugação a 900 g por 15 minutos e lavada com PBS (tampão fosfato salino) a fim de separar a fração estromal vascular, que sedimentam, do conteúdo de adipócitos e óleo, que se constitui a fração flutuante. As células sedimentadas foram ressuspensas em DMEM-Low *glucose* (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low glucose, Meio de Eagle Modificado por Dulbecco-Baixa glicose, Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Gibco) e a partir de uma pequena alíquota da suspensão corada com Líquido de Turk foi realizada a contagem das células totais obtidas da SVF e a contagem foi realizada no microscópio óptico. Posteriormente as células foram centrifugadas 900 g por 15 minutos para serem ressuspensas em meio utilizado para o cultivo.

4.3 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS ASC

4.3.1 Cultivo bi-dimensional

As células da SVF sedimentada foram essuspendidas em meio de cultura quimicamente definido para células mesenquimais humanas (MSCGM-CD™ Mesenchymal Stem Cell Medium, Chemically Defined, Lonza, Walkersville, MD EUA) suplementado com 2% de SFB e acrescido de 100U/ml de penicilina sódica, distribuídas em garrafas de cultura de 25 cm² (10⁵/cm²) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, para obtenção das células-tronco/estromais. Após aproximadamente 48 horas a fração aderente que corresponde às ASC foi lavada duas vezes com PBS, retirando-se assim as células não aderentes. As ASC foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ para expansão. Quando confluentes, a monocamada foi dissociada com tripsina 0,125% (Gibco BRL, Rockville, MD, EUA) e 0,78mM de EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid, Ácido Tetra acético de Etilenediamina, Invitrogen, São Paulo, Brasil). Uma fração de células foi distribuída em uma densidade de 0,8 – 1,3x10⁴ células/cm² para expansão, e o restante foi criopreservado em nitrogênio líquido para formação do banco mestre de células.

4.3.2 Metodologia para biofabricação da agarose micromoldada

Para produção da agarose micromolada foi utilizado o molde de silicone (MicroTissues® 3D Dish®, Sigma) que apresenta 81 microrecessos. Antes da produção da agore micromoldada, os moldes de silicone foram lavados com Extran 0,01% e enxaguados com água destilada corrente. Posteriormente, foram esterilizados por autoclavação durante 30 minutos à temperatura de 100°C e pressão de 120 Pa e em seguida foram colocados em estufa de secagem a 60° até a completa secagem. A fim de produzir a agasore micromoldada, utilizamos agarose ultrapura 2% (Invitrogen, São Paulo, Brasil) diluída em um frasco contendo NaCl 0,9% e aquecida em micro-ondas para completa diluição. Ainda aquecida, dispensamos 500µl da agarose 2% no interior de um molde de silicone e após 1 hora a agarose já estava complementemente solidificada. Com o auxílio de uma pinça estéril, a agarose micromoldada foi desenformada dentro de um poço de uma placa de 12 poços (**Figura**

9). Com o objetivo de não deixar a agarose micromoldada solta dentro do poço, foi adicionado 1mL de agarose na borda do poço.

Após completa solidificação da agarose, foi adicionado 2,5mL de DMEM sem suplementos no poço contendo a agarose micromoldada e matidos por 15 minutos em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Este processo foi repetido por duas vezes, sendo a última repetição realizada com meio para cultivo de esferoides (Tabela 1).

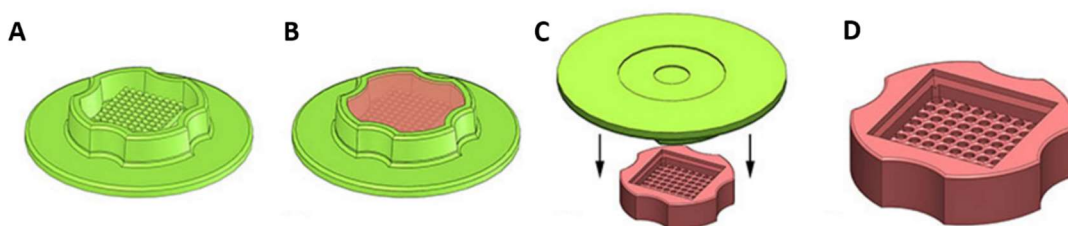


Figura 9. Etapas da produção da agarose micromoldada. Molde de silicone (A), agarose 2% no interior do molde de silicone (B), agarose micromoldada desenhada do molde de silicone em direção ao poço da placa de cultura (C), agarose micromoldada (D). Adaptado de Microtissues natural 3D ®. [Homepage da internet] Fonte:<<http://www.microtissues.com/>>.

4.3.3 Cultivo tridimensional – Esferóides

Ao atingir a confluência, as células foram desaderidas da garrafa de cultura utilizando solução de tripsina, como descrito anteriormente. Após a contagem das células, foi separado 2×10^6 de célula em um tubo de 15mL. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com solução de PBS e em seguida centrifugada a 300g. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 120µL em meio para cultivo de esferoides (Tabela 1), a suspensão foi então homogeneizada e todo volume foi então semeado no interior da agarose micromoldada e mantidas por um período de 1 hora em estufa a 37°C com 5% CO₂ e 20% O₂, para que as células sedimentassem no interior dos micro-recessos. Após esse período, foi adicionado 2,5mL de meio de cultivo base para esferoides. Após 24 horas, foi realizada a troca do meio dos esferoides do grupo induzido para via condrogênica (Tabela 1) e esses esferoides passaram a ser mantidos em estufa de hipóxia contendo 5% CO₂ e 10% de O₂ a 37°C sob atmosfera úmida por 21 dias. A produção dos esferoides foi realizada a partir de células de amostras coletadas de 3 diferentes doadores em experimentos independentes, a fim de termos uma triplicata biológica (n=3).

Componente	Concentração
Ácido Ascórbico	50µg/mL
Albumina humana	1,25µg/mL
PS (Penicilina/Estreptomicina)	1000mg/mL / 1000UI/mL
ITS* (Lonza)	1x (**)
DMEM	q.s.p.
Fatores de indução condrogênica	
TGF-β3 (Sigma)	10ng/ml
Dexametasona (Sigma)	10 ⁻⁸ M

Tabela 1. Composição do meio dos esferoides de ASC e dos esferoides de ASC induzidos para via condrogênica. (*) ITS: Insulina, Transferrina e Selênio. (**)1x em relação ao estoque, cuja concentração do fornecedor foi de 100x; q.s.p. = quantidade suficiente para o volume final.

4.4 MEDIDA DOS DIÂMETROS DOS ESFEROIDES

Os esferoides de ASC e os esferoides de ASC induzidos foram fotografados após 7, 14 e 21 dias utilizando uma câmera acoplada a um microscópio invertido (Leica DFC 500), com lente objetiva 10x e em contraste de fase. As medidas dos diâmetros maior e menor foram realizadas através de imagens digitais de 17 esferoides com auxílio do programa Axio Vision (AxioVs40 V4.8.2.0), em que foram determinados os diâmetros maior e menor. Os valores dos diâmetros foram representados como média e desvio padrão.

4.5 ANÁLISE FENOTÍPICA E DE VIABILIDADE DOS ESFEROIDES

Para realizar a análise fenotípica, os esferoides de ambas condições foram retirados da agarose micromoldada a partir do fluxo de meio gerado pela pipeta. Posteriormente, quando os esferoides já estavam soltos dentro do poço, realizamos a sua coleta e transferimos para um tubo cônico de 15mL. Subsequentemente, os esferoides foram lavados uma vez em 1mL de PBS. Após retirar todo PBS de dentro do tubo foi adicionado 1mg/mL de colagenase tipo 1 (Sigma) e o tubo foi mantido em 4°C durante 20 minutos. Em seguida, o tubo foi colocado em banho maria a 37°C e os esferoides foram dissociados a partir do fluxo de meio gerado com auxílio de uma

pipeta manual. Após dissociação, a collagenase foi inativada utilizando meio DMEM suplementado com 10% de SFB e a suspensão de células gerada foi centrifugada a 900g por 15 minutos. Após, o *pellet* foi ressuspensionado em PBS e centrifugado novamente, com o intuito de lavar as células. Seguido da centrifugação, foi então realizado o descarte de todo o PBS contido no tubo e as células foram marcadas com os anticorpos monoclonais para fenotipagem, bem como para ensaio de viabilidade. A fenotipagem foi realizada também em ASC cultivadas em monocamada, que foram desaderidas da garrafa de cultura por ação da tripsina e centrifugadas por 5 minutos a 700g. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspensionado em PBS, para lavagem das células, e centrifugado novamente a fim de obter o *pellet* para marcação com os anticorpos. Para a fenotipagem, o *pellet* foi incubado por 20 minutos a 4°C com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, PE (Phycoerythrin, Ficoeritrina), PerCP (Clorofil-Peridina), PE-Cy5 (Cyanin-5, Cinanina-5) FITC (Fluorescein Isothiocyanate, Fluoresceína Isotiocianato) (Todos BD Biosciences, São Paulo, Brasil). Foram analisados os seguintes marcadores de superfície CD105 FITC, CD73 PE, CD34 PerCP, CD90 APC e posteriormente foram analisados por citometria de fluxo. Já para ensaio de viabilidade, o *pellet* foi marcado com o marcador de superfície CD90 APC, para que as células pudessem ser identificadas, e também com o intercalante de DNA fluorescente 7AAD a fim de verificar as células inviáveis. A presença de 7AAD foi analisada de acordo com a detecção de sua fluorescência no canal FL3. Os resultados foram adquiridos no citômetro de fluxo – BDFACSAria III e analisados utilizando o programa FCPAArray (Software versão 3.0). Posteriormente, a suspensão de células cultivadas em monocamada e a suspensão celular cultivadas em modelo tridimensional foram avaliadas a fim de avaliar o tamanho celular, que foi analisado utilizando o parâmetro de espalhamento frontal de luz (FSC, do inglês *ForwardScatter*). Para estes experimentos foi realizado um *pool* de 3 pacientes.

A viabilidade celular também foi analisada por uma metodologia complementar a partir de um kit comercial de fluorescência (Live/Dead Cell Viability Assays, Invitrogen) para marcação de calceína citoplasmática (corante polianiónico verde) e incorporação de marcador nuclear (homodímero-1 de etídio, vermelho). As imagens para posterior análise foram realizadas por microscopia confocal e microscópio de fluorescência microscópio Leica DMI 6000 associado ao software de deconvolução LAS AF 3.2.

4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO: FIXAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Com o intuito de avaliarmos a morfologia dos esferoides de ASC induzidos para via condrogênica realizamos uma análise histológica. Para isso, os esferoides foram coletados do interior da agarose micromoldada e posteriormente lavados 2 vezes com solução de PBS. Em seguida os esferoides foram fixados com paraformaldeído 4% tamponado em PBS e mantidos durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, os esferoides foram lavados 1 vez com PBS e 2 vezes com água destilada, sendo posteriormente mantidos por 20 minutos em banhos seriados de álcool 70%, uma vez, álcool 100%, 2 vezes, para desidratação sucessiva, seguido de 2 banhos em xilol 100% e 3 banhos em parafina pura e em seguida foram incluídos em parafina pura para a obtenção dos cortes.

Os fragmentos de cartilagem humana foram lavados uma vez com PBS e então fixados em formol 10% por 24 horas e, posteriormente, foram incubados em solução descalcificadora (formol:ácido fórmico) por um período de 8 horas. Em seguida, foram submetidos a banhos sucessivos, de 30 minutos cada, em álcool 70%, uma vez, álcool 100%, duas vezes, seguido de 2 banhos em xilol 100% e dois banhos em parafina pura e em seguida foram incluídos em parafina pura para a obtenção dos cortes.

Os blocos de parafina com as amostras (esferoides de ASC, esferoides ASC induzidos e cartilagem) foram cortados no micrótomo (Slee Medical – Cut 5062) a fim de obter cortes de 5µm de espessura. Os cortes foram coletados do banho maria a 40°C diretamente para as lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina 0.01% (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) e secos à temperatura ambiente.

4.7 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

A fim de realizar a coloração das amostras a partir da metodologia de HE as lâminas contendo os cortes foram mantidas em estufa a 60°C por 30 minutos. Posteriormente, ainda mantidos na estufa, foram desparafinizados em três banhos

consecutivos de xilol 100% por três minutos cada. Em seguida foram re-hidratados em banhos decrescentes de álcool absoluto - álcool 95% e álcool 70% - por 3 minutos cada em água destilada por 5 minutos. Os cortes foram corados com hematoxilina por 10 minutos e lavados em água corrente por 5 minutos seguido de banho rápido em solução de álcool clorídrico 1% (Vetec, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) para diferenciação da cor e lavados em água destilada por 3 minutos. Posteriormente, os cortes foram expostos a eosina alcohólica por 45 segundos, e em seguida foram mergulhados rapidamente em água acética 1% e lavados em água destilada por 3 minutos. Subsequentemente, foi realizado banhos, de 2 minutos cada, em álcool 95% e dois banhos em álcool 100% para desidratação rápida e, então, os cortes foram clarificados em três banhos de 3 minutos em xilol 100%. As lâminas foram montadas com lamínulas em *Entellan* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os cortes foram analisados em microscópio óptico.

4.8 PERFIL DE SECREÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS

A secreção de fatores de crescimento e citocinas foram monitoradas a partir do sobrenadante da cultura dos esferoides de ASC e a partir dos esferoides de ASC induzidos para via condrogênica. As análises foram realizadas a partir do meio de cultivo após 7, 14 e 21 dias. Para que fosse realizada a análise do sobrenadante do cultivo dos esferoides, 24 horas antes da coleta foi realizado a troca do sobrenadante para um meio de cultivo sem os fatores de indução condrogênica dexametasona e TGF- β 3, para um meio de cultivo de esferoides. Após as 24 horas em meio de cultivo de esferoides, foi realizado a coleta do sobrenadante, homogeneizado e em seguida foi realizada a distribuição em microtubos e armazenados em freezer -80°C e mantidos até o dia da análise das citocinas ou de TGF- β 1, - β 2, - β 3.

4.8.1 Quantificação da secreção de citocinas

A dosagem das citocinas contidas no sobrenadante foi realizada utilizando o kit *Cytometric Beads Array* (CBA) (BD Biosciences, São Paulo, Brasil) de acordo com o manual do fabricante. A primeira etapa consistiu em reconstituir os padrões de IL-6 e IL-8 a fim de preparar a curva padrão. Para preparo do padrão foi realizada uma

diluição seriada (1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:729) após a reconstituição das citocinas padrão liofilizadas. As etapas posteriores foram as mesmas tanto para a curva padrão, como para as amostras do sobrenadante do cultivo dos esferoides. Para a análise das amostras, foi adicionado 25µL do sobrenadante da cultura dos esferoides e da curva padrão em tubos do tipo *ependorfs*. Posteriormente, uma solução de *beads* de captura foi homogeneizada com o auxílio de um vortex por pelo menos 5 segundos e foi então adicionado 25µL das *beads* de captura nos *ependorfs* contendo as amostras e nos *ependorfs* contendo a diluição seriada do padrão, misturado gentilmente e incubados por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 25µL da mistura dos reagentes de detecção PE em todos os tubos do tipo *ependorfs* e misturado gentilmente. Em seguida, os tubos do tipo *ependorfs* foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 0,5mL do tampão de lavagem em cada tubo do tipo *ependorfs* de ensaio e centrifugados a 200g por 5 minutos. O sobrenadante dos tubos do tipo *ependorfs* foram removidos cuidadosamente e, então, foram adicionados 150µL do tampão de lavagem em cada tubo do tipo *ependorfs*. Posteriormente, a solução foi misturada com o auxílio do vortex para ressuspender as *beads*. Os resultados foram obtidos no citômetro de fluxo – BDFACSAria III e analisadas utilizando o programa BDFACSDiva.

4.8.2 Quantificação da secreção de TGF-β1, -β2, -β3

A dosagem dos fatores TGF-β1, -β2 e -β3 contidos no sobrenadante foi realizada através do kit TGF-β BioPlex MAGPIX (BioRadLaboratories, Califórnia, EUA) de acordo com o manual do fabricante. Os reagentes liofilizados foram reconstituídos e posteriormente foi preparado a curva padrão com as *beads* magnéticas. Em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços, foi adicionado as amostras de sobrenadante e posteriormente as *beads*. A incubação dos reagentes da curva padrão e controle foi realizada mantendo a placa sob agitação de 350 rpm à temperatura ambiente durante 1 hora. O mesmo parâmetro foi empregado para os sobrenadantes incubados com os anticorpos de detecção. A estreptavidina PR foi adicionada e incubada por 30 minutos no escuro e à temperatura ambiente sob agitação de 350 rpm. Por fim, as esferas magnéticas foram ressuspensas em tampão

de ensaio e agitadas por 30 segundos a 1200 rpm e a leitura foi realizada no BioPlex MAGPIX (BioRad).

4.9 ENSAIO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS ESFERÓIDES DE ASC E DOS ESFERÓIDES DE ASC INDUZIDOS

A resistência dos esferóides à compressão foi avaliada utilizando o equipamento Microsquisher (CellScale). Para tal análise os esferóides de ASC e os esferóides de ASC induzidos foram recolhidos da agarose micromoldada e dispostos em uma plataforma contendo PBS à temperatura de 37°C. Uma placa posicionada acima do esferoide exerceu ciclos de compressão que consistiu de uma força vertical com amplitude de 25% do diâmetro dos esferóides. Cada ciclo foi composto de uma fase de carga de 20 segundos, seguida de recuperação de 10 segundos. As forças máximas necessárias para atingir 25% da compressão dos esferóides foram determinadas em micronewton (μN) e posteriormente foi realizado um gráfico da média com o desvio padrão. Cinco ciclos foram realizados em quadruplicata a partir de amostras de três pacientes. Os esferóides fusionados também foram avaliados por essa metodologia (ver tópico 5.4).

5. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS mRNA POR PCR EM TEMPO REAL

Para a análise da expressão dos mRNAs relacionados com a via de diferenciação condrogênica, avaliamos a expressão dos master genes Sox5, Sox6, Sox9, assim como do Runx2. A primeira etapa consistiu em extrair o RNA total dos esferóides de cada condição com o QIAGEN RNeasy® mini kit (Applied Biosystems, USA). A quantificação de mRNA foi realizada a partir do AgPath-ID™ one-step RT-PCR kit (Applied Biosystems, USA) no equipamento CFX96 Touch qPCR System. Em resumo, foi utilizado 1,5 μL RNA total (15ng/ μL) e amplificado em master mix composto por 5 μL de 2x RT-PCR buffer, 0,4 μL de 25x RT-PCR enzyme mix, 0,67 μL de detection enhancer e por fim a solução de master mix foi avolumada com água livre de RNase para um volume final de 10 μL da mistura. Primers específicos e sondas específicas

TaqMan (Applied Biosystems, USA) foram utilizadas, Sox5 (Código: Hs00753050_s1), Sox6 (Código: Hs00264525_m1) e Sox9 (Código: Hs01001343_g1) e do Runx2 (Código: Hs00231692_m1). Foi realizado a triplicada para cada amostra de RNA que foram posteriormente normalizadas com a expressão do gene housekeeping RPL (Ribosomal protein L) (Hs99999902_m1) utilizando o método do $\Delta\Delta C_t$. A fim de comparar a diferença entre a expressão das duas condições realizamos a razão da expressão entre ASC dos esferoides induzidos em relação as ASC dos esferoides controle, portanto, o gráfico mostra o quão maior ou menor foi a expressão das ASC dos esferoides induzidos foi em relação as ASC dos esferoides controle – Fold Change (induzido vs controle). A fim de verificar a cinética de expressão das ASC dos esferoides induzidos para via condrogênica ao longo dos 21 dias de indução relativizamos a expressão das ASC dos esferoides induzidos em relação a expressão de 7 dias de indução – Fold Change induzido (vs induzido 7 dias).

5.1 ANÁLISES DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para avaliar a eficiência da diferenciação dos esferoides de ASC para via condrogênica realizamos a análise de imunohistoquímica com anticorpos específicos de tecido cartilaginoso. A primeira etapa está descrita no tópico 4.6, que mostra como foi realizado o preparo das amostras. Os cortes para imunohistoquímica foram realizados utilizando lâminas silanizadas (Starfrost®) que foram desparafinizadas e reidratação das lâminas a partir de banhos seriados de xilol, 2 vezes, por 5 minutos, álcool 100%, 2 vezes por 3 minutos, álcool 70%, 2 vezes, por 3 minutos, álcool 50%, por 3 minutos e um banho maria em água destilada por 1 minuto. Após as etapas de desparafinização e reidratação, as amostras foram submetidas aos bloqueios de proteína (BSA 0,5%, caseína 0,5% e azida de sódio 0,1%) pingando 2 gotas do bloqueador e foi deixado por 15 minutos em contato com as amostras. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (Peróxido de hidrogênio 0.3%), pingando 2 gotas sobre as amostras e deixado por 10 minutos, com o intuito de evitar marcações inespecíficas. Após as etapas de bloqueio, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários à temperatura ambiente por 1 hora. Em especial, o anti-colágeno II, por recomendação do fabricante, passaram por uma etapa adicional para recuperação enzimática dos sítios antigênicos antes de serem submetidas as etapas

de bloqueio, usando a enzima Condroitinase ABC (0.01%) por 30 minutos à 37 graus (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). As diluições dos anticorpos primários foram as seguintes: N-Caderina 1:800; Colágeno tipo I 1:100; Colágeno tipo II 1:50; Colágeno tipo VI 1:100; Sulfato de Condroitina 1:100; Agrecana 1:100 e Vimentina 1:200. Seguido da etapa de incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados em tampão e posteriormente foi adicionado o reagente Complement (Spring), que consiste em uma mistura de anticorpos secundários anti-camundongos e anti-coelho, e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Sem seguida, os cortes foram lavados novamente em TBS e então foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente com o reagente Conjugate (Spring), que consiste em um polímero que promove a ligação da estreptavidina com o anticorpo secundário. Por fim, os cortes foram novamente lavados com TBS e incubados com cromógeno diaminobenzidina DAB (Spring) por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram delicadamente lavadas. Os cortes foram contra-corados em hematoxilina e foram montadas as lamínulas em Entellan (Merck, RJ, Brasil). Esse experimento foi realizado a partir de esferoides produzidos a partir de 3 pacientes.

5.2 ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DA COLORAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Após a aquisição das imagens dos cortes corados por imunohistoquímica foi realizado análises semi-quantitativas a partir do método de Ruifrok e Johnston, a deconvolução de cores. Após a deconvolução do algoritmo a informação de cor foi adquirida com câmeras RGB (verde, azul e vermelho) e foi então calculado a contribuição de cada um dos corantes aplicados em uma amostra, com base na absorção RGB-corante específico (RUIFROK; JOHNSTON, 2001). Para deconvolução de cores foi utilizado um plugin do software Image J e a opção “H-DAB” foi selecionada, as imagens foram separadas em: imagem da colaração de hematoxilina e imagem da colaração do DAB. Para que o software gere o resultado de quantificação em unidades de intensidade em pixels o comando de análise *mean gray value* foi selecionado. Após o resultado ter sido obtido, o valor da intensidade foi convertido para dispersão óptica (DO) usando a fórmula: $DO = \log (\text{intensidade máxima/média da intensidade})$ onde a intensidade máxima é 255 para imagens RGB. A partir dessa metodologia é possível atribuir um valor para a intensidade da marcação

do DAB, no entanto, é fundamental ressaltar que a coloração por imunohistoquímica não é estequiométrica. Uma vez que a marcação não caracteriza exatamente a quantidade de produtos da reação antígeno-anticorpo, sendo, portanto, uma análise semi-quantitativa.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A fim de avaliar a superfície dos esferoides realizamos a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Para isso, os esferoides foram recolhidos da agarose micromolada e armazenados em microtubos e então lavados com tampão com Cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 o tampão foi retirado e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os esferoides passaram por 3 lavagens de 5 minutos com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% (diluído em água destilada) e mantidos por 20 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente. Então os esferoides passaram novamente por 3 lavagens de 5 minutos cada com tampão cacodilato de sódio 0,1M também ao abrigo de luz à temperatura ambiente. Em seguida, os esferoides passaram por banhos com concentração de álcool crescente de 10 minutos cada (álcool 35%, álcool 50%, álcool 70%, álcool 95% e álcool 100%). Posteriormente aos banhos, o material foi secado a partir do método de ponto crítico, seguido de metalização com ouro. Após a metalização, os esferoides foram aderidos a um suporte para MEV (stub) contendo fita dupla face de carbono e foram então analisados com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura Fei quanta 450 (Oregon, USA).

5.4 ENSAIO DE FUSÃO DOS ESFEROIDES INDUZIDOS

O ensaio de fusão foi realizado em esferoides de ASC induzidos para via condrogênica após 14 dias de indução. Para isso, os esferoides foram recolhidos da agarose micromoldada e transferidos para uma placa de fundo plano de 96 poços previamente revestidos com agarose (agarose 2% - Ultrapure Agarose, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA - em NaCl solução 0,9%), com o intuito de evitar a aderência dos esferoides na superfície do poço. Foi então semeado quatro esferoides por poço bem

próximos um do outro e mantidos em cultivo em meio de indução condrogênica por 7 dias. Cada poço foi posteriormente avaliado por microscópio de contraste de fase (Zeiss 37081) após 1 hora, 3 e 7 dias.

5.5 ENSAIO DE ASSOCIAÇÃO DOS ESFEROIDES DE ASC INDUZIDOS ÀS NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA (PCL)

Para biofabricação do contruído, os esferóides de ASC induzidos para via condrogênica por 21 dias foram recolhidos da agarose micromoldada e semeados em matrizes de nanofibras alinhadas que foram adquiridas através de colaboração com o Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), França. A primeira etapa consistiu na colação das nanofibras de PCL presas a inserções estéreis (CellCrown TM, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) com o intuito de delimitar um espaço no qual as nanofibras permanecessem esticadas, evitando seu dobramento durante o procedimento, e também para garantir que os esferoides seriam semeados em contato com as nanofibras (**Figura 10A**). Após esta etapa, as nanofibras já presas as inserções foram colocadas em etanol 70% e mantidas à temperatura de 4°C por 24 horas a fim que o material fosse esterilizado (**Figura 10B**). Após as 24 horas, as inserções com as nanofibras foram submetidas a banhos sucessivos de PBS. No primeiro banho o material ficou 5 minutos em PBS, após esse tempo foram mergulhados em um PBS limpo por mais 30 minutos, este último processo foi repetido 3 vezes. Em seguida, o material foi estabilizado em meio de cultivo de esferoides (**Figura 10C**) e posteriormente os esferoides de ASC induzidos para via condrogênica foram semeados sobre as nanofibras no interior das inserções. Os eventos de aderência e de fusão foram analisados por microscopia óptica.

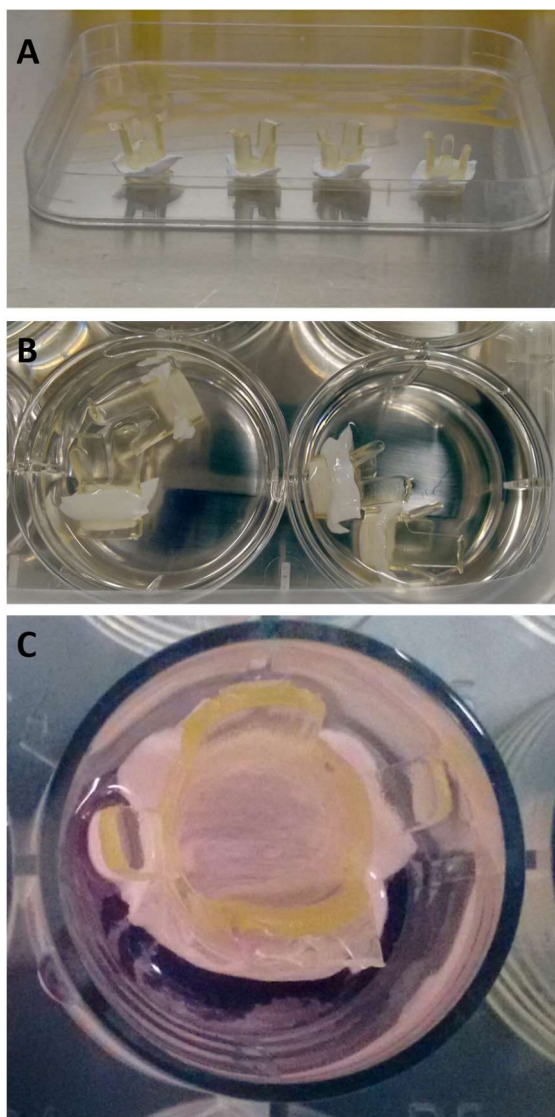


Figura 10. Etapas de preparo das nanofiibras presas às inserções. Nanofibras de PCL (material branco) presas nas inserções (material amarelo) (A). Nanofibras presas às inserções dentro de um poço de placa e cultura contendo etanol 70% (B). Nanofibras presas às inserções dentro de um poço de placa de cultura contendo meio de cultivo de esferoide – etapa que antecede a semeadura das esferas (imagem do topo da placa) (C).

5.6 IMPLANTE DOS ESFEROIDES ASSOCIADOS ÀS NANOFIBRAS NA REGIÃO SUBCUTÂNEA DE CAMUNDONGOS

Após a avaliação dos esferoides semeados às matrizes de nanofibras de PCL realizamos esse material foi implantado na região subcutânea de camundongos. Para isso, utilizamos 60 camundongos Balb C pesando 20-25g. Os animais foram mantidos em mini-isoladores e tiveram acesso livre a água e ração peletizada. Os animais foram anestesiados com 0,2 ml de solução anestésica preparada com 1,0 ml de Quetamina a 10% (Dopalen® - 100 mg/ml), 0,5 ml de xilazina a 2% (Anasedan® - 20 mg/ml) e 8,5 ml de solução salina estéril (KabiPac®), por via intraperitoneal. Após a ausência de reflexo à dor foi realizada a tricotomia e degermação com solução de clorexidina degermante e clorexidina alcoólica 2%, seguindo-se a aposição dos campos cirúrgicos

esterilizados previamente, para a delimitação e isolamento do sítio cirúrgico (**Figura 11A**). Posteriormente foi realizada uma incisão retilínea na região dorsal do animal com cerca de 10 mm de extensão em região de pele seguida de deslocamento da pele da fáscia muscular através do uso de cabo de bisturi n°3 (Bard Parker®) lâmina n°15C (Becton-Dickinson®) (**Figura 11B**) e da tesoura de ponta romba (Metzenbaun 15cm - Golgran), expondo a tela subcutânea para inserção dos biomateriais na região subcutânea com a utilização de um medidor de volume padronizado (**Figura 11C**). Os esferoides associados às nanofibras de PCL foram implantados (**Figura 11D, E**) e em seguida foi realizada a sutura com fio de nylon 5.0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, Brasil) e foi feita a antissepsia com gaze e solução alcoólica de clorexidina 2% para proteção da ferida cirúrgica, evitando-se possível contaminação secundária. No período pós-operatório os animais foram mantidos no (LEA/UFF), separados em 7 caixas através de seus grupos e períodos experimentais, onde receberam alimentação e água à vontade (**Figura 11F**). A medicação analgésica foi realizada no dia da cirurgia e mantida por mais dois dias com Meloxicam – 5mg/kg via subcutânea a cada 24 horas. Decorridos os períodos experimentais de 3, 14, 28 e 90 dias, cinco animais de cada grupo receberam uma dose letal de 150 mg/Kg de pentobarbital para coleta das amostras e tecidos circunjacentes. As amostras foram removidas com uma margem de segurança de aproximadamente 5 mm de cada lado da região de implantação dos esferoides com o auxílio de um cabo de bisturi n°3 (Bard Parker®), lâmina n°15 C (Becton- Dickinson®) e da tesoura de ponta romba e as amostras foram analisadas macroscopicamente e através de microscopia de luz. Após a obtenção das amostras, as carcaças dos animais foram congeladas em sacos pretos de plástico até o recolhimento pela empresa especializada em incineração, de acordo com o protocolo do NAL.

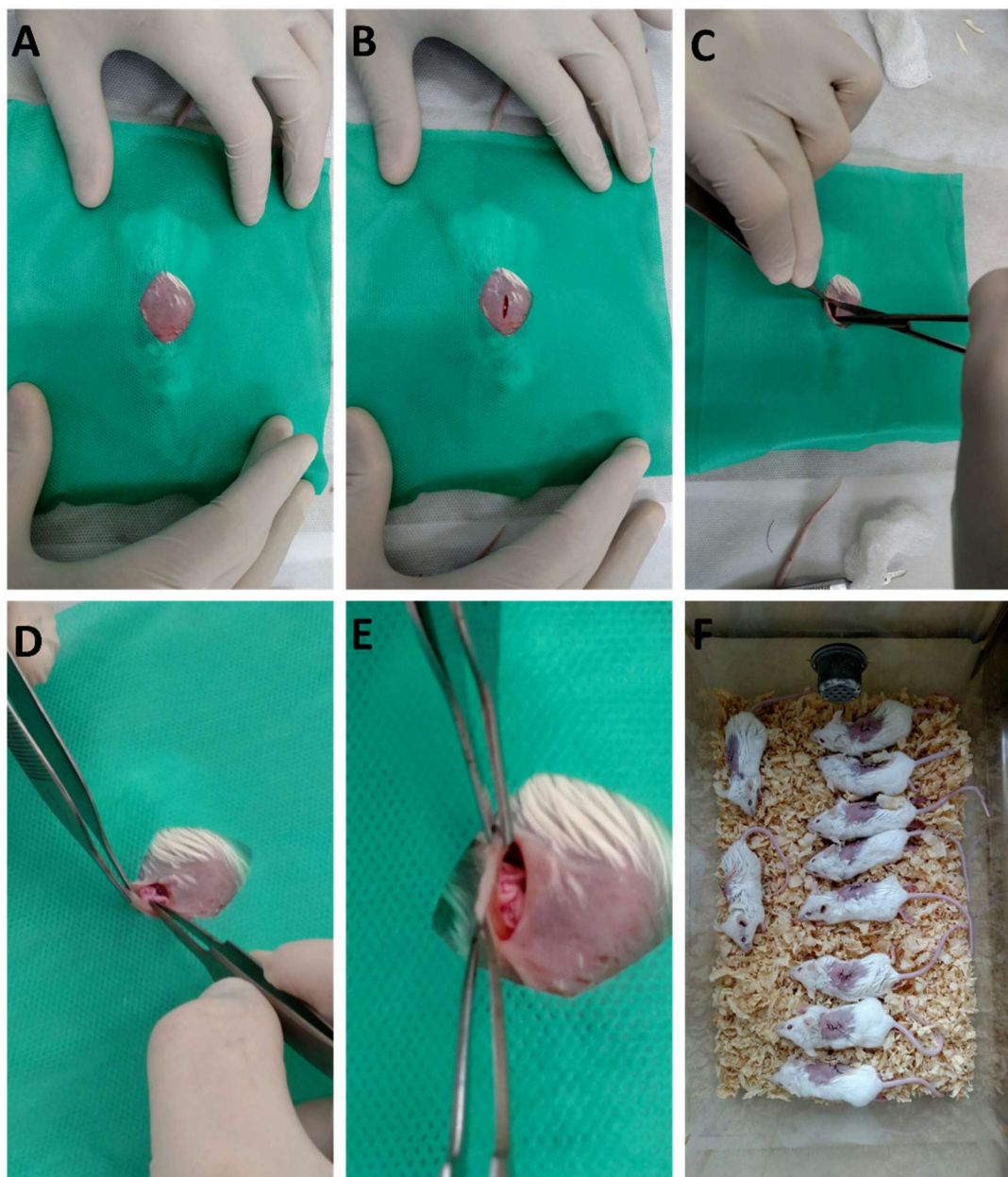


Figura 11. Procedimentos do implante dos esferoides de ASC associados a nanofibra de PCL na região subcutânea de camundongos. Delimitação e isolamento do sítio cirúrgico (A). Incisão retilínea na região dorsal do animal com cerca de 10 mm de extensão em região de pele (B). Deslocamento da pele da fáscia muscular (C). Implantação dos esferoides associados à nanofibra de PCL (D, E). Camundongos separados em caixas logo após o implante (F).

6. RESULTADOS

6.1 PRODUÇÃO DA AGAROSE MICROMOLDADA E DOS ESFERÓIDES DE ASC

A produção dos esferóides consiste inicialmente no preparo da agarose micromoldada a partir de molde de silicone (**Figura 12**). A agarose micromoldada foi produzida segundo recomendação do fornecedor. Após a agarose micromoldada ser colocada no poço de cultura foi realizada a adição de agarose nas bordas a fim de torná-la fixa dentro do poço. Esta etapa adicional aumentou a eficiência da produção dos esferóides pois a agarose micromoldada solta dentro do poço dificultava a troca de meio de cultivo, uma vez que ocorria a movimentação da mesma, que resultava em eventual escape dos esferóides de um recesso para outro. Cada agarose micromoldada possui 81 microrecessos, produzindo, portanto, 81 esferóides.

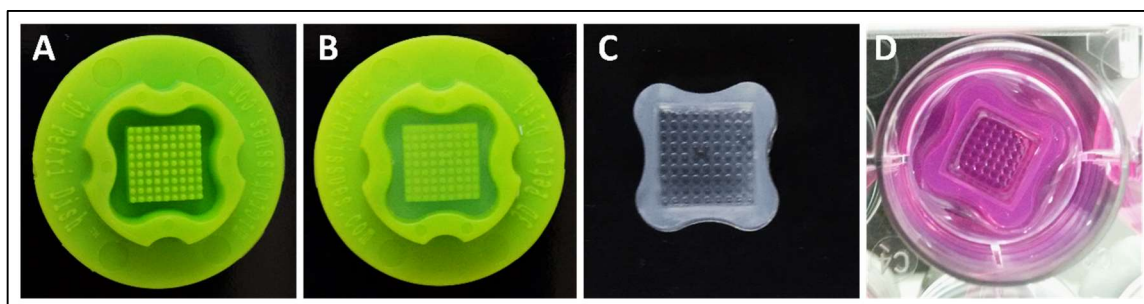


Figura 12. Etapas de preparo da agarose micromoldada em 3D Petri Dish®. Molde de silicone 3D Petri Dish® (A). Molde de silicone após ter sido dispensado a agarose em seu interior (B). Agarose micromoldada desenformada contendo 81 microrecessos (C). Agarose micromoldada inserida no poço da placa de cultura e fixada com adição de agarose nas laterais do poço. Os moldes são estabilizados em meio de cultivo, resultando na coloração rosada da agarose micromoldada (D).

A produção dos esferóides reside inicialmente no cultivo das ASC em monocamada (**Figura 13A**). Após obtenção da suspensão celular foi realizado a semeadura das células no interior da agarose micromoldada. Cerca de 20 minutos após a semeadura, as células se sedimentam no interior dos microrecessos por ação da gravidade, sendo possível visualizar as células individualizadas (**Figura 13B**). A compactação dos esferóides foi observada após 24 horas (**Figura 13C**).

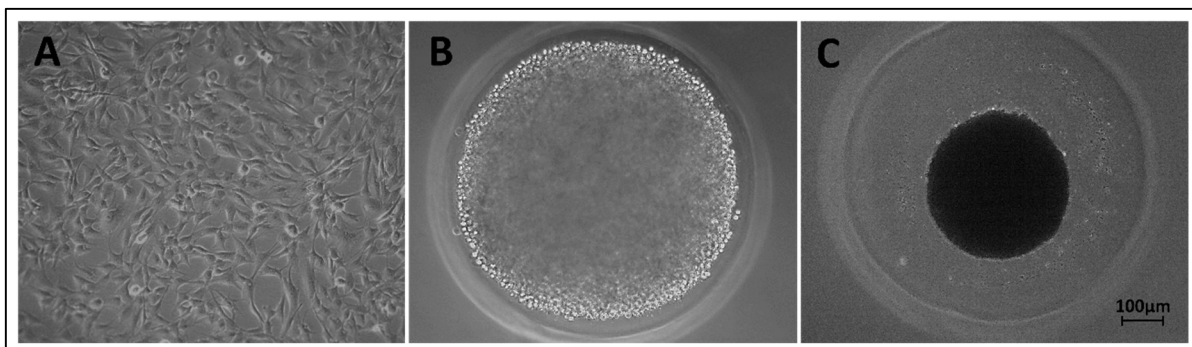


Figura 13. Etapas de produção dos esferóides em agarose micromoldada. Monocamada de ASC após 3 dias de cultivo na segunda passagem (**A**). Suspensão de ASC sedimentadas no interior de um único microrrecesso (**B**). Compactação das células após 24 horas da semeadura das ASC (**C**). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. Barra de aumento 100µm para todas as figuras.

Com intuito de avaliar a homogeneidade de distribuição de tamanho dos esferóides de ASC e dos esferóides de ASC induzido para via condrogênica, foi realizado a medição do diâmetro dos esferóides durante as 3 semanas de cultivo. Para isso, realizamos a medição do diâmetro maior e menor (**Figura 14 A, B, C**), a fim de observar o quão esférico o esferoide foi formado. Em 7 dias de cultivo, a média do diâmetro maior e menor dos esferóides de ASC foi respectivamente de $340,7 \pm 26,22\mu\text{m}$ e $314,5 \pm 29,6\mu\text{m}$ e dos esferóides induzidos foi de $361,3 \pm 32,4\mu\text{m}$ e $333,3 \pm 37,11\mu\text{m}$ (**Figura 14D**). Na figura 14 (**E, F**) é possível observar a morfologia dos esferóides após 7 dias em cultivo. Em 14 dias de cultivo os esferóides de ASC apresentaram o diâmetro maior e menor de $332,1 \pm 25,64\mu\text{m}$ e $295,8 \pm 23,94\mu\text{m}$ e os esferóides induzidos $367,1 \pm 35,87\mu\text{m}$ e $348,2 \pm 40,99\mu\text{m}$, respectivamente (**Figura 14G**). Na figura (**H, I**) podemos avaliar as alterações dos esferóides após 14 dias em cultivo. Após 21 dias de cultivo, os esferóides controle tiveram uma média de $353,8 \pm 29,52\mu\text{m}$ e $303,7 \pm 24,79\mu\text{m}$ para os diâmetros maior e menor respectivamente, enquanto os esferóides induzidos apresentaram uma média de $367,6 \pm 30,01\mu\text{m}$ para o diâmetro maior e $339,6 \pm 36,96\mu\text{m}$ para o diâmetro menor (**Figura 14J**). Na figura (**Figura 14 L, M**) é possível observar que os esferóides controle passam a apresentar uma morfologia com aspecto oval que é comprovado pela grande diferença entre os diâmetros maior e menor. Enquanto os esferóides induzidos apresentam morfologia similar às semanas anteriores, apresentando baixa diferença entre os diâmetros maior e menor. Desta forma, a indução condrogênica resultou em esferóides mais esféricos e estáveis quando comparado com os esferóides controle.

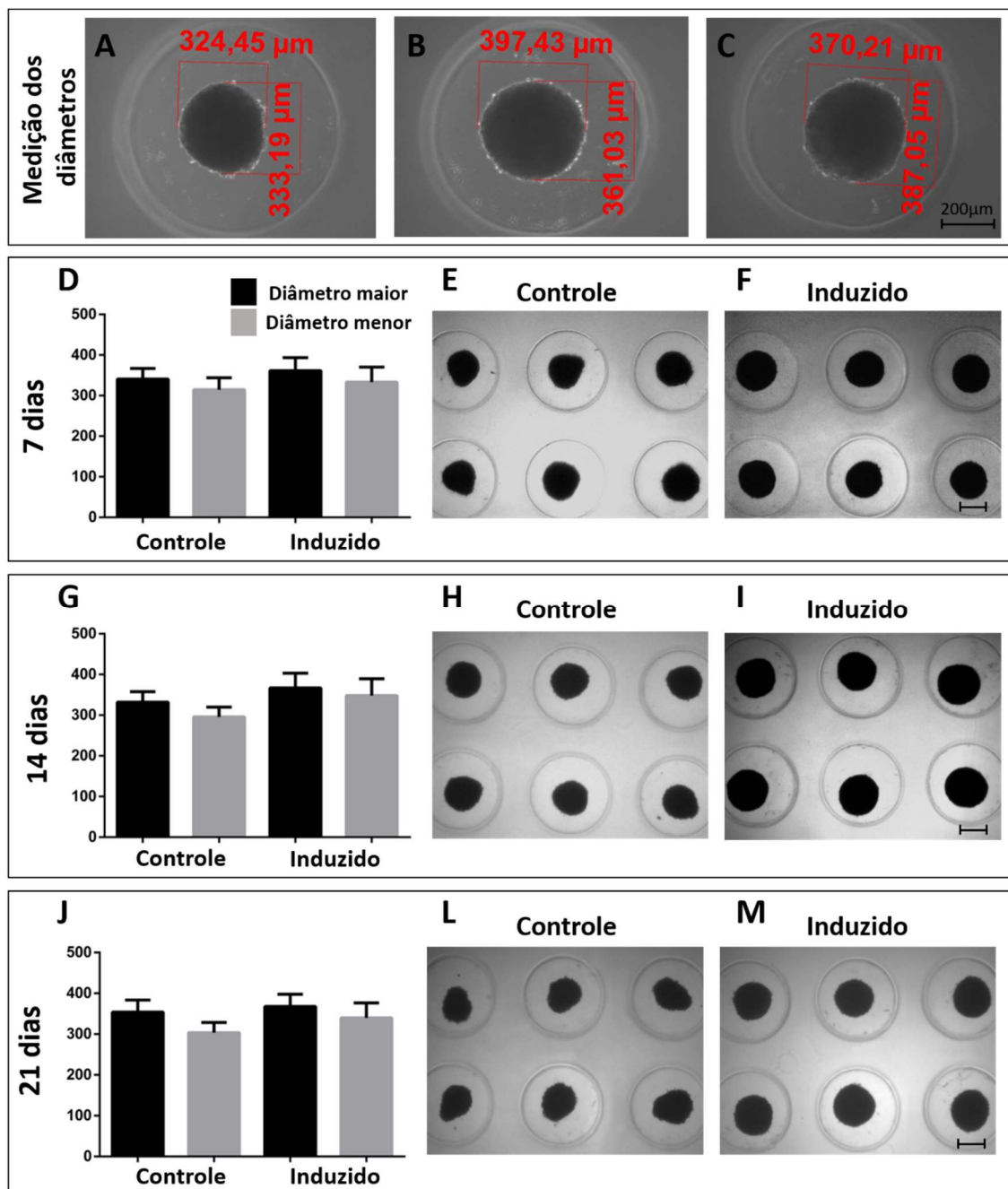


Figura 14. Medição do diâmetro de esferóides controle e induzidos ao longo de 21 dias. Imagem representativa da medição de diâmetro maior e menor dos esferóides (**A**, **B**, **C**). Barra de aumento 200 μm . Média com desvio padrão dos diâmetros maior (coluna em preto) e menor (coluna em cinza) dos esferóides controle e induzido em 7 dias de cultivo (**D**), 14 dias (**G**) e 21 dias (**J**). Contraste de fase dos esferóides controle em 7 dias (**E**), 14 dias (**H**) e 21 dias (**M**). Contraste de fase dos esferóides induzidos em 7 dias (**F**), 14 dias (**I**) e 21 dias (**M**). Barra de aumento 250 μm .

6.2 ESFERÓIDES DE ASC RECELARAM DIFERENÇAS NO FENÓTIPO E NO TAMANHO CELULAR EM RELAÇÃO AS ASC CULTIVADAS EM MONOCAMADA

A fim de avaliar comparativamente o perfil de marcação de superfície das ASC cultivadas em monocamada e após serem mantidas no cultivo tridimensional, os esferóides controle e induzido foram mantidos em cultivo por 21 dias. A suspensão celular de ambos cultivos foi submetida a análises fenotípicas através da citometria de fluxo. Verificou-se que não houve diferença na expressão de CD34 nas ASC cultivadas em monocamada quando comparado com o cultivo tridimensional de ambas condições, controle e induzido, sendo baixa a expressão desse marcador em todas as condições (**Figura 15 A, B, C**). A expressão de superfície de CD73 foi regulada negativamente quando as ASC foram mantidas em cultivo tridimensional (**Figura 15 D, E, F**). A expressão de CD90 manteve-se alta mesmo após as ASC serem mantidas em cultivo tridimensional e após indução condrogênica dos esferóides, ocorrendo apenas uma pequena diminuição quando comparado com as ASC em monocamada (**Figura 15 G, H, I**). Já a expressão de CD105 foi baixa nas ASC de monocamada e não houve marcação nas ASC cultivadas em tridimensional (**Figura 15 J, L, M**). Os valores da quantificação da expressão dos marcadores de superfície são mostrados na tabela 2.

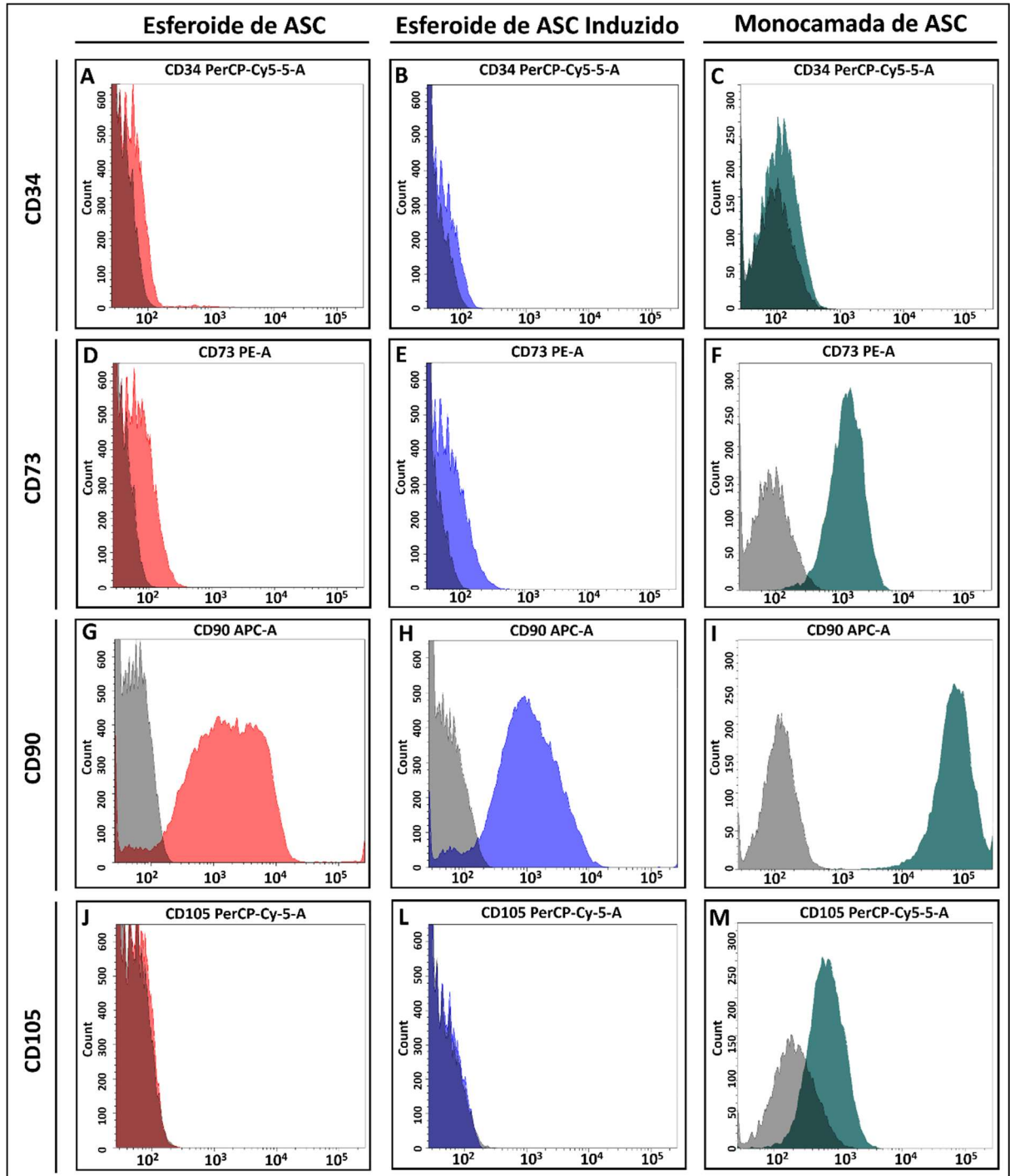


Figura 15. Análise da expressão de CD34, CD73, CD90 e CD105 em esferóides de ASC, esferóides de ASC induzidos e ASC em monocamada em terceira passagem. Histogramas mostram a expressão de superfície de CD34 (A, B, C), CD73 (D, E, F) CD90 (G, H, I), CD105 (J, L, M) em esferóides controle (A, D, G, J – histogramas em vermelho), esferóides induzidos (B, E, H, L – histograma em azul) e monocamada de ASC (C, F, M, I – histograma em verde). Os histogramas em cinza representam as células não marcadas. Count: contagem de eventos. ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo.

Tabela 2. Quantificação da expressão de CD34, CD73, CD90 e CD105 das esferas controle e induzida e da monocamada.

	CD34	CD73	CD90	CD105
Esferoide de ASC	2%	9,2%	91,7%	0%
Esferoide de ASC Induzido	0,8%	8,8%	88,9%	0%
Monocamada de ASC	0,1%	85,8%	99,9%	3,8%

Além das diferenças fenotípicas, verificou-se que as ASC também apresentaram diferenças em seu tamanho quando mantidas em 21 dias em cultivo tridimensional. A análise do tamanho das células de ambos cultivos foi avaliada por citometria de fluxo a partir do espalhamento frontal de luz (FSC, do inglês *Forward Scatter*). Observeu-se que ocorre uma diminuição no tamanho celular quando as ASC são cultivadas em sistema tridimensional (**Figura 16**). Onde, a maioria das ASC cultivadas em monocamada apresentaram-se na faixa de 100 a 150 de FSC (**Figura 16A**) e as ASC cultivadas em tridimensional até 50, realizamos esta análise a partir do pico do espectro, onde observamos a concentração das células analisadas (**Figura 16B**).

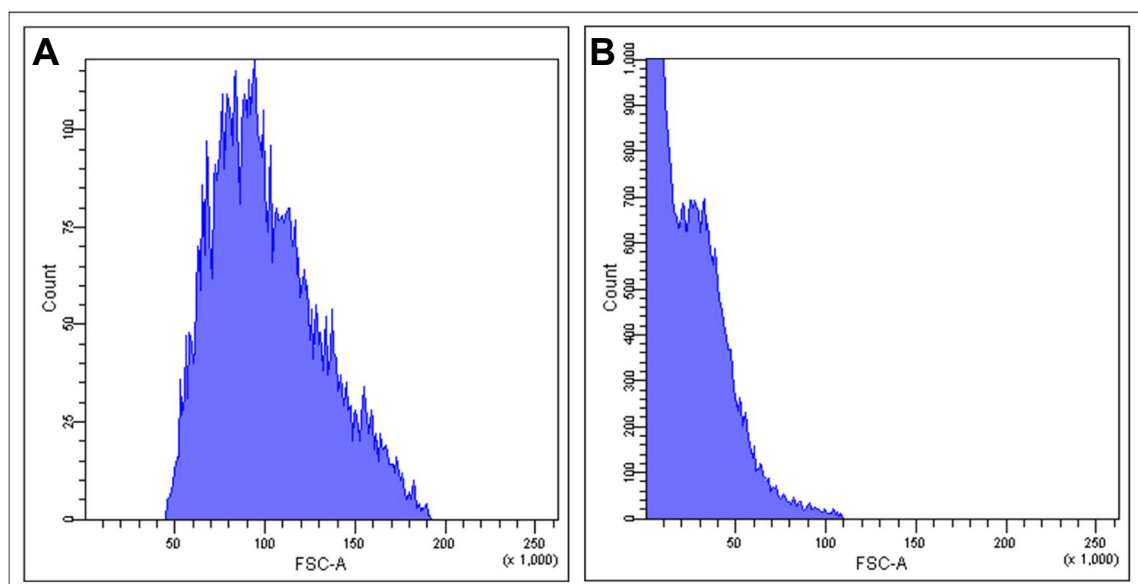


Figura 16. Comparação do tamanho celular de ASC cultivadas em monocamada e após serem mantidas em cultivo tridimensional. O histograma representa o perfil do tamanho celular adquirido pelo espalhamento frontal de luz (FSC, Forward Scatter) de ASC de monocamada (**A**) e ASC mantidas em cultivo tridimensional (**B**). A maioria das ASC de monocamada apresentam metade do tamanho das ASC cultivadas em modelo tridimensional. Count: contagem de eventos. ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo.

6.3 ESFERÓIDES PRODUZIDOS POR AGAROSE MICROMOLDADA APRESENTAM ALTA VIABILIDADE CELULAR COM AUSÊNCIA DE CENTROS NECRÓTICOS NOS ESFERÓIDES DE ASC INDUZIDOS

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados com o objetivo de avaliar as células viáveis dos esferóides de ASC produzidos através da metodologia de agarose micromoldada e para verificar a manutenção da viabilidade celular dos esferóides induzidos e mantidos em condição de hipóxia.

Com esse intuito foi realizado a avaliação dos esferóides controle e dos esferóides induzidos para via condrogênica, ambos mantidos em cultivo por 21 dias. As células foram identificadas por marcação do CD90, e posteriormente foi avaliado a viabilidade das células através da marcação do 7AAD. As células dos esferóides controle (**Figura 17A**) e induzido (**Figura 17B**) apresentaram alta viabilidade celular, com respectivamente 92,1% e 90,2% de células viáveis (**Tabela 3**). As **Figura 17C** e a **Figura 17D** apresentam o controle negativo sem marcação das ASC dos esferóides controle e induzidos, respectivamente.

Como análise complementar, os esferóides de ASC induzidos foram avaliados quanto à marcação de calceína citoplasmática (marcação em verde) a fim de identificar as células viáveis *in situ* e quanto à incorporação do intercalante nuclear homodímero de etídio (marcação em vermelho) com o objetivo de revelar as células necróticas. As análises foram realizadas através de microscopia confocal (**Figura 17E**) e por microscópio de fluorescência associado a *software* de deconvolução (**Figura 17F**). A análise revelou que as células permaneceram majoritariamente viáveis mesmo após 21 dias de cultivo.

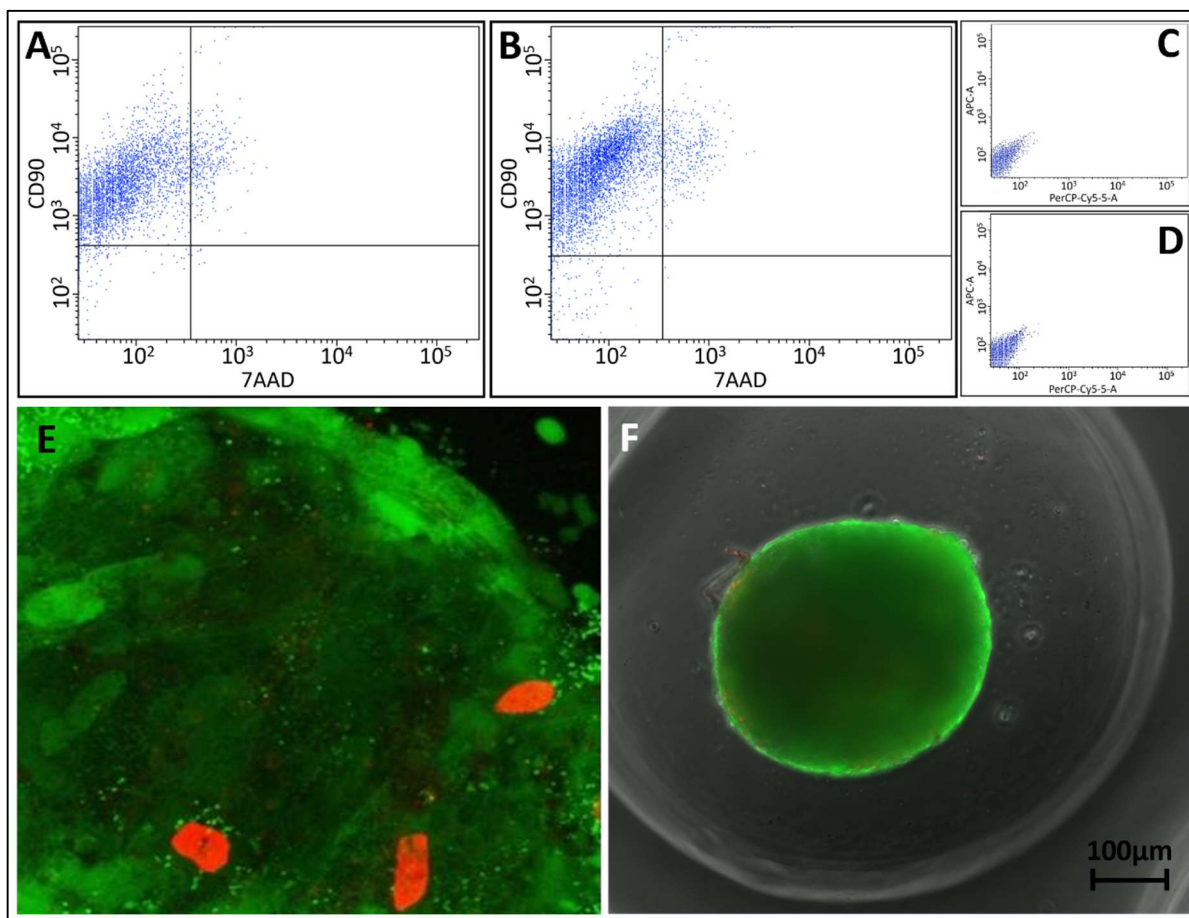


Figura 17. Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo e por marcação citoplasmática e nuclear em células de esferóide após 21 dias de cultivo. Células de esferóides de ASC com marcação positiva para CD90 (detecção no canal APC) e 7AAD (detecção no canal PerCP-Cy5-5-A), analisadas por citometria de fluxo, representam o percentual de células necróticas (Q2), sendo 5,1% e 5,7% dos esferóides controle (**A**) e induzidos (**B**), respectivamente. Os gráficos de ambas condições foram obtidos a partir da aquisição de 100.000 eventos. Controle negativo sem marcação dos esferóides controle (**C**) e induzidos (**D**). Esferóides induzidos incubados com calceína citoplasmática (marcação em verde) e homodímero de etídio (marcação em vermelho) analisados por microscópio confocal (**E**) e microscópio de fluorescência associado a *software* de deconvolução (**F**) revelaram células majoritariamente viáveis com marcação em verde e poucas células necróticas marcadas em vermelho. A tabela 3 mostra a quantificação das análises por citometria de fluxo. Q: quadrante.

Tabela 3. Quantificação da expressão de CD90 e marcação de 7AAD.

	CD90+ 7AAD- (Células viáveis)	CD90+ 7AAD+ (células necróticas)
Esferoide de ASC	92,1%	5,1%
Esferoide de ASC Induzido	90,2%	5,7%

A fim de avaliar a morfologia dos esferóides de ASC induzidos para a via condrogênica e acompanhar o comportamento celular no interior dos esferóides foi realizado análises histológicas ao longo dos 21 dias de indução condrogênica. A partir dos cortes histológicos corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina verificou-se que os esferóides não apresentaram núcleos picnóticos, característicos de células necróticas, ao longo das semanas de indução. Além disso, foi observado que os esferóides apresentam células com morfologia similar em 7 dias de indução, como é possível verificar a partir dos núcleos mais esféricos por todo esferoide (**Figura 18 A, B – seta**). A partir de 14 dias de indução parece ocorrer um agrupamento de células preferencialmente no interior dos esferóides (**Figura 18 C, D – seta**). Observou-se também um espaçamento maior entre as células na periferia dos esferóides. Em 21 dias de indução a periferia dos esferóides apresenta células com morfologia fibroblastóide, que é indicado pelos núcleos com aspecto fusiforme (**Figura 18 E, F – cabeça de seta**) e as células com morfologia não-fibroblastóides se mantiveram no interior dos esferoides (**Figura 18 E, F – seta**).

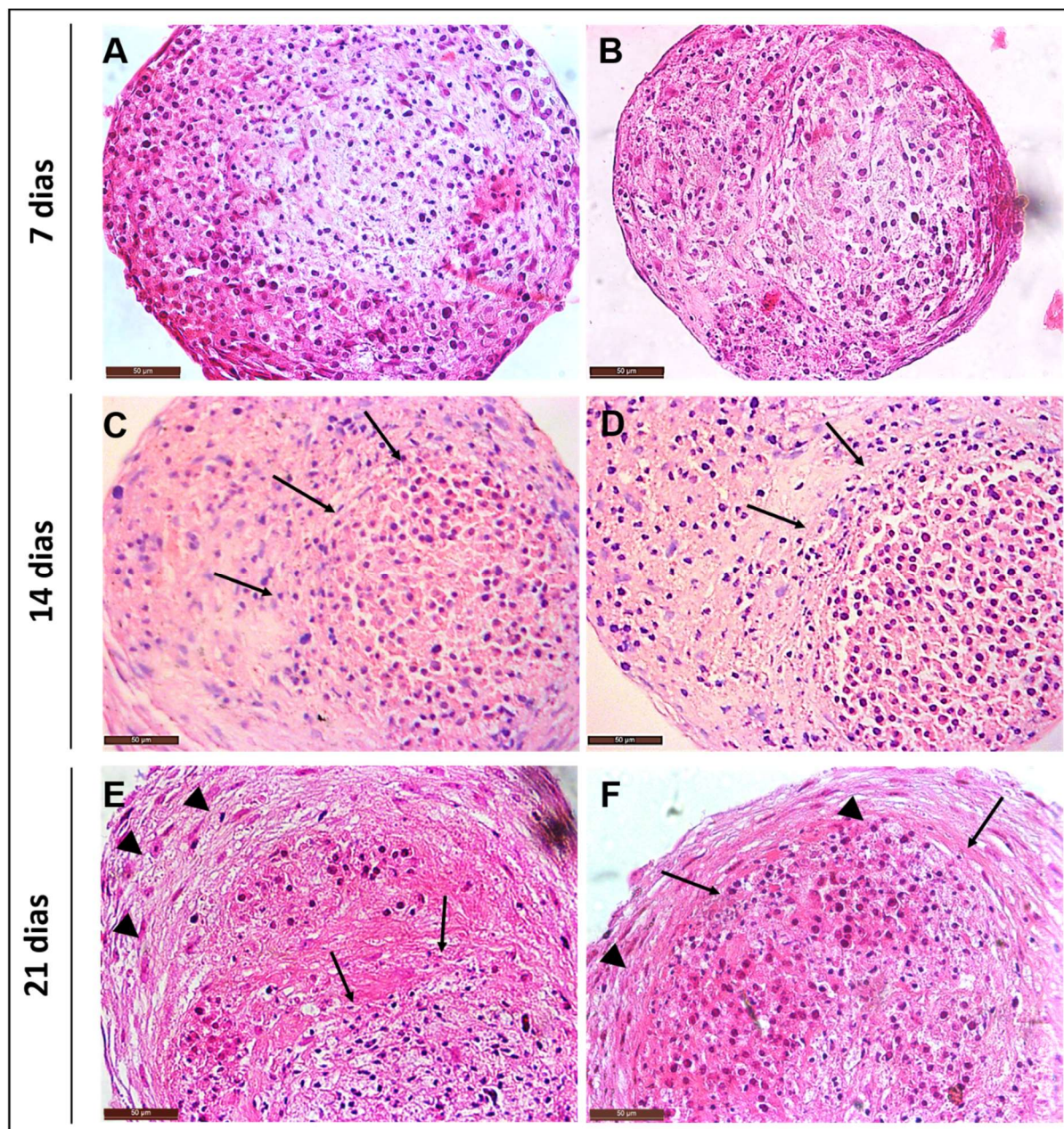


Figura 18. Análise histológica de esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias. Esferóides induzidos apresentam mudança na morfologia das células ao longo dos 21 dias de indução. Análise realizada após 7 dias de indução revela células com morfologia arredondada em todo esferoide (**A, B**). Após 14 dias de indução as células encontram-se majoritariamente agrupadas no interior dos esferóides e apresentam uma diminuição de células na periferia (**C, D**). Em 21 dias de indução as células localizadas periféricamente assumem uma morfologia com característica fibroblastóide (núcleos fusiformes, indicado por asteriscos) e células com aspecto arredondado no interior dos esferóides (núcleos arredondados, indicado por setas) (**E, F**). Os cortes histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Barra de escala 50 µm.

6.4 ESFERÓIDES DE ASC POSSUEM DIFERENÇAS NO PERFIL DE SECREÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS E DE FATORES DE CRESCIMENTO QUANDO COMPARADO COM OS ESFERÓIDES DE ASC INDUZIDOS PARA A VIA CONDRÓGENICA

A fim de avaliar o perfil de secreção de mediadores solúveis e fatores de crescimento pelos esferóides de ASC após a indução condrogênica foi realizada uma cinética ao longo de 21 dias de indução. As análises também foram realizadas em esferóides de ASC não induzidos para via condrogênica, com o objetivo de avaliar a influência da diferenciação nos esferóides de ASC.

Através de ensaio de citometria de fluxo CBA, foi observado que ambos grupos – esferóides de ASC controle e induzido – apresentam alta secreção de IL-6 (**Figura 19A**) e IL-8 (**Figura 19B**) em 7 dias de cultivos. Esferóides de ASC controle apresentaram alto decaimento na secreção IL-6 e IL-8 em 14 dias de cultivo que se manteve baixo até 21 dias de cultivo. Já os esferóides de ASC induzidos para via condrogênica só apresentaram diminuição, de maneira abrupta, em 21 dias de indução.

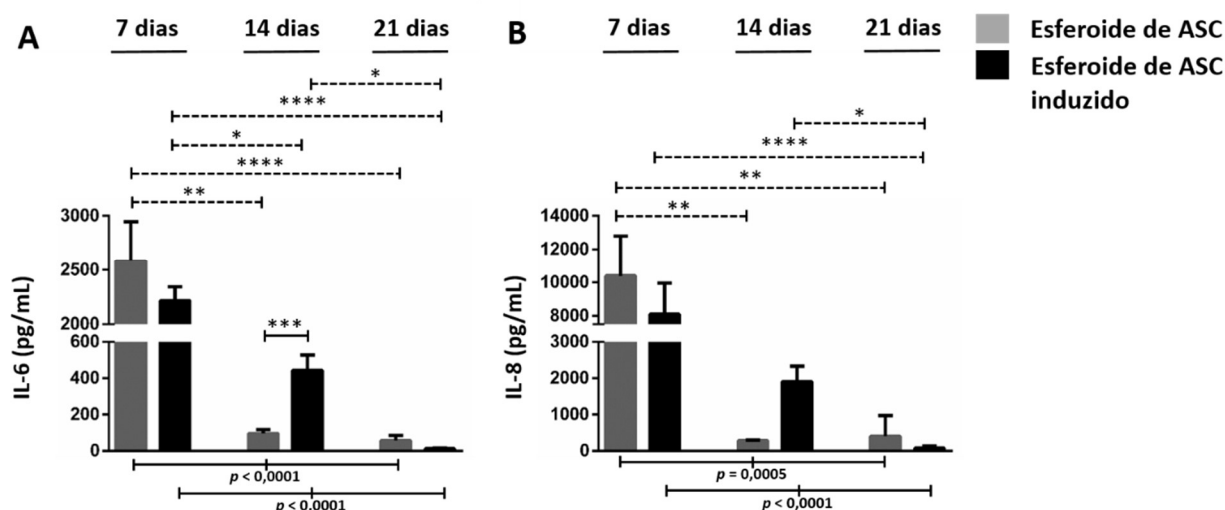


Figura 19. Dosagem de citocinas no sobrenadante do cultivo de esferóides de ASC controle e induzidos para via condrogênica. A análise foi realizada por citometria de fluxo (CBA – *cytometric beads array*). Esferóides de ASC controle e induzido apresentam mesmo padrão de secreção de IL-6 e IL-8. Esferóides controle e induzido apresentaram alta secreção de ambas citocinas em 7 dias de cultivo, ocorrendo uma redução evidente em 14 dias de cultivo na situação ou condição controle e uma redução moderada na condição induzido. Ambos grupos apresentaram baixa secreção das citocinas em 21 dias de cultivo (**A**, **B**). O teste ANOVA foi aplicado dentro de cada grupo controle e induzido a fim de observar

diferenças estatísticas em 7, 14 e 21 dias. O valor de p obtido nos testes ANOVA dos grupos controle e induzido estão descritos abaixo de cada gráfico. Linhas tracejadas indicam análises do pós-teste de ambas condições. Linhas contínuas indicam análises de teste t , que foi realizado a fim de verificar a diferença estatística entre o grupo controle e induzido em 7, 14 e 21 dias. Asteriscos indicam valores de p obtidos no pós-teste e no teste t (* $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0005$; **** $p<0,0001$). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. IL: Interleucina.

A modulação da secreção dos fatores de crescimento da família TGF- β foi investigada em esferóides de ASC e em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica, através da análise de multiplex por luminometria de fluxo. A partir das análises, foi observado um decaimento de TGF- β 1 ao longo dos 21 dias pelos esferóides de ASC induzidos para via condrogênica (**Figura 20A**). Não foi observado secreção de TGF- β 1 a partir do grupo controle (**Figura 20B**). Os níveis de TGF- β 2 do grupo controle apresentaram-se constantes ao longo do cultivo (**Figura 20A**). Já os esferóides induzidos apresentaram maior secreção de TGF- β 2 em 7 dias (**Figura 20B**). Os esferóides de ASC sem indução condrogênica apresentaram decaimento progressivo nos níveis de TGF- β 3 (**Figura 20C**). Enquanto que os esferóides induzidos, apesar de ocorrer uma diminuição dos níveis de TGF- β 3 em 14 dias (**Figura 20C**), o aumento da secreção é retomado em 21 dias de indução (**Figura 20C**). Como a secreção de TGF- β 3 pelos esferóides de ASC foi bastante baixa quando comparado com os esferóides de ASC induzidos esses dados foram adicionalmente colocados no gráfico da **Figura 20D**, onde é possível ter melhor visualização da cinética ao longo dos 21 dias e pudemos observar um decaimento ao longo das semanas. A **Figura 20E** representa a razão entre TGF- β 3 e TGF- β 1, mostrando alta secreção de ambas isoformas até 7 dias de indução. Posteriormente, ocorre uma compensação entre as duas isoformas, sendo maior secreção de TGF- β 1 em 14 dias e maior secreção de TGF- β 3 em 21 dias de indução.

6.5 COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA MECÂNICA ENTRE OS ESFEROIDES DE ASC E OS ESFEROIDES DE ASC INDUZIDO

O ensaio de resistência mecânica foi realizado a partir do equipamento Microsquisher (CellScale) (**Figura 21A**). Para isso, os esferoides foram expostos entre duas placas com o intuito de sofrer a compressão (**Figura 21B**). Ensaio de resistência mecânica revelou que os esferoides de ASC induzidos apresentaram maior resistência mecânica durante os 21 dias de cultura. No entanto, os esferoides de ASC apresentaram resistência mecânica estável durante os 21 dias, enquanto que os esferoides de ASC induzidos para a via condrogênica apresentaram um pico em 14 dias. Porém os esferoides de ASC induzidos quando fusionados após 14 dias de indução, manteve a mesma resistência mecânica alta quando comparado aos esferoides de ASC induzidos após 14 dias de indução (**Figura 21C**).

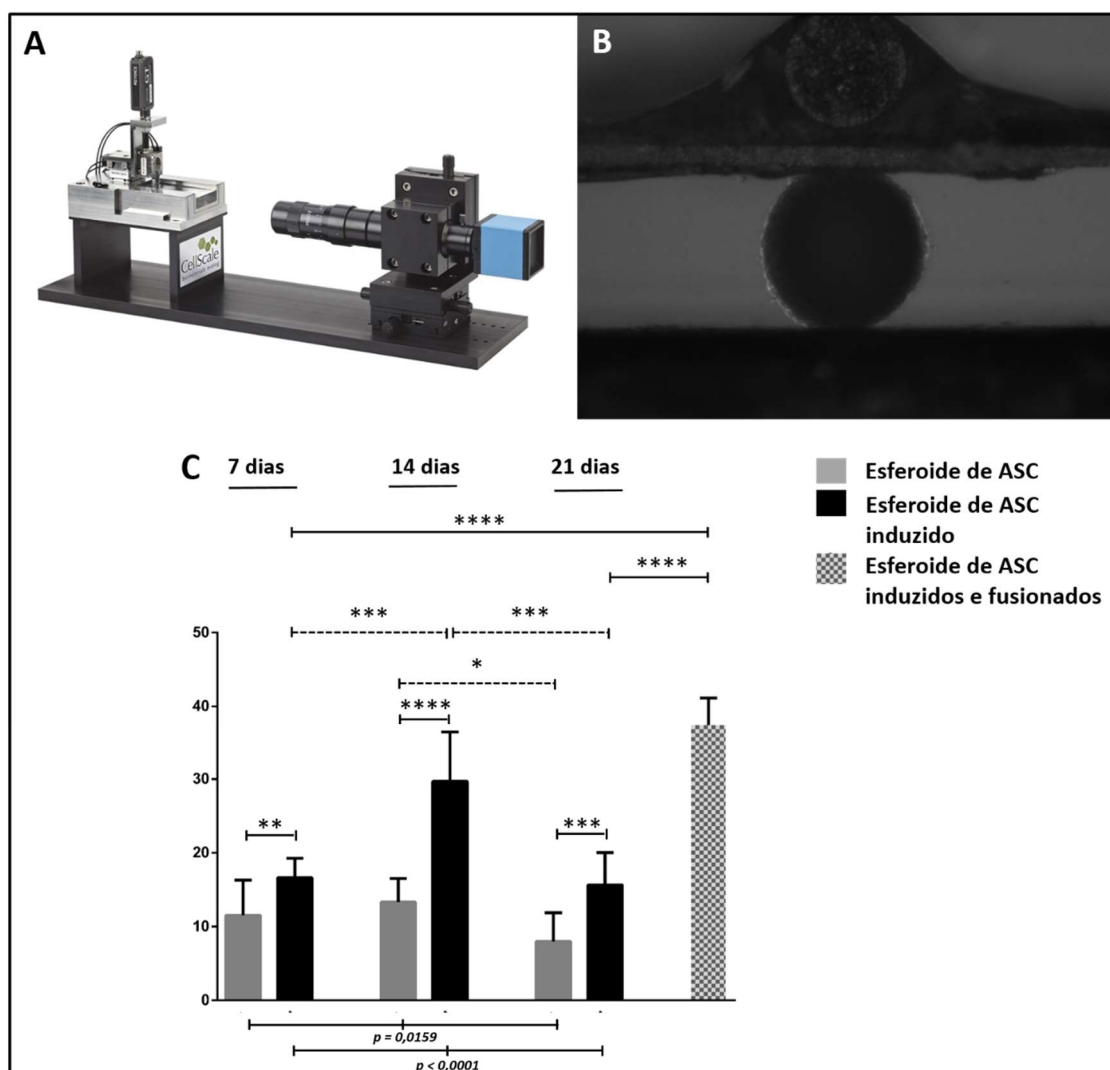


Figura 21.

Figura 21. Ensaio de resistência mecânica dos esferoides de ASC em comparação com os esferoides de ASC induzidos após ao longo dos 21 dias de cultivo. Equipamento utilizado para medição dos teste de resistência mecânica (A). Um esferoide entre as duas placas de compressão (B). Dados coletados a partir de 4 esferoides de cultivo de ASC de 3 pacientes (C). O teste ANOVA foi aplicado dentro de cada grupo controle e induzido a fim de observar diferenças estatísticas em 7, 14 e 21 dias. O valor de p obtido nos testes ANOVA dos grupos controle e induzido estão descritos abaixo de cada gráfico. Linhas tracejadas indicam análises do pós-teste de ambas condições. Linhas contínuas indicam análises de teste t, que foi realizado a fim de verificar a diferença estatística entre o grupo dos esferoides de ASC e dos esferoides de ASC induzido em 7, 14 e 21 dias. Linhas contínuas também representam a comparação entre o esferoide de ASC induzido e fusionado com os esferoides de ASC induzidos. Asteriscos indicam valores de p obtidos no pós-teste e no teste t (* $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0005$; **** $p<0,0001$). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo.

6.6 ESFEROIDES DE ASC APRESENTAM VARIAÇÕES NA EXPRESSÃO DE MASTER GENES AO LONGO DA INDUÇÃO CONDRÓGENICA

Com intuito de avaliar o perfil gênico das células dos esferóides induzidos foi realizado análises dos principais genes envolvidos na via regulatória relacionadas ao destino celular de diferenciação. As análises foram realizadas nos esferóides controle e induzidos em 7, 14 e 21 dias. A fim de verificar a expressão dos esferóides controle e induzidos foi realizado uma razão entre as duas condições. Foi verificado que a expressão de Sox5 apresentou maior diferença entre os esferóides induzidos quando comparado com os esferóides controle em 7 dias de cultivo, com a proximadamente o triplo da expressão em relação aos esferóides controle (**Figura 22A**). Enquanto que a maior diferença de expressão dos genes Sox6 e Sox9 entre os esferóides controle e induzido ocorreu em 21 dias de cultivo. Apresentando uma expressão 10 vezes maior de Sox6 dos esferóides induzidos em relação aos esferóides controle (**Figura 22C**) e de quase 4 vezes mais de Sox9 (**Figura 22E**). Com o objetivo de avaliar a cinética de expressão dos esferóides induzidos ao longo dos 21 dias de indução foi realizado um comparação com os esferóides induzidos com os esferóides induzidos em 7 dias de cultivo. Foi observado que os esferóides induzidos dos três genes Sox apresentaram maior expressão em 21 dias de cultivo (**Figura 22 B, D, F**).

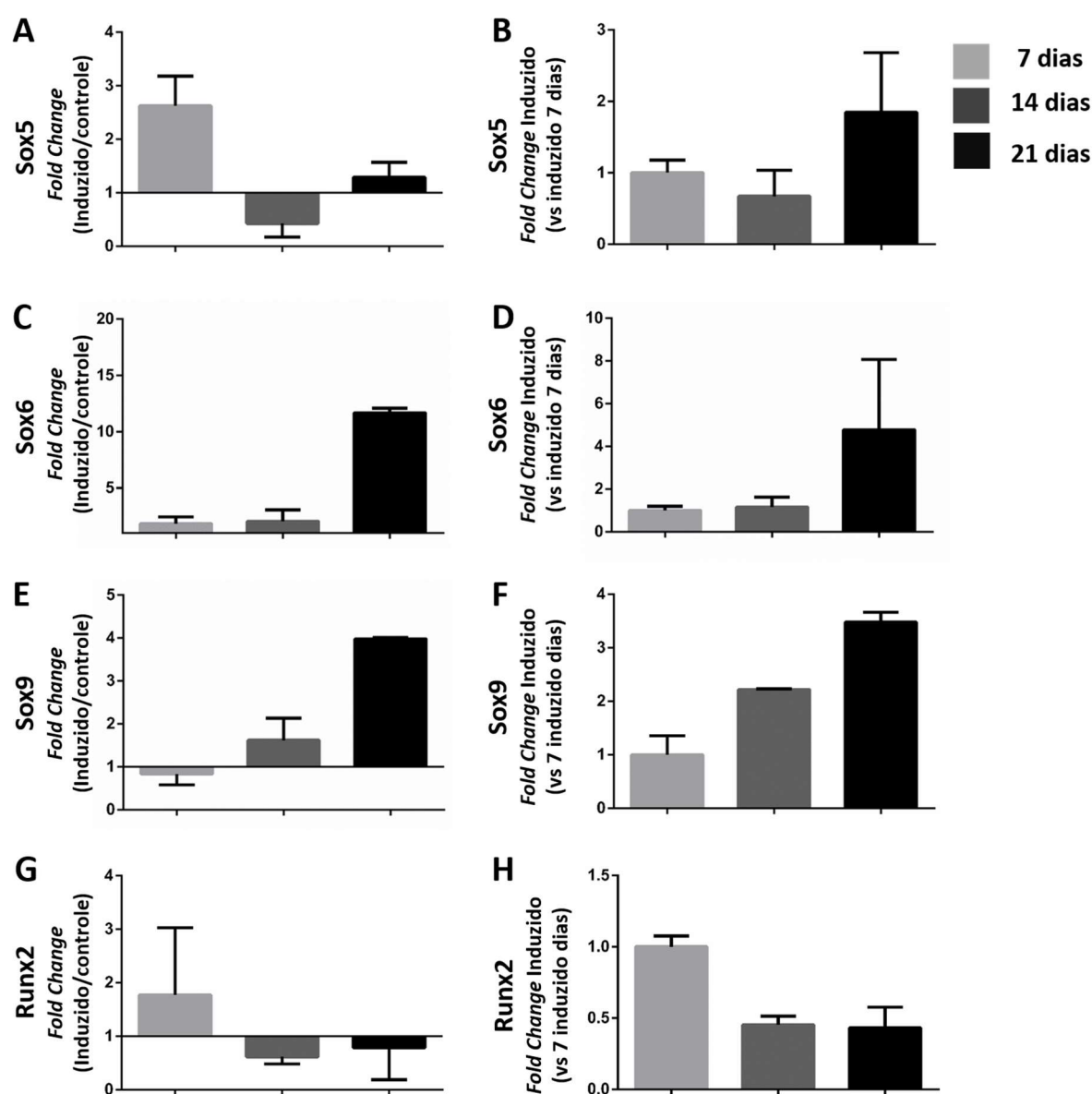


Figura 22. Análise da expressão de mRNA de *master genes* por PCR em tempo real. Razão da expressão gênica do Sox 5 (A), Sox6 (C), Sox9 (E) e Runx2 (G) por células dos esferóides induzidos em relação as células dos esferóides controle. Comparação da expressão gênica do Sox 5 (B), Sox6 (D), Sox9 (F) e Runx2 (H).

A fim de analisar a composição de MEC produzida pelas células dos esferóides de ASC induzidos para a via condrogênica foi realizado análises de imunohistoquímica ao longo dos 21 dias de indução. Com o intuito de avaliar a eficiência da diferenciação condrogênica foram realizadas marcações com anticorpos específicos de componentes de matriz de tecido cartilaginoso, como colágeno do tipo II e VI, sulfato de condroitina e agrecana. Foi analisado também moléculas de adesão celular como

N-caderina e vimentina que são fundamentais no processo de formação e de compactação dos esferóides. As análises de imunohistoquímica foram confirmadas a partir da quantificação da intensidade de marcação, que foi realizada através do *software* Image J.

O colágeno I não apresentou variação ao longo dos 21 dias de cultivo (**Figura 23**). Já a expressão de colágeno II (**Figura 24**) e VI (**Figura 25**) apresentou um aumento em 21 dias de indução. Vale ressaltar que o colágeno II, que é o mais abundante no tecido cartilaginoso, apresentou maior expressão quando comparado aos outros colágenos analisados. A partir da análise semi-quantitativa de intensidade de marcação podemos confirmar esses dados (**Figura 26**). Assim, a indução condrogênica conservou a alta expressão de colágeno II e baixa expressão de colágeno I ao longo das semanas.

O sulfato de condroitina, apresentou alta expressão durante os 21 dias de indução, apresentando um leve aumento na última semana de indução (**Figura 27**). Já a agrecana apresentou uma diminuição moderada em 14 dias de cultivo (**Figura 28**), apesar de apresentar alta expressão ao longo de todo período de indução (**Figura 29**). Esses dados foram confirmados a partir da análise semi-quantitativa de intensidade de marcação (**Figura 30**).

A expressão de vimentina foi negativamente modulada pela indução condrogênica. Verificou-se que ao longo dos 14 dias de indução houve alta expressão de vimentina, ocorrendo um decaimento em 21 dias. Além disso, em 21 dias, observamos marcação preferencial na periferia dos esferóides (**Figura 31**). Por outro lado, a N-caderina foi positivamente modulada pela indução condrogênica, apresentando um aumento significativo em 21 dias de indução (**Figura 32**).

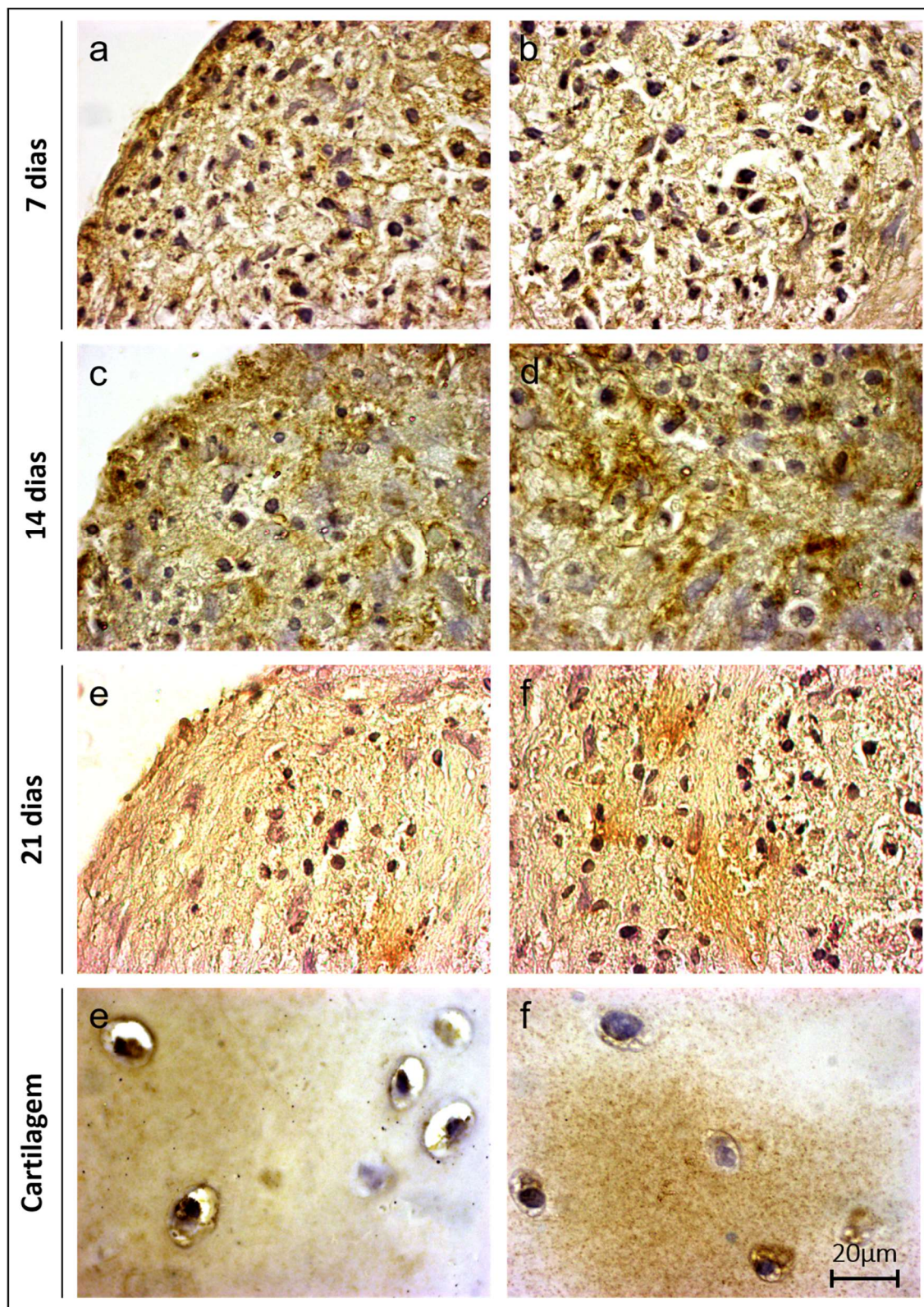


Figura 23. Composição de colágeno I em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução. A análise foi realizada por imunohistoquímica. A marcação de colágeno I não apresentou variação ao longo da indução condrogênica. Controle positivo: tecido de cartilagem (g, h). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. Barra de aumento 20µm.

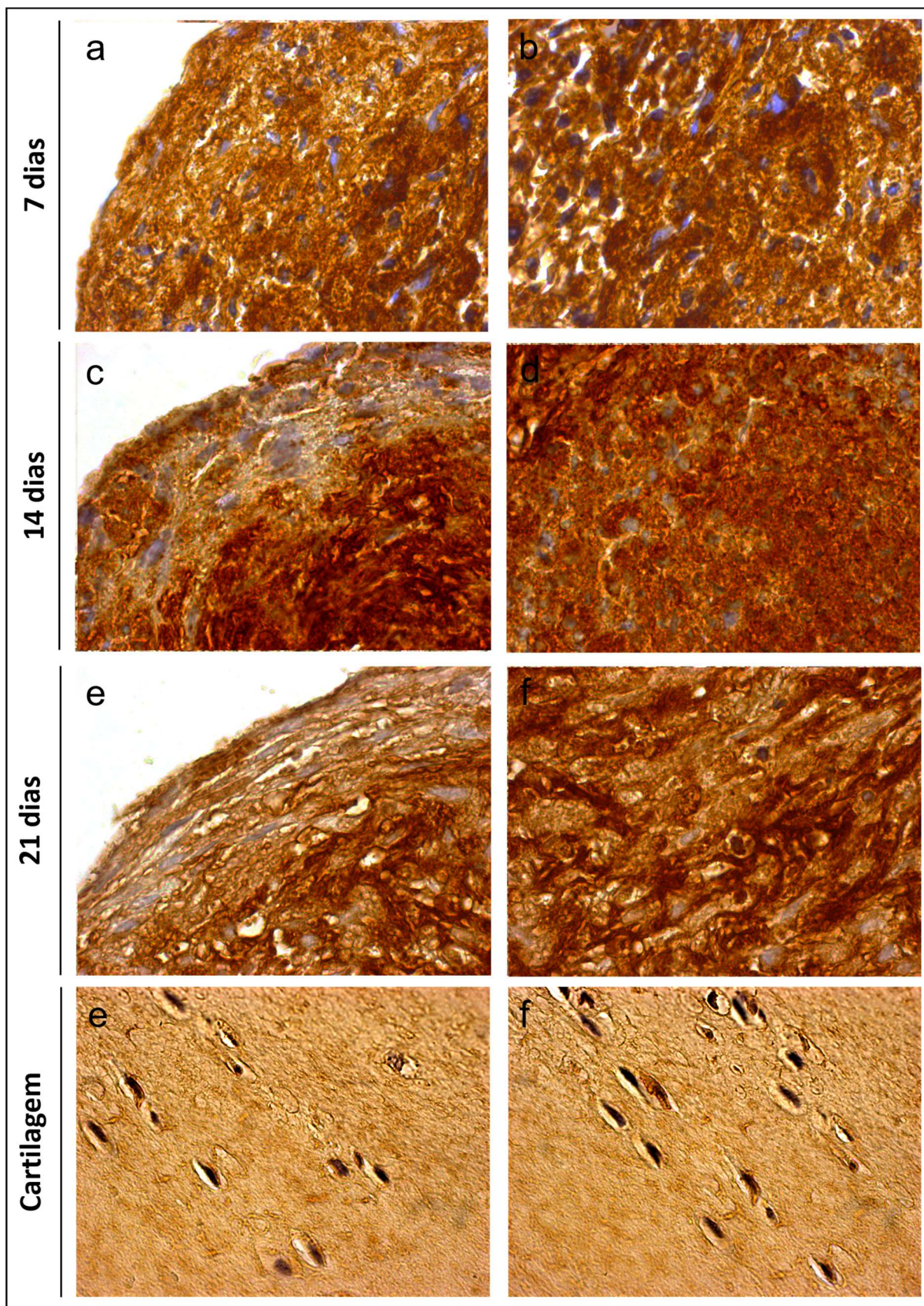


Figura 24. Composição de colágeno II em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução. A análise foi realizada por imunohistoquímica. Controle positivo: tecido de cartilagem (g, h). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. Barra de aumento 20µm.

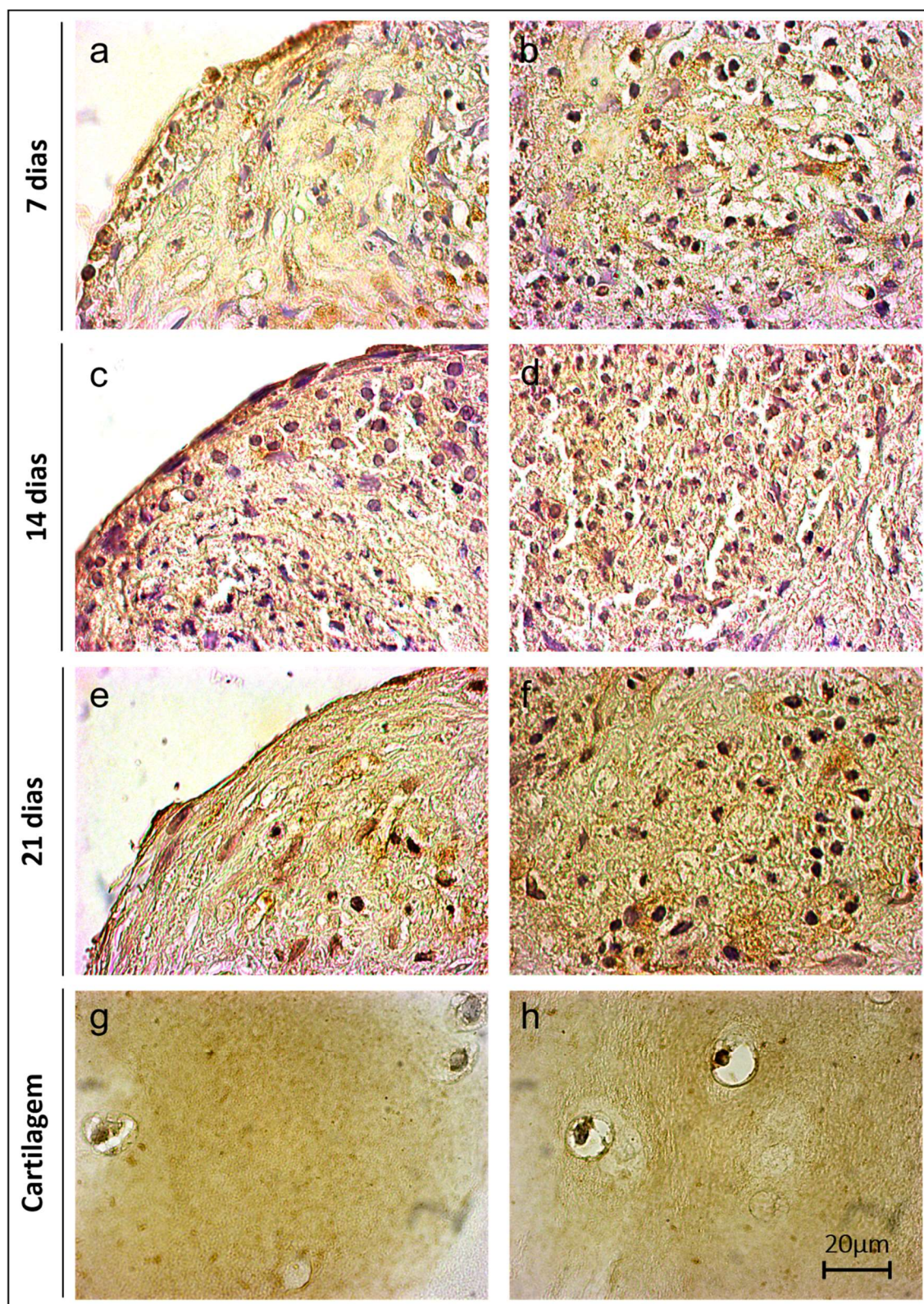


Figura 25. Composição de colágeno VI em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução. A análise foi realizada por imunohistoquímica. Controle positivo: tecido de cartilagem (g, h). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. Barra de aumento 20µm.

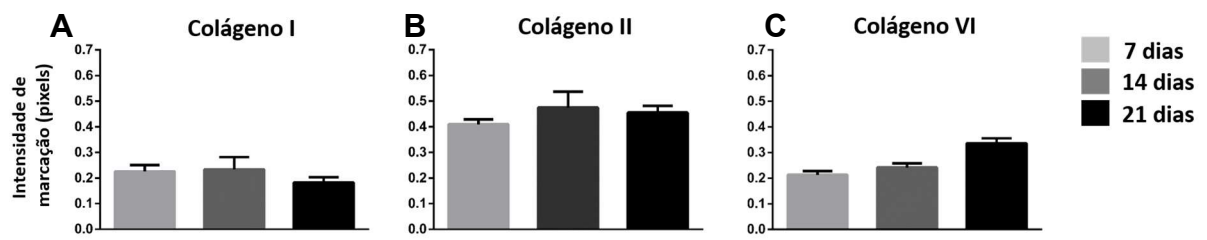


Figura 26. Gráficos semi-quantitativos da marcação de colágenos em esferóides induzidos. Análise realizada através de *software imageJ* utilizando um *plugin* específico para análise de imunohistoquímica. Todas as marcações foram realizadas concomitantemente. A análise revela que os esferóides induzidos apresentam maior expressão de colágeno II e que a indução condrogênica resulta em aumento da expressão de colágeno VI (**A, B, C**).

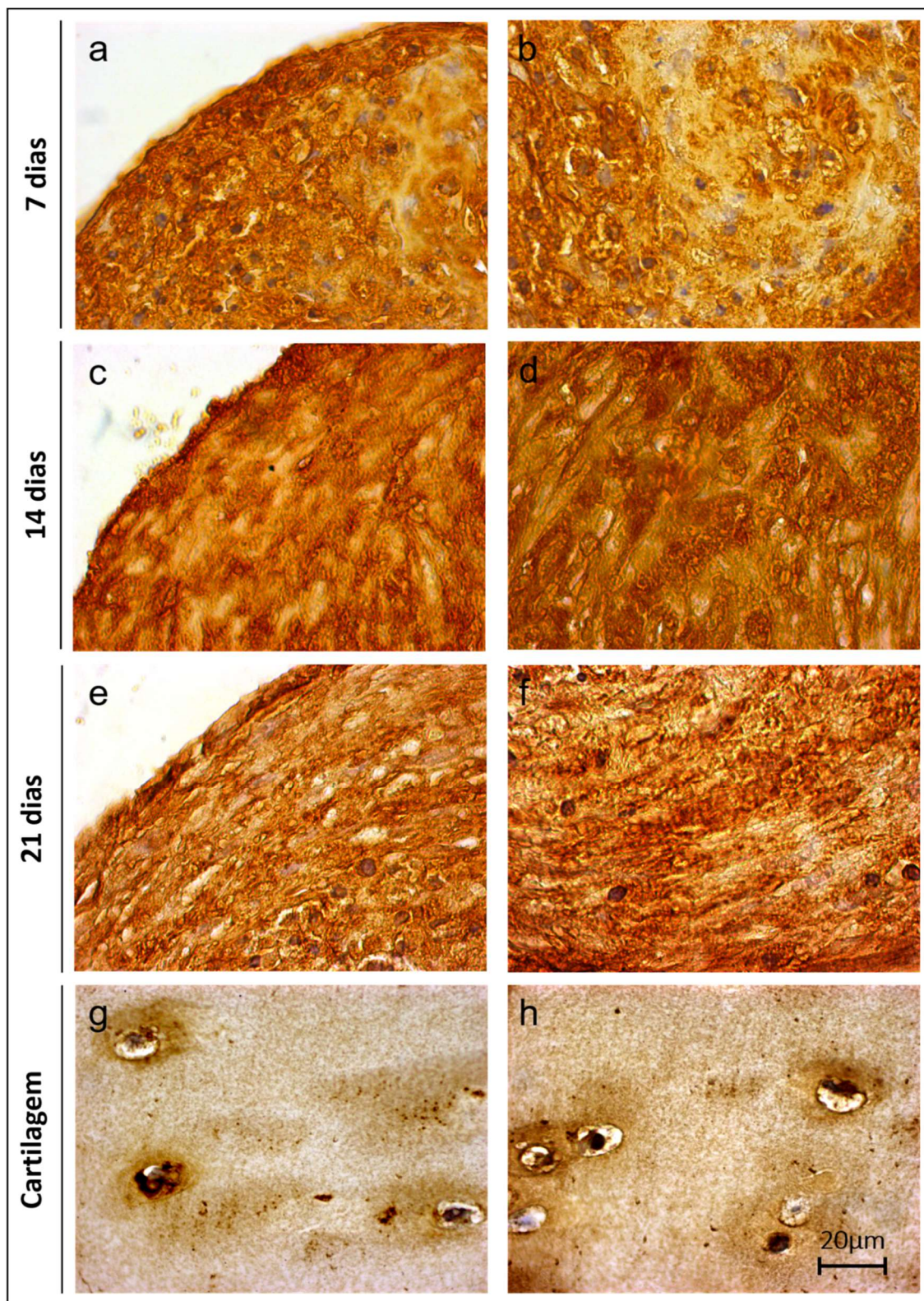


Figura 27. Composição de sulfato de condroitina em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução. Análise realizada por imunohistoquímica. Controle positivo: tecido de cartilagem (g, h). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. Barra de aumento 20µm.

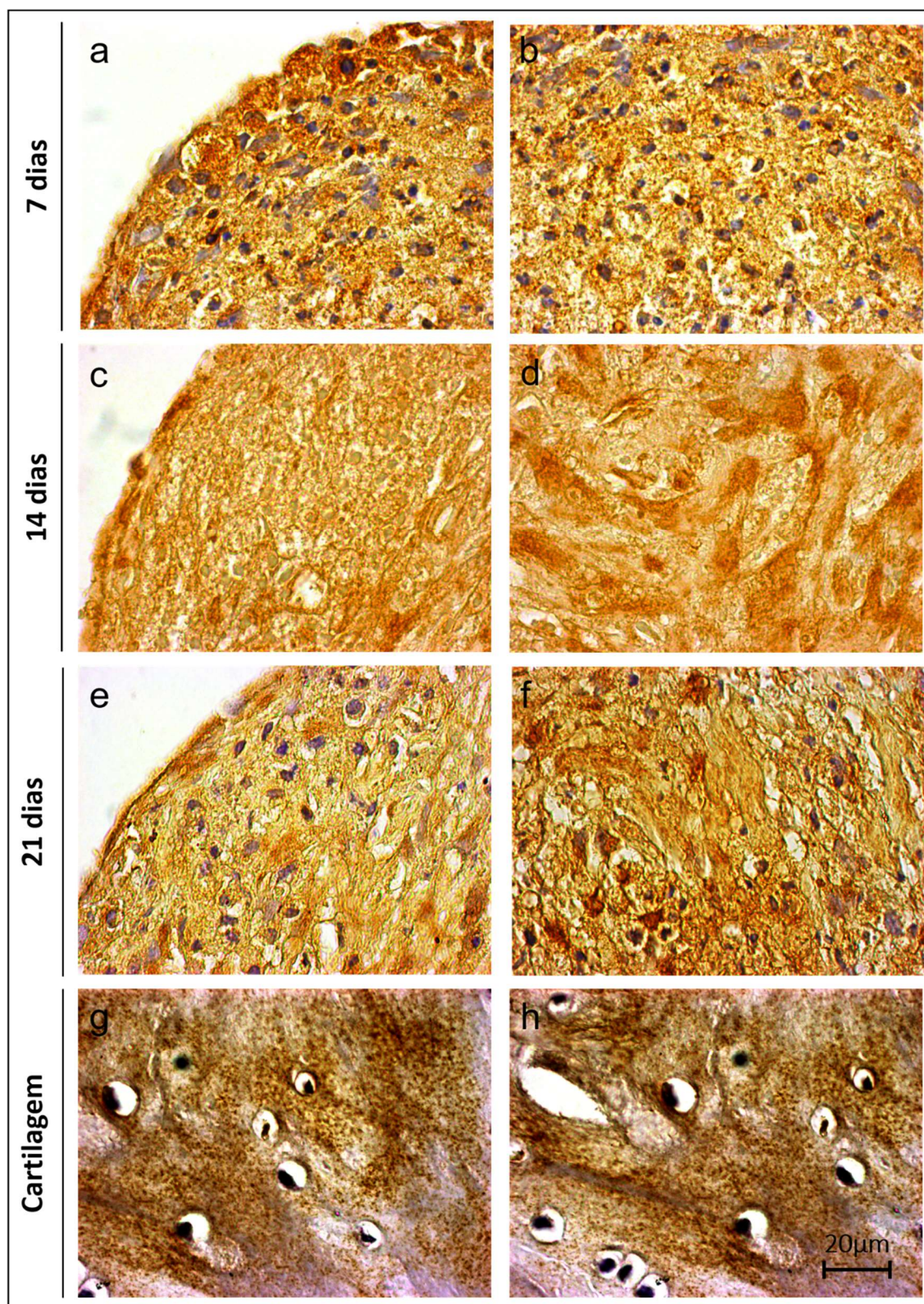


Figura 28. Composição de agrecana em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução. Análise realizada por imuno-histoquímica. Controle positivo: tecido de cartilagem (g, h). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. Barra de aumento 20µm.

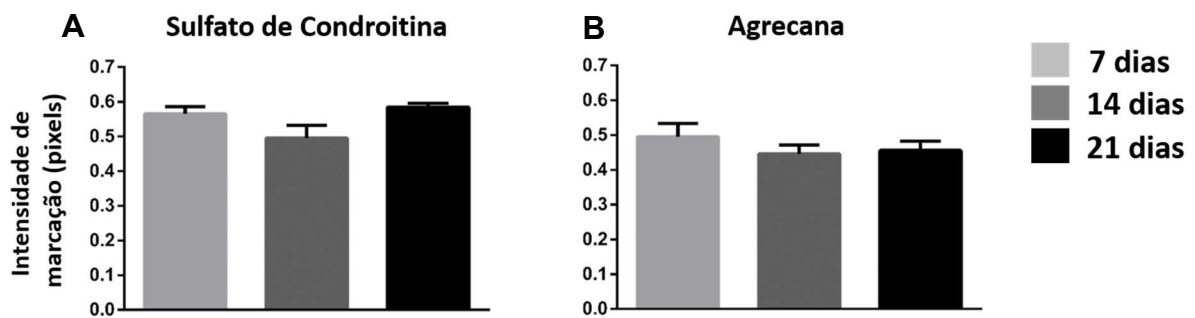


Figura 29. Gráficos semi-quantitativos da marcação de componentes de MEC em esferóides induzidos. Análise realizada através de *software imageJ* utilizando um *plugin* específico para análise de imunohistoquímica. Todas marcações foram realizadas concomitantemente. A análise revela que a indução condrogênica em esferóides de ASC resulta na manutenção de produção de componentes de matriz extracelular, sulfato de condroitina (**A**) e agrecana (**B**) durante os 21 dias.

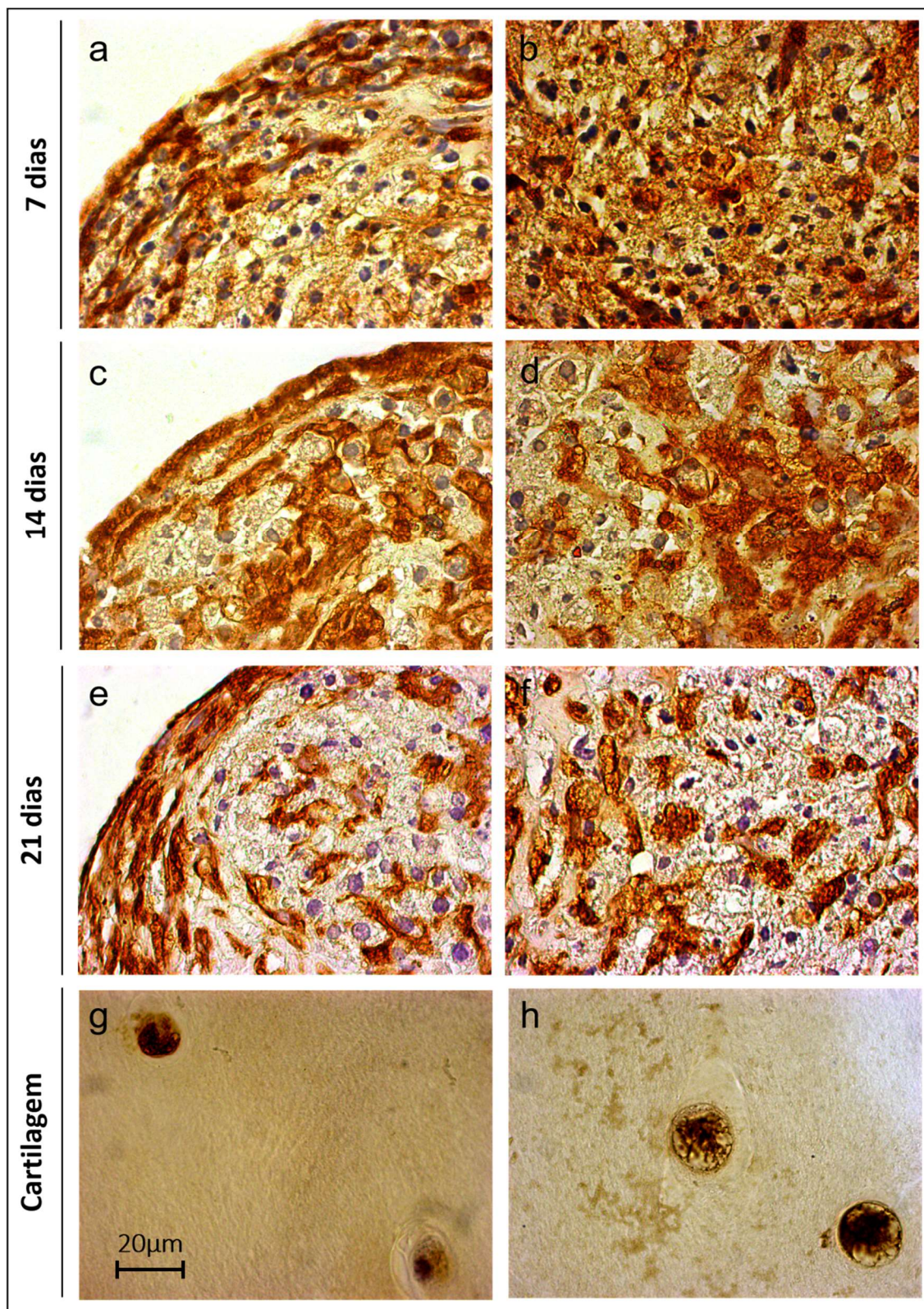


Figura 30. Composição de vimentina em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução. Análise realizada por imuno-histoquímica. Controle positivo: tecido de cartilagem (g, h). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. Barra de aumento 20µm.

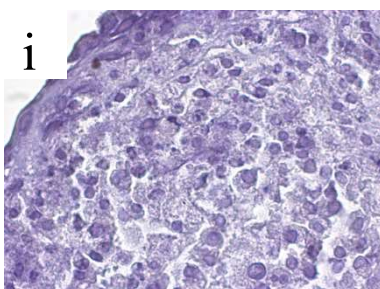
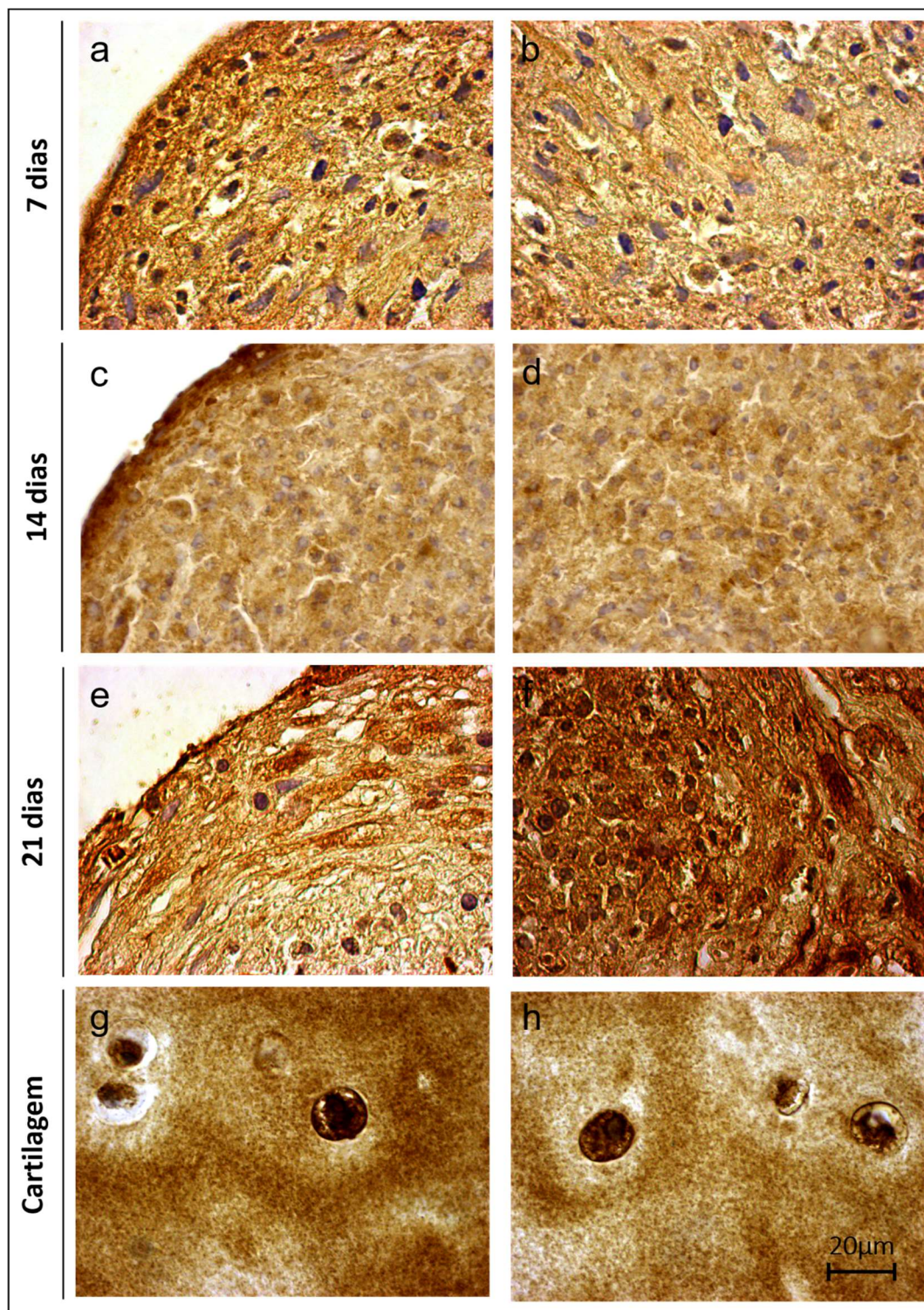


Figura 31. Composição de N-caderina em esferóides de ASC induzidos para via condrogênica ao longo de 21 dias de indução. Análise realizada por imuno-histoquímica. Controle positivo: tecido de cartilagem (g, h). Controle negativo da reação (i). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo. Barra de aumento 20µm.

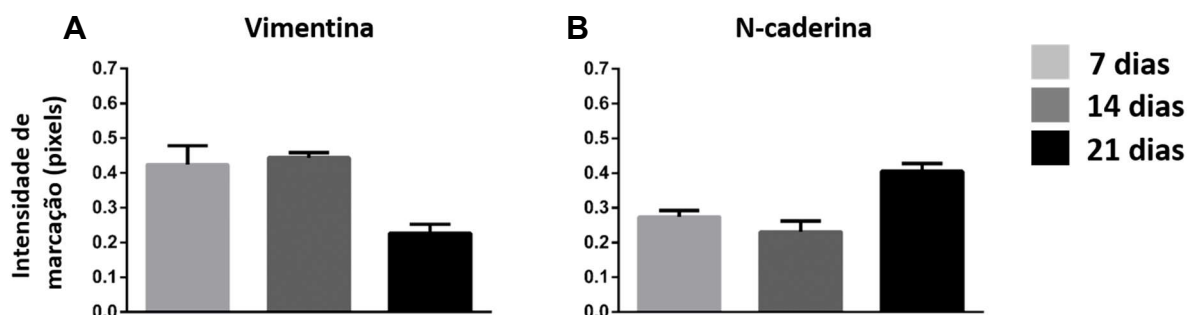


Figura 32. Gráficos semi-quantitativos da marcação de moléculas de adesão em esferóides induzidos. Análise realizada através de *software imageJ* utilizando um *plugin* específico para análise de imunohistoquímica. Todas marcações foram realizadas concomitantemente. A análise revela que a indução condrogênica em esferóides de ASC resulta no balanço entre a diminuição de vimentina com localização preferencial na superfície do esferoide (**A**) e aumento de N-caderina (**B**) na última semana de indução.

6.7 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE ESFERÓIDES DE ASC INDUZIDOS PARA A VIA CONDRÓGÊNICA

A fim de avaliar a superfície dos esferóides induzidos para via condrogênica por 21 dias, os esferóides foram processados e analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Através da avaliação realizada foi observado que os esferóides possuem morfologia irregular e apresentam diferentes estruturas em sua superfície. A partir de um maior aumento identificamos estruturas esféricas na superfície dos esferóides, com tamanho entre 0,2 a 1µm, que sugerem a presença de vesículas extracelulares (**Figura 33 A, B, C, D, E, F**).

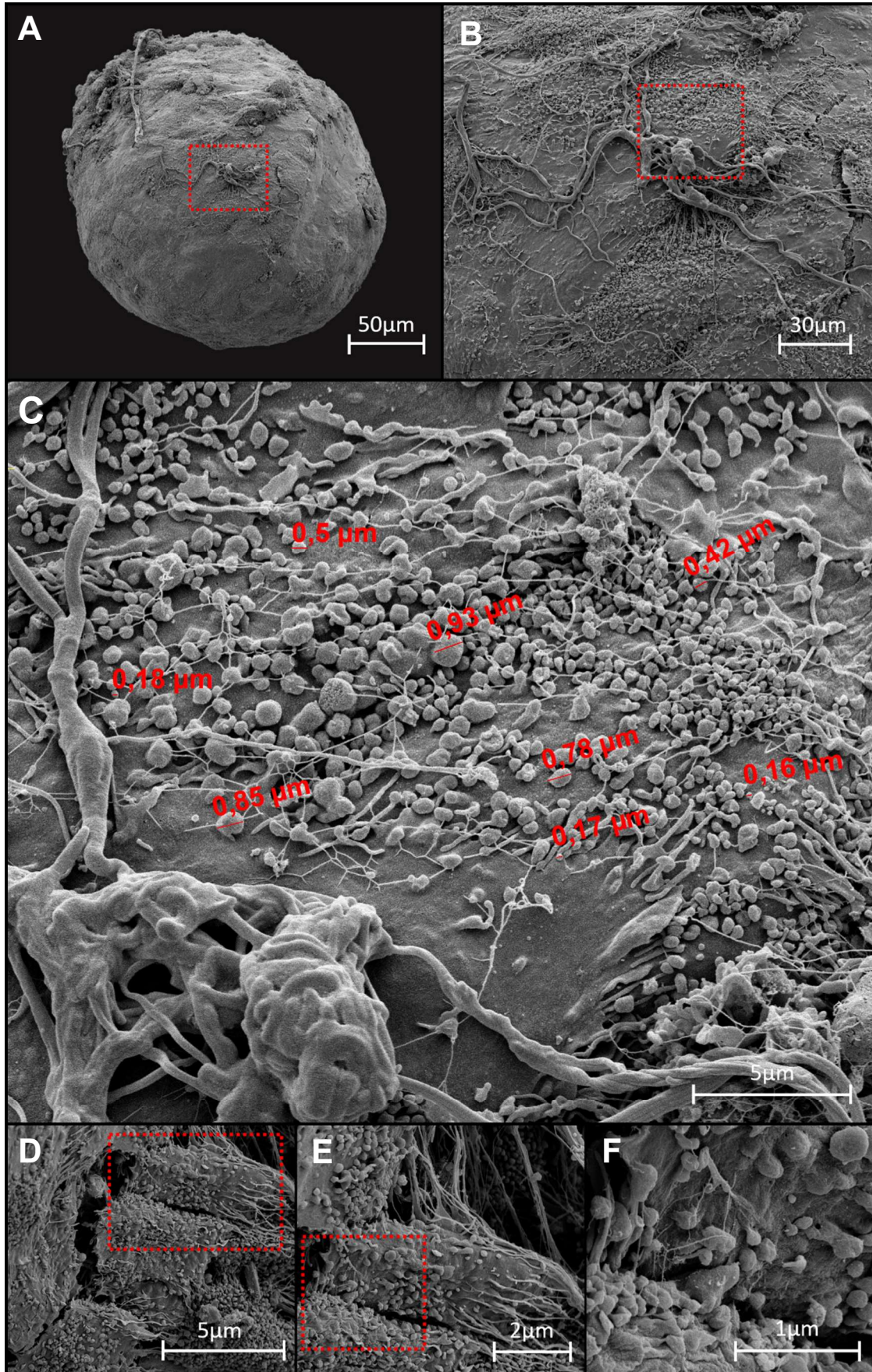


Figura 33.

Figura 33. MEV de esferóides de ASC induzidos para via condrogênica. Os esferóides induzidos apresentam superfície rugosa, com aspecto irregular (**A**). A partir da amplificação do retângulo tracejado em amarelo, é possível observar com mais detalhamento essa irregularidade e também a presença de diferentes estruturas (**B**). A partir de um maior aumento é possível observar a presença de pequenas vesículas membranosas ou extracelulares na estrutura dos esferóides, com tamanho que varia em torno de 0,2µm até 1µm de diâmetro (**C**). Imagens apresentando a superfície dos esferóides (**D, E, F**). ASC: Células-tronco/estromais de tecido adiposo.

Com o intuito de facilitar a visualização final dos resultados foi elaborado uma tabela de sistema de cruzes (**Tabela 4**). Para os resultados de imunohistoquímica a comparação foi realizada entre 7, 14, 21 dias para cada marcação e também entre as moléculas uma vez que todas as marcações foram realizadas juntas na mesma reação. Os resultados de TGF- β foram analisados apenas entre as semanas devido a grande diferença de valores entre as 3 isoformas. Portanto, avaliamos apenas a variação entre 7, 14 e 21 dias dentro de cada isoforma, não havendo comparação entre TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. O mesmo foi realizado para as interleucinas. O trio Sox também foi avaliado somente entre 7, 14 e 21 dias dentro de cada gene, não havendo também comparação entre os genes.

Tabela 4. Quadro de resultados gerais representado por sistema de cruzes.

	7 dias	14 dias	21 dias
Colágeno I	+	+	+
Colágeno II	+++	+++	+++
Colágeno VI	+	+	++
Sulfato de Condroitina	++++	+++	++++
Agrecana	+++	+++	+++
Vimentina	+++	+++	+
N-caderina	+	+	+++
TGF-b1	++++	++	+
TGF-b2	++++	++	+++
TGF-b3	++++	+	+++
IL-6	+++	++	+
IL-8	+++	++	+
Sox5	++	++	+++
Sox6	+	+	+++
Sox9	++	+++	++++

6.8 ENSAIO DE FUSÃO E ASSOCIAÇÃO DE ESFEROIDES DE ASC INDUZIDOS À NANOFIBRA DE POLICAPROLACTONA

A fim de avaliarmos a interação esferoide-esferoide no processo de fusão, foi realizado um ensaio semeando 4 esferoides em poço de placa de cultura previamente revestido com agarose (**Figura 34 A, B, C**). Após 1 hora os esferoides encontravam-se bem próximos. Após 3 dias os esferoides apresentaram-se em processo inicial de fusão (**Figura 34 D, E, F**). Em 7 dias de cultivo os esferoides estavam completamente fusionados resultado em um único esferoide (**Figura 34 G, H, I**).

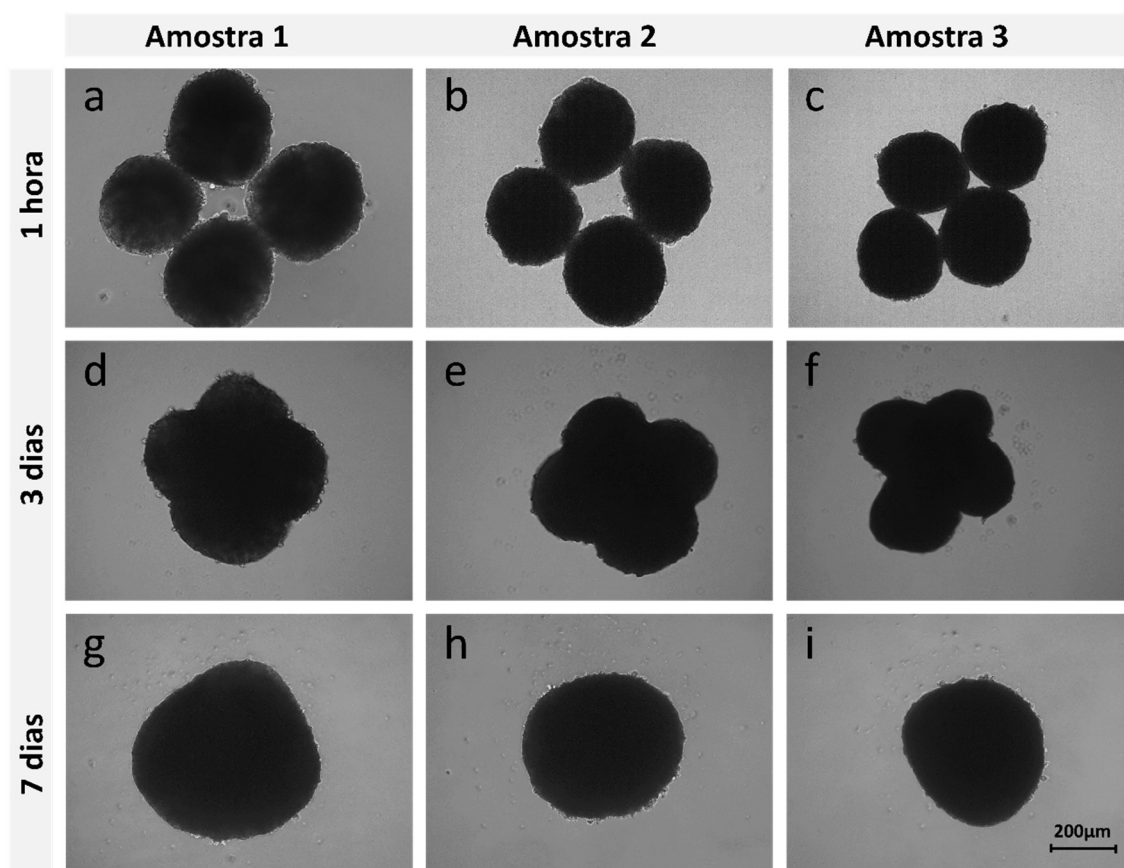


Figura 34. Ensaio de fusão de esferoides induzidos. Esferóides semeados em poço de placa de cultura revestidos em agarose após 1 hora em contato (**A, B, C**). Esferóides fusionados após 3 horas de contato (**D, E, G**). Esferóides completamente fusionados após 7 dias (**G, H, I**). Barra de aumento 200µm.

Com o intuito de gerar microtecidos autógenos, como etapa inicial para a formação de tecidos de maior complexidade, foi realizada a semeadura de esferoides induzidos em matrizes de nanofibras alinhadas de policaprolactona (PCL) (**Figura 35**

A, B). Após 24 horas foi observado que as esferas encontravam-se completamente aderidas à nanofibra de PCL (**Figura 35 C, D**) e que após 3 dias havia ocorrido a fusão entre os esferóides (**Figura 35 E, F**).

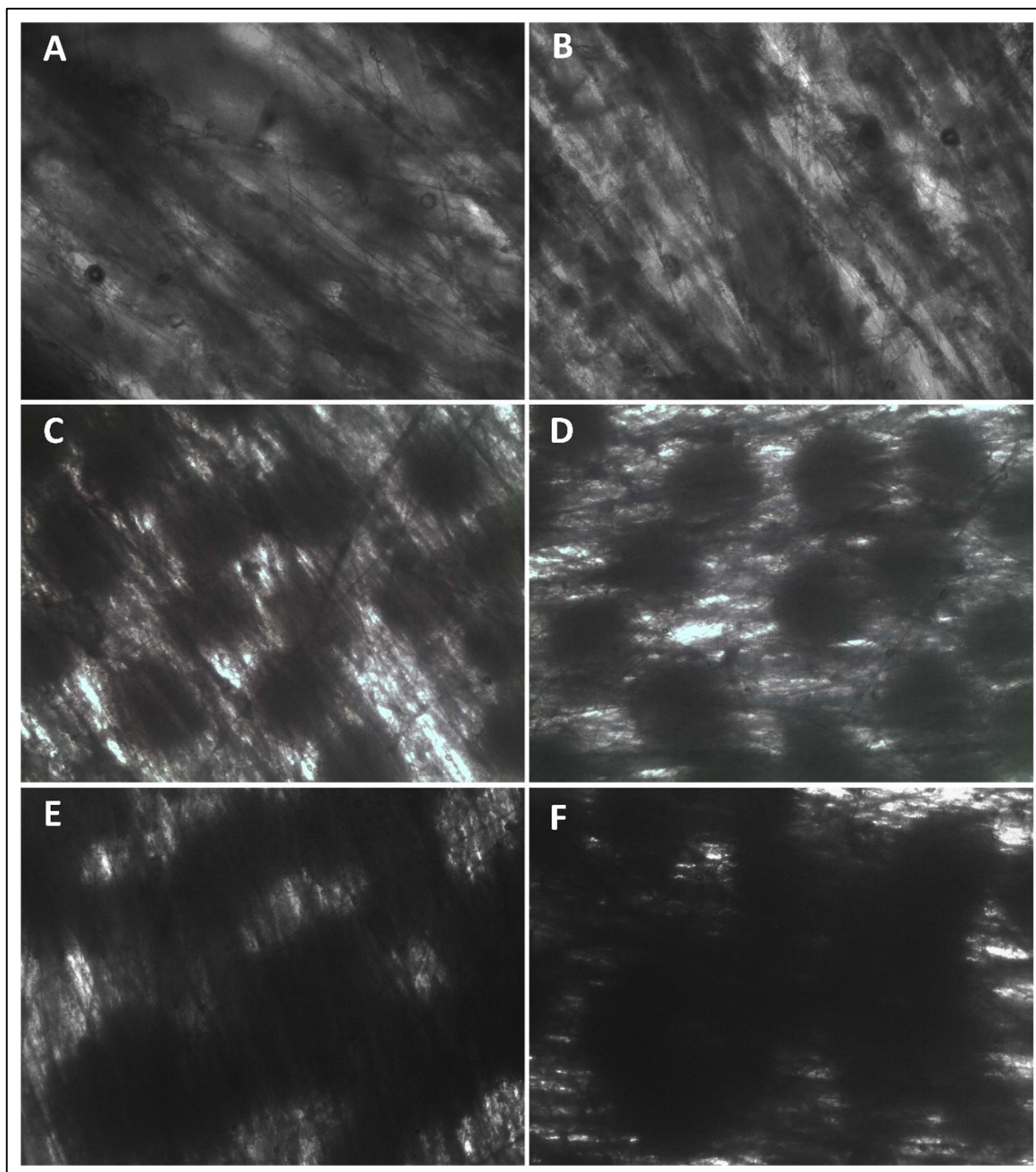


Figura 35. Associação dos esferóides de ASC induzidos em nanofibras de PCL. Nanofibras de PCL alinhadas (**A**). Esferóides associados às nanofibras de PCL (**B**). Etapa inicial de fusão dos esferóides (**C**).

Realizamos imagens macroscópicas a fim de acompanhar a interação da nanofibra, em associação com os esferoides, com o tecido do animal. partir das imagens macroscópicas é possível observar a completa aderência da nanofibra ao tecido do camundongo (**Figura 36**).

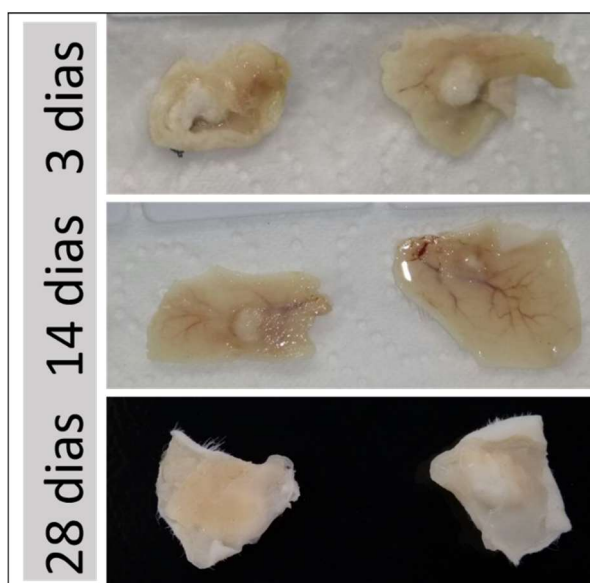


Figura 36. Imagens macroscópicas dos esferoides associados à nanofibra de PCL após 3, 14 e 28 dias.

As análises dos cortes histológicos corados pela técnica de HE e por tricromo de masson revelaram que em 3 dias (**Figura 37**) e 14 dias (**Figura 38**) parece ter ocorrido uma reação inflamação moderada, tendo um aumento em 28 dias (**Figura 39**). No entanto, a partir da morfologia arredondada das células no interior do esferoide, é possível supor que houve manutenção no fenótipo diferenciado das células para via condrogênica até 28 dias. No entanto, mais análises precisam ser realizadas a fim de confirmar essa hipótese.

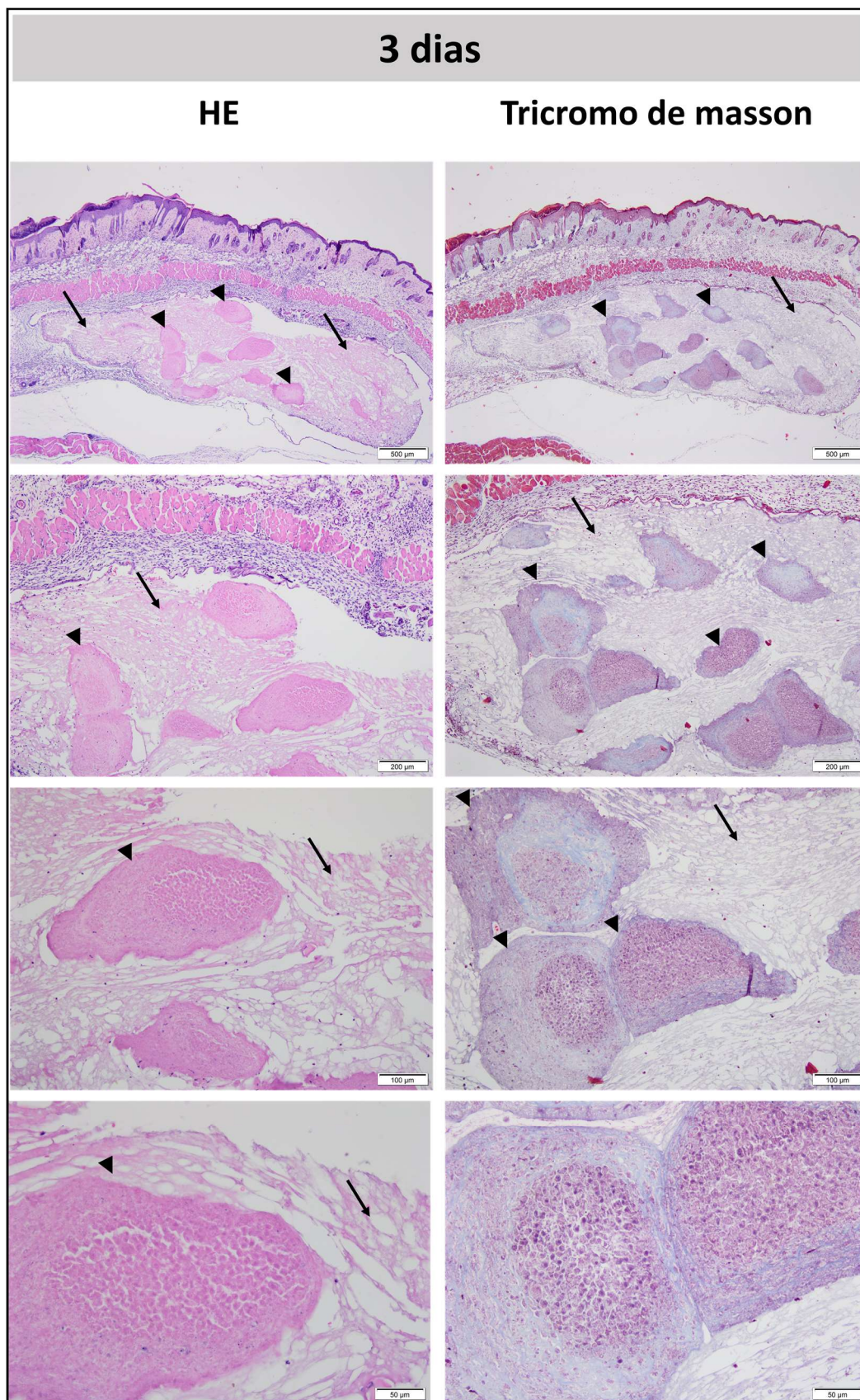


Figura 37. Análise de HE e tricromo de masson de esferoides associados à nanofibras e implantado na região subcutânea de camundongos após 3 dias. As setas indicam as nanofibras de PCL e as cabeças de seta indicam os esferoides de ASC induzidos.

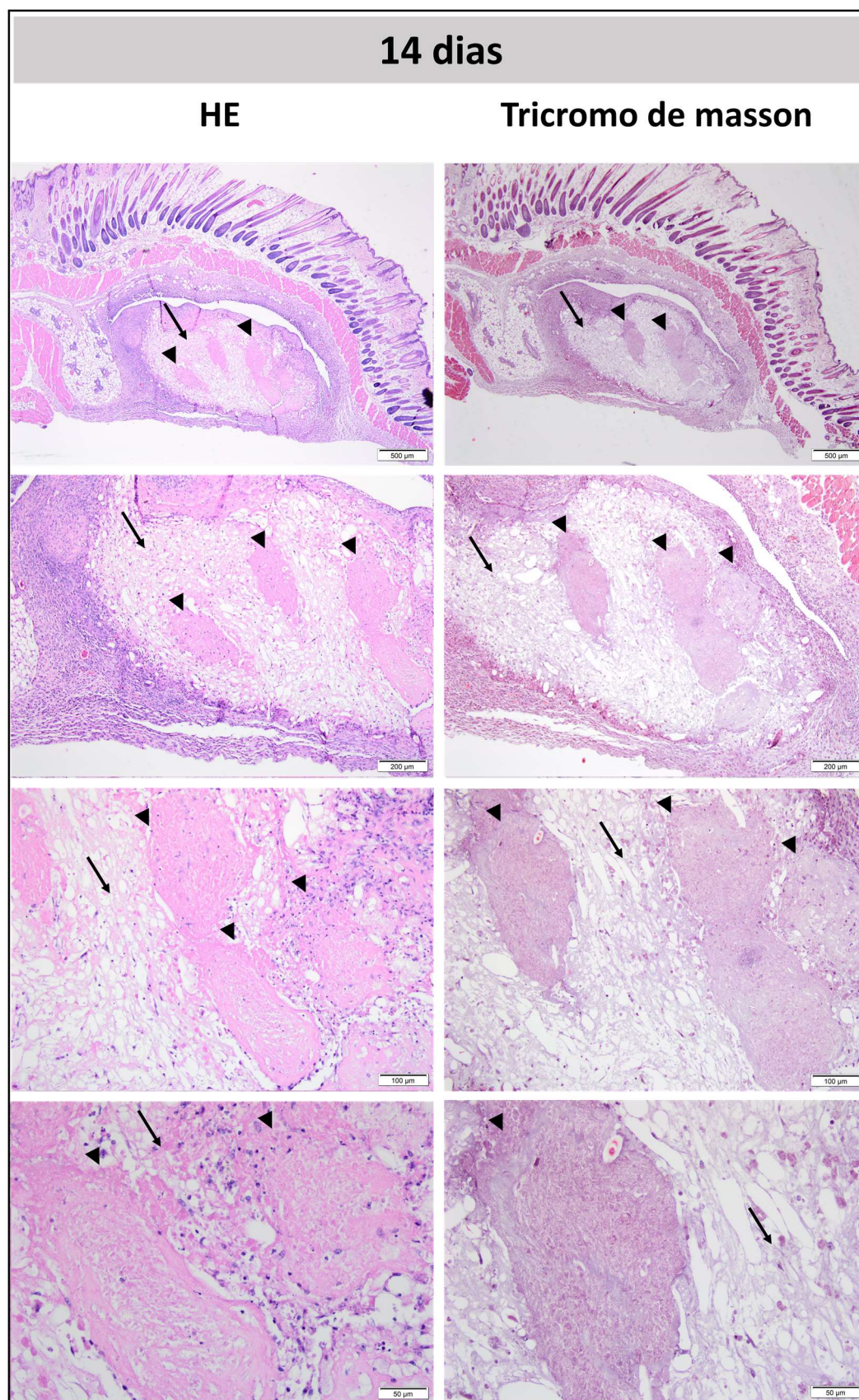


Figura 38. Análise de HE e tricromo de masson de esferoides associados à nanofibras e implantado na região subcutânea de camundongos após 14 dias. As setas indicam as nanofibras de PCL e as cabeças de seta indicam os esferoides de ASC induzidos.

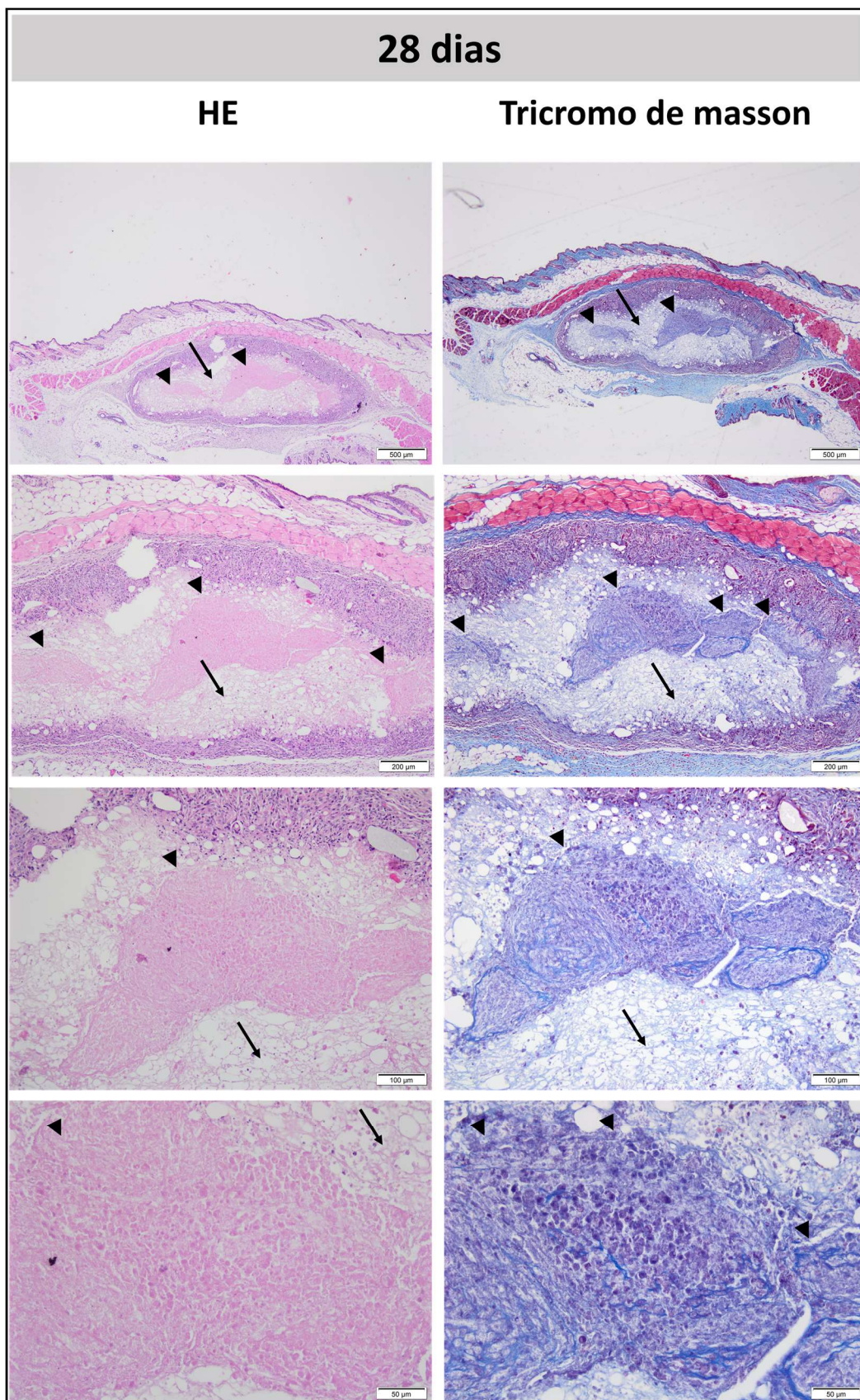


Figura 39. Análise de HE e tricromo de masson de esferoides associados à nanofibras e implantado na região subcutânea de camundongos após 28 dias. As setas indicam as nanofibras de PCL e as cabeças de seta indicam os esferoides de ASC induzidos.

7. DISCUSSÃO

A diferenciação condrogênica, *in vivo*, é governada por diversas condições. Uma delas é a interação celular, que atua de maneira concomitante com fatores de crescimento e de diferenciação a fim de desencadear vias de sinalização, bem como transcrição de genes específicos. Diversas citocinas e mediadores químicos estão envolvidos nessa sinalização intracelular que ocorre durante a diferenciação condrogênica (Erlebacher et al., 1995; Mundlos e Olsen, 1997). Em resumo, a condrogênese é controlada principalmente por sinais que são iniciados pelas interações célula-célula e célula-matriz (Goldring et al., 2006).

Desta maneira, a metodologia de automontagem tem ganhado merecido destaque, principalmente por propiciar a ligação de proteínas de superfície, como a N-caderina, e desempenha importante papel na adesão célula-célula (Youssef et al., 2011). Esse processo de automontagem pôde ser observado quando as ASC foram semeadas na superfície não aderente da agarose micromoldada (Napolitano et al., 2007), sendo este um processo mediado pela contração do citoesqueleto e da interação célula-célula (Svoronos., 2009) sem a adição de força externa. Desta forma, esse modelo atua positivamente no estímulo a indução condrogênica, uma vez que mimetiza etapas da diferenciação condrogênica, como a condensação que corre no embriogênese (Bobick et al., 2009).

O modelo para produção dos esferoides a partir de agarose micromoldada permite a produção de centenas de esferoides em uma única placa de cultura celular, além de ser uma metodologia passível de escalonamento. Em adição, pudemos verificar que os esferoides de ASC induzidos apresentaram-se esféricos ao longo das semanas, uma vez que não observamos grande variação entre a medição dos diâmetros maior e menor. Em contrapartida, os esferoides de ASC sem indução condrogênica, apresentaram maior variação entre os diâmetros menor e maior na última semana de cultivo. Essa alteração na morfologia desses esferoides pode ser observada a partir das imagens de contraste de fase, apesar de não ter sido crítico ao modelo. Além disso, podemos verificar também que o desvio padrão das medições foram baixos, mostrando que os 81 esferoides produzidos na agarose micromoldada apresentaram-se homogêneos.

A padronização da formação dos esferoides, como sua homogeneidade de tamanho e a sua morfologia esférica é fundamental para garantir que o mesmo microambiente tecidual esteja sendo gerado de maneira similar em todos os esferoides. Principalmente em relação a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, bem como a hipóxia gerada no interior dos esferoides, que pode desencadear diversos eventos nas células que compõem os esferoides. Já foi relatado que os esferoides com tamanho de 400µm são ideais para recriar a condição de hipóxia no centro do esferoide (Ranga et al., 2014). Os esferoides de ASC induzidos apresentaram, de fato, tamanho próximo ao tamanho proposto na literatura. Apresentando, portanto, uma condição favorável a diferenciação condrogênica, uma vez que mimetiza o ambiente avascular da cartilagem.

Além disso, observamos que essa hipóxia gerada no interior do esferoide não apresentou efeito destrutivo, visto que, a partir das análises de citometria de fluxo e fluorescência, as células apresentaram-se majoritariamente viáveis, além de não ter sido observado centros necróticos através dos cortes corados com HE. Esses dados demonstram que apesar da limitação do cultivo 3D em manter a viabilidade celular principalmente no centro do cultivo que apresentam maior barreira à perfusão de nutrientes, observamos que foi possível induzir os esferóides de ASC por 21 dias mantendo-os em condição de hipóxia sem ocorrer danos celulares nem mesmo nas áreas mais centrais.

A análise fenotípica de ASC cultivadas em monocamada revelou a presença dos marcadores de superfície CD73 e CD90. Já existe um consenso que o CD73 e CD90 configuram a classe de marcadores primários com mais de 80% de marcação em ASC (Bourin et al., 2013).

Apesar de alguns autores mostrarem marcação para CD34 em ASC (Bourin et al., 2013), em nosso estudo as ASC cultivadas em monocamada não apresentaram marcação para o CD34. Nossas análises foram realizadas na terceira passagem e já foi relatado em diversos estudos que ao longo das passagens ocorre a perda do CD34 (Martínez-Lorenzo, 2008; Cheng et al., 2012; Oñate et al., 2013). Apesar de já ter sido demonstrado que o CD34 é positivo em ASC nativa, foi relatado que seu decaimento ocorre até mesmo durante alguns dias em cultura (Maumus et al., 2011). Além disso, acreditamos que diferenças no isolamento, tipo de cultivo e até mesmo no meio de cultura podem estar relacionados com estas discrepâncias. Observamos também que

o cultivo das ASC em modelo tridimensional desencadeou um pequeno aumento na regulação do CD34, assim como demonstrado por Cheng e colaboradores (Cheng et al., 2012).

As ASC mantiveram a expressão de CD90 mesmo quando cultivadas em modelo tridimensional e mesmo sob estímulo condrogênico. Estudo realizado com esferóides de ASC também revelou essa manutenção para esse marcador de superfície (Cheng et al., 2012).

O cultivo tridimensional regulou negativamente o marcador de superfície CD73, apresentando marcação positiva para 9,2% das ASC dos esferóides não induzidos e 8,8% em ASC dos esferóides induzidos. Em contrapartida, 85,8% de ASC cultivadas em monocamada apresentam marcação para o CD73. Assim, podemos inferir que o cultivo tridimensional é capaz de alterar o perfil fenotípico das ASC. No entanto, pouco se sabe sobre a influência do CD73 na condrogênese. Martínez-Lorenzo demonstrou que ASC derivadas de diferentes espécies – humana, coelho e ovelha - apresentaram marcação diferenciada e que a ausência da expressão de CD73 em coelhos e ovelhas não impossibilitou a diferenciação condrogênica (Martínez-Lorenzo, 2008).

Outros autores também mostram que o CD73 é diminuído na diferenciação condrogênica (Delorme et al., 2008). Porém em nosso modelo não podemos afirmar que a diminuição do CD73 ocorreu devido a diferenciação, uma vez que as ASC dos esferóides não induzidos também apresentam esse decaimento. Em contrapartida, podemos supor que esse decaimento, que ocorreu em ambas condições, pode ter contribuído na diferenciação dos esferóides de ASC induzidos para via condrogênica. Visto que já foi demonstrado que o bloqueio de CD73 desencadeia o aumento de componentes de matriz cartilaginosa (Schoon et al., 2013).

A marcação para CD105 em ASC cultivadas em monocamada já foi descrita por diversos autores, até mesmo em cultivo de esferóides (Cheng et al., 2012) porém em nosso estudo não obtivemos marcação no cultivo tridimensional e apenas 3,8% das ASC cultivadas em monocamada apresentaram esse marcador. As nossas análises realizadas por citometria de fluxo mostraram que, além das diferenças fenotípicas observadas, as ASC reduzem também seu tamanho quando cultivadas em modelo tridimensional (Bartosh et al., 2010).

Os esferóides de ASC induzidos apresentam-se inicialmente constituídos por células apresentando a morfologia nuclear esférica e bastante homogênea por todo o

esferoide, que sugere a presença de células similares. No entanto, a partir da segunda semana as ASC dos esferóides mantidas sob estímulos condrogênico parecem se agrupar preferencialmente no interior do esferóide. Na última semana de indução observamos alterações mais proeminentes, onde as células, que antes apresentavam-se homogêneas, passaram a apresentar diferenças morfológicas. As células da periferia dos esferóides passaram a adquirir uma morfologia fibroblastóide enquanto que as células no interior dos esferóides mantiveram suas características iniciais.

Esses dados sugerem a existência de diferentes subpopulações de células das ASC compondo os esferóides. No qual podemos propor que as células no interior do esferóide se condensam após alguns dias de indução a fim de tonarem-se comprometidas com a via condrogênica. Já as células que não apresentam esse comprometimento foram deslocadas para periferia dessa zona de diferenciação, supondo a existência de subpopulações de células. De fato, diversos estudos têm demonstrado essa heterogeneidade dentro da população de MSC de medula óssea. Estudo desenvolvido por Tormin e colaboradores identificou a presença de três diferentes subpopulações, demonstrando diferenças funcionais (Tormin et al., 2009) e diferenças no potencial de diferenciação das diferentes subpopulações de MSC de medula óssea (Satomura et al., 2000; Gronthos et al., 2003). Rada e colaboradores, usando *beads* magnéticas, demonstram que as ASC também são compostas por diferentes subpopulações de células, que expressam diferentes níveis de marcadores e, portanto, apresentam potencialidade de diferenciação distinta para condrogênese (Rada et al., 2010).

A presença de subpopulações compondo os esferóides pode contribuir positivamente para a eficiência do modelo, visto que se compararmos com a cartilagem articular, sabemos que essa setorização celular é algo que ocorre de maneira natural no desenvolvimento da cartilagem. A cartilagem madura é composta por células com morfologias distintas, que estão inseridas dentro de uma matriz extracelular com diferente composição e diferentes propriedades mecânicas, e que, portanto, apresentam funções específicas no reparo tecidual (Poole et al., 2001). Em adição, já foi demonstrado diferenças na expressão de genes em diferentes zonas da cartilagem articular. Revelando, portanto, que a cartilagem é composta por subpopulações de condrócitos com diferentes características dependendo de sua

localização (Grogan et al., 2013). No entanto, análises futuras precisam ser realizadas para confirmarmos se, de fato, existe uma subpopulação compondo os esferóides e se essas diferentes populações de células contribuem positivamente para o nosso modelo ou se será necessário realizar a seleção de células antes do cultivo.

ASC de esferóides não induzidos e de esferóides induzidos para via condrogênica foram capazes de secretar mediadores solúveis. De fato, já foi relatado na literatura que as MSC têm grande potencial em secretar diversas citocinas incluindo a IL-6 (Aggarwal e Pittenger, 2005; Kondo et al., Chen et al., 2008; Pricola et al., 2009). Além disso, Kondo e colaboradores relatam que os agregados de MSC diferenciados possuem maior potencial de secreção de IL-6 quando comparado com MSC cultivadas em monocamada, no entanto, essa secreção é perdida ao longo da indução condrogênica, sugerindo que a capacidade de secretar IL-6 seja uma propriedade de MSC indiferenciadas. De fato, nosso estudo mostrou esse mesmo padrão de alta secreção de IL-6 pelas ASC dos esferóides induzidos nas primeiras semanas com decaimento ao longo da indução. No entanto, em nosso estudo, observamos também que as ASC quando cultivadas em modelo tridimensional e sem indução condrogênica também perdem a capacidade de secretar IL-6 ao longo do tempo. Esses dados indicam que não foi unicamente a diferenciação condrogênica que desencadeou a diminuição da secreção de IL-6, mas acima de tudo que o cultivo tridimensional pode ter alterado o perfil de secreção de mediadores solúveis.

Apesar de observarmos que ambas condições apresentaram alta produção desse mediador solúvel na primeira semana de cultivo, percebemos também que os esferóides de ASC sem indução apresentam uma evidente redução logo na segunda semana de cultivo. Em contrapartida, os esferóides de ASC induzidos só apresentaram esse decaimento abrupto na última semana de cultivo. Esses dados sugerem uma possível participação da IL-6 na condrogênese, a partir de células já diferenciadas. Estudo realizado com MSC com o intuito de verificar a importância da IL-6 na condrogênese realizou a indução agregados de MSC com TGF- β 3, IL-6 e IL-6R e, de fato, foi observado o aumento da expressão de marcadores condrocíticos, tais como colágeno II e agrecana, quando comparado com os agregados que tiveram apenas o estímulo com o TGF- β 3, ou com MSC que não receberam nenhum estímulo de diferenciação (Kondo et al., 2015). Em adição, também foi relatado que a indução de condrocitos saudáveis com IL-6 exógena resultou em aumento o conteúdo de

glicosaminoglicano em um modelo de regeneração de cartilagem *in vitro* (Tsuchida et al., 2012). Também já foi demonstrado que a indução de condrócitos derivados da cartilagem femoral com IL-6 e sIL-6R α desencadeou maior expressão de colágeno II (Namba et al., 2007).

Esse decaimento ao longo das semanas da secreção de IL-6 por ASC induzidas para a via condrogênica também foi observado por Kondo e colaboradores, com a única diferença que em nosso modelo não foi necessário o estímulo exógeno de IL-6. Além disso, Kondo demonstrou também que os agregados de MSC que foram induzidos com TGF- β 3 apresentaram aumento na expressão de Sox9, e quando foi acrescentado o estímulo com IL-6 o aumento foi potencializado. Também foi relatado a detecção do IL-6 em células *MSC-like* na zona condral superficial em um ensaio *in vivo*, sugerindo que o IL-6 é produzido por essas células na cartilagem com o intuito de promover a diferenciação condrogenica ou atuar na homeostase do tecido (Kondo et al., 2015).

Esses dados sugerem uma função anabólica da IL-6 em processos de diferenciação condrogênica. E a partir dos nossos resultados podemos supor que a participação da IL-6 ocorre apenas em estágios iniciais de diferenciação, atuando, portanto, como um inicializador do processo de comprometimento das ASC dos esferoides induzidos para via condrogenica. Além disso, em nosso modelo a IL-6 não parece apresentar função da manutenção dos componentes de matriz. Uma vez que mesmo com o seu decaimento os níveis de agrecana, sulfato de condroitina e colágeno II permaneceram altos. Nossos dados também indicam que a IL-6 não apresentou efeito catabólico em nosso sistema, uma vez que o decaimento de IL-6 não resultou em aumento dos componentes de matriz. Esse efeito catabólico foi demonstrado ocorrer em modelo de osteoartrite por Tsuchida e colaboradores, que sugerem uma função destrutiva do IL-6. Onde relataram que em condrócitos saudáveis a produção de IL-6 foi mais baixa quando comparado com condrócitos de pacientes com osteoartrite, no entanto, relatou que a adição de IL-6 exógena nos agregados de MSC resultou em aumento de GAG no modelo de neocartilagem *in vitro*. Entretanto, apesar dos condrócitos provenientes de pacientes com osteoartrite terem produzido alta concentração de IL-6 endógena durante a regeneração, a inibição do IL-6 não afetou o conteúdo de matriz cartilaginosa e a adição de IL-6 resultou em diminuição de GAG (Tsuchida et al., 2012).

Desta forma, podemos observar que a IL-6 parece apresentar diferentes funções dependendo da célula alvo, órgãos e ambiente, podendo, portanto, desempenhar um papel anabólico ou catabólico na cartilagem. Assim, mais estudos a respeito da função da IL-6 na condrogênese e regeneração da cartilagem, bem como em processos de degeneração da cartilagem, precisam ser realizados a fim de elucidar sua atuação nessas diferentes condições.

Além da IL-6, a capacidade das MSC, cultivadas em monocamada, em secretar IL-8 também já foi demonstrada (Aggarwal e Pittenger, 2005). Entretanto, em nosso estudo, nós comprovamos que as ASC cultivadas em modelo tridimensional também detêm esse potencial. Curiosamente, a secreção de IL-8 pelas ASC dos esferoides não induzidos e induzidos apresentaram o mesmo padrão de secreção da IL-6. Apresentando-se alta na primeira semana e com decaimento gradativo ao longo das semanas. Esses dados sugerem que a IL-6 e IL-8 parecem atuar de maneira integrada na diferenciação condrogênica.

Recentemente foi relatado que a IL-8 atua, em conjunto com outras citoninas, favorecendo a regeneração cartilaginosa pelo recrutamento de células-tronco de medula óssea para o local do defeito osteocondral (Park et al., 2015). Além disso, um estudo revelou que a IL-8 ou a combinação de IL-8 e células-tronco de medula óssea desencadeou processo de regeneração da cartilagem hialina superior aos grupos que receberam apenas as células. Além disso, a combinação das células com a IL-8 revelou aumento de colágeno II, agracana e Sox9 na cartilagem regenerada. Em adição, esse estudo também relata que a IL-8 também foi capaz de induzir a síntese de GAG, especialmente condroitina sulfato (Lee et al., 2016). Portanto, assim como a IL-6, a IL-8 também possui um importante papel em processos de diferenciação condrogênica. Se separadamente diversos trabalhos mostraram o benefício desses mediadores solúveis, acreditamos que em conjunto possam resultar em um processo de diferenciação mais eficiente. De fato, observamos que logo na primeira semana de indução os esferoides de ASC apresentaram alta expressão de moléculas de matriz cartilaginosa.

Ainda não existe um consenso na literatura a respeito da atuação do TGF- β 1 na condrogênese. Visto que alguns estudos demonstraram que o TGF- β 1 apresenta um papel benéfico no desenvolvimento da cartilagem, através do estímulo à produção de moléculas de matriz cartilaginosa, tais como colágeno II e proteoglicanos (Galéra

et al., 1992; Van Beuningen et al., 1994; Kim et al., 2014; Barry et al., 2001). Evidenciando que a participação do TGF- β 1 é fundamental para o desenvolvimento normal das articulações. Em contrapartida, o aumento da atividade do TGF- β 1 em camundongos adultos pode acelerar ou até mesmo iniciar degeneração na articulação adulta. Com intuito de demonstrar que a inibição da sinalização de TGF- β 1 protege a articulação no desenvolvimento da osteoartrite, Chen e colaboradores realizaram um estudo em camundongos com o receptor Tgfbr2 inativado e camundongos tratados com um inibidor do receptor Tgfbr2. De fato, a remoção ou a inibição do Tgfbr2 retardou a progressão da degeneração da cartilagem em comparação com os camundongos controle, concluindo que a inibição do Tgfbr2 protegeu as articulações do joelho em camundongos (Chen et al., 2015). Desta forma, muitos autores apoiam que o TGF- β 1 participe do processo degenerativo da cartilagem articular madura. Além disso, a injeção intracelular de TGF- β 1 na articulação de camundongo adulto desencadeou em estágios iniciais da osteoartrite (Itayem et al., 1999).

Esses dados nos indicam que o TGF- β 1 mostra-se fundamental para a diferenciação condrogênica, mas que não parece ser essencial para a manutenção desse tecido, uma vez que gera desestabilização na cartilagem madura. Observamos em nosso modelo um decaimento do TGF- β 1 ao longo dos 21 dias de indução. No entanto, no início da indução condrogênica os níveis de TGF- β 1 e TGF- β 3 apresentaram-se similares, havendo uma maior produção do TGF- β 1 na segunda semana de cultivo.

Na última semana de indução observamos uma queda acentuada do TGF- β 1, entretanto, pudemos notar a partir da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica que os níveis de sulfato de condroitina e colágeno II permaneceram altos até a última semana de indução. Portanto, duas possibilidades são sugeridas, a primeira seria que essas moléculas apresentam alta estabilidade e por isso não acompanharam o decaimento do TGF- β 1 ao longo das semanas. Uma outra possibilidade seria que o TGF- β 3 atue de maneira mais ativa durante todo processo de diferenciação e não apenas no início da indução. De fato, na última semana de indução, onde observamos o decaimento de TGF- β 1, notamos que o nível de TGF- β 3 se reestabelece, apresentando-se superior ao TGF- β 1. Em adição, poderíamos propor também que a manutenção dos componentes de matriz extracelular só se manteve alto devido ao decaimento do TGF- β 1, que tem sido relatado na literatura como tendo um papel

catabólico na cartilagem madura e que esse fator só tenha participado no início da diferenciação.

Estudo realizado por Barry e colaboradores comparou as três isoformas de TGF- β relatando, que de fato, o TGF- β 3 é mais eficiente em desencadear a condrogênese quando comparado com o TGF- β 1, pois desencadeia maior expressão de glicosaminoglicanos, além de estimular maior deposição de colágeno II ainda em estágios iniciais da diferenciação. Em contrapartida, a indução com TGF- β 1 só desencadeou a expressão de colágeno II em um momento posterior ao TGF- β 3 (Barry et al., 2001). Além disso, podemos supor que o decaimento de TGF- β 1 parece ter regulado positivamente a manutenção do fenótipo diferenciado das células, uma vez que já foi relatado que o cultivo de condrócitos articulares humano cultivados em sistema de micromassa e induzidos com TGF- β 1 desencadeou um fenótipo hipertrófico nos condrócitos, com aumento do colágeno X e MMP13 após 14 dias de indução (Narcisi et al., 2011).

Apesar da atuação do TGF- β 1 ser principalmente na etapa de condensação, todas as isoformas de TGF- β são importantes nessa fase. De fato, observamos que as três isoformas apresentaram maior expressão na primeira semana de indução, revelando que parecem ser fundamentais para a inicialização da condensação assim como para dirigir as ASC para via condrogênica. Portanto, a partir dos nossos dados, supomos que o TGF- β 1 atue principalmente como iniciador da diferenciação condrogênica. De fato, já foi relatado que o TGF- β 1 é o fator mais importante na inicialização da diferenciação condrogênica. Visto que durante essa fase o TGF- β 1 atua na etapa de condensação a partir do estímulo à produção de N-caderina a fim de promover a interação celular (Tuli et al., 2003).

A partir dos nossos resultados pudemos notar também que os esferóides de ASC por si só não foram capazes de estimular a expressão de TGF- β 1. Em contrapartida, os esferóides de ASC sem indução foram capazes de produzir TGF- β 2 e TGF- β 3 endógena mesmo sem o estímulo do TGF- β 3. Os esferóides de ASC produziram TGF- β 3 mesmo que em concentração bastante inferior quando comparado com os esferóides de ASC induzidos. No entanto, é possível observar que houve um decaimento de TGF- β 3 nos esferóides de ASC ao longo do tempo, enquanto que os esferóides induzidos, apesar de decair o nível na segunda semana a produção do fator é retomada na última semana de indução. Esse decaimento

sugere que os esferóides de ASC que não receberam o estímulo de diferenciação condrogênica esteja sendo dirigido para outra via de diferenciação, perdendo ao longo do tempo um dos principais fatores de diferenciação envolvido na condrogênese.

Akiyama e colaboradores relataram a importância do Sox9 em diferentes etapas da diferenciação condrogênica em estudo realizado em embriões de camundongos com o Sox9 inativado em células mesenquimais indiferenciadas e em camundongos que tiveram o gene Sox9 inativado após a condensação mesenquimal. A inativação do Sox9 resultou em completa ausência da condensação mesenquimal e foi incapaz de gerar a cartilagem e, além disso, não foi observado também a expressão de Sox5 e Sox6. Já os camundongos que tiveram o Sox9 inativado após a condensação mesenquimal, apresentaram condrodisplasia e as células mesenquimais da condensação não apresentaram diferenciação evidente, apesar da maioria das células continuarem mantidas condensadas (Akiyama et al., 2002).

Esses dados indicam que a expressão do Sox9 é requerida em sucessivas etapas na diferenciação condrogênica, desde a condensação celular até a fase de diferenciação condrogênica. As ASC dos esferóides induzidos expressaram Sox9 desde a primeira semana de diferenciação, sugerindo que a presença deste fator de transcrição gênica tenha sido fundamental para a etapa de condensação celular. Além disso, na última semana de cultivo as ASC dos esferóides apresentaram maior tendência em expressar Sox9, e os fatores Sox5 e Sox6 demonstraram tender a acompanhar esse padrão de expressão e, portanto, parecem apresentar uma dependência do Sox9 assim como relatado por Akiyama e colaboradores (Akiyama et al., 2002).

Já foi relatado que o Sox9 atua diretamente de maneira a induzir a expressão do maior componente estrutural da cartilagem, o colágeno II (Bell et al., 1997; Ling-Jim et al., 1997). De fato, observamos que aumento progressivo do Sox9 ocorrido nas ASC durante o período de indução condrogênica foi acompanhado por um pequeno aumento de colágeno II na última semana de indução. Além do colágeno II, observamos também que o colágeno VI acompanhou esse aumento. Em contrapartida, o colágeno I, um colágeno específico em MSC indiferenciada, apresentou uma tênue diminuição, mesmo não sendo significativa. Esses dados indicam que o Sox9 possivelmente apresente um papel fundamental após a indução condrogênica, principalmente na manutenção das moléculas de matriz.

De fato, alguns autores têm mostrado a participação do Sox9 em etapas posteriores a diferenciação, atuando principalmente como inibidor da vascularização. Uma vez que já foi demonstrado que o VEGF é altamente sintetizado por condrócitos hipertróficos, que atua de maneira a estimular a invasão de capilares (Gerber et al., 1999; Carlevaro et al., 2000). Hattori e colaboradores realizaram um estudo em modelo transgênico de camundongos que expressem Sox9 na cartilagem hipertrófica e observaram que os camundongos *wild-type* apresentaram expressão de VEGF em condrócitos hipertróficos, como o esperado. Entretanto, os camundongos transgênicos apresentaram completa ausência de VEGF na cartilagem hipertrófica. Além do VEGF, a expressão de MMP13 e de osteopontina, dois marcadores da diferenciação terminal dos condrócitos hipertróficos, também foram completamente inibidas (Hattori et al., 2010). Assim, foi mostrado que a expressão forçada de Sox9 resultou no bloqueio da expressão de diversos marcadores importantes em condrócitos hipertróficos (Hattori et al., 2010). O contrário também já foi demonstrado, que a atuação do Sox9 é fundamental para evitar a hipertrofia dos condrócitos (Akiyama et al., 2002). Esses dados indicam a importância do aumento do Sox9 ao longo da indução, pois este fator não atua somente na diferenciação condrogênica.

Nesse estudo, a eficiência da diferenciação condrogênica foi confirmada pela presença de moléculas de matriz cartilaginosa, uma vez que a cartilagem é composta por condrócitos embebidos dentro uma densa matriz extracelular e essas macromoléculas são essenciais para a funcionalidade da cartilagem, principalmente por propiciar uma função mecânica ao tecido (Huang et al., 2009).

A cartilagem é principalmente composta por colágeno II, proteoglicanas e GAG (Chen et al., 2014). Sendo o colágeno o componente macromolecular mais abundante na cartilagem, representando cerca de 60% do seu peso seco e o colágeno II o mais abundante, compondo entre 90 a 95% do volume de colágenos totais (Buckwalter e Mankin, 1998). De fato, a partir das análises de imunohistoquímica pudemos observar essa representatividade do colágeno II, que apresentou-se superior ao colágeno I e ao colágeno VI. A presença do colágeno II foi estável durante o período de indução, ocorrendo um leve aumento na última semana. Portanto, a manutenção do colágeno II parece não depender diretamente da atuação de fatores, uma vez que, após sua produção não houve oscilação como observado em relação a alguns fatores conhecidos por estimular sua síntese. Em contrapartida, o nível do colágeno I

apresentou-se sempre em menor quantidade em relação ao colágeno II, sendo bastante importante para nosso modelo, uma vez que o colágeno I é o maior constituinte da fribrocartilagem (David et al., 1983).

O colágeno VI também é conhecido por compor a cartilagem e está principalmente concentrado na matriz pericelular (Cescon et al., 2015) e tem sido sugerida sua atuação na transdução de sinais mecânicos e físico-químico da matriz extracelular para matriz pericelular e, portanto, para os condrócitos (Zelenski et al., 2015). Observamos a marcação desse colágeno difusa por todo o esferoide. Em adição, o colágeno VI apresentou um aumento significativo na última semana de indução.

A agrecana é o maior proteoglicano da cartilagem, e tem sido proposta como sendo um importante fator no processo da automontagem e também na integridade da cartilagem pericelular (Han et al., 2008). Além disso, a agrecana forma um agregado de alto peso molecular sendo necessário principalmente para hidratação da cartilagem (Dudhia, 2005), através da sua interação com a hialurona e proteínas de ligação (Kiani et al., 2002). Essa hidratação é principalmente importante para que a cartilagem apresente propriedades biomecânicas. Em adição, a rede de colágeno/agrecana apresenta grande importância na cartilagem atuando de forma a resistir a deformação (Kiani et al., 2002). Desta forma, podemos observar a importância da agrecana em estágios iniciais da diferenciação, atuando em processos de agregação celular e também em estágios pós-diferenciação, desempenhando um papel funcional à cartilagem, atuando como um fator contribuinte a sua rigidez. De maneira importante, observamos que a agrecana permaneceu estável ao longo da diferenciação condrogênica, apresentando apenas uma leve redução na segunda semana de indução.

A agrecana também faz ligação com os glicosaminoglicanos, como o sulfato de condroitina. O agregado de proteoglicanos, juntamente com a rede de colágeno é o que determina a resistência e flexibilidade do tecido cartilaginoso, sendo capaz de suportar repetitivas forças de compressão. Além disso, atuam também na lubrificação das articulações durante o movimento, que é propiciado pela elevada capacidade de reter água e também apresenta a função de distribuir nutrientes aos condrócitos (Kuettner et al., 1982; Jerosch et al., 2011). Desta forma, o sulfato de condroitina suporta importantes funções juntamente com a agrecana. E os esferoides de ASC

induzidos revelaram-se capazes de produzir grande quantidade de sulfato de condroitina. E em adição, observamos um leve aumento na última semana de indução, apesar da sua expressão ter sido alta ao longo da diferenciação.

Os condrócitos são compostos por uma rede tridimensional de citoesqueleto composto por microfilamentos de actina, microtúbulos de tubulina e filamentos intermediário de vimentina (Langelier et al., 1999). Com o intuito de investigar a estrutura citoplasmática dos esferoides de ASC induzidos para a via condrogênica realizamos análises de imunohistoquímica e verificamos que os esferoides apresentaram marcação para vimentina bastante difundida por todo o esferoide durante 14 dias de indução. Em contrapartida, a partir das análises semi-quantitativas, verificamos que na última semana de indução houve uma redução significativa da marcação de vimentina.

Langelier e colaboradores realizaram um estudo com o intuito de investigar a estrutura do citoesqueleto de condrócitos oriundos da cartilagem articular madura bovina. E a partir de análises de microscopia de fluorescência foi observado que a intensidade do filamento intermediário de vimentina foi maior na zona superficial quando comparado com a zona profunda e posteriormente esses dados foram confirmados por Western blotting. Esses dados sugerem que um citoesqueleto mais denso parece ser requisitado em condrócitos sujeitos a maior deformação celular (Langelier et al., 1999). De fato, verificamos que essa marcação apresentou-se preferencialmente na periferia dos esferoides, região composta principalmente por células com morfologia fibroblástica. Além disso, Langelier e colaboradores analisaram os condrócitos por microscopia confocal a fim de ser observada a estrutura tridimensional da vimentina que compõe os condrócitos e revelou uma estrutura bastante compactada no citoplasma dos condrócitos (Langelier et al., 1999).

A vimentina atua principalmente com o intuito de fornecer rigidez aos condrócitos e foi demonstrado que a destruição do citoesqueleto de vimentina em condrócitos saudáveis reduz sua rigidez (Haudenschild et al., 2011). De fato, observamos em nosso modelo que a perda de vimentina foi acompanhada pelo decaimento da força mecânica dos esferoides de ASC induzidos, que apresentou-se baixo na última semana. Portanto, podemos sugerir que a ausência de vimentina no interior dos esferoides pode ter levado a diminuição da força mecânica. No entanto, mais análises precisam ser realizadas para confirmar essa possibilidade, uma vez que

na primeira semana de indução a presença de vimentina foi alta e os esferóides também apresentaram baixa força mecânica.

A análise de microscopia eletrônica de varredura revelou a presença das vesículas na superfície dos esferóides de ASC induzidos para via condrogenica. As microvesículas apresentam uma heterogênea população de vesículas, incluindo exossomos que possuem de 0,05 a 0,1 μ m e os ectossomos possuem entre 0,1 a 1 μ m (Cocucci e Meldoleis, 2015). Evidenciando que em nosso modelo pudemos observar a presença de ectossomos na superfície dos esferóides, uma vez que, a partir das nossas análises verificamos a presença de microvesículas com tamanho variando entre 0,2 a 1 μ m. Sendo o ectossomo uma vesícula extracelular gerada pelo brotamento da membrana plasmática e seguida pela compressão e liberação da membrana para o espaço extracelular (Cocucci e Meldoleis, 2015).

A presença desses ectossomos indicam uma dinâmica de transferência de proteínas e materiais genéticos para as células, que podem estar atuando como veículos para troca intercelular de sinais biológicos e informação, como lipídeos, mRNA, miRNA e desempenhar um importante papel na comunicação célula-célula (Sabin et al., 2013; Takagaki et al., 2012). Esses dados podem ser confirmados pela intensa secreção de fatores solúveis pelos esferóides de ASC induzidos, como pudemos observar pelas análises de detecção de citocinas e fatores envolvidos com a diferenciação condrogênica.

Análise de força mecânica revelou que os esferóides de ASC induzidos apresentam maior resistência mecânica após 14 dias de indução. A partir desses esferóides realizamos a fusão de 4 esferóides e realizamos a análise destes esferóides juntamente com os esferóides de ASC induzidos por 21 dias. Pudemos observar que os esferóides fusionados mantêm alta força mecânica como nos esferóides de ASC induzidos em 14 dias, em contrapartida, os esferóides de ASC apresentam um decaimento da força mecânica após 21 dias de indução, como já foi mencionado.

A fusão dos esferóides é importante principalmente para formação de microtecido autógeno para posterior implante. E pudemos observar que os esferóides de ASC apresentaram capacidade de se fusionarem totalmente e formar uma única esfera a partir da fusão de quatro esferas.

Após observarmos a capacidade desses esferoides de se fusionarem, realizamos então a semeadura dos esferoides em nanofibras de policaprolactona e verificamos que a completa adesão desses esferoides nesse material mesmo sem tratamento prévio. Além disso pudemos confirmar que os esferoides mantiveram sua capacidade de se fusionarem mesmo quando semeados na superfície da nanofibra, sendo um passo importante, uma vez possibilita a formação de microtecidos autógeno associados a um sistema de *delivery* que auxilia na retenção dos esferoides no local do implante.

Por fim, os esferoides foram implantados na região subcutânea de camundongos a fim de verificarmos a resposta inflamatória dos esferoides, bem como sua retenção no local do implante. E observamos a presença de infiltrado de células inflamatórias, principalmente no ponto de 14 e 28 dias. No entanto, não realizamos uma análise implantando somente a nanofibra a fim de evidenciar qual seria o principal fator inflamatório. Desta maneira novas análises precisam ser realizadas com o intuito de investigar melhor a resposta inflamatória, bem como o potencial dos esferoides de ASC em manter seu fenótipo induzido.

Com base nos resultados aqui apresentados, os esferoides de ASC apresentaram-se promissores para aplicação no campo da engenharia de tecidos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

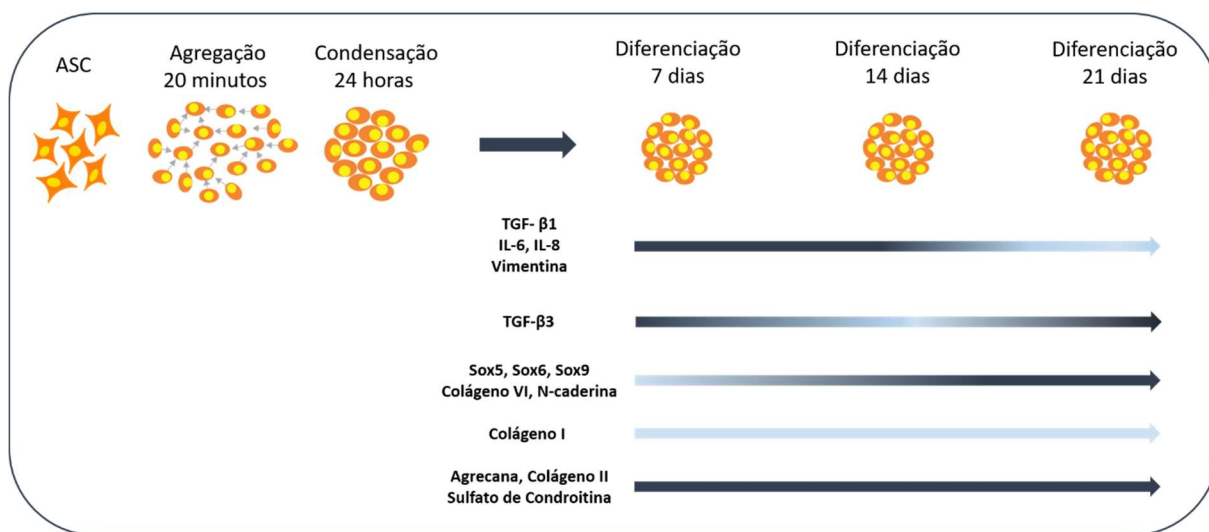


Figura 40. Desenhos esquemáticos das etapas da diferenciação condrogênica observadas na indução de ASC *in vitro* durante a cinética de 21 dias. A partir da intensidade de cores das setas é possível observar o aumento ou diminuição de determinado componente em 7, 14 e 21 dias de indução condrogênica. Onde a cor azul claro representa a diminuição e a cor azul escuro representa aumento.

A partir deste estudo pudemos acompanhar a diferenciação condrogênica em diferentes etapas a partir de uma cinética de três pontos ao longo de 21 dias de indução de ASC em sistema de esferóides.

Verificamos que os diferentes fatores de diferenciação condrogênica, bem como mediadores solúveis atuam nesse processo de diferenciação em diferentes estágios. Onde os principais fatores já descritos na literatura, como TGF-β1, β2 e β3 atuam de maneira ativa no início da diferenciação condrogênica. No entanto, apenas o nível de TGF-β3 mantém-se relativamente alto na última semana de indução. Esses dados sugerem uma participação ativa de todos os fatores de diferenciação na etapa inicial deste processo e que apenas o TGF-β3 parece ser necessário para etapas posteriores a diferenciação podendo atuar diretamente no estímulo a manutenção dos componentes de matriz. Além disso, a indução da diferenciação condrogênica dos esferóides de ASC favoreceu a diminuição da secreção de TGF-β1 ao longo das semanas, além de permitir que os esferóides voltassem a secretar novamente altos níveis de TGF-β3 na última semana de indução. Assim, a indução dos esferóides de ASC levou a um balanço entre o decaimento de TGF-β1 e concomitante aumento de TGF-β3 na última semana de indução. Já foi sugerido na literatura a capacidade do

TGF- β 3 em induzir a expressão de Sox9, que por sua vez atua de maneira direta na produção do colágeno II. Onde, de fato, observamos que o aumento de Sox9 desencadeou um pequeno aumento de colágeno II na última semana de indução.

Além disso, poderíamos propor, em concordância a literatura, que o TGF- β 3 atuou de forma a manter o fenótipo das células diferenciadas, atuando de maneira a inibir a expressão de colágeno I.

A expressão do trio Sox revela que ASC dos esferoides diferenciados para via condrogênica apresentaram expressão durante todas as semanas. No entanto essa expressão foi expressiva na última semana de indução. Revelando a atuação desses fatores não apenas em estágios iniciais da diferenciação, mas também em etapas posteriores. Além disso, como relatado da literatura, esse aumento foi principalmente benéfico para que as células diferenciadas não sofram o processo de hipertrofia e geralmente seguida pela ossificação endocondral.

Podemos propor também que o IL-6 atua na diferenciação condrogenica, como evidenciado por alguns autores, no entanto, a partir do nosso estudo parece que o IL-6 participa apenas de estágios iniciais da diferenciação. Além disso, a indução condrogênica favoreceu a manutenção da secreção dos mediadores solúveis – IL-6 e IL-8 – por mais tempo, tornando seu decaimento mais tardio quando comparado com os esferoides de ASC sem indução.

A partir das análises de imunohistoquímica, podemos sugerir que apesar das alterações nos níveis de secreção dos fatores de diferenciação e das citocinas, que os esferoides de ASC apresentaram-se estáveis após a diferenciação. Visto que, não observamos alteração no perfil de marcação das principais moléculas de matriz do tecido cartilaginoso, como o colágeno II, agrecana, sulfato de condroitina, o que indica a estabilidade dessas moléculas a partir dos esferoides de ASC induzidos.

9. CONCLUSÃO

- Foi possível padronizar o cultivo tridimensional das ASC em sistema de agarose micromoldada passível de escalonamento para produção de esferoides com homogeneidade na distribuição do diâmetro e alta viabilidade celular.
- O microambiente gerado através do cultivo tridimensional em relação ao cultivo de monocamada resultou na diminuição do tamanho celular e na alteração fenotípica de alguns marcadores de superfície.
- A eficiência da diferenciação das ASC para a via condrogênica foi confirmada pela presença de componentes de matriz extracelular de cartilagem, pelo aumento dos *master genes* ao longo das semanas de indução e pela presença dos fatores condrogênicos da família TGF- β .
- Foi possível associar os esferoides de ASC induzidos às nanofibras de PCL e implantar em camundongos sem ocorrer perda dos esferoides após 28 dias.

9. REFERÊNCIAS

- Abad V. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*, v. 143, 1851-1857, 2002.
- Abramson S, Krasnokutsky S. Biomarkers in Osteoarthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases.*, v. 64, p. 1, 2006.
- Akiyama H, Chaboissier M, Martin J, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development*, v. 16, 2813-2828, 2002.
- Akiyama H, Chaboissier M, Martin J, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, v. 16, 2813-2828, 2002.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.*, v. 16, p. 2813-2828, 2002.
- Akiyama H. Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, v. 101, p. 6502-6507, 2004.
- Akiyama, H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol*, v. 18, p. 213-219, 2008.
- Allen K, Golightly Y. State of the evidence. *Curr Opin Rheumatol*, v. 27, 276-83, 2015.
- Archer C, Douthwaite G, Francis-West P. Development of synovial joints. *Birth Defects Research (Part C)*, v. 69, 144–155, 2003.
- Archer CW, Douthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. *Birth Defects Res.*, v. 69, p. 144–155, 2003.
- Aust L, Devlin B, Foster S. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, v. 6, 7–14, 2004.
- Aydelotte, M. & Kuettner, K. Heterogeneity of articular chondrocytes and cartilage matrix. *Marcel Dekker*, 1992.
- Baer P, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*, 2012.
- Baer P. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells*, v.6, 256-265, 2014.

Baksh D, Song L, Tuan R. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, v. 8, 301-316, 2004.

Baksh D, Song L, Tuan R. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* V. 8, 301-316, 2004.

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells*, v. 26, 2705-2712. 2008.

Bao B, Jiang J, Yanase T, Nishi Y, Morgan JR. Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. *FASEB J.*, v. 25, p. 255-264, 2011.

Baptista LB. Caracterização morfo-funcional e molecular das células mesenquimais do estroma do tecido adiposo e sua possível identidade com o estroma da medula óssea. Tese, 2008.

Baptista LB, Amaral R, Carias R, Ancineto M, Claudio-da-Silva C, Borojevic R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy*. V. 11, P 706-715, 2009.

Baptista LS, Pedrosa CGS, Silva KR, Otazú IB, Takyia CM, Dutra HS, Cláudio-da-Silva C, Borojevic R, Rossi MID. Bone Marrow and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: How Close Are They? *J. Stem Cells*, v.2, n. 2. 2007.

Baptista LS, do Amaral RJ, Carias RB, Aniceto M, Claudio-da-Silva C, Borojevic R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy.*, v. 11, p. 706-715, 2009.

Barry F, Boynton R, Liu B, Murphy J. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*, v. 268, 189-200, 2001.

Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 107, p. 13724-13729, 2010.

Battula V, Bareiss P, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation*, v. 75, 279-291, 2007.

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.*, v. 16, p. 174-178, 1997.

Bi W, Deng J, Zhang Z, Behringer R, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nature genetics*, v. 22, 85-89, 1999.

Bian L, Zhai DY, Tous E, Rai R, Mauck RL, Burdick JA. Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- β 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 32, 6425–6434, 2011.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, v. 19, 180-192, 2001.

Bobick BE, Chen FH, LE AM, Tuan RS. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth defects research part c, embryo today: reviews*. v. 87, p. 351–71, 2009

Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *American journal of medical genetics*, v. 167, 2869-2892, 2015.

Bourin P, Bunnell B, Casteilla L, Dominici M, Katz A, March K, Redl H, Rubin J, Yoshimura K, Gimble J. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. Cytotherapy, v. 15, 641–648, 2013.

Breslin S, O'driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*., v. 18, p. 240-249, 2013.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, v. 331, 889-895, 1994.

Brondello, J.M., Philipot, D., Djouad, F., Jorgensen, C., and Noel, D. Cellular senescence is a common characteristic shared by preneoplastic and osteo-arthritic tissue. *Open Rheumatol J*, v. 4, 10, 2010.

Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease *J Orthop Trauma*; v. 10, p. 739–744, 2006.

Brunet LJ¹, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science.*, v. 29, p. 1455-1457, 1998.

Buckwalter A, Mankin HI. Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Bone Joint Sue.*, v. 79, p. 600-611, 1997.

Buckwalter, J. & Mankin, H. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte matrix interactions. *AAOS Instr Cours Lect*, v. 47, 487-504, 1998.

Campagnoli C, Roberts I, Kumar S, Bennett P, Bellantuono I, Fisk N. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow, *Blood*, v. 98, 2396-2402, 2001

Caplan A, Pechak D. The cellular and molecular embryology of bone formation. In *Bone and mineral research*, v. 5, 117 –183, 1987.

Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P. Collagen VI at a glance. *J Cell Sci.*, v. 128, p. 3525-3531, 2015.

Chen JL, Duan L, Zhu W, Xiong J, Wang D. Extracellular matrix production in vitro in cartilage tissue engineering. *J Transl Med.*, v. 12, p. 88, 2014.

Chen R, Mian M, Fu M, Zhao JY, Yang L, Li Y, Xu L. Attenuation of the Progression of Articular Cartilage Degeneration by Inhibition of TGF- β 1 Signaling in a Mouse Model of Osteoarthritis. *Am J Pathol.*, v. 185, p. 2875–2885, 2015.

Chen-An P, Andreassen K, Henriksen K, Karsdal M, Bay-Jensen A. Investigation of chondrocyte hypertrophy and cartilage calcification in a full-depth articular cartilage explants model. *Rheumatol Int*, v. 33, 401, 2013.

Cheng N, Estes B, Awad H, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Eng. Part A*, v. 15, 231–41, 2009.

Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials*, v. 33, p. 1748-1758, 2012.

Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz M, Diaz de Leon L. Regulation of chondrocyte differentiation by transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3, and beta 5. *Ann N Y Acad Sci*, v. 785, 241-244, 1996.

Chimal-Monroy J, Diaz de Leon L. Differential effects of transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3 and beta 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Int J Dev Biol* 41, 91-102 (1997).

Church V. Expression and function of Bapx1 during chick limb development. *Anat Embryol (Berl)*, v. 209, 461-469, 2005.

Cocucci E¹, Meldolesi J². Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.*, v. 25, p. 364-372, 2015.

Collagen of fibrocartilage: A distinctive molecular phenotype in bovine meniscus Eyre DR, Wu JJ. *FEBS.*, v. 25, p. 265-267, 1983.

Colombo F, Sampogna G, Coccozza G, Guraya AY, Forgione A. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. *Journal of microscopy and ultrastructure*, v. 5, p. 1-8, 2017.

Conget P, Minguell J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, v. 181, 67-73, 1999.

Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr.*, v. 14, p. 99-129, 1994.

Corselli M, Chen C, Crisan M, Lazzari L, Peault B. Perivascular Ancestors of Adult Multipotent Stem Cells. *Arterioscler, Vasc. Biol.*, v. 30, 1104–1109, 2010.

Cousin B, Caspar-Bauguil S, Planat-Bénarf V, Laharrague P, Pénicaud L, Casteilla L. Adipose tissue: a subtle and complex cell system. *J. Soc. Biol.*, v. 200, p. 51-57, 2006.

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.*, v. 8, p. 739-750, 2005.

Day, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. *Dev. Cell* 8, 739–750, 2005.

De Bari C, Dell'Accio F, Luyten F. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.*, v. 44, 85-95, 2001.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP: Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.*, v. 44, 1928-1942, 2001

De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch J, Raymackers J, Luyten F. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol.*, v. 160, 909-918, 2003.

De Ugarte DA¹, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.*, v. 174, p. 101-109.

Dean DM, Morgan JR. Cytoskeletal-mediated tension modulates the directed self-assembly of microtissues. *Tissue Eng Part A.* v. 14, p. 1989-1997, 2008.

Decker R, Koyama E, Pacifici M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. *Curr Osteoporos Rep.*, v. 13, 407–414, 2015.

DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.*, v. 8, p. 309-334, 2000.

Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, Rosset P, Sensebé L, Layrolle P, Häupl T, Charbord P. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood.*, v. 111, p. 2631-2635, 2008.

Desroches BR, Zhang P, Choi BR, King ME, Maldonado AE, Li W. Functional scaffold-free 3-D cardiac microtissues: a novel model for the investigation of heart cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v. 302, p. 2031, 2012.

Duguay D, Foty RA, Steinberg MS. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev Biol.*, v. 253, p. 30923, 2003.

- Dy P, Smits P, Silvester A, Penzo-Mendez A, Dumitriu B, Han Y, et al. Synovial joint morphogenesis requires the chondrogenic action of Sox5 and Sox6 in growth plate and articular cartilage. *Developmental biology*, v. 341, 346-59, 2010.
- Dy P, Wang W, Bhattaram P, Wang Q, Wang L, Ballock RT, Lefebvre V. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell.*, v. 22, p. 597–609, 2012.
- Effects of IL-6 and Soluble IL-6 Receptor on the Expression of Cartilage Matrix Proteins in Human Chondrocytes. *Connective Tissue Research.*, v. 48, p. 263–270, 2007.
- Emans P, Caron M, van Rhijn, L, Shastri V, Welting T. Cartilage Tissue Engineering; Lessons Learned From Periosteum. *Tissue Science & Engineering*, 2011.
- Erices A, Conget P, Minguell J, Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood, *Br. J. Haematol*, v. 109, 235-242, 2000.
- Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Comm*, v. 290, 763-769, 2012.
- Erlebacher, A., E.H. Filvaroff, S.E. Gitelman, and R. Derynck. 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*. 80:371-378.
- Estes B, Guilak F, Three-dimensional culture systems to induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells. *Methods Mol. Biol*, v. 702, 201–217, 2011.
- Feisst V, Meidinger S, Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning.*, v. 8, p. 149–162, 2015.
- Felson DT, Kuettner KE, Goldberg VM. The epidemiology of osteoarthritis: prevalence and risk factors. *Osteoarthritis disorders.*, Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons., p. 13–24, 1995.
- Felson DT, Neogi T. Osteoarthritis: Is It a Disease of Cartilage or of Bone? *Arthritis&Rheumatism.*, v. 50, p. 341–44, 2004.
- Felson, D. T. An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol. Clin. North Am.*, v. 42, p. 1–9, 2004.
- Feng X, Zhang Y, Wu R, Derynck R. The tumor suppressor Smad4/ DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGFbeta-induced transcriptional activation. *Genes Dev*, v. 12, 2153-2163, 1998.
- Ferguson C. Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1 induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology*, v. 141, 4728-4735, 2000.
- Ferguson C. Transforming growth factor-beta1 induced alteration of skeletal morphogenesis in vivo. *J Orthop Res*, v. 22, 687-696, 2004.
- Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* v. 9, 669- 676, 2003.

Flores MV, Lam EY, Crosier P, Crosier KA. hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish. *Dev Syn.*, v. 235, p. 3166-3176, 2006.

Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, Kwok C, Weller P, Stevanovic M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, v. 372, 525-530, 1994.

Foster N, Henstock J, Reinwald Y, and A. J. El Haj. Dynamic 3D culture: Models of chondrogenesis and endochondral ossification. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev*, v. 105, 19–33, 2015.

Foty RA, Pflieger CM, Forgacs G, Steinberg MS. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development*. v. 122, p. 1611-1620, 1996.

Fraser J, Schreiber R, Strem B. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, v. 3, 33–37, 2006.

Galéra P, Vivien D, Pronost S, Bonaventure J, Rédini F, Loyau G, Pujol JP. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) up-regulation of collagen type II in primary cultures of rabbit articular chondrocytes (RAC) involves increased mRNA levels without affecting mRNA stability and procollagen processing. *J Cell Physiol.*, v. 153, p. 596–606.

Gandhi N, Mancera R. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des*, v. 72, 455–72482, 2008.

Gao L, Sheu TJ, Dong Y, Hoak DM, Zuscik MJ, Schwarz EM, Hilton MJ, O'Keefe RJ, Jonason JH TAK1 regulates SOX9 expression in chondrocytes and is essential for postnatal development of the growth plate and articular cartilages. *J Cell Sci*, v. 126, 5704-5713, 2013.

Ghosh S, Laha M, Mondal S, Sengupta S, Kaplan DL. In vitro Model of Mesenchymal Condensation During Chondrogenic Development. *Biomaterials.*, v. 30, p. 6530–6540, 2009.

Gimble J, Bunnell B, Chiu E, Guilak F. Concise Review: AdiposeDerived Stromal Vascular Fraction Cells and Stem Cells: Let's Not Get Lost in Translation. *Stem Cells*, v. 29, 749–754, 2011.

Gimble J, Grayson W, Guilak F, Lopez M, Vunjak-Novakovic G. Adipose tissue as a stem cell source for musculoskeletal regeneration. *Front. Biosci*, v. 3, 69–81, 2011.

Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, v. 5, 362–369, 2003.

Gimble J, Guilak F. Differentiation Potential of Adipose Derived Adult Stem (ADAS) Cells. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 58, 137–160, 2003.

Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human Adipose Stem Cells: Current Clinical Applications. *Plast Reconstr Surg.*, v. 129, p. 1277-1290, 2012.

Goldring M, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.*, v. 97, 33–44, 2006.

Grogan SP, Duffy SF, Pauli C, Koziol JA, Su AI, D'Lima DD, Lotz MK. Zone-specific Gene Expression Patterns in Articular Cartilage. *Arthritis Rheum.*, v. 65, p. 418–428, 2013.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science*, v. 116, p. 1827–1835, 2003.

Guo X, Day T, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y. *Genes Dev.* 18, 2404–2417, 2004.

Hall, B. Miyake K. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays*, v. 22, 138–147, 2000.

Han L, Dean D, Daher AL, Grodzinsky, Ortiz C. Cartilage Aggrecan Can Undergo Self-Adhesion. *Biophys J.*, v. 95, p. 48-4870, 2008.

Han Y, Lefebvre V. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol*, v. 28, 4999-5013, 2008.

Hartmann C, Tabin C. *Cell*, v. 104, 341–351, 2001.

Hasler E, Herzog W, Wu J, Muller W, Wyss, U. Articular cartilage biomechanics: theoretical models, material properties, and biosynthetic response. *Crit Rev Biomed Eng*, v. 27, 415-488, 1999.

Hattori T, Müller C, Gebhard et al. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development*, v. 137, 901–911, 2010.

Hattori T, Müller C, Gebhard S, Bauer E, Pausch F, Schlund B, Bösl MR, Hess A, Surmann-Schmitt C, von der Mark H, de Crombrughe B, von der Mark K. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development.*, v. 137, p. 901-911, 2010.

Haudenschild DR, Chen J, Pang N, Steklov N, Grogan SP, Lotz MK, D'Lima DD. Vimentin contributes to changes in chondrocyte stiffness in osteoarthritis. *J Orthop Res.*, v. 29, p. 20-25, 2011.

Henry S, Liang S, Akdemir K, de Crombrughe B. The postnatal role of Sox9 in cartilage. *J Bone Miner Res*, v. 27, 2511-25, 2012.

Hinchliffe JR, Jonson DR. *The Development of the Vertebrate Limb*. Oxford University Press, p. 72–83, 1980.

Holder N. An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 39, p. 115–127, 1977.

Huang AH, Farrell MJ, Mauck RL. Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage. *J Biomech.*, v. 5, p. 128–136, 2010.

Huber, M., Trattnig, S., Lintner, F., 2000. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest. Radiol.* 35, 573–580.

Hunter, W. Of the structure and diseases of articulating cartilages. *Phil. Trans. Royal Soc.*, v. 470, p. 514–521, 1743.

Hunziker E, Kapfinger E, Geiss J. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 15, 403–413, 2007.

Hunziker E, Michel M, Studer D. Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. *Microsc. Res. Tech*, v. 37, 271– 284, 1997.

Hunziker, E. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. Raven Press, 1992.

Im GI. Chondrogenesis from mesenchymal stem cells derived from adipose tissue on the fibrin scaffold. *Current Applied Physics*, v. 5, 438–443, 2005.

Itayem R, Mengarelli-Widholm S, Reinholt F. The long-term effect of a short course of transforming growth factor- β 1 on rat articular cartilage. v. 107, p. 183–192.

Jack G, Almeida F, Zhang R, Alfonso Z, Zuk P, Rodríguez L. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *Journal of Urology*, v. 174, 2041– 2045, 2005.

Jenner F, Ijpma A, Cleary M, Heijman D, Narcisi R, van der Spek P, Kremer A, van Weeren R, Brama P, van Osch G. Differential gene expression of the intermediate and outer interzone layers of developing articular cartilage in murine embryos. *Stem Cells Dev*, v. 23, 1883–1898, 2014.

Jerosch J. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. *Int J Rheumatol.*, v. 2011, p. 17, 2011.

Jin X, Sun Y, Zhang K, Wang J, Ju X, Lou S. Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo. *Acta Pharmacol Sin*, v. 28, 663–671, 2007.

Jin XB, Sun YS, Zhang K, Wang J, Ju XD, Lou SQ. Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo. *Acta Pharmacol Sin*, v. 28, 663–671, 2007.

Jung S, Rhie J, Kwon H, Jun Y, Seo J, Yoo G. In vivo cartilage formation using chondrogenic-differentiated human adipose-derived mesenchymal stem cells mixed with fibrin glue. *J Craniofac Surg*, v. 21, 468-472, 2010.

Jung Y, Chung YI, Kim SH, Tae G, Kim YH, Rhie JW, et al. In situ chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells in a TGF- β 1 loaded fibrin-poly(lactide-caprolactone) nanoparticulate complex. *Biomaterials*, v. 30, 4657-4664, 2009.

Jung Y, Chung YI, Kim SH, Tae G, Kim YH, Rhie JW, et al. In situ chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells in a TGF- β 1 loaded fibrin-poly(lactide-caprolactone) nanoparticulate complex. *Biomaterials*, v. 30, 4657-4664, 2009.

Jux C, Leiber K, Hügel U, Blum W, Ohlsson C, Klaus G, Mehls O. Dexamethasone impairs growth hormone (GH)-stimulated growth by suppression of local insulin-like growth factor (IGF)-I production and expression of GH- and IGF-I-receptor in cultured rat chondrocytes. *Endocrinology*, v.139, 3296-305, 1998.

Kan A, Tabin CJ. c-Jun is required for the specification of joint cell fates. *Genes Dev.*, v. 27, p. 514–524, 2013.

Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis, v. 6, 71-79, 2000.

Karlsson C, Lindahl A. Articular cartilage stem cell signalling. *Arthritis research & therapy*, v. 11, 121, 2009.

Katsuda T¹, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, Takeshita F, Sakai Y, Kuroda M, Ochiya T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep.*, v. 3, p. 1197, 2013.

Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells* 25, 1, 2008.

Kawakami Y, Rodriguez-León J, Izpisua Belmonte JC. The role of TGF β s and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* v. 18:723–729, 2006.

Kiani C, Chen L, Wu UJ, YEE AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Research.*, v. 12, p. 19–32, 2002.

Kim YI, Ryu JS, Yeo JE, Choi YJ, Kim YS, Ko K, Koh YG. Overexpression of TGF- β 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 450, p. 1593-1599, 2014.

Kingsley D. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* v. 8, 133146, 1994.

Kobolak, J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for

regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*, v. 99, p.62-68, 2016.

Kolf C, Cho E, Tuan R. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res. Ther.*, v. 9, 204–204, 2007.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, v. 89, 755-764, 1997.

Kondo M, Yamaoka K, Sakata K, Sonomoto K, Lin L, Nakano K, Tanaka Y. Contribution of the Interleukin-6/STAT-3 Signaling Pathway to Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Arthritis Rheumatol.*, v. 67, p. 1250-1260, 2015.

Kronenberg H. Developmental regulation of the growth plate. *Endocrine Unit*, v. 423, 332-336, 2003.

Kuettner KE, Memoli VA, Pauli BU, Wrobel NC, Thonar EJ, Daniel JC. Synthesis of Cartilage Matrix by Mammalian Chondrocytes In Vitro . II . Maintenance of Collagen and Proteoglycan Phenotype. *J Cell Biol.*, v. 93, p. 751-757, 1982.

Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*, v. 383, 832-836, 1996.

Lassar A, Paterson B, Weintraub H. Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell*, v. 47, 649-656, 1986.

Lee J, Kemp D. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 341, 882–888, 2006.

Lee JM, Kim BS, Lee H, Im GI. In vivo tracking of mesenchymal stem cells using fluorescent nanoparticles in an osteochondral repair model. *Mol Ther.*, v. 20, p. 1434, 2012.

Lefebvre V, Huang W, Harley V, Goodfellow P, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1(\text{II})$ collagen gene. *Mol Cell Biol*, v. 17, 2336-2346, 1997.

Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res.C.Embryo.Today.*, v. 75 p. 200-212, 2005.

Lefebvre, V., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 69-75, 2001.

Lefebvre, V., Li, P. & de Crombrughe, B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J*, v. 17, 5718-5733, 1998.

Leung V, Gao B, Leung K. SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS Genetics*, v. 7, 2011.

Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med*, v. 9, 929-939, 2005.

Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med*, v. 9, 929-939, 2005.

Lin YF, Jing W, Wu L, Li XY, Wu Y, Liu L, Tang W, Long J, Tian WD, Mo XM. Identification of osteo-adipo progenitor cells in fat tissue. *Cell Prolif.*, v. 41, p. 803-812, 2008.

Litwic A, Edwards M, Dennison E, Cooper, C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British Medical Bulletin*, v. 105, 185-199, 2013.

Liu C, Lefebvre V. The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genomewide through super-enhancers to drive chondrogenesis. *Nucleic acids research*, 2015.

Liu J, Zhao B, Zhang Y, Lin Y, Hu P, Ye C. PHBV and predifferentiated human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A*, v. 94, 603-610, 2010.

Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*, v. 25, 750-760, 2007.

Liu Y, Zhou G, Cao Y. Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering—Our Experience and Future Directions. *Engineering*, v. 3, p 28-35, 2017.

Locker M, Kellermann O, Boucquey M, Khun H, Huerre M, Poliard A. Paracrine and autocrine signals promoting full chondrogenic differentiation of a mesoblastic cell line. *J Bone Miner Res*, v. 19, 100-110, 2004.

Long F, Ornitz D. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 5, 2013.

Long F, Ornitz DM. Development of the Endochondral Skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, v. 1, p. 008224, 2013.

Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Martinez-Cue, C., Garcia-Porrero, J. A. & Hurle, J. M. Transforming growth factors beta coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme. *The Journal of biological chemistry*, v. 284, 29988-29996, 2009.

Losina E, Paltiel AD, Weinstein AM, Yelin E, Hunter DJ, Chen SP, Klara K, Suter LG, Solomon DH, Burbine AS, Walensky RP, Katz JN. Lifetime medical costs of knee osteoarthritis management in the United States: Impact of extending indications for total knee arthroplasty. *Arthritis Care and Research*. v. 67, p. 203-215, 2015.

Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone*, v. 51, p. 241-248, 2012.

M Oedayrajsingh-Varma, van Ham S, Knippenberg M. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytherapy*, v. 8, 166–177, 2006.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 40, p. 460 62, 2008.

Maes C, Kobayashi T, Selig M, Torrekens S, Roth S, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg H. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*, v. 19, 329–344, 2010.

Mankin H, Mow V, Buckwalter J. Articular cartilage structure, composition, and function. 2000.

Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring SR, Goldring MB, Jones G, Teichtahk AJ, Pelletier JP. Osteoarthritis. *Nature*, 2016.

Martínez-Lorenzo MJ¹, Royo-Cañas M, Alegre-Aguarón E, Desportes P, Castiella T, García-Alvarez F, Larrad L. Phenotype and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Cells from Adipose Tissue of Different Species. *J Orthop Res.*, v. 27, p. 1499-1507, 2009.

Mastrogiacomo M, Derubeis AR, Cancedda R. Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. *J Cell Physiol*, v. 204, 594-603, 2005.

Maumus M¹, Peyrafitte JA, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumié A, Casteilla L, Sengenès C, Bourin P. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*., v. 35, p. 1141–1153, 2011.

Mehlhorn A, Zwingmann J, Finkenzeller G, Niemeyer P, Dauner M, Stark B, et al. Chondrogenesis of adipose-derived adult stem cells in a poly-lactide-co-glycolide scaffold. *Tissue Eng Part A*, v.15, 1159-1167, 2009.

Mehlhorn AT, Zwingmann J, Finkenzeller G, Niemeyer P, Dauner M, Stark B, et al. Chondrogenesis of adipose-derived adult stem cells in a poly-lactide-co-glycolide scaffold. *Tissue Eng Part A*, v.15, 1159-1167, 2009.

Merceron C, Portron S, Masson M, Lesoeur J, Fellah BH, Gauthier O, et al. The effect of two-and three dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human

adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with and injectable hydrogel. *Cell Transplant*, v. 20, 1575-1588, 2011.

Miranda GM, Mendes AC, Silva AL. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. *Rev. bras. geriatr. gerontol.* v.19, 2016.

Mitrovic D. Development of the diarthrodial joints in the rat embryo. *Am. J. Anat.* v. 151, p. 475–485, 1978.

Mizuno H, Zuk P, Zhu M, Lorenz, Benhaim P, Hedrick M. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 109, 199–209, 2002.

Moscona A., and Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J Anat.*, v. 86, p. 287–301, 1952.

Moses HL, Serra R. Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev.*, v. 6, p. 581-586, 1996.

Mueller M, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, Kujat R, Nerlich M, Tuan R, Angele P. Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs*, v. 192, 158-166, 2010.

Mueller M, Tuan R. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* May; v. 58, 1377-1388, 2008.

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR

Mundlos S, Olsen B. Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB J*, v. 11, 125-132, 1997.

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113:1161-1166, 2000.

Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res*, v. 4, 233–242, 2002.

Nakahara H, Bruder S, Goldberg P, Caplan A. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop Relat Res*, v. 259, 223-232, 1990.

Nakahara H, Goldberg V, Caplan A. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res*, v. 9, 465-476, 1991.

Namba A, Aida Y, Suzuki N, Watanabe Y, Kawato T, Motohashi M, et al. Effects of IL-6 and soluble IL-6 receptor on the expression of cartilage matrix proteins in human chondrocytes. *Connect Tissue Res*, v. 48, 263-270, 2007.

Namba A, Aida Y, Suzuki N, Watanabe Y, Kawato T, Motohashi M, Maeno M, Matsumura H, Matsumoto M.

Napolitano AP, Chai P, Dean DM, Morgan JR. Dynamics of the selfassembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. *Tissue engineering.*, v. 13, p. 2087-2094, 2007.

Narcisi R, Quarto R, Ulivi V, Muraglia A, Molfetta L, Giannoni P. TGF β -1 Administration During Ex Vivo Expansion of Human Articular Chondrocytes in a Serum-Free Medium Redirects the Cell Phenotype Toward Hypertrophy. *J Cell Physiol.*, v. 227, p. 3282-3290, 2012.

Naumann A, Dennis J, Awadallah A, Carrino D, Mansour J, Kastenbauer E. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*, v. 50, 1049, 2002.

Naumann A, Dennis J, Awadallah A, Carrino D, Mansour J, Kastenbauer E. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*, v. 50, 1049, 2002.

Ng L, Wheatley S, Muscat G, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell D, Tam P, Cheah K, Koopman P. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol*, v. 183, 108-121, 1997.

Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P. SOX9 Binds DNA, Activates Transcription, and Coexpresses with Type II Collagen during Chondrogenesis in the Mouse. *Dev Biol.*, v. 183, p. 108–121, 1997.

Noer, A, Sørensen A, Boquest, A.C. and Collas, P. Stable CpG Hypomethylation of Adipogenic Promoters in Freshly Isolated, Cultured, and Differentiated Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Molecular Biology of the Cell*, v.17, 3543-3556, 2006.

Ode A¹, Schoon J, Kurtz A, Gaetjen M, Ode JE, Geissler S, Duda GN. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater.*, v. 8, p. 37-47, 2013.

Ofek G, Revell CM, Hu JC, Allison DD, Grande-Allen KJ, Athanasiou KA. Matrix development in self-assembly of articular cartilage. *PloS One*. v. 3, p. 2795, 2008.

Oñate B, Vilahur G, Camino-López S, Díez-Caballero A, Ballesta-López C, Ybarra J, Moscatiello F, Herrero J, Badimon L. Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics.*, v. 14, p. 625, 2013.

Onyekwelu I, Goldring M, Hidaka, C. Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. *J. Cell. Biochem*, v. 107, 383–392, 2009.

Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M and Gentili C. Development of articular cartilage: What do we know about it and how may it occur? *Connective tissue Research*, v. 4, 175-184, 2000.

Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M, Gentili C. Printed In Malaysia Development of Articular Cartilage: What Do We Know About it and How May It Occur? *Connective Tissue Research*, v. 41, p. 175-184, 2000.

Pacifici M, Koyama E, Shibukawa Y, Wu C, Tamamura Y, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M. Cellular and Molecular Mechanisms of Synovial Joint and Articular Cartilage Formation. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 1068, p. 74-86, 1910.

Pan Q, Yu Y, Chen Q, Li C, Wu H, Wan Y, Ma J, Sun F. Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol*, v. 217, 228-41, 2008.

Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *PLoS ONE*, v. 3. p. 1886, 2005.

Park MS, Kim YH, Jung Y, Kim SH, Park JC, Yoon DS, Kim SH, Lee JW. In situ recruitment of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells using chemokines for articular cartilage regeneration. *Cell Transplant.*, v. 24, p. 1067, 2015.

Park MS, Kim YH, Jung Y, Kim SH, Park JC, Yoon DS, Kim SH, Lee JW. In Situ Recruitment of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Chemokines for Articular Cartilage Regeneration. *Cell Transplant.*, v. 24, p. 1067-1083, 2015.

Pearle A, Warren R, Rodeo S. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin. Sports Med*, v. 24, 1–12, 2005.

Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Lieberman J. Healing of Critically Sized Femoral Defects, Using GenETilly Modified Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue. *Tissue engineering*, v. 11, 120-129 2005.

Phull AR, Eo SH, Abbas Q, Ahmed M, Kim SJ. Applications of Chondrocyte-Based Cartilage Engineering: An Overview. *BioMed Research International*. v. 2016, 2016.

Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, 143-147, 1999.

Pittenger M, Mackay A, Beck S. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, 143–147, 1999.

Poole A. The growth plate: Cellular physiology, cartilage assembly and mineralization. In *Cartilage: Molecular aspects*, 179–212, 1991.

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.*, p. 26–33, 2001.

Pricola K, Kuhn N, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan R. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem*, v. 108, 577–588, 2009.

Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS. Interleukin-6 Maintains Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Stemness by an ERK1/2-Dependent Mechanism. *J Cell Biochem.*, v. 108, p. 577-588, 2009.

Prockop D, Sekiya I, Colter D. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytherapy*, v. 98, 7841-7845, 2001.

Provot S. Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Development*, v. 133, 651-662, 2006.

Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct Stem Cells Subpopulations Isolated from Human Adipose Tissue Exhibit Different Chondrogenic and Osteogenic Differentiation Potential. *Stem Cell Ver.*, v. 7, p. 64-76, 2010.

Ranga A, Gjorevski N, Lutolf M. Drug discovery through stem cell-based organoid models. v. 69-70, p. 19-28, 2014.

Rodríguez L, Alfonso Z, Zhang R, Leung J, Wu B, Ignarro L. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, 12167–12172, 2006.

Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 15, 1367–1377, 2007.

Ryu JH, Kim SJ, Kim SH, Oh CD, Hwang SG, Chun CH, Oh SH, Seong JK, Huh TL, Chun JS. Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin. *Development.*, v. 129, p. 5541-5550, 2002.

Sabin K, Kikyo N. Microvesicles as mediators of tissue regeneration. *Transl Res.*, v. 163, p. 286-295, 2014.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini M, Davies J. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors, *Stem Cells, In Review*, v. 23, 220-209, 2004.

Satomura K, Krebsbach P, Bianco P, Gehron Robey P. Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *J Cell Biochem.*, v. 78, p. 391–403, 2000.

Schellenberg A, Lin Q, Schöler, H, Koch, C, Joussen S, Denecke B, Walenda, G, Pallua N, Suschek, C, Zenke M, Wagner W. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells Causes DNA-Methylation Changes Which Correlate with Repressive Histone Marks. *Aging*, v. 3, 873-888, 2011.

Science, v. 284, 143-174, 1999.

Scott W. N. Insall & Scott: *Cirurgia do joelho/ W. Norman Scott*; tradução Soraya Imon de Oliveira et al. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 148, 2015.

Setton L. Polymer therapeutics: reservoir drugs. *Nature Materials*. v.7, p.172-174, 2008.

Shintani N, Siebenrock K, Hunziker E. TGF- β 1 enhances the BMP-2-induced chondrogenesis of bovine synovial explants and arrests downstream differentiation at an early stage of hypertrophy. *PLoS One*, v. 8, e53086, 2013.

Silva KR, Liechocki S, Carneiro JR, Cláudio-da-Silva CS, Monteiro CMM, Borokeyvic R, Baptista LS. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem cell research & therapy.*, v. 6, p. 72, 2015.

Simmons P, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, v. 78, 55-62, 1991.

Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Developmental cell*, v. 1, 277-290, 2001.

Smolen J, Schoels M, Nishimoto N, Breedveld F, Burmester G, Dougados M. Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis*, v. 72, 482–492, 2013.

Somoza R, Welter J, Correa D, Caplan I. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations, *Tissue engineering*, v. 20, 1-50, 2014.

Somoza RA, Welter JF, Correa D, Caplan AI. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations. *Tissue Eng Part B Rev.*, v. 20, p. 596-608, 2014.

Song J, Aswad R, Kanaan R, Rico M, Owen T, Barbe M, Safadi F, Popoff S. Connective tissue growth factor (CTGF) acts as a downstream mediator of TGF- β 1 to induce mesenchymal cell condensation. *J Cell Physiol*, v. 210, 398-410, 2007.

Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone*, v. 30, 699-704, 2002.

Steck E, Fischer J, Lorenz H, Gotterbarm T, Jung M, Richter W. Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev*, v. 18, 969, 2009.

Strem B, Hicok K, Zhu M. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio Journal of Medicine*, v. 54, 132–141, 2005.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.*, v. 54, p. 132-141, 2005.

Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S. Role of Runx Genes in Chondrocyte Differentiation. *Dev Biol.*, v. 245, p. 95-108, 2002.

Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells*, v. 21, 2724-2752, 2012.

Sukegawa, A., Iwasaki, N., Kasahara, Y., Onodera, T., Igarashi, T., and Minami, A. Repair of rabbit osteochondral defects by an acellular technique with an ultrapurified alginate gel containing stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A.*, v. 18, p. 934, 2012.

Svoronos AA, Tejavibulya N, Schell JY, Shenoy VB, Morgan JR. Micro-Mold Design Controls the 3D Morphological Evolution of Self-Assembling Multicellular Microtissues. *Tissue engineering part A.* v. 20, p. 1134-1344, 2014.

Takeda S, Bonnamy J, Owen M, Ducy P, Karsenty G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes & development*, v.15, 46781, 2001.

Tang QO, Shakib K, Heliotis M, Tsiridis E, Mantalaris A, Ripamonti U, Tsiridis E. TGF- β 3: A potential biological therapy for enhancing chondrogenesis. *Expert Opin Biol Ther.*, v. 9, p. 689-701, 2009.

The Chondrocyte Cytoskeleton in Mature Articular Cartilage: Structure and Distribution of Actin, Tubulin, and Vimentin Filaments Eve Langelier, Rosmarie Suetterlin, Caroline D. Hoemann, Ueli Aebi, and Michael D. Buschmann

Thorogood P, Hinchliffe J. An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J Embryol Exp Morphol* v. 33, 581–606, 1975.

Topol L, Chen W, Song H, Day TF, Yang Y. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus. *The Journal of biological chemistry.*, v. 284, p. 3323-3333, 2009.

Tormin A, Brune JC, Olsson E, Valcich J, Neuman U, Olofsson T, Jacobsen SE, Scheduling S. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets. *Cytotherapy*, v. 11, p. 114-128, 2009.

Tsuchida AI, Beekhuizen M, Rutgers M, van Osch GJ, Bekkers JE, Bot AG, Geurts B, Dhert WJ, Saris DB, Creemers LB. Interleukin-6 is elevated in synovial fluid of patients with focal cartilage defects and stimulates cartilage matrix production in an in vitro regeneration model. *Arthritis Res Ther.*, v. 14, p. 262, 2012.

Tsuji W, Rubin J, Marra K. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells*, v.6, 312-321, 2014.

Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner P, Hozack W, Danielson K, Hall D, Tuan R. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem*, v. 278, 41227-41236, 2003.

van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest.*, v. 71, p. 279–290, 1994.

Verzijl N., DeGroot J., Thorpe S.R., Bank R.A., Shaw J.N., Lyons T.J., Bijlsma J.W., Lafeber F.P., Baynes J.W., TeKoppele J.M. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem.*, v. 275, p. 39027–39031, 2000.

Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, Gordeladze J, Brondello J, Jorgensen C, Weiss P, Guicheux J, Noël D. Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*, v. 4, 318–329, 2009.

Vrahas MS, Mithoefer K, Joseph D. The long-term effects of articular impaction. *Clin Orthop Relat Res*. p. 40-43, 2004.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, v. 79,1111-1120, 1994.

Wang W, Rigueur D, Lyons KM. TGFβ Signaling in Cartilage Development and Maintenance. *Birth Defects Res C Embryo Today.*, v. 102, p. 37-51, 2014.

Wegmeyer H, Bröske AM, Leddin M, Kuentzer K, Nisslbeck AK, Hupfeld J, Wiechmann K, Kuhlen J, von Schwerin C, Stein C, Knothe S, Funk J, Huss R, Neubauer M. Mesenchymal Stromal Cell Characteristics Vary Depending on Their Origin. *Stem Cells Dev*, v. 22, 2606-2618, 2013.

WHO. The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life (WHO, 2002)

Wright E., M. R. Hargrave, Christansen J, Cooper L, Kun J, Evans T Gangadharan U, Andy G, Koopman P. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*, v. 9, 15-20, 1995.

Wuelling M, Vortkamp A. Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol.*, v. 25, p. 625-631, 2010.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, v.101, 311–320, 1998.

Yamashita S. Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes. *Experimental cell research*, v. 315, 2231-2240, 2009.

Yang H, Park J, Woo D, Jeon S, Do H, Lim H, Kim S, Kim J, Park K. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells and dedifferentiated chondrocytes by transfection with SOX Trio genes. *Biomaterials*, v. 32, 7695–7704, 2011a.

Yang Z, Huang C, Candiotti K, Zeng X, Yuan T, Li J, Yu H, Abdi S. Sox-9 facilitates differentiation of adipose tissue-derived stem cells into a chondrocyte-like phenotype in vitro. *J Orthop Res*, v. 29, 1291–1297, 2011b.

Ye C, Hu P, Ma MX, Xiang Y, Liu RG, Shang XW. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterial*, v. 30, 4401-4406, 2009.

Ye C, Hu P, Ma MX, Xiang Y, Liu RG, Shang XW. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, 4401-4406, 2009.

Yen B, Huang H, Chien C, Jui H, Ko B, Yao M. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*, v. 23, 3-9, 2005.

Yoon DS, Lee KM, Kim SH, Kim SH, Jung Y, Kim SH, Park KH, Choi Y, Ryu HA, Choi WJ, Lee JW. Synergistic Action of IL-8 and Bone Marrow Concentrate on Cartilage Regeneration Through Upregulation of Chondrogenic Transcription Factors. *Tissue Eng Part A.*, v. 22, p. 363-374, 2016.

Yoon H, Bhang S, Shin J, Shin J, Kim B. Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*, v.18, 1949-1956, 2012.

Yoon H, Bhang S, Shin J, Shin J, Kim B. Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*, v. 18, 1949-1956, 2012.

Yoshida C, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes & development*. v.18, 952-963, 2004.

Youssef J, Nurse AK, Freund LB, Morgan JR. Quantification of the forces driving self-assembly of three-dimensional microtissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 108, p. 6993-6998, 2011.

Zelenski NA, Leddy HA, Sanchez-Adams J, Zhang J, Bonaldo P, Liedtke W, Guilak F. Collagen VI regulates pericellular matrix properties, chondrocyte swelling, and mechanotransduction in articular cartilage. *Arthritis Rheumatol.*, v. 67, p. 1286-1294.

Zhang X, Ziran N, Goater J, Schwarz E, Puzas J, Rosier R, Zuscik M, Drissi H, O'Keefe R. Primary murine limb bud mesenchymal cells in long-term culture complete chondrocyte differentiation: TGF-beta delays hypertrophy and PGE2 inhibits terminal differentiation. *Bone*, v. 34, 809-817, 2004.

Zhu X, Shi W, Tai W, Liu F. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Research*, v. 350, 277-281, 2012.

Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function*, v. 26, 664-675, 2008.

Zuk P, Zhu M, Ashjian P, de Ugarte D, Huang J, Mizuno H, Alfonso Z, Fraser J, Benhaim P, Hedrick M. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.*, v. 13, p. 4279-2495, 2002.

Zuk P, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. v.13, 4279-4295, 2002.

Zuk P, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J, Katz A, Benhaim P, Lorenz H, Hedrick M. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, v. 7, 211-228, 2001.

Zuk P, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J, Katz A, Benhaim P, Lorenz H, Hedrick M. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, v. 7, 211-228, 2001.

Zuk P, Zhu M, Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, v. 7, 211-228, 2001.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, v. 7, p. 211-228, 2001.

Zvaifler N, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards C, Moss J, Burger J, Maini R. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals, *Arthritis Res*, v. 2, 477-488, 2000.

ANEXO I

FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:

☒ Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Associado

Secretário:

☒ Zuzana Rodrigues da Silva
Professor

Membros Titulares:

☐ Beatriz Maria Alsin de Herédia

Antropólogo - Prof. Associado

☐ Eliza Regina Ambrosio

Assistente Social - Mestre

☒ Helena Wazyński

Representante dos Usuários

☐ Luzia da Conceição de Araújo Marques

Enfermeiro - Mestre

☐ Marco Antonio Alves Brasil

Médico - Professor Adjunto

☒ Mario Telesim Antonio

Farmacêutico - Especialista

☒ Nairma Conceição Fernandes

Médico - Prof. Adjunto

☒ Paulo Feijó Barros

Médico - Prof. Assistente

☐ Roberto Coury Pedrosa

Médico - Doutor

☐ Roberto Takashi Sudo

Médico - Prof. Titular

Membros Suplentes:

☒ Anna Paola Trindade Rocha Pierucci

Nutricionista - Professor Auxiliar

☐ Benício Monte Tiropo

Médico - Doutora

☒ Carlos Alberto Guimarães

Médico - Prof. Associado

☐ Cesário de Assis Martinsso

Jornalismo

☐ Lucia Helena Luiz Viem Arim

Biólogo - Mestre

☐ Maria da Conceição Lopes Buzque

Assistente Social

☒ Moringelma Oliveira da Silva

Enfermeiro

☒ Gilvan Renato Mury de Souza

Médico - Prof. Associado

☒ Nathalia Henrique Silva Canedo

Médico - Professor Adjunto

☒ Renan Moritz Vianer Rodrigues Almeida

Engenheiro - Professor Adjunto

☒ Maria Bernadete Tavares Soares

Representante dos Usuários

☐ Rui Haddad

Médico - Prof. Adjunto

CEP - MEMO – n.º 826/09

Rio de Janeiro, 08 de outubro de 2009.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Leandra Santos Baptista

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 029 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 145/09 - CEP

Título: "Isolamento e caracterização de células derivadas de tecido adiposo e da pele de pacientes com índice de massa corporal normal e ex-obesos visando o seu uso em protocolos de terapia celular e engenharia tecidual"

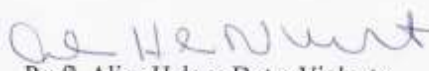
Pesquisador (a) responsável: Dra. Leandra Santos Baptista

Data de apreciação do parecer: 05/10/2009

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 05/04/2010, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,


Profª. Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP

ANEXO II

FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEUA



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº732, intitulado "BIOENGENHARIA TECIDUAL APLICADA À CARTILAGEM" sob a orientação do Profa. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia, da Faculdade de Odontologia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 01 de outubro de 2015. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de sessenta (60) ratos, e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.

Niterói, 01 de outubro de 2015.

Presidente da C.E.U.A.