



Renata Akemi M. Matsui

**INVESTIGAÇÃO DO SECRETOMA DE
ESFEROIDES EM ENSAIOS *IN VITRO* DE
DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA**

Duque de Caxias

2017

Renata Akemi M. Matsui

**INVESTIGAÇÃO DO SECRETOMA DE
ESFEROIDES EM ENSAIOS *IN VITRO* DE
DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biomedicina
Translacional da Universidade do
Grande Rio como Requisito para a
obtenção do título de Mestre.

Orientadores:

Prof^a Leandra S. Baptista

Prof. José Mauro Granjeiro

Duque de Caxias

2017

Renata Akemi M. Matsui

**INVESTIGAÇÃO DO SECRETOMA DE ESFEROIDES EM
ENSAIOS *IN VITRO* DE DIFERENCIAÇÃO
CONDROGÊNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional da
Universidade do Grande Rio como
Requisito para a obtenção do título de
Mestre.

Aprovado em 19 de Setembro de 2017

Banca examinadora

Prof^a. Gisele Cardoso de Amorim
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a Silas Pessini Rodrigues
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a Paulo Emílio Corrêa Leite
INMETRO

Dedico

Aos meus pais e irmã.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, minha base. Obrigada pela paciência e compreensão nos inúmeros momentos de ausência. Por terem me proporcionado educação e amor pelos estudos. Sou eternamente grata pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha querida irmã, pelo incentivo, força e ajuda nos momentos difíceis da vida.

À minha orientadora, professora Leandra, obrigada pela oportunidade e por todo conhecimento compartilhado. Sempre pronta para atender seus orientandos, seja a hora que fosse ou o País que estivesse. Obrigada por estar sempre presente. Seu apoio e auxílio foram essenciais nesta caminhada.

Ao meu orientador, professor José Mauro Granjeiro, obrigada pela confiança depositada na elaboração deste trabalho.

À equipe do Instituto de Bioquímica e Química de Proteínas- Lyon, em especial a professora Catherine Moali e pesquisadores Sandrine Legoff e Frederic Delolme, pela dedicação e atenção para com este trabalho e pelo apoio científico.

Aos pesquisadores Paulo Beltrão e Soraya Ochs, por toda ajuda, ensinamento e paciência. Obrigada!

À professora Karina, obrigada pela paciência de sempre e por estar presente para sanar minhas dúvidas.

Aos amigos de laboratório Ísis, Mayra, Letícia, Gabriela, Guilherme, Taís, Mayane, Anderson, pelo apoio e por tornarem o laboratório um ótimo ambiente para trabalhar.

Aos amigos que me acompanharam e tornaram essa jornada um pouco mais leve, Natália, Camila, Chayenne, Gerônimo, Marlon, Luths. Obrigada pelas risadas e pelo conforto.

Ao professor Paulo Emílio, pelas sugestões pertinentes para esta dissertação.

Aos professores da banca, agradeço a cortesia em aceitarem integrar a banca de exame dessa dissertação.

À coordenadora da Pós-graduação em Biomedicina Translacional, professora Virgínia Genelhu de Abreu e à secretária Luana Patrocínio e Alan Cruz, pela disponibilidade, ajuda e eficiência por sanar dúvidas junto à pós-graduação.

| Aos funcionários do Numpex, Brunno, Aline, Daniel, Alessandra e Fernanda por sempre estarem dispostos a ajudar e buscar soluções para os nossos problemas.

A todos do laboratório de Biotecnologia do INMETRO, funcionários, secretárias e técnicos.

| A todos os amigos de Cuiabá e familiares que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

Ao apoio financeiro CAPES, CNPq e FAPERJ.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

RESUMO

Introdução: Dor nas articulações causada pela degeneração da cartilagem é um problema grave que afeta milhões de pessoas de todas as faixas etárias. É cada vez mais abundante a realização de estudos que utilizam diferentes metodologias de cultivos celulares tridimensionais (3D) com base em células-tronco estimuladas à diferenciação condrogênica *in vitro*, visando construir um substituto da cartilagem lesionada. **Objetivo:** Comparar o secretoma de células-tronco de tecido adiposo (ASCs, do inglês *Adipose-derived stromal/stem cell*) induzidas à diferenciação condrogênica com células progenitoras de cartilagem (CPCs), de conhecida capacidade de diferenciação condrogênica, em sistema de cultivo 3D livre de arcabouço. Dessa forma, identificar biomarcadores de diferenciação condrogênica a fim de contribuir para a caracterização de esferoides formados pelo sistema de cultivo 3D em hidrogel micromoldado, etapa esta crucial para a utilização dos esferoides em protocolos de medicina regenerativa. **Metodologia:** CPCs de septo nasal humano e ASCs humanas foram expandidas em sistema bidimensional (2D) de cultivo a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e O₂ atmosférico (21% de O₂). Posteriormente, as células foram semeadas em hidrogel de agarose com ressecções moldadas para a formação de esferoides celulares. Esferoides de ASCs foram induzidos para a diferenciação condrogênica, mantendo-os em hipóxia (10% de O₂ e 5% CO₂) a 37°C, em meio indutor de condrogênese. Esferoides de ASCs e de CPCs mantidos em a 37°C com 5% de CO₂ e O₂ atmosférico na ausência de indutores de condrogênese foram utilizados como controle do estado indiferenciado das ASC e como controle positivo da diferenciação condrogênica, respectivamente. Após 21 dias de cultivo, o sobrenadante de cada condição foi coletado e processado para avaliação do secretoma de cada condição através de espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida em tandem (LC-MS/MS) pelo método quantitativo iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitative*). Os dados foram submetidos a uma busca de identificação contra o genoma humano. **Resultados:** O método quantitativo iTRAQ permitiu comparar os secretomas de ASCs induzido *versus* ASCs não induzido e ASCs induzidos contra CPCs.

RESUMO

O resultado desta análise revelou a presença de moléculas que são essenciais para a via condrogênica dentre elas: *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), colágenos dos tipos II, VI e XI, vimentina, proteoglicanos, proteína induzida pelo fator de crescimento, trombospondina, proteína potenciador de procolágeno C-endopeptidase e outras. Tais proteínas são diferencialmente reguladas pelas ASCs induzidas tanto em relação às não induzidas quanto às CPCs. **Conclusão:** Foi possível traçar um perfil do secretoma de ASCs induzidas à diferenciação condrogênica em sistema 3D de cultivo em relação às CPCs, estimando-se a síntese de proteínas e proteoglicanos envolvidos em vários processos biológicos, notadamente no processo de diferenciação condrogênica. Além disso, proteínas envolvidas na diferenciação condrogênica são diferencialmente reguladas de acordo com a fonte de células e a condição de cultivo.

Abstract

Joint pain caused by cartilage degeneration is a serious problem that affects million people of all ages. It is increasingly abundant conducting studies using different methodologies of 3D cell cultures based on stem cells stimulated to chondrogenic differentiation in vitro, with the objective to replacement of the damaged cartilage. **The aim of this study** is to compare the secretome of adipose-derived stromal/stem cells (ASCs) induced to the chondrogenic lineage with cartilage progenitor cells (CPCs) cultured in a 3D cell culture scaffold-free system, focused on the identification of chondrogenic biomarkers in order to contribute to the characterization of the spheroids formed by the 3D scaffold-free culture system as a crucial step to use spheroids for regenerative medicine protocols. Human nasal septum CPCs and ASCs were expanded in a two dimensional culture system at 37°C with 5% CO₂ and atmospheric O₂ (21% O₂). Subsequently, cells were seeded in molded resections of an agarose hydrogel for spheroids formation. ASCs spheroids were induced to the chondrogenic lineage by culture at hypoxia (10% O₂ and 5% CO₂) at 37°C in a chondrogenic inducing medium. ASCs and CPCs spheroids were kept at 37° C with 5% CO₂ and atmospheric O₂, in absence of chondrogenic inducers as a control of the undifferentiated state of ASCs, and as a positive control of chondrogenic differentiation, respectively. After culturing for 21 days, the supernatant of each condition was collected and processed for evaluation of secretome by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Based Targeted Proteomics. (LC-MS/MS) using the quantitative method iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitative). Data collected were submitted to a search against the human genome identity. The quantitative iTRAQ method allowed to compare the secretomes of induced ASCs versus non-induced ASCs and induced ASCs against CPCs. **The result of this analysis** revealed the presence of molecules that are essential for the chondrogenic pathway like: cartilage oligomeric matrix protein (COMP), collagen types II, VI and XI, vimentin, proteoglycans, thrombospondin, Transforming growth factor-induced protein,

Abstract

Procollagen C-endopeptidase enhancer and others. Such proteins are differentially regulated by ASCs induced in relation to non-induced as the CPCs.

As a conclusion, it was possible to trace a profile of the secretome of ASCs induced to the chondrogenic lineage, cultured in a scaffold -free 3D culture system, in relation to CPCs, estimating the synthesis of proteoglycans and proteins involved in various biological processes, particularly in chondrogenesis. In addition, proteins involved in chondrogenic differentiation are differentially regulated in accordance with the source of cells and the conditions of cell culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Figura esquemática dos processos de diferenciação a partir de MSCs.	23
Figura 2. Organização esquemática da cartilagem articular	26
Figura 3. Sucessão de eventos da condrogênese durante o desenvolvimento dos ossos.	27
Figura 4. Esquema dos eventos da diferenciação condrogênica de MSCs.	28
Figura 5. Esquema exemplificando o desenvolvimento da cartilagem articular	30
Figura 6. Figura esquemática evidenciando a identificação de propriedades “tronco” das CPCs.	31
Figura 7. Formação de esferoides em Hidrogeis micromoldados.	34
Figura 8. Disposição topográfica, adesiva e mecânica de um modelo 2D e 3D.	35
Figura 9. Figura esquemática do mecanismo proposto de agregação e organização de MSCs.	37
Figura 10. Esquema de quantificação por Itraq.	41
Figura 11. Formação dos esferoides.	47
Figura 12. Etapas da análise proteômica de esferas de ASCs e CPCs.	51
Figura 13. Confeção do hidrogel micromoldado.	52
Figura 14. Estágios da formação de esferoides a partir da suspensão celular	52
Figura 15. Fotomicrografia por contraste de fase da monocamada de células-tronco de tecido adiposo e células progenitoras de cartilagem do septo nasal humano.	53
Figura 16. A valiação morfológica de esferoides ASCs induzidos, não induzidos e CPCs.	54
Figura 17. Análise ontológica do secretoma de CPCs versus ASCs induzido.	67
Figura 18. Funções do processo celular gerado pelo software Gorilla.	69
Figura 19. Autorradiografia representativo de <i>Western blot</i> .	70

LISTA DE TABELAS E GRÁFICO

Tabela 1. Razão Itraq entre ASCs induzido:CPCs	56
Tabela 2 Proteínas com alta taxa de regulação do secretoma de ASCs induzido versus CPCs	60
Tabela 3- Função das proteínas com alta taxa de regulação no secretoma de ASCs induzidas versus CPCs	61
Tabela 4 Proteínas com baixa taxa de regulação no secretoma de ASCs induzidas versus CPCs	62
Tabela 5 Função Proteínas com baixa taxa de regulação do secretoma de ASCs induzidas versus CPCs	63
Tabela 6 Proteínas com alta taxa de regulação no secretoma de ASCs induzidas versus ASCs não induzido	64
Tabela 7 Função Proteínas com alta taxa de regulação do secretoma de ASCs induzidas versus ASCs não induzido	65
Tabela 8 Proteínas com alta taxa de regulação no secretoma de ASCs induzidas versus ASCs não induzido	65
Tabela 9 Função Proteínas com baixa taxa de regulação do secretoma de ASCs induzidas versus ASCs não induzido	66
Gráfico 1 Análise do <i>Gene ontology</i> (GO) do secretoma de esferas de ASCs induzido versus CPCs	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCs = Células-tronco do tecido adiposo

BiNGO = *Gene Ontology Tool of Biological Networks*

COMP = *Cartilage oligomeric matrix protein*

CPCs = Células progenitoras de cartilagem

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low glucose*

EDTA = Ácido Tetra acético de Etilenediamina

Exp. 1 = Experimento 1

Exp. 2 = Experimento 2

iTRAQ = *Isobaric tags for relative and absolute quantitative*

MEC = *Matrix Extracellular*

OA = Osteoartrite

PBS = *phosphate buffered saline*

PMSF = *phenylmethylsulfonyl fluoride*

PS = Penicilina e estreptomicina

SFB = Soro fetal bovino

TFA = *trifluoroacetic acid*

TSP-1 = Trombospondina

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1 Células- tronco mesenquimais	20
1.2 A utilização das células-tronco do tecido adiposo como uma poderosa ferramenta para a engenharia de tecidos	23
1.3 Principais características da cartilagem do tipo articular	25
1.4 Diferenciação condrogênica	27
1.5 Células progenitoras de cartilagem	31
1.6 Engenharia de tecidos: O uso de arcabouço <i>versus</i> a metodologia livre de arcabouço.....	33
1.7 Buscando simular <i>in vitro</i> a existência <i>in vivo</i> : O cultivo tridimensional de esferoides (3D) de células-tronco e progenitoras	35
1.8 Análise por espectrometria de massas	38
1.9 A importância do secretoma para a engenharia de tecidos.....	40
2. Justificativa	42
3. Objetivos.....	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4. Material e Métodos	45
4.1 Obtenção das amostras	45
4.2 Isolamento das células-tronco estromais de tecido adiposo humano....	45
4.3 Isolamento das células progenitoras de cartilagem do septo nasal humano	46
4.4 Preparo do hidrogel micromoldado para a geração de esferoides tridimensionais de ASCs e CPCs	46
4.5 Cultivo de esferóides.....	47
4.6 Medição dos diâmetro dos esferoides	48
4.7 Filtração e quantificação de proteínas	48
4.8 Leitura no espectrômetro de massas, análise de dados e <i>Western Blot</i>	49

5. Resultados	52
5.1 Biofabricação do hidrogel micromoldado	52
5.2 Caracterização do cultivo de esferoides de ASCs e CPCs	53
5.3 Panorama da análise do processo biológico do secretoma das esferas de CPCs, ASCs não induzido e induzido para a via condrogênica	54
5.4 Relação das proteínas identificadas no secretoma dos esferoides de CPCs versus esferoides de ASCs induzidos	55
5.5 Proteínas com abundância diferencial quando comparado ASCs induzido versus CPCs	59
5.6 Constatação de processos envolvidos durante a diferenciação condrogênica no secretoma de ASCs induzidos para esta via	66
5.7 Confirmação de proteínas através da análise por <i>Western Blot</i>	69
6. Discussão	71
7. Conclusões	87
8. Referências	88
9. Material Suplementar	111

1. INTRODUÇÃO

O fascínio pela capacidade de regeneração de tecidos e órgãos vem desde as primeiras observações de *Prometheus*, um titã grego que furtou o fogo dos deuses do Olimpo com o qual presenteou a Humanidade. Como punição, Zeus ordenou que ele fosse acorrentado por 30 mil anos, durante os quais uma águia lhe destruiria o fígado de dia, ao passo que à noite este órgão regenerava, de modo que o ciclo destrutivo se reiniciava a cada dia (Raggio, 1958).

No entanto, apenas na era moderna, a medicina regenerativa começou a dar os seus primeiros passos, de modo a desenvolver procedimentos terapêuticos que buscam reconstituir tecidos lesados (Badylak and Nerem, 2010).

Uma das abordagens da Medicina Regenerativa é a Engenharia de Tecidos. Esta ciência emergente envolve o estudo e aplicação de metodologias de regeneração ou substituição de tecidos ou órgãos a fim de buscar a sua recuperação permanente, danificado por senescência, degeneração ou trauma (Orlando *et al*, 2013). Seu propósito é também fornecer elementos necessários para a reparação *in vivo* e estimular as capacidades intrínsecas do corpo para a regeneração (Greenwood *et al*, 2006).

Portanto, para se obter uma regeneração de tecido eficiente, esta nova abordagem se utiliza de 3 ferramentas básicas: células, arcabouços e fatores de crescimento, não necessariamente utilizados simultaneamente (Berthiaume *et al*, 2011). Ou seja, a engenharia de tecidos concentra-se no princípio da utilização de: (i) células viáveis, de fácil isolamento e altamente responsivas a diferentes estímulos ambientais, (ii) carreadores/arcabouços adequados para auxiliar o processo de diferenciação *in vitro* e *in vivo* de células e (iii) um conjunto de moléculas bioativas que conduz aos processos de diferenciação e maturação.

O arcabouço fornece estabilidade mecânica e promove um posicionamento espacial das células semeadas ou atraídas para o desenvolvimento do tecido (Schultz *et al*, 2000). Já as células são essenciais para a formação de novos tecidos através da síntese de matriz extracelular (MEC) e portanto, responsáveis pelo equilíbrio e estabilidade desta matriz (Bonassar and Vacanti., 1998).

Encontrar uma fonte de células com características apropriadas para aplicação na medicina regenerativa e engenharia de tecidos ainda representa um gargalo tecnológico, isso porque é desejado atingir um alto número de células

num menor espaço de tempo, explorando seu potencial de divisão e diferenciação (Morrison *et al*, 1997).

Já foi descrito que as células-tronco estromais, também conhecidas como mesenquimais, são caracterizadas como células multipotentes capazes de dar origem a múltiplas linhagens mesodermas como osso, tendão, ligamento, estroma da medula óssea e cartilagem (Caplan, 1991; Sacchetti *et al*, 2007). A habilidade dessas células de sofrerem diferenciação condrogênica enfatiza a promessa visando terapias baseadas em células-tronco no que diz respeito a doenças articulares (Machay *et al*, 2007).

O conceito clássico da engenharia de tecidos é baseado numa abordagem “*top-down*”, onde as células são semeadas num arcabouço criando assim sua própria MEC (Lu *et al*, 2013). A formação da MEC é essencial pois proporciona propriedades químicas, físicas e biológicas para os tecidos, como por exemplo, a transdução de sinais via receptores da superfície celular (Hinderer *et al*, 2015) além de estar em constante remodelamento por células residentes do tecido. Porém, um dos grandes desafios dessa abordagem é a produção em larga escala de arcabouços visando à construção de inúmeros tecidos e também de maior complexidade (Hutmacher, 2000).

O sistema de cultivo tridimensional livre de arcabouço são sistemas pensados em se assemelhar ao ambiente fisiológico do tecido ao permitir uma maior interação célula-célula e interações célula-matriz. Dessa forma, a produção de biomoléculas, na ausência de matriz artificiais, se intensifica (Baraniak and Mc Devitt, 2012). Porém, esse sistema só é possível devido a capacidade intrínseca de tecidos e órgãos de se auto-organizarem. Essa organização espontânea também é observada em células e tecidos, sem a necessidade de aplicação de forças externas (Napolitano, 2007).

Desse modo, sob a ausência de aderência e condições de forças externas as células passam por um processo chamado de auto-montagem, onde compactam por interação célula-célula formando esferoides celulares. Pode haver a fusão entre estes para a formação de tecidos complexos.

Visando analisar o conteúdo proteico que os esferoides de células progenitoras de cartilagem (CPCs) e de células tronco de tecido adiposo (ASCs) secretam, foi realizado um estudo proteômico tendo em vista a análise do sobrenadante dessa cultura tridimensional.

A Proteômica é uma abordagem tecnológica composta por diversas técnicas que permitem a determinação do perfil de expressão global de proteínas, modificações pós-traducionais, localização celular e interações entre elas, a fim de desvendar seus mecanismos funcionais (Yarmush and Jayaraman., 2002; Aebersold and Mann, 2003).

Desse modo, utilizando a mesma nomenclatura, o secretoma emergiu recentemente como uma nova abordagem para descrever o estudo global de proteínas que são secretadas por células, organismos ou tecidos (de mesmo genoma) sob determinadas condições ou em determinado momento. Abordagens de proteômica, principalmente focadas na análise de proteínas secretadas, permitem a identificação de biomarcadores proteicos de modificações celulares tais como a diferenciação ou a progressão de uma doença.

A problemática de se construir biomateriais capazes de transmitir informações físicas, químicas e biológicas, a fim de modular interações de célula-matriz com o objetivo de induzir a formação funcional do tecido, é cada vez mais laborioso. Por outro lado, a produção de estruturas tridimensionais na inexistência de um arcabouço aderente tem sido progressivamente estudado para aplicação na engenharia tecidual. Entretanto, há um hiato na literatura no que tange a identificação de biomarcadores típicos de condrogênese em esferoides de ASCs induzidos para essa via de diferenciação, e o emprego desses dados para fins de uso na terapia celular.

1.1 Células-tronco mesenquimais

Células-tronco mesenquimais de fonte humana (hMSCs, do inglês *human mesenchymal stem cells*), introduzidas por Caplan (1991), são consideradas células multipotentes sendo encontradas em vários tecidos (Rankin., 2012) tais como medula óssea, tecido adiposo (Zuk *et al*, 2001), músculo esquelético (Dellavalle *et al*, 2007) e placenta (Kogler *et al*, 2004). Constituem-se de células aderentes e com potencial de se diferenciar em múltiplas linhagens mesenquimais tais como cartilagem (Schultz *et al*, 2000), osso (Jaiswal *et al*., 1997; Long., 2001), tendão (Yang *et al*, 2013; Pittenger *et al*, 2002) e tecido adiposo (Zuk *et al*, 2002; Baptista *et al*, 2009), além de evidências de que essas

células também são capazes de se diferenciar em linhagens neurogênicas e miogênicas (Richardson *et al*, 2010).

Essas células possuem duas habilidades intrínsecas, características consideradas fundamentais na definição de célula-tronco: a capacidade de se eternizar através de processos de auto-renovação e de gerar tipos celulares especializados ao longo do processo de diferenciação (Baksh *et al*, 2004). Essas características tornam as MSCs um atrativo para o desenvolvimento de novas estratégias para aplicação clínica baseada em terapia celular.

Há muitos questionamentos acerca de onde residem as MSCs, qual seu nicho. O conceito “nicho” foi introduzido pela primeira vez por Schofield em 1978. Este abrange todos os elementos que envolvem as células-tronco, bem como a MEC e moléculas solúveis. A somatória desses elementos colaboram para manter as células-tronco em seu estado indiferenciado (Kolf *et al*, 2007). O nicho protege contra produção excessiva de células-tronco que podem, portanto, culminar na manifestação do câncer. Há fortes evidências de que os pericitos podem ser células nativas de MSC (Caplan, 2017). São relatados como células ramificadas localizadas ao redor de pequenos vasos sanguíneos. Sua função inclui fornecer estabilidade dos vasos sanguíneos, síntese de proteínas da matriz e atividade imunológica (Diaz-Flores *et al*, 2009). Desta maneira, manter o equilíbrio e balanço da atividade e quiescência das células-tronco é uma particularidade de um nicho funcional. Vários estudos descreveram semelhanças entre MSCs e pericitos em termos de fenótipo e expressão gênica (de Souza *et al*, 2016; Shi *et al.*, 2003; Schwab *et al*, 2007; Crisan *et al*, 2008; Zannettino *et al*, 2008; Traktnev *et al*, 2008). A combinação destas células a vasos facilitaria a disponibilidade para o reparo e regeneração tecidual local (Da Silva-Meirelles *et al*, 2006).

Um estudo realizado em 1960 por Friedenstein e colaboradores demonstrou o potencial de diferenciação de várias populações de MSCs derivadas de cachorro, camundongo, rato, coelho e humano, comprovando, então, a capacidade das MSCs de se diferenciar em fenótipos variados incluindo osso, cartilagem, tendão, tecido adiposo e músculo. Em vista disso, ao longo dos anos, tornou-se claro que o uso de MSCs poderia ser a essência de um poderoso “sistema natural de reparo tecidual” (Phinney and Prockop, 2007). Atualmente,

são consideradas ótimas candidatas para o reparo local de osso (Freitas *et al*, 2017), cartilagem (Go *et al*, 2017) e tendão (Tan and Schon., 2016).

Como já mencionado acima, uma característica relevante das MSCs é o seu potencial de diferenciação. Contudo, o mecanismo molecular que governa essa diferenciação não é totalmente compreendido. Fundamentado em informações genéticas através de vários estudos, Baksh e colaboradores (2004) propuseram um modelo para a regulação da diferenciação das MSCs (Fig. 1).

Como primeira etapa, as MSCs passam por uma modificação transcricional, gerando células precursoras sem alterar o fenótipo e a capacidade de auto-renovação. Grande parte das MSCs cultivadas *in vitro* permanecem quiescentes até serem estimuladas, como por exemplo, através de fatores de crescimento. Após estimulação, MSCs sofrem divisão originando duas células-filha, sendo uma réplica exata da célula-mãe e a outra uma célula precursora, sendo esta mais restrita em seu processo de desenvolvimento.

Nesse modelo proposto por Baskh, a célula precursora se divide gerando uma célula bipotente e tripotente que se assemelham morfologicamente às MSCs, mas diferem por ter um outro conjunto de transcrição gênica. A transição de compartimentos, célula-tronco para célula comprometida, se inicia quando as células se dividem simetricamente, gerando então células progenitoras unipotentes e simultaneamente a obtenção de linhagens específicas.

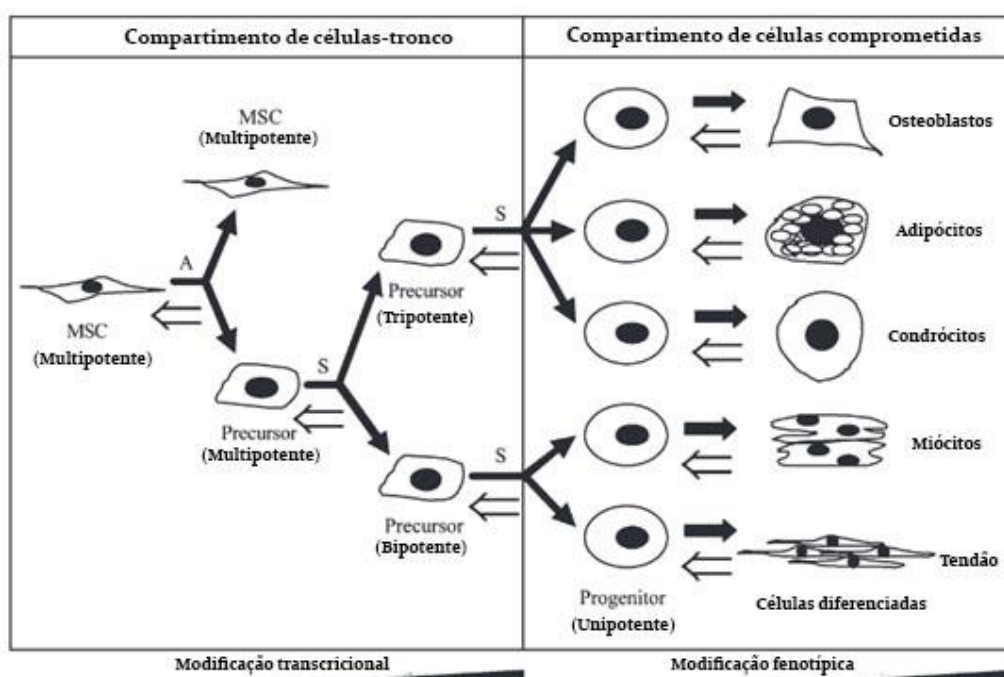


Figura 1. Figura esquemática dos processos de diferenciação a partir de MSCs. MSCs não comprometidas percorrem duas etapas até atingir seu fenótipo específico. Uma etapa é a de modificação transcricional e outra de modificação fenotípica. No primeiro quadrante, MSCs multipotentes dão origem a uma população de células precursoras através de divisões assimétricas (A), que por fim gera mais células precursoras com um potencial de diferenciação limitado através da divisão simétrica (S). Ainda no compartimento celular comprometido, as células bi ou tripotentes continuam a se dividir simetricamente gerando células progenitoras bi ou unipotentes, com orientação celular já estabelecida, dando origem a células completamente diferenciadas (Baksh *et al*, 2004).

1.2 A utilização das células-tronco do tecido adiposo como uma poderosa ferramenta para a engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos tem o potencial de contrapor a crise da carência de órgãos e tecidos, beneficiando milhões de pessoas que estão na fila a espera por um órgão saudável (Fuchs *et al*, 2001). Porém, encontrar uma fonte de células com características apropriadas para aplicação em medicina regenerativa e engenharia de tecidos ainda representa um gargalo tecnológico, tendo em vista a necessidade de se obter um grande número de células em um menor espaço de tempo, explorando o potencial de proliferação celular e sua eficiência terapêutica (Tabata, 2001).

Desta forma, uma alternativa seria a utilização de células-tronco/estromais do tecido adiposo humano (ASCs, do inglês *Adipose stem cells*), obtidas a partir de lipoaspirados oriundos de cirurgia eletiva para fins estéticos. Uma das grandes vantagens de se utilizar ASCs para a engenharia tecidual é sua capacidade de auto-renovação e potencial de diferenciação para as linhagens mesodérmicas (Strem *et al*, 2005). Entretanto, possuem características distintas com relação à regeneração de acordo com o estado de obesidade de cada paciente e da perda de peso dos mesmos (Baptista *et al*, 2009; Silva *et al*, 2015).

Pesquisas realizadas com células-tronco adultas estão sendo cada vez mais aprimoradas, e representam um forte potencial para a fabricação de tecidos humanos *in vitro*, uma vez que possuem alto potencial de diferenciação e secreção de fatores envolvidos com processos morfogênicos (Langer, 2007).

O tecido adiposo, tal como a medula óssea, tem origem no mesênquima embrionário e possui um estroma de fácil isolamento. Estudos já demonstraram que o tecido adiposo contém uma vasta população de células heterogêneas

denominada fração vascular estromal (*stromal vascular fraction- SVF*). Estas podem ser cultivadas e expandidas, evidenciando uma população de células aderentes, as ASCs. Estudos relacionados ao uso de SVF e ASCs tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos, evidenciando a eficácia e segurança do uso dessas células em modelos animais. Devido a sua plasticidade, podem se diferenciar em diversas linhagens celulares como a adipogênica, condrogênica, osteogênica, miogênica (Yu *et al*, 2010; Zuk *et al*, 2002; Baptista *et al*, 2009; Lee *et al*, 2011; Baptista *et al*, 2013; Deshpande *et al*, 2015).

A indução à diferenciação condrogênica dessas células *in vitro* se dá conforme a adição de um coquetel específico de mediadores solúveis (Bunnell *et al*, 2008) tais como ácido ascórbico, insulina, dexametasona, ITS (Insulin-Transferrin- Selenium) e TGF- β (transforming growth factor- β). O papel do ácido ascórbico é de estimular a produção de colágeno afetando diretamente na diferenciação em condrócitos. Além disso, o ácido ascórbico é um antioxidante conferindo proteção aos condrócitos contra radicais tóxicos e peróxidos (Haart *et al*, 1999; Leboy *et al*, 1997). A insulina é um suplemento hormonal. A dexametasona em associação com TGF- β 3, potencializa a diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais, pois aumenta a produção de proteoglicanos e a expressão de agregan, colágeno tipo II e colágeno tipo XI (Derfoul *et al*, 2006). A adição de ITS em meio isento de soro é necessário para fornecer nutrientes suficientes para a diferenciação de MSC em condrócitos. A transferrina serve como uma proteína de ligação para hormônios e nutrientes. O selênio é um cofator de glutathione peroxidase essencial para a proliferação celular. Por estas razões, o ITS é um importante suplemento na cultura de células em condições reduzidas de soro.

Consequentemente, as ASCs irão secretar proteínas referentes à cartilagem, como o colágeno tipo II, colágeno tipo VI, agregan e proteína da matriz da cartilagem oligomérica (COMP, do inglês *Cartilage oligomeric matrix protein*), quando mantidas em condições de cultura apropriada e próximo a 2 semanas (Gimble and Guilak., 2003).

Essa característica multipotente e seu potencial para a diferenciação condrogênica gera um enorme interesse na comunidade científica pois sugere que essas células podem proporcionar uma abundante fonte de células

autólogas para desenvolver abordagens na engenharia de tecidos, atuando no reparo ou substituição da cartilagem. Dessa maneira, há uma grande expectativa em estudos utilizando ASCs visando a geração de cartilagem, podendo ser um tratamento alternativo e com grandes vantagens socioeconômicas. No entanto, em nosso grupo de pesquisa, ainda não foi estabelecido um construído com características de cartilagem madura *in vitro* a partir de ASCs (Baptista *et al*, 2013).

1.3 Principais características da cartilagem do tipo articular

Há três tipos de cartilagem que se diferenciam pelo conteúdo molecular da matriz extracelular, sua localização e função:

- Cartilagem hialina, tem sua MEC composta por água, proteoglicanos e colágeno tipo II predominante, que recobrem as extremidades dos ossos longos de articulações sinoviais ou cartilagem do septo nasal (Woodfield *et al*, 2002)
- Cartilagem elástica, que se distingue por apresentar elastina na MEC (Stoltz, *et al*, 2012)
- Cartilagem fibrosa, cuja fibras de colágeno tipo I são predominantes em sua MEC (Kierszenbaum and Tres, 2012)

Estes três tipos de cartilagem diferem pela composição molecular e organização da MEC, sendo a cartilagem do tipo hialina a mais prevalente. Composto a cartilagem hialina está a cartilagem articular, mais comum e mais estudada, caracterizada por revestir a articulação diartroidal (Ross *et al*, 2003) e fornecendo uma camada fina, lisa e resistente durante a fricção entre a articulação. Permitindo que estas se movam suavemente e sem causar dor à pessoa (Kiani *et al*, 2002). Sendo assim, uma das características da articulação diartroidal é suportar uma enorme força de fricção e, portanto, se localiza na maioria das articulações esqueléticas encontradas em organismos vertebrados. Portanto, a cartilagem hialina é um tecido conectivo liso e resistente, que funciona tanto como uma superfície deslizante como o de suportar uma grande quantidade de peso. É composta principalmente por células denominadas condrócitos, responsáveis pela produção, organização e manutenção da MEC (Palukuru *et al*, 2014).

A cartilagem articular é dividida em 4 camadas horizontais distintas: (i) camada superficial (ii) camada transitória (iii) camada profunda (iv) camada calcificada (Fig. 2). A camada superficial é caracterizada por condrócitos em forma de disco, baixa presença de proteoglicanos e densas camadas de fibras de colágeno dispostas uniformemente que confere característica da cartilagem hialina. Na camada transitória, os condrócitos possuem formato arredondado. Há um aumento de proteoglicanos e os colágenos se encontram dispostos em 'x', cruzados entre si, a fim de fornecer uma transição entre as camadas transitória e profunda. A camada profunda se distingue das demais por possuir condrócitos arredondados dispostos em coluna e maior quantidade de proteoglicanos. Por fim, a camada calcificada é definida por condrócitos arredondados em lacunas não calcificadas, ausência de proteoglicanos e fibras de colágeno (Poole, 1993).

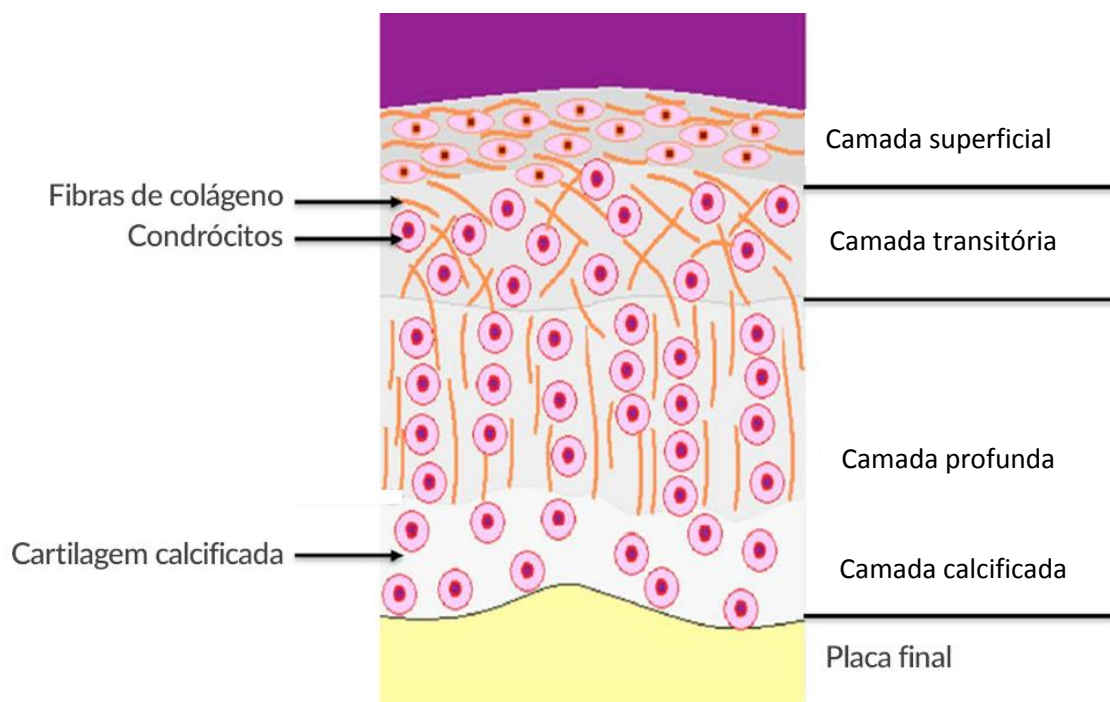


Figura 2. Organização esquemática da cartilagem articular. Zona Superficial: resistente ao cisalhamento devido à disposição tangencial. Baixa atividade metabólica e, portanto, baixo potencial de cura. Zona de transição: resistente à compressão, alta concentração de colágeno dispostas obliquamente em ângulos retos entre si. Zona radial: resistente à compressão, esta zona contém as fibrilas de colágeno de maior diâmetro, a concentração mais elevada de proteoglicanos, e a concentração mais baixa de água. As células são dispostas em colunas. Zona Calcificada: atua como uma âncora entre cartilagem articular e subcondral (Stoltz *et al*, 2012).

Há predominantemente 2 tipos principais de moléculas que são secretadas por condrócitos que compõem a cartilagem hialina: proteoglicanos e fibras de colágeno. Apesar do colágeno tipo II ser o principal constituinte, estão presentes também o colágeno tipo IX, XI e tipo VI (Luo *et al*, 2017; Upholt *et al*, 1989). Há também dois tipos de proteoglicanos que prevalecem na matriz extracelular: decorina e agrecan (Poole *et al*, 2005).

1.4 Diferenciação condrogênica

A condrogênese é o primórdio da fase de desenvolvimento esquelético. Esta envolve a migração e recrutamento de MSCs, condensação de células progenitoras e diferenciação e maturação dos condrócitos sucedendo na formação da cartilagem e osso, durante o processo de ossificação endocondral (Colnot, 2005).

Um dos primeiros eventos da condrogênese, agregação das MSCs condroprogenitoras originando a condensação de pré-cartilagem, foi primeiramente descrita por Fell em 1925. Este processo é dependente de sinais que se iniciam através de interações célula-célula e célula-matriz, assim como a secreção de fatores de crescimento e sua interação com seu respectivo receptor além de uma intensa mudança na arquitetura do citoesqueleto (Figura 3).

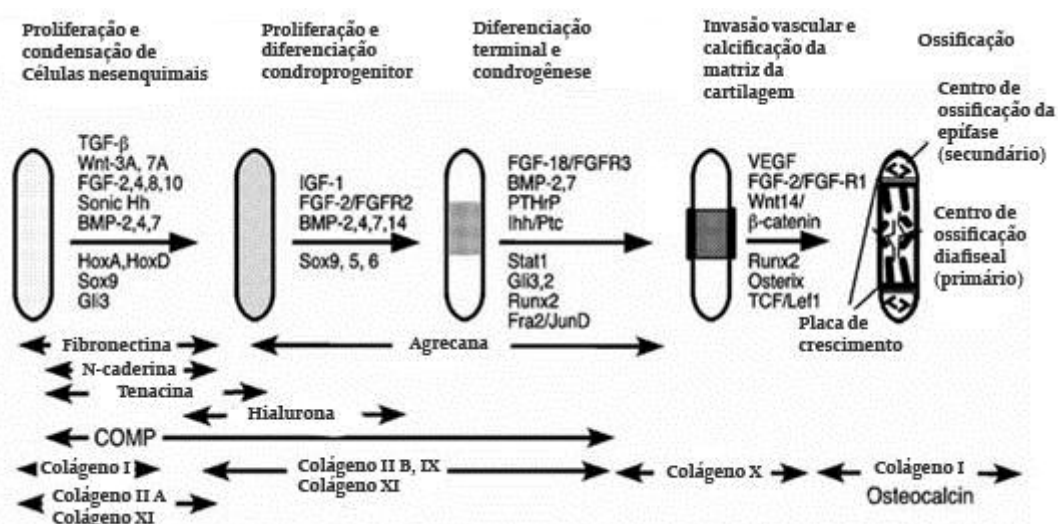


Figura 3. Sucessão de eventos da condrogênese durante o desenvolvimento dos ossos. Diferentes estágios da diferenciação são apresentados esquematicamente, evidenciando padrões de crescimento, fatores de diferenciação e transcrição envolvidos. As proteínas da matriz extracelular que diferem nos diferentes estágios também estão evidenciados. (Goldring *et al*, 2005).

Antes da condensação, há uma enorme síntese de MEC rica em hialuronano e colágeno tipo I, através das células mesenquimais pré-condrocíticas. O início de fato da condensação de MSCs, etapa crucial para a condrogênese, está intimamente ligada ao aumento da atividade da hialuronidase e ao surgimento de moléculas de adesão celular como a caderina (N-caderina) e moléculas de adesão de células neurais N-CAM (*Neural-cell adhesion molecules*) (Tavella., 1994).

A diferenciação condrogênica de MSCs abrange a síntese de glicosaminoglicano e deposição de MEC acompanhada de uma radical mudança na morfologia da célula. Este processo se deve à três fatores primordiais: i) morfologia tridimensional (Solursh., 1991), ii) baixa tensão de oxigênio (Grimshaw and Mason., 2000), e iii) presença de fatores de crescimento adequados como TGF- β (*transforming growth factor*). Trata-se de um importante fator de crescimento que está entre os primeiros sinais na condensação condrogênica. TGF- β 2 e TGF- β 3 são mais eficazes na indução condrogênica que o TGF- β 1, proporcionando um maior acúmulo de glicosaminoglicanos e posteriormente de colágeno tipo II (Fig. 3). Este estimula a síntese de fibronectina que por sua vez regula N-CAM. Vários componentes da MEC de um tecido cartilaginoso são depositados em MSCs expostas ao TGF- β 3, incluindo agrecan, fibromodulina, COMP, colágeno tipo II e condroaderina (Fig. 4). Já a decorina e moléculas da MEC, como tenascinas, trombospondina e COMP interagem com as moléculas de adesão celular para ativar vias de sinalização intracelular e dar início à transição de células condroprogenitoras para um condrócito totalmente maduro (DeLise *et al*, 2000).

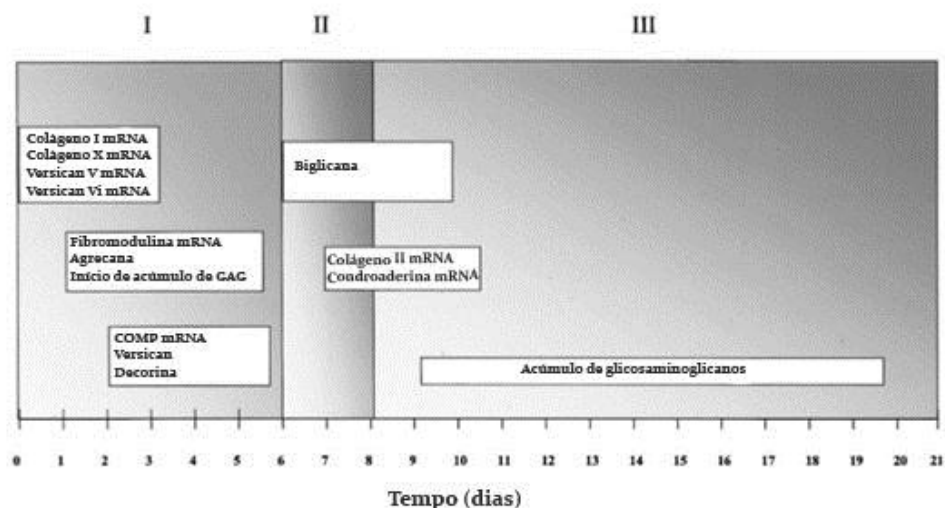


Figura 4. Esquema dos eventos da diferenciação condrogênica de MSCs. Determinação sequencial e temporal de componentes da MEC (Barry *et al*, 2001).

O desenvolvimento da cartilagem articular se sucede através da justaposição da articulação sinovial. O processo é constituído de 2 etapas. A primeira se baseia na condensação pré-condrogênica mesenquimal e na sua diferenciação em um esqueleto cartilaginoso. Já a segunda etapa determina a formação das estruturas articulares e o espaço entre elas. Os condrócitos residentes na zona de junção passam por processo de mudança fenotípica seguido de degeneração celular e morte (Mitrovic, 1978), culminando na formação de uma interzona que separa e define o esqueleto cartilaginoso. Esta etapa de formação da interzona ainda é pouco elucidada, não se sabe ao certo se a interzona se origina da transdiferenciação de condrócitos em MSCs ou da migração de MSCs para o sítio da junção, ou até mesmo de ambas maneiras (Pacifci *et al*, 2000).

Dando continuidade ao processo, à proporção que o desenvolvimento continua, a interzona se discrimina em 3 camadas de tecido: duas camadas de pericôndrio na extremidade cartilaginosa da epífase e outra camada com pouco tecido com função de separar os elementos. Análises feitas das células dessa camada de separação sugerem função na geração de estruturas associadas à articulação, enquanto que as células associadas à camada do pericôndrio são condrogênicas (Mitrovic, 1978; Mankin, 1964).

As células residentes no interior dessas camadas proliferam e se diferenciam em condrócitos, contribuindo para o crescimento epifisário. Apesar dessa etapa ser bem descrita na literatura, ainda há uma lacuna acerca da origem dos condrócitos articulares. Especula-se que esses condrócitos não se originam das condensações mesenquimais, mas sim da interzona mesenquimal. Estes condrócitos, mais próximos da epífase, supostamente adquirem propriedades fenotípicas diferenciadas através de sinais adjacentes de maneira a evitar sua maturação, hipertrofia e ossificação, persistindo, portanto, como célula ativa e funcional durante sua permanência no tecido (Figura 5) (Pacifci *et al*, 2000).

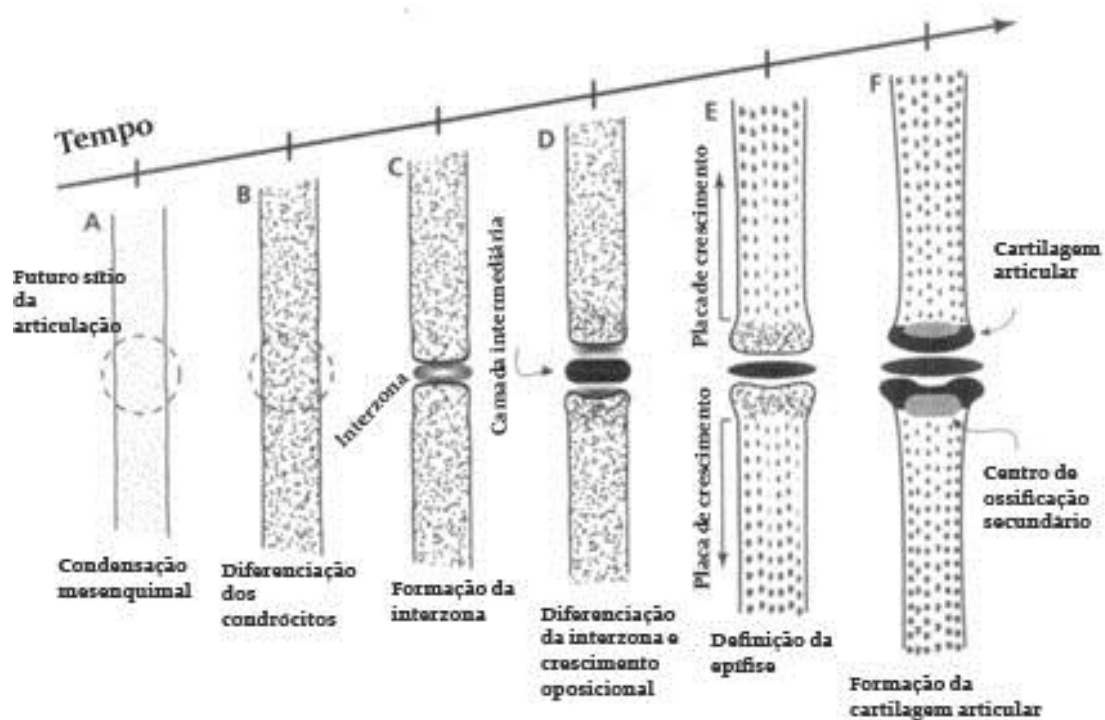


Figura 5. Esquema exemplificando o desenvolvimento da cartilagem articular. Em A, ocorre a condensação mesenquimal para a formação da junção da articulação. Em B, a diferenciação das MSCs. Em C, a formação da interzona. Na etapa D, a formação de uma zona intermediária e duas camadas condrogênicas que auxiliam para o crescimento longitudinal da epífase. No passo E, a formação da epífase e formação de placas de crescimento tornando o mecanismo fundamental para o crescimento longitudinal. Na última etapa, F, ocorre a formação dos condrócitos articulares (Pacifici *et al*, 2000).

Por fim, os condrócitos localizados no centro da região cartilaginosa são estimulados a proliferar e avançar através de estágios de maturação e hipertrofia. São, portanto, substituídos por osteoblastos, iniciando a formação do tecido ósseo (DeLise and Tuan, 2000).

Logo após a diferenciação condrogênica, os condrócitos aumentam consideravelmente de tamanho. Os condrócitos, agora hipertrofiados, são responsáveis por secretar diferentes moléculas na MEC. A mudança mais radical observada na MEC de condrócitos hipertrofiados é a presença do colágeno tipo X (Von Der Mark *et al*, 1992), considerada um marcador específico deste tipo celular, descrito por Schmid & Conrad em 1982. A formação da cartilagem hipertrófica ocorre em torno de uma camada de células indiferenciadas, que durante o desenvolvimento, dará origem aos osteoblastos.

1.5 Células progenitoras de cartilagem

Na superfície da cartilagem articular é possível observar uma população de células progenitoras de cartilagem (CPC) (Dowthwaite, 2004). Estas foram identificadas, isoladas e consequentemente averiguada a expressão de marcadores de superfície relacionadas com células-tronco mesenquimais, capacidade de auto-renovação. Além da sua capacidade de diferenciação em diversas linhagens além da habilidade de migração para sítios de lesão (Fig. 6).

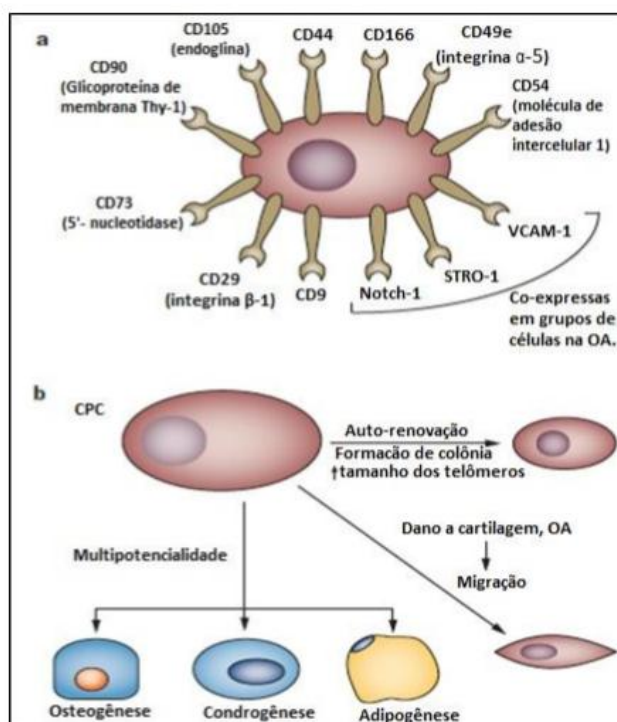


Figura 6. Figura esquemática evidenciando a identificação de propriedades “tronco” das CPCs. (A) Expressão de marcadores de superfície compartilhado com marcadores de célula-tronco mesenquimais. (B) Propriedade multipotente das CPCs. Quando o tecido sofre dano, há migração dessas células ao local injuriado (Jiang & Tuan, 2015).

De modo similar às células-tronco, células progenitoras podem se dividir por períodos de tempo prolongados, mantendo seu estado indiferenciado (Morrison *et al*, 1997).

Nesse contexto, a fonte celular utilizada em engenharia de tecidos é obtida a partir de uma biópsia do tecido saudável que é então dissociada para o isolamento e manutenção das células em cultivo. A fonte do tecido doado pode

ser *i*) autóloga (fonte derivada do próprio paciente) ou *ii*) heteróloga. Como as células autólogas são melhores aceitas pelo sistema imunológico, estas se tornam as melhores escolhas (Hipp and Atala, 2008; Berthiaume *et al*, 2011).

Atualmente, a única terapia celular aprovada pela *Food and Drugs Administration*(EUA) visando o reparo da cartilagem em modelos clínicos em humanos é o transplante autólogo de condrócitos maduros. Porém, a limitada capacidade proliferativa dos condrócitos aliada ao decréscimo do seu potencial de diferenciação (Dozin *et al*, 2002) torna esse tipo de terapia um tanto quanto desfavorável.

De forma alternativa, células progenitoras de cartilagem (CPCs) do septo nasal humano foram descritas pelo o nosso grupo de pesquisa (Amaral *et al.*, 2012) e localizam-se na superfície da cartilagem do septo nasal humano. Foi descrito também que na ausência de fatores de crescimento condrogênicos no sistema de cultura, possuem capacidade de sintetizar glicosaminoglicanos sulfatados além de produzir grandes quantidades de colágeno tipo II. Uma vantagem dessa fonte celular é sua alta taxa de proliferação *in vitro* e potencial intrínseco para diferenciação condrogênica.

Quando CPCs são cultivadas em um sistema tridimensional livre de arcabouço, como por exemplo no método de *pellet*, sua diferenciação condrogênica é otimizada evidenciando ser uma excelente fonte em protocolos na engenharia de tecidos (Baptista *et al*, 2013). Entretanto, a desvantagem de se utilizar esse tipo de fonte celular reside no fato da aquisição de quantidade limitada de amostra de septo nasal durante procedimento de rinoplastia, resultando em baixa quantidade de células adquiridas. Além disso, o procedimento cirúrgico para obtenção da cartilagem do septo nasal é bastante invasivo.

1.6 Engenharia de tecidos: o uso de arcabouço versus a metodologia livre de

Como já abordado, a engenharia de tecidos tem como objetivo a restauração de tecidos danificados ou degenerados. Esta ciência visa mimetizar a complexidade do tecido nativo a fim de impulsionar a completa restauração e funcionalidade do tecido. Atualmente, há duas abordagens que prevalece no

meio científico quanto a biofabricação de tecidos e órgãos: utilização de arcabouço ou livres de arcabouço.

A utilização do método baseado no uso de um arcabouço requer um rigoroso controle do arcabouço a ser empregado como a porosidade, forma, rigidez, elasticidade entre outros já que a substituição do tecido é alcançada a partir de células em arcabouços tridimensionais encarregadas de desenvolver funcionalidade ao tecido ao serem implantadas *in vivo*. Ademais, é suposto o arcabouço se degradar por completo e se integrar no tecido no qual foi implantado. Há vários trabalhos utilizando essa técnica, reconstruindo inúmeros tipos de tecidos como osso, cartilagem e bexiga (Van Tienen *et al*, 2009; Kerker *et al*, 2008). Não obstante, esse tipo de abordagem apresenta alguns desafios como o controle da imunogenicidade, inflamação resultante da biodegradação do biomaterial, propriedades mecânicas do arcabouço para o tecido circundante, introdução de um número limitado de células e sua distribuição uniforme no arcabouço. Por conseguinte, pesquisadores desenvolveram métodos alternativos como a abordagem de *self-assembly* ou auto-montagem das células, onde células individuais se organizam em subunidades multicelulares, como por exemplo, esferoides (Norotte *et al*, 2009).

Já a utilização do método livre de arcabouço, no qual se baseia o presente estudo, é possível considerando a capacidade intrínseca de tecidos e órgãos de auto-organização, explorando a adesão célula-célula e a capacidade das células cultivadas desenvolverem sua própria MEC. Isso reduz possíveis respostas pró-inflamatórias. Um exemplo do método de *self-assembly* e livre de arcabouço é abordado neste trabalho, onde hidrogéis não aderentes micromoldados formam esferoides através da utilização de molde contendo ressecções arredondadas na parte inferior. A suspensão celular é semeada sob este molde seguido de decantação e originando um único esferoide por ressecção (Figura 7) (Napolitano *et al*, 2007; Achilli *et al*, 2012).

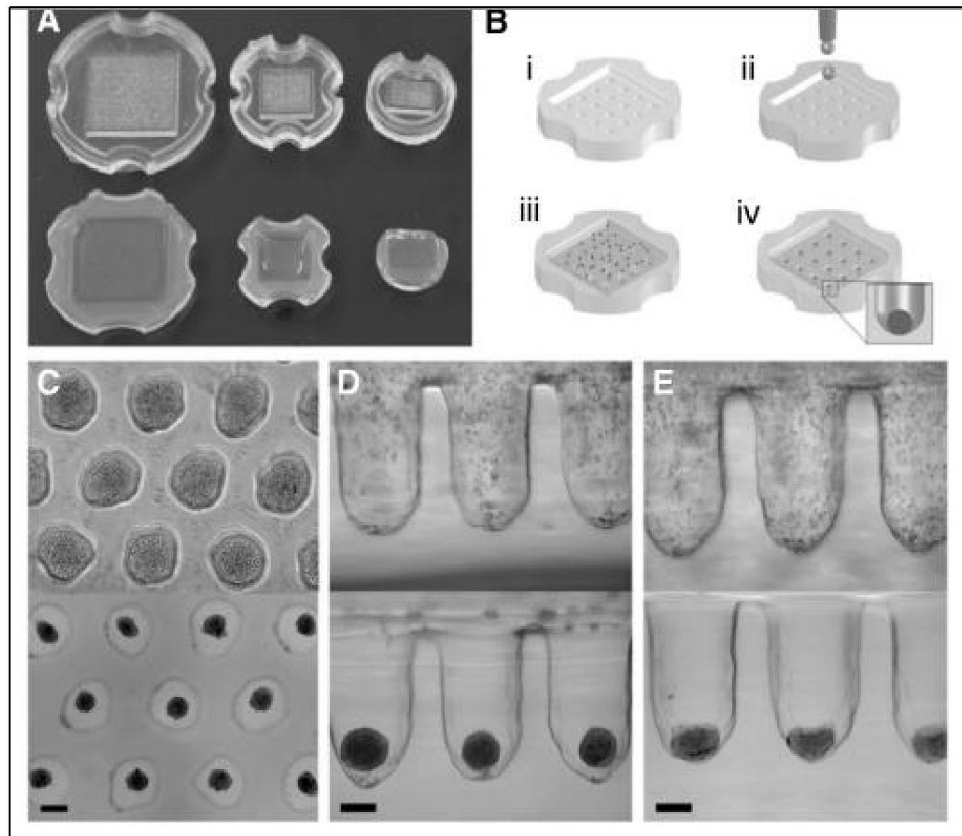


Figura 7. Formação de esferoides em Hidrogeis micromoldados. (A) Poli-dimetil-siloxano (PDMS) é utilizado para fabricar os hidrogeis micromoldados. (B) Protocolo de semeadura das células. (Bi) Hidrogel micromoldado e equilibrado em meio de cultura. (Bii) Semeadura das células no interior do hidrogel micromoldado. (Biii) Decantação das células nas microrressecções sob a força gravitacional. (Biv) Visão geral da formação do esferoide em uma única ressecção. (C) Fotomicrografia de esferoides de fibroblasto humano. Na figura superior, células decantam no interior das ressecções minutos após o plaqueamento e na figura inferior, 24 horas após o plaqueamento. (D) Visão lateral dos esferoides no interior das ressecções e (E) células de hepatoma de camundongo. Barra de aumento 200 μm (Napolitano *et al*, 2007).

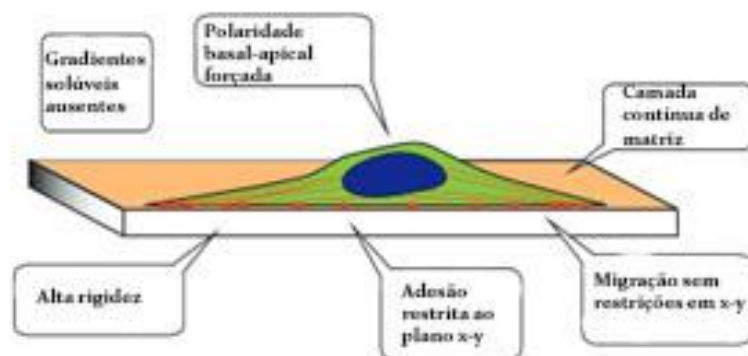
1.7 Simulando *in vitro* a existência *in vivo*: O cultivo tridimensional de esferoides de células-tronco e progenitoras

A tecnologia de cultivo celular em duas dimensões (2D), típicas monocamadas de células, tem sido rotineiramente utilizadas por inúmeros laboratórios em todo mundo. Porém, o cultivo de células em 2D não reproduz a morfologia de um tecido para estudos mais profundos sobre a biologia e fisiologia celulares. Com isso, tecnologias de cultivo celular em sistema tridimensional (3D) revolucionaram a compreensão do comportamento celular e tornaram mais madura e relevante a concepção da fisiologia humana e animal, pois simula a

sua existência *in vivo* (Pampaloni *et al*, 2007; Khoruzhenko, 2011; Breslin and O'Driscoll, 2016).

As células residentes em tecidos no corpo humano interagem com células vizinhas e com a MEC, estabelecendo assim uma organização 3D. Estas interações formam uma complexa rede de comunicação de sinais mecânicos e bioquímicos, essenciais para a fisiologia celular. Consequentemente, é comum a perda de propriedades específicas do tecido em uma cultura em monocamada (Figura 8) (Griffith *et al*, 2007; Pampaloni *et al*, 2007).

Modelo de cultivo 2D



Modelo de cultivo 3D

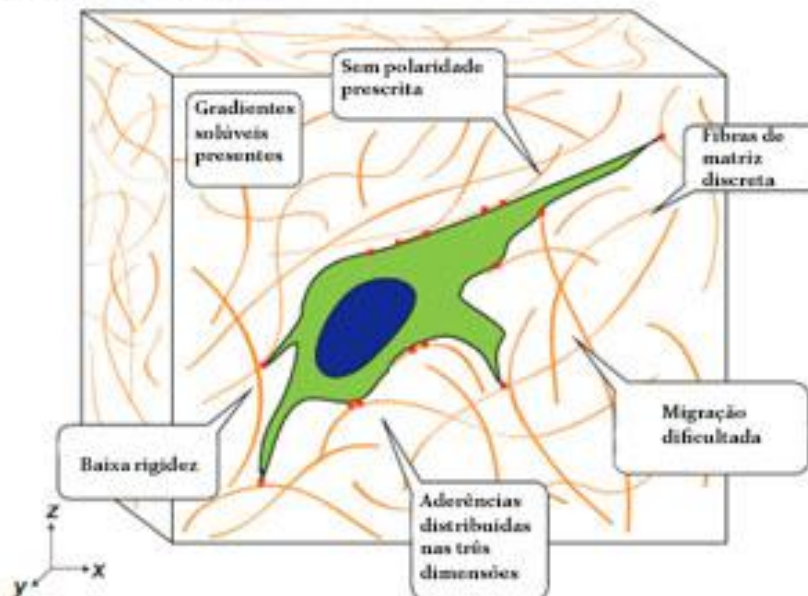


Figura 8. Disposição topográfica, adesiva e mecânica de modelo de cultivo 2D e 3D. A singular disposição da MEC de uma célula aderente ao plástico, cultivo 2D, e uma típica disposição da MEC em 3D, como o colágeno (Baker and Chen, 2012).

Para a engenharia de tecidos livre de arcabouços, é importante que seja utilizado um método simples e reprodutível para a geração de esferoides. Os critérios para a seleção do método incluem a eficiência na produção, tamanho uniforme dos esferoides, conveniência e possível adequação para futuras aplicações (Lin and Chang, 2008). Uma desvantagem das atuais técnicas comumente utilizadas para a geração de esferoides se dá pelo fato de serem técnicas não escalonáveis.

Visando transpor esta barreira, hidrogéis micromoldados não aderentes de agarose ultra-pura são uma alternativa para a fabricação em larga escala de esferoides, onde células são semeadas alcançando a produção de até centenas de esferoides uniformes em seu diâmetro, garantindo homogeneidade do perfil de cada um dos esferoides em um mesmo hidrogel micromoldado (Napolitano *et al*, 2007).

Quando estas células são cultivadas em uma superfície não aderente, são capazes de estabelecer interações com as células vizinhas, via caderinas, iniciando um processo denominado auto-montagem (*self-assembly*), culminando na formação de esferoides celulares (Tzanakakis *et al*, 2001; Figura 9).

Curiosamente, estudos confirmaram uma maior eficiência da diferenciação condrogênica quando células de ASCs são cultivadas em modelo 3D em oposição ao cultivo 2D. Erickson e colaboradores (2002) verificaram maior presença de colágeno tipo II e tipo VI, agrecana e outros proteoglicanos em ASCs cultivadas em modelo 3D em meio de indução condrogênica. Quando comparado com o cultivo 2D, notou-se redução dessas moléculas. O sistema de cultivo 3D é vantajoso, pois as células possuem maior interação célula-célula, similar ao que ocorre na etapa de condensação mesenquimal durante o desenvolvimento da cartilagem no embrião (Erickson *et al*, 2002).

No presente estudo, foram utilizados como construtos livres de arcabouços, esferoides fabricados em hidrogéis de agarose micromoldados a partir de ASCs e CPCs.

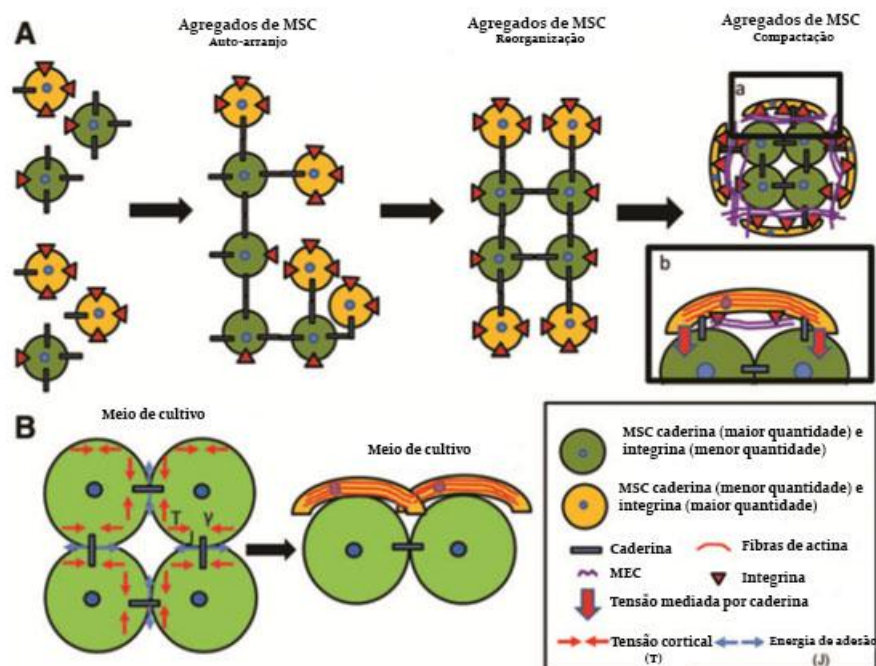


Figura 9. Figura esquemática do mecanismo proposto de auto-montagem e organização de MSCs em esferoides. (A) População de células com alta expressão de caderinas e integrinas. A montagem inicial é mediada por interações caderina-caderina. Estas atuam como ponto de ancoragem para o citoesqueleto e intermedeiam o aumento da tensão na interface do agregado celular. Em decorrência dessa tensão e da interação integrina-MEC, há a formação de esferoides e a organização das fibras de estresse de actina. (B) A tensão cortical (T) se iguala à tensão interfacial (γ) que tem como consequência um aumento da tensão cortical (T), intensificando a polimerização da actina na extremidade dos esferoides (Sart *et al.*, 2013).

1.8 Análise por espectrometria de massas

As análises de proteínas baseada em espectrometria de massas (MS) abrange a digestão de proteínas em peptídeos. O mecanismo de pré-fracionamento ajuda consideravelmente a reduzir a complexidade da análise quando são analisadas amostras biológicas altamente complexas. Uma estratégia comumente realizada é a utilização do GeLC-MS/MS, cujo método consiste da separação de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida da digestão dessas proteínas retidas no gel com tripsina, extração dos peptídeos e análise destes através de LC-MS/MS (Wang *et al.*, 2010). Porém, esta técnica traz uma desvantagem. Como cada pedaço de gel é analisado em aquisições independentes, consequentemente acarreta em tempo maior de uso do equipamento para a análise desses fragmentos, além da perda de proteínas

aprisionadas na matriz. Isso resulta em uma pobre cobertura de sequência (Jonsson *et al*, 2001).

Por conseguinte, a técnica de *shotgun* é amplamente utilizada como um método de análise de um conjunto de proteínas sem nenhuma separação prévia. Esse método foi escolhido e utilizado no presente estudo pois abrange um maior número de identificação de proteínas, fornecendo caracterização integral do perfil proteico do sobrenadante de esferoides de CPCs e ASCs, induzidos e não induzidos para a via condrogênica. Este método de digestão de proteínas oferece elevada cobertura da amostra (Olsen *et al*, 2006) e, por essa razão, pode substituir progressivamente a separação de proteínas em gel. A solução de proteínas é submetida à digestão proteolítica, geralmente por tripsina, em solução, onde é diretamente injetada no cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas. Após a separação dos peptídeos por fase reversa, estes são ionizados e sequenciados por MS/MS (Hass *et al*, 2006).

A cromatografia líquida (LC) é uma tecnologia utilizada há muitos anos e várias modificações foram realizadas ao longo do tempo. Um deles foi a introdução do *electrospray* (ESI). Esta abordagem consiste na formação de um *spray*, formando pequenas gotículas nebulizadas contendo peptídeos altamente carregados. Estes deixam o cromatógrafo na fase líquida e entra no espectrômetro de massas na fase gasosa. Isso permite que uma grande diversidade de moléculas seja transferida para a fase gasosa sem fragmentação, incluindo moléculas grandes como as proteínas (Fenn *et al*, 1989). Outro avanço de grande importância foi com a miniaturização do emissor ESI, conferindo um menor fluxo no LC tal qual as quantidades de amostra, fornecendo evidente aumento na sensibilidade (Wilm and Mann, 1994; Emmett and Caprioli, 1994).

O método chamado *bottom-up* é um tipo de experimento de proteômica habitualmente utilizado. Esta técnica consiste, inicialmente, da digestão enzimática de uma amostra proteica em peptídeos, através do uso de proteases, sendo geralmente tripsina (Chait, 2006). Consequentemente, a complexidade da amostra é aumentada pois cada proteína gera inúmeros peptídeos. Todavia, é uma abordagem favorável, posto que é mais suscetível à introdução à fase gasosa, apresentando melhor relação massa/carga (m/z) às habilidades do espectrômetro de massas gerando bom espectro de fragmentação.

Dessa maneira, os íons em fase gasosa provenientes da fonte *electrospray* acoplada ao cromatógrafo líquido, são introduzidos no interior do espectrômetro de massas, o qual mede o número de íons da razão massa/carga de um analito. O presente trabalho utilizou o analisador de massas *Orbitrap – Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific), responsável por identificar e analisar proteínas, peptídeos e outras moléculas com alta precisão em tempo reduzido. Este sistema combina um quadrupolo segmentado para seleção de íons precursores de alto desempenho com um analisador de massa *orbitrap* de alta resolução e precisão, qualidade e sensibilidade espectral.

Após o isolamento e a fragmentação do íon de um peptídeo, os fragmentos resultantes do scan MS/MS são usados como resultado para identificação destes peptídeos. A técnica de fragmentação usada para este trabalho foi o *collision induced dissociation* (CID), técnica mais utilizada para fragmentar cadeias polipeptídicas em instrumentos *Orbitrap* (49).

A identificação de peptídeos, a começar pelo espectro de fragmentação, é um passo crucial para o processamento de dados imposta pela proteômica baseada em espectrometria de massas (Gigy and Aebersold, 2000). A estratégia utilizada nesse estudo para interpretar os espectros MS/MS e a assinatura de sequências para os íons precursores de peptídeos referem-se à confrontação de sequência de bancos de dados. Foi empregado o software *MASCOT* 2.2.2 contra o banco de dados humanos *Swiss-Prot*.

1.9 A importância do secretoma para a engenharia de tecidos

Atualmente, a espectrometria de massas é o método utilizado para análise estrutural e de identificação em estudos de proteômica, possuindo características como alta sensibilidade e capacidade de gerar informações com base em estrutura de proteínas e peptídeos. Os resultados obtidos são confrontados com sequências conservadas em bancos de dados, tais como grupo de massas de peptídeos e sequências de aminoácidos parciais ou totais, resultante de peptídeos que foram produzidos por proteólise limitada (Graves and Haystead, 2002). Um exemplo envolvendo o uso dessa tecnologia é do pesquisador Fernandez-Puentes e colaboradores (2017), que monitoram candidatos a biomarcadores da osteoartrite (Fernandez-Puentes *et al*, 2017).

Uma interessante abordagem proteômica consiste na marcação isobárica (iTRAQ- do inglês *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitative*) para quantificação absoluta e relativa, baseando-se na derivação de grupos amino primários de peptídeos obtidos após o processo de digestão proteica. Essa técnica foi primeiramente descrita por Ross e colaboradores (2004) e permite que até 8 amostras sejam analisadas simultaneamente (Ross et al, 2004). Esse artifício permite sinalizar peptídeos de diferentes amostras com diferentes isóbaros denominado iTRAQ. Estas amostras são reagrupadas na maioria dos casos e separadas por nano-HPLC e, em seguida, submetidas à análise em espectrometria de massas. No decorrer do processo de fragmentação dos íons peptídeos que foram previamente marcados, ocorre a formação de íons repórteres de baixa massa que serão utilizados para a quantificação relativa da proteína nas diversas amostras em uma única análise (Creaney et al, 2017; Aggarwal et al, 2006; Wiese et al, 2006; Shadforth et al, 2005). A principal vantagem dessa técnica é a mistura de várias amostras, que podem ser marcadas previamente, e analisadas em um único *vial* no espectrômetro de massas, como ilustrado na figura 10.

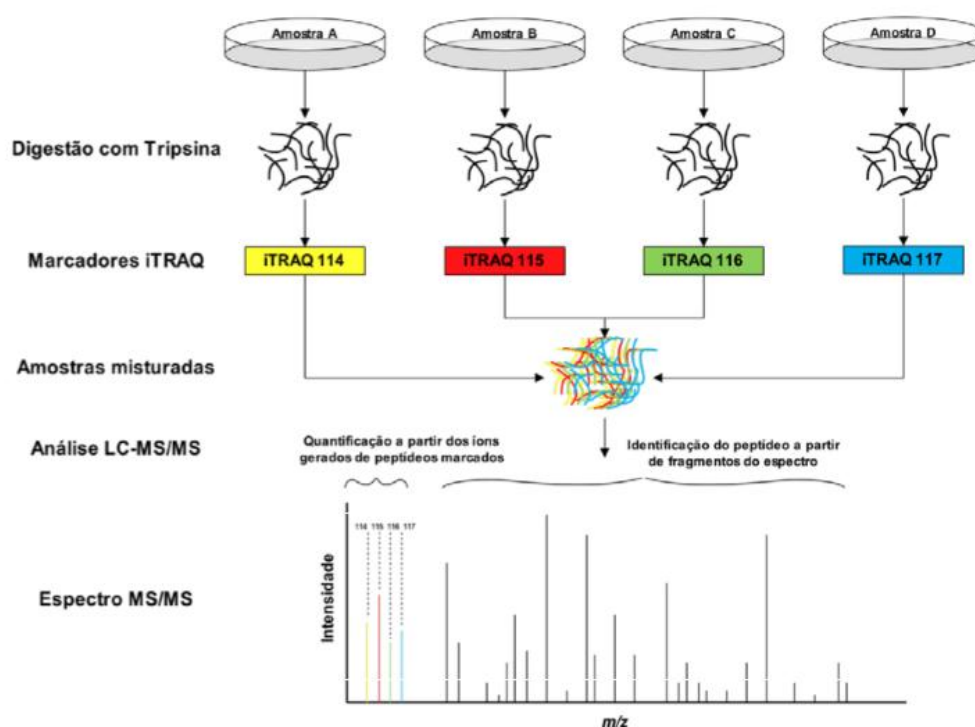


Figura 10. Esquema de quantificação por Itraq. Amostras são digeridas por tripsina, marcadas com reagentes Itraq e combinadas às análises LC-MS/MS. A quantificação dos peptídeos é resultante do confronto das intensidades dos íons precursores (picos coloridos no espectro). Já a identificação dos peptídeos é resultante das séries de íons das cadeias de peptídeos fragmentados (picos prestos no espectro de MS/MS) (Broad Institute of MIT and Harvard, 2012).

Portanto, as abordagens de proteômica, principalmente focadas na análise de proteínas secretadas (secretoma), permitem a identificação de biomarcadores proteicos de modificações celulares tais como a diferenciação ou a progressão de uma doença. Diversos estudos buscam estabelecer *in vitro*, constructos para substituição de cartilagem lesada a partir da diferenciação de ASCs em condrócitos. Os constructos são caracterizados através de ferramentas moleculares e morfológicas para identificação de biomarcadores da diferenciação condrogênica. No entanto, o secretoma é também uma ferramenta que permite identificar e traçar um perfil de eventos de diferenciação celular que ocorrem a partir da célula-tronco, podendo, desse modo, complementar a caracterização e estabelecimento do constructo *in vitro*.

Nesse contexto, o presente estudo propõe avaliar o secretoma de esferoides de ASCs humanos induzidos para a via condrogênica, de modo a identificar biomarcadores da diferenciação condrogênica. Serão ainda estabelecidos esferoides de CPCs cujo secretoma servirá como padrão de diferenciação condrogênica para a análise dos constructos de ASCs. Uma vez que, como mencionado anteriormente, as CPCs têm um potencial intrínseco para essa via de diferenciação. Este estudo permitirá uma melhor caracterização da diferenciação condrogênica *in vitro* a partir de ASCs. Além disso, o estudo pode contribuir para a compreensão de mecanismos moleculares pelos quais as células estudadas podem regular processos de regeneração tecidual (Estrada *et al*, 2009), uma vez que, *in vivo*, as proteínas secretadas entram diretamente em contato com células adjacentes, atuando como fatores que proporcionam um microambiente tecidual de regeneração (Paul and Anisimov, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, “anualmente 5,8 milhões de pessoas morrem por trauma em todo o mundo, 32% a mais que a soma das mortes por malária, AIDS e tuberculose” (OMS, 2012). Trauma é a causa mais comum de morte em pessoas entre 1 e 44 anos e a terceira causa mais comum de morte em geral (Moradi *et al*, 2015).

Por outro lado, a dor nas articulações causada pela degeneração da cartilagem é um problema grave que afeta milhões de pessoas de todas as idades. A lesão na cartilagem é em grande parte intratável em função das altas concentrações de inibidores de proteases e possivelmente pela presença de inibidores de crescimento (Reddi, 1998), além do pouco favorecimento da regeneração tecidual (Zhang *et al*, 2009). Somado a esse quadro, a osteoartrite, doença reumática mais comum na população mundial, aumenta com o aumento da idade do paciente (Nelson *et al*, 2011; Lawrence *et al*, 2008). De acordo com a Organização Mundial (OMS) de Saúde e a Liga Internacional de Associação da comunidade de Reumatologia Orientada ao Programa de Controle de Doenças Reumáticas (COPCORD), o Brasil tem prevalência de 4,1% em sua população que sofre desse mal (Senna *et al*, 2004). Logo, é necessária uma investigação para o desenvolvimento de estratégias de redução desta doença na população.

Justamente por sua capacidade limitada de regeneração, a cartilagem torna-se objeto de estudo para a engenharia de tecidos. Esta, por sua vez, é uma ferramenta potencialmente poderosa para modelar processos biológicos e moleculares do desenvolvimento de cartilagem e para identificar sinais necessários para induzir sua regeneração.

Nesse quesito, a medicina regenerativa aliada à engenharia de tecidos e de cartilagem possui potencial para desempenhar um importante papel na melhora deste cenário, oferecendo alternativas terapêuticas sofisticadas e multifatoriais, podendo incluir a utilização de células-tronco e progenitoras, além de moléculas solúveis (Greenwood *et al*, 2006).

Novas abordagens na engenharia de tecidos estão sendo desenvolvidas para promover a regeneração da cartilagem. É cada vez mais abundante estudos utilizando cultivos celulares 3D de células-tronco, visando a diferenciação condrogênica *in vitro* para serem utilizados em terapias. Porém, o

revés desses estudos está em conseguir alcançar uma diferenciação condrogênica madura *in vitro* fazendo uso de uma fonte de células clinicamente relevante, de modo que as células cultivadas estejam secretando fatores e proteínas que estejam envolvidas com a sua função de diferenciação condrogênica.

A busca por marcadores de condrogênese constitui um tema de grande relevância para a descoberta de tratamentos a serem utilizados para o diagnóstico e prognóstico de doenças, como por exemplo, a osteoartrite (Sanchez *et al*, 2017). Além disso, a identificação de novos biomarcadores para esta via é de interesse para o aprimoramento biotecnológico para fins de uso na engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Isto posto, esse trabalho objetivou identificar e comparar as proteínas secretadas por esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica com ASCs não induzidos. Além disso, identificar a fração de proteínas secretadas por esferoides de CPCs, considerado o padrão de referência de diferenciação condrogênica, e comparar com ASCs induzidas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o secretoma de esferoides de ASCs induzidos para a diferenciação condrogênica com os de CPCs com foco na identificação de biomarcadores de diferenciação condrogênica, a fim de contribuir para a caracterização do sistema de cultivo 3D livre de arcabouço em hidrogel micromoldado, como etapa crucial para a utilização de esferoides em protocolos de medicina regenerativa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Biofabricar e cultivar esferoides de CPCs e ASCs induzido e não induzido;
- Avaliar o diâmetro dos esferoides de ASCs e CPCs;
- Analisar o perfil proteico do secretoma de ASCs induzidos para a via condrogênica quando comparado às CPCs, padrão de referência, pelo método Itraq;
- Identificar os constituintes do secretoma de ASCs induzidos e comparar com CPCs, bem como comparar o secretoma de ASCs induzidos com ASCs não induzidos;
- Classificar as proteínas identificadas de acordo com suas principais funções e processos biológicos;
- Empregar ferramentas de bioinformática a fim de inferir as proteínas secretadas;
- Apontar possíveis marcadores condrogênicos e seu potencial uso na terapia celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras

As células progenitoras de cartilagem (CPCs) foram obtidas de amostras de septo nasal humano de doadores submetidos a cirurgia para tratamentos estéticos (n=3). As células-tronco de tecido adiposo (ASCs) foram obtidas de pacientes adultos submetidos à cirurgia de lipoaspiração da região abdominal (n=3). Ambos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (Protocolos 145/09 e 146/09, respectivamente).

4.2 Isolamento das células-tronco estromais de tecido adiposo humano

Para o isolamento das células-tronco do tecido adiposo, foi realizado o método mecânico de dissociação das células, realizado a partir do protocolo estabelecido pelo grupo de pesquisa (BAPTISTA et al., 2009).

A amostra de lipoaspirado de tecido adiposo foi transferida para um tubo contendo solução ACK (Lonza, São Paulo, Brasil) (1/1, v/v) para lise de hemácias. Este tubo foi agitado constantemente com auxílio do vórtex, durante 1 minuto repetindo esse procedimento 3 vezes. Em seguida, a suspensão foi mantida à temperatura de 37°C durante 15 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 900g por 15 minutos separando-se o sedimento contendo as células da fração estromal-vascular e a fração flutuante de adipócitos. O sedimento foi lavado com salina fosfato tamponada (PBS, phosphate buffered saline) por centrifugação e ao final ressuspenso em meio de cultivo quimicamente definido (MSCGM-CD, Lonza) contendo 100 U/mL de penicilina sódica (LGC, São Paulo, Brasil) e 100 µg/mL de estreptomicina (LGC) para expansão em sistema de cultivo em monocamada e 2% de soro fetal bovino. O meio de cultura foi trocado a cada 3-5 dias até atingirem confluência.

4.3 Isolamento das células progenitoras de cartilagem do septo nasal humano (CPCs)

O isolamento dessas células foi realizado através de metodologia já estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa (AMARAL *et al.*, 2012). Os fragmentos de cartilagem foram picados em pequenos tamanhos e incubados com colagenase IA 2 mg/mL (Sigma, Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA). Em seguida, a amostra foi submetida a uma agitação em shaker orbital por 2 horas a 37°C. Logo após, a mistura foi inativada com meio DMEM suplementado com 10% SFB. A suspensão de células foi então filtrada em *cell strainer* (BD, Biosciences, São Paulo, Brasil) com porosidade de 200 µm. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 700xG durante 15 minutos. Logo após, foi adicionado meio de inativação no *pellet*, sendo a amostra filtrada novamente. Foi realizada a contagem e exclusão das células por azul de turk e em seguida, plaqueadas em garrafas de cultura em meio DMEM acrescido de 10% de SFB (Gibco) suplementado com 100 U/mL de penicilina sódica (LGC) e 100 µg/mL de estreptomicina (LGC). As garrafas de cultura foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3-5 dias até atingirem confluência.

4.4 Preparo do hidrogel micromoldado para a geração de esferoides de ASCs e CPCs

Para o preparo do hidrogel micromoldado, 2 gramas de agarose ultrapura (Invitrogen) foi dissolvido em solução salina 0,9% NaCl (Sigma). Em seguida, a mistura foi aquecida em microondas em intervalos de 10 segundos até que ficasse completamente homogênea. Após esse período, 600 µl de solução a 2% de agarose ultrapura foi adicionado sob o molde de silicone (Sigma) contendo 81 ressecções, sendo aguardado 1 hora até a total solidificação da agarose no molde de silicone. Posteriormente, o hidrogel micromoldado foi retirado do molde de silicone e mantidos individualmente em poços de placas de 12 poços imersos em meio de cultivo DMEM *phenol red free* (Sigma) e mantidos em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ até o plaqueamento das células.

4.5 Cultivo de esferóides

A suspensão contendo 2×10^6 células expandida até a terceira passagem foi centrifugada e semeada em um hidrogel micromoldado de agarose ultrapura 2% (Invitrogen) não-aderente. Cada esferoide foi formado separadamente a partir de cada ressecção, totalizando ao final, 81 esferóides gerados a partir de um único hidrogel micromoldado.

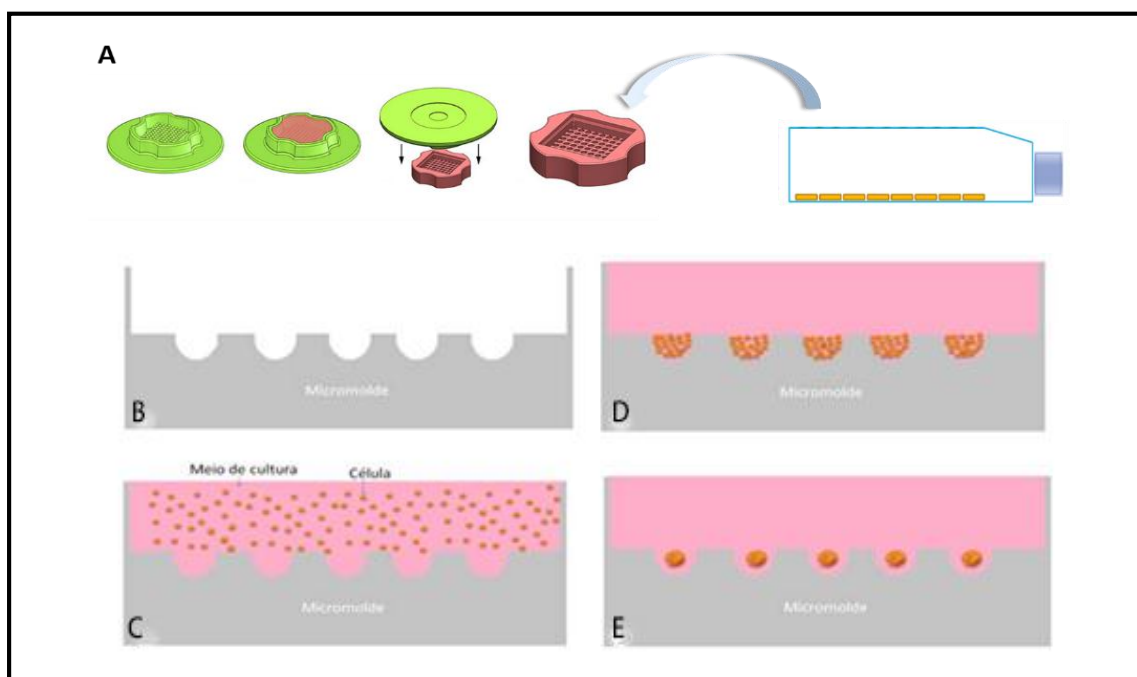


Figura 11: Formação dos esferóides. (A) Figura representativa da fabricação do hidrogel micromoldado. A agarose ultrapura 2% é dispensada no interior do molde de silicone e após aproximadamente 60 minutos o hidrogel é retirado do molde. (B) Esquema simulando corte transversal do hidrogel micromoldado. (C) Momento que as células são plaqueadas no hidrogel. (D) Alguns instantes após o plaqueamento das células, ocorre a sedimentação no interior das ressecções por ação da gravidade. (E) Após 24 horas, as esferas apresentam completa formação (Napolitano *et al*, 2007)

O meio de cultura no qual os esferóides são mantidos é composto por DMEM *phenol red free* (Sigma), ácido ascórbico 50 $\mu\text{g/ml}$, albumina humana 1,25 $\mu\text{g/ml}$, penicilina sódica 100 U/mL (LGC) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (LGC). Os esferóides de ASCs foram estimulados para a via condrogênica, sendo mantidos a 5% CO_2 , 85% N_2 (hipóxia) e 10% de O_2 a 37°C sob atmosfera úmida, por até 3 semanas em meio de cultivo de esferóides suplementado com 10ng/ml de TGF- β 3 e 10^{-8} M de dexametasona. Esferóides de ASCs mantidos

em estufa a 5% de CO₂ e 20% de O₂ (normóxia) e na ausência de fatores de indução foram utilizados como controle do estado indiferenciado das ASCs.

Os esferóides de CPCs foram mantidos em condição de normóxia em meio de cultivo de esferóides acrescido de 50 µg/ml de insulina.

O meio foi trocado duas vezes por semana e somente na terceira semana o sobrenadante dos esferóides de cada condição (ASCs induzidos para a via condrogênica, ASCs não induzido e CPCs) foi coletado e posteriormente analisados.

4.6 Medição do diâmetro dos esferóides

Para a medição do diâmetro dos esferóides de ASCs e CPCs, foram coletados 10 imagens de cada grupo e medidos através do *software Axiovision*. Em seguida, após a medição do diâmetro em micrômetros (µm) foi empregado análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

4.7 Filtração e quantificação de proteínas

Os sobrenadantes foram filtrados e centrifugado a 10,000 g durante 15 minutos lavados com 1 mM EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid, Ácido Tetra acético de Etilenediamina, Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) (Sigma) em um sistema de membranas com poro de 3 KDa, Amicon Ultra com capacidade para 0,5 mL (Merck Millipore, São Paulo, Brasil).

As amostras foram ressuspensas sendo realizado quantificação de proteínas de acordo com o método colorimétrico de Bradford (1976) (Sigma-Aldrich).

Após a quantificação, o sobrenadante foi submetido ao equipamento *speed vac* (Eppendorf, São Paulo, Brasil) para se obter uma amostra final mais concentrada.

4.8 Leitura no espectrômetro de massas, análise de dados e *Western Blot*

O uso do método iTRAQ de espectrometria de massas permite a comparação de múltiplos proteomas, cada um marcado com um tag de massa isobárica. A razão de intensidades entre os diferentes íons repórteres foi utilizada para medir a alta ou baixa regulação de peptídeos correspondentes. Esta etapa do procedimento foi realizado pelo Instituto de Bioquímica e Química de Proteínas (IBCP) Lyon-França.

As amostras foram purificadas, através do NanoLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific), em duas colunas, primeiramente numa *trap-column* (5 µm, 100 Å, 300 µm id x 5 mm, Acclaim PepMap C18 100) e numa coluna nano (5 µm, 100 Å, 75 µm id x 50 cm, Acclaim PepMap C18 100). Cada coluna foi eluída com 1 ml de 95% de acetonitrila e 0,1% trifluoroacético (TFA), foram misturadas e evaporadas através do *Speed-vac* para obter uma concentração final de 2 mg/ml.

Alíquotas de 7 µg de cada amostra do secretoma referente ao primeiro experimento e 20 µg referente ao segundo experimento foram ajustados num pH 8 através do tampão de dissolução iTRAQ (iTRAQ™ Reagent Multi-plex kit, AB Sciex), reduzido com 3,5 mM de *Tris (2-carboxyethyl) phosphinehydrochloride* (TCEP) por 1 hora a 60 °C alquilado com 6.7 mM *methyl methanethiosulphonate* por 10 minutos a temperatura ambiente e digerido *overnight* a 37°C com tripsina (Promega) numa concentração de 1:10 tripsina:proteína.

As amostras foram marcadas com o reagente iTRAQ utilizando os isóbaros: (A) 114 - ASCs não induzido, (B) 115 - ASCs induzido e (C) 116 – CPCs. Após a marcação, foi adicionado 70µl de etanol em cada amostra. Após 60 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram misturadas, pois foram previamente marcadas, e seguiu-se o mesmo processo de ultrafiltração utilizando as mesmas colunas. A mistura foi então diluída num volume final de 1,9 ml com um tampão de reidratação (Offgel Low Resolution kit, Agilent). Em seguida a amostra foi evaporada através do *speed vac* e ressuspensa em 0,1% TFA antes de serem analisadas pelo espectrômetro de massas. A abordagem de marcação com iTRAQ para quantificação relativa de proteínas permite que as amostras sejam injetadas uma única vez, posto que cada condição foi previamente marcada com o respectivo isóbaro. Isso permite a comparação de níveis de expressão de proteínas de cada amostra analisada.

A comparação realizada entre os proteomas, executados pelo sistema iTRAQ, foi: ASC induzidos para a via condrogênica *versus* ASCs não induzido e ASC induzidos para a via condrogênica contra CPCs, padrão ouro. Para a distribuição da razão (ASCs induzido: CPCs) pelo método quantitativo Itraq foi aplicado a distribuição Gaussiana para estabelecer o corte estatístico das proteínas identificadas na comparação do secretoma entre CPCs e ASCs induzido.

A lista de picos (.mgf files), referente ao método utilizado, foi gerado para cada arquivo MS/MS através do *software* (Mascot.dll script, default parameters) e utilizou-se para pesquisa o banco de dados MASCOT 2.2.2. Os dados obtidos através do espectrômetro de massas foram pesquisados contra o banco de dados de humanos *Swiss-Prot*. O perfil de proteínas identificadas foi analisado quanto aos processos biológicos em que estão envolvidas através da utilização do banco de dados *Gene Ontology (Panther classification system)* e *David (Bioinformatics Resources 6.8)*.

As etapas envolvendo a análise proteômica do presente estudo estão esquematicamente representadas na figura 12.

A última abordagem para este trabalho, consistiu na realização da técnica de *Western Blot*, utilizou-se a metodologia proposta pela Equipe de Metaproteases e Remodelamento Tecidual de Lyon-França (Delome *et al*, 2015).

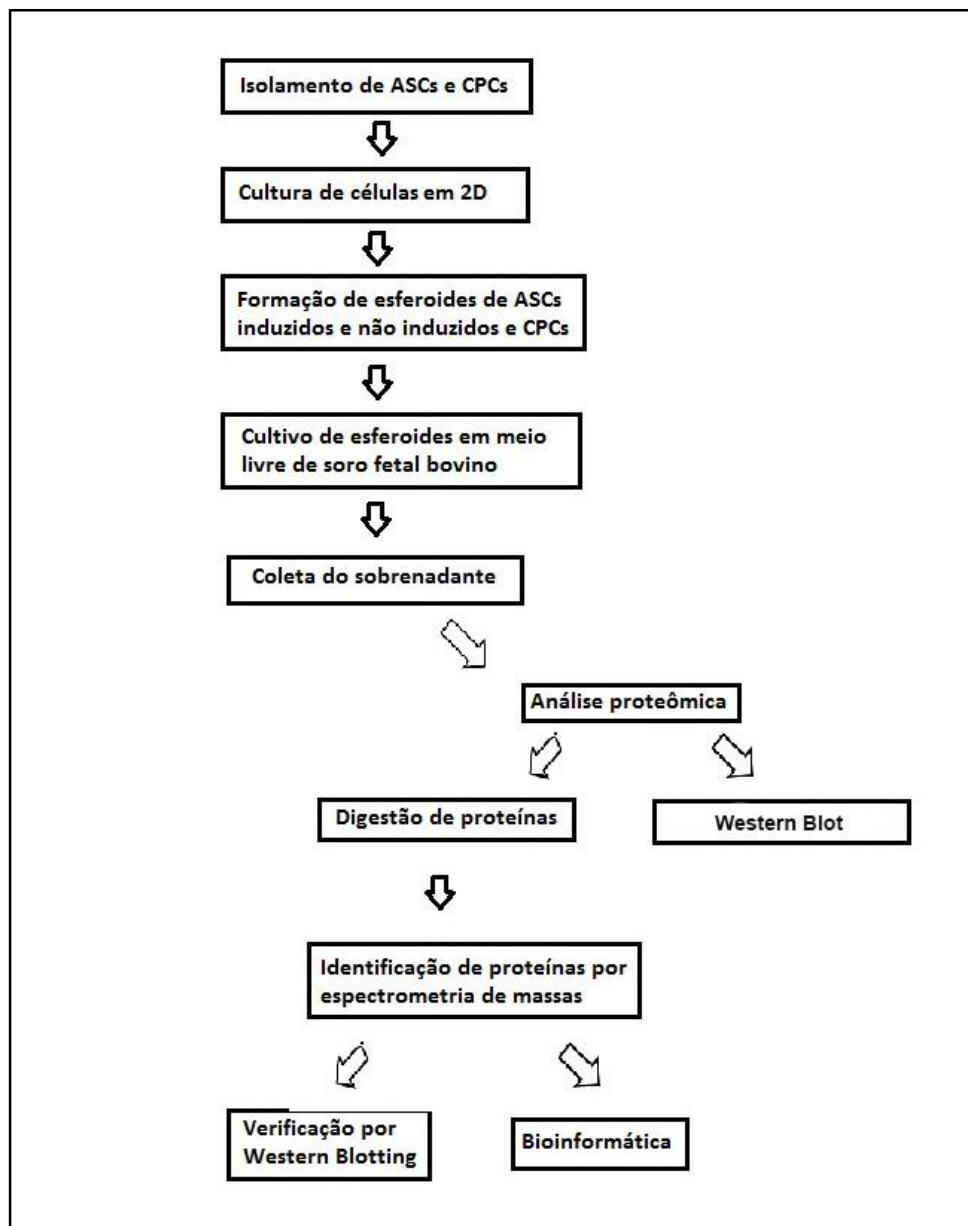


Figura 12. Etapas da análise proteômica de esferoides de ASCs e CPCs.

RESULTADOS

5.1 Biofabricação do hidrogel micromoldado

Os esferóides de ASCs induzido, não induzido e CPCs foram gerados a partir de micromoldes de silicone, servindo como base para a confecção de um molde de hidrogel não aderente de 81 ressecções (Figura 13).

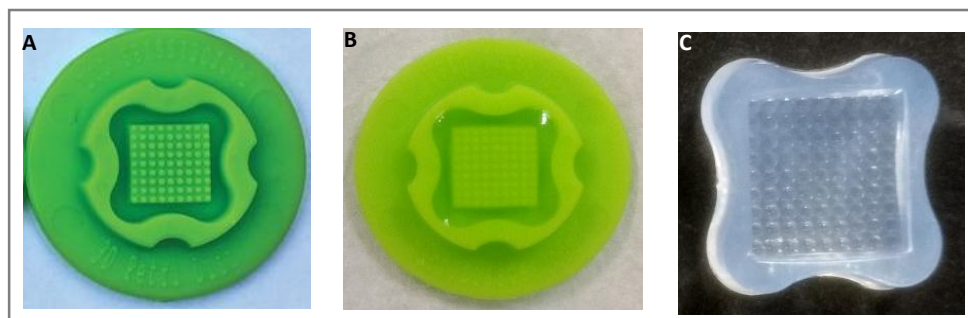


Figura 13. Confeção do hidrogel micromoldado. (A) Micromolde de silicone. (B) Micromolde de silicone com agarose ultrapura dispensada em seu interior. (C) Após 60 minutos, o molde de agarose é desenformado.

Após a tripsinização das células cultivadas em monocamada, a suspensão foi semeada no interior do micromolde de hidrogel e em poucas horas as células encontram-se sedimentadas no interior das ressecções. Após 24 horas, observou-se a formação de um esferoide por ressecção do hidrogel de agarose (Figura 14).

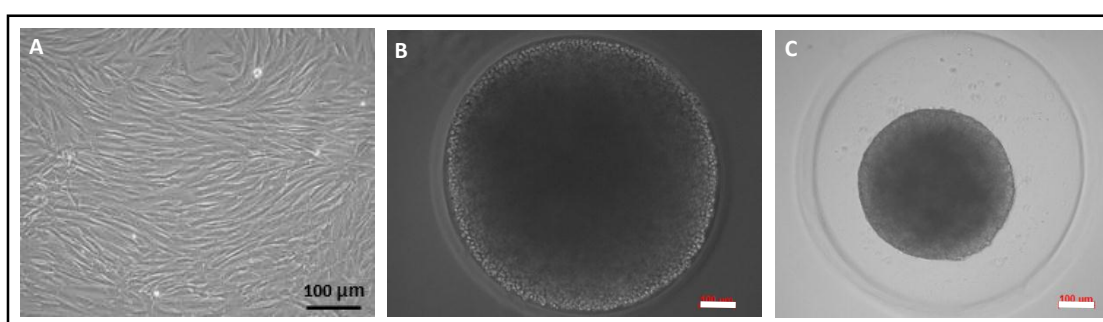


Figura 14. Estágios da formação de esferoides a partir da suspensão celular. (A) Fotomicrografia de contraste de fase de células cultivadas em monocamada. (B) Fotomicrografia de apenas uma microressecção do hidrogel micromoldado minutos após o plaqueamento das células. (C) Compactação e estabilidade de um único esferoide após 24 horas do plaqueamento. Barra de escala 100µm.

5.2 Caracterização do cultivo de esferoides de ASCs e CPCs

Não foi observado, em nível microscópico, diferenças no aspecto morfológico das células. Ambos os tipos celulares utilizados nesse estudo apresentaram morfologia fibroblastoide quando cultivadas em sistema de monocamada (Figura 15A, B). Algumas horas após a semeadura, as células encontram-se sedimentadas no interior de cada ressecção e após 24 horas observou-se a formação de um único esferoide em cada uma das 81 ressecções do hidrogel de agarose micromoldado (Figura 15C - E).

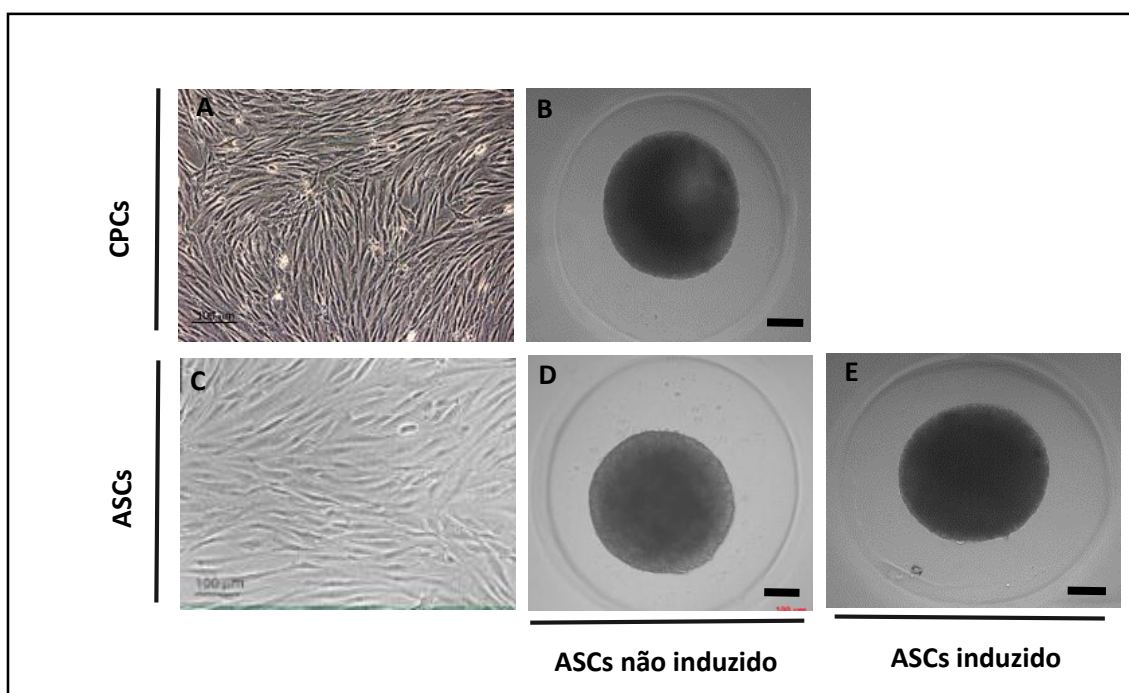


Figura 15. Fotomicrografia por contraste de fase da monocamada e cultivo 3D de células-tronco de tecido adiposo e células progenitoras de cartilagem do septo nasal humano. (A) Aspectos morfológicos das células-tronco de tecido adiposo isoladas por método mecânico, em cultivo 2D e (B) esferoide de células progenitoras de cartilagem, na terceira semana de cultivo. (C) Aspectos morfológicos das células progenitoras de cartilagem do septo nasal humano, em cultivo 2D. (D) Esferoide de ASCs em meio não indutor (E) esferoide de ASCs em meio de indução condrogênica. Barra de escala 100µm.

Independente do meio de cultivo, os esferoides apresentaram forma esferoidal em todos os moldes, tanto de esferoides de ASCs em meio de indução para a via condrogênica, esferoides de ASCs não induzidos e esferoides de CPCs. A medição dos diâmetros dos esferoides mostrou semelhança no tamanho entre os três grupos analisados, sendo formados esferoides entre 500 µm e 700 µm de diâmetro com pequena variação de

tamanho dentre os esferoides medidos em um mesmo grupo experimental (Figura 16).

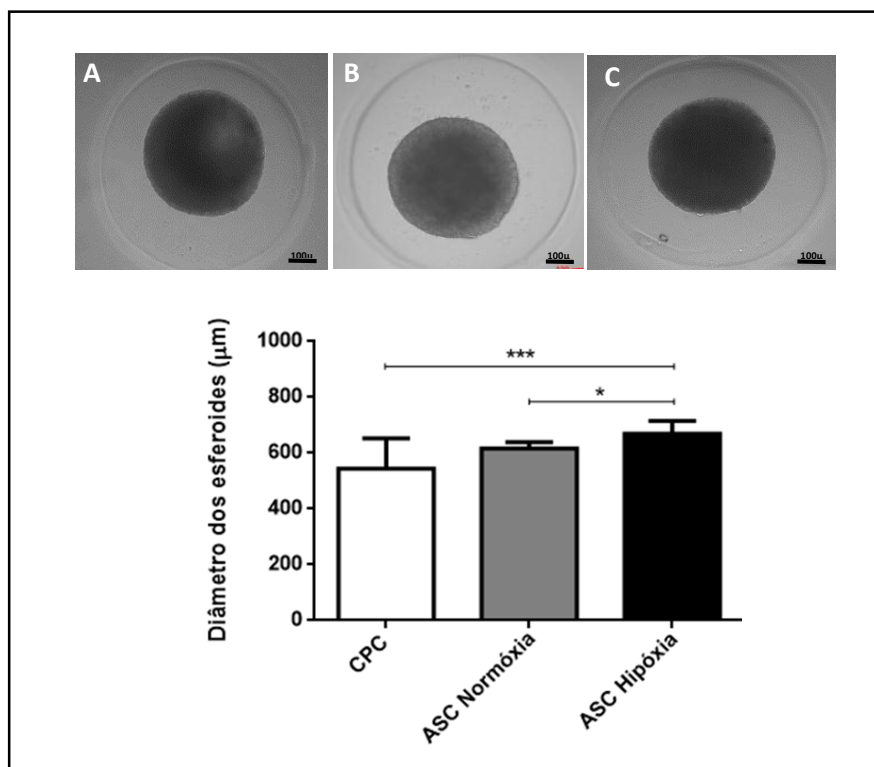


Figura 16. Avaliação morfológica de esferoides ASCs induzidos, não induzidos e CPCs. (A) Esferoide de CPCs. (B) Esferoide de ASCs não induzido e (C) esferoide de ASCs induzido. Em (D) gráfico da média do diâmetro dos esferoides cultivados *in vitro*. Asteriscos representam os valores de p obtidos a partir da múltipla comparação entre as colunas. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$). Barra de escala 100 µm.

5.3 Panorama da análise do processo biológico do secretoma dos esferoides de CPCs, ASCs induzido e não induzido para a via condrogênica

No presente estudo, a fim de analisar o secretoma do constructo 3D, coletamos o sobrenadante dos esferoides de CPCs, ASCs induzidos e ASCs não induzidos para a via condrogênica. Com o intuito de compararmos a razão de proteínas secretadas entre os esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica *versus* CPCs, nosso padrão ouro, e compararmos também o secretoma de ASCs induzido *versus* ASCs não induzido para a via, foi utilizado o método de marcação Itraq, analisado através de espectrometria de massas.

Através do método de *Bradford* para quantificação de proteínas, foram detectadas 60 µg/µl de proteínas no secretoma de CPCs no primeiro

experimento e 1,3 µg/µl no segundo experimento. No secretoma de ASCs induzido, 7,7 µg/ µl no primeiro e 0,5 µg/ µl de proteínas no segundo experimento e por fim 7,9 µg/µl de proteínas no secretoma de ASCs não induzido no primeiro experimento e 0,8 µg/µl no segundo experimento. O terceiro experimento se baseia nos dados do segundo experimento, já que este foi uma replicata técnica.

Os dados de espectrometria de massas foram pesquisados e analisados contra o banco de dados Swiss-Prot humano com uma tolerância de 0,4 Da para precursor e fragmentos de íons. A tabela geral contendo informações das proteínas detectadas na comparação do secretoma entre ASCs induzido *versus* CPCs, e ASCs induzido *versus* ASCs não induzido, do primeiro e segundo experimento, se encontram como material suplementar na seção de anexos.

5.4 Relação das proteínas identificadas no secretoma dos esferoides de CPCs *versus* esferoides de ASCs induzidos

Com o propósito de clarificar quais proteínas não foram dadas com alta ou com baixa taxa de regulação no secretoma dos esferoides ASCs induzidos *versus* CPCs, foi confeccionada a tabela 1 onde evidencia-se 96 proteínas que se ajustaram ao critério definido acima, numa razão entre 0,5 e 2,0. Foram selecionadas somente proteínas cuja função são relevantes para o presente estudo. Essa análise foi realizada apenas com a comparação mencionada acima, ASCs induzida *versus* CPCs, em razão da investigação de proteínas que os esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica secretam quando comparado ao nosso padrão de condrogênese, nesse caso, com o secretoma de CPCs. As linhas cujo valor da razão apresentam em em branco significa que os valores foram detectados mas não correspondem a razão proposta da tabela.

Tabela 1. Razão ItRAQ entre ASCs induzido:CPCs

Proteína (Número de acesso ao UniprotKB) Processos Exp. 1 Exp. 2 Exp. 3

Anexina A2 pseudogene 3 (P07355)	Síntese de colágeno	0.91	0.95	0.92
Basigin (P35613-2)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	1.42	-
Calmodulina 3 (fosforilase quinase, delta) (P81605)	Matriz Extracelular da Cartilagem	0.50	0.77	-
Proteína oligomérica da matriz de cartilagem (P49747)	Síntese de colágeno		1.95	1.88
Catepsina B (P07858)	Síntese de colágeno	-	1.42	1.16
Catepsina D (P07339)	Síntese de colágeno	-	1.25	0.99
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (P42830)	Inflamação	-	1.58	1.43
Colágeno, tripla hélice 1 (Q96CG8)	Síntese de colágeno	-	1.72	1.56
Colágeno, tipo I, alfa 2 (P08123)	Matriz Extracelular da Cartilagem	1.88	1.18	1.13
Colágeno tipo II, alfa 1 (P02458)	Matriz Extracelular da Cartilagem			0.69
Colágeno, tipo III, alfa 1 (P02461)	Matriz Extracelular da Cartilagem	1.39	1.69	1.58
Colágeno, tipo V, alfa 1 (P20908)	Matriz Extracelular da Cartilagem	1.81	1.88	1.55
Colágeno, tipo VI, alfa 1 (P12109)	Matriz Extracelular da Cartilagem	1.76	1.59	1.36
Colágeno, tipo VI, alfa 2 (P12110)	Matriz Extracelular da Cartilagem	1.37	1.62	1.29
Colágeno, tipo VI, alfa 3 (P12111)	Matriz Extracelular da Cartilagem	1.17	1.30	0.99
Colágeno, tipo XI, alfa 1 (P12107)	Matriz Extracelular da Cartilagem	1.76	0.68	0.88
Colágeno, tipo XII, alfa 1 (Q99715)	Matriz Extracelular da Cartilagem	1.04	0.78	0.80
Colágeno, tipo XIV, alfa 1 (Q05707)	Matriz Extracelular da Cartilagem	-	1.13	1.10
Colágeno, tipo XVIII, alfa 1 (P39060)	Matriz Extracelular da Cartilagem	-	1.35	1.40
Componente do complemento 1, r subcomponent (P00736)	Inflamação	0.93	0.79	0.96
Complement component 1, s subcomponent (P09871)	Inflamação	0.70	0.82	0.83
Fator de complemento H (P08603)	Matriz Extracelular da Cartilagem	-	0.96	0.83
Família de lectina do tipo 3C, membro B (P05452)	Condrogênese	-	0.71	0.38
Decorina (P07585)	Matriz Extracelular da Cartilagem	0.59	0.46	0.45
Dermcidin (P81605)	Matriz Extracelular da Cartilagem	0.50	0.77	-
Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Q9UBP4)	Condrogênese	0.48	0.60	0.47
Dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1) (Q14118)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	0.99	-
Proteína da matriz extracelular (Q16610)	Remodelamento da Matriz Extracelular	1.28	0.83	0.83
Fibrilina 1 (P35555)	Inflamação	1.12	0.84	1.11
Fibulina 1 (P23142)	Remodelamento da Matriz Extracelular	1.81	1.27	1.03
Fibulina 5 (Q9UBX5)	Remodelamento da Matriz Extracelular	0.79	1.50	1.79
Fibromodulina (Q06828)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	0.90	0.40
Filamina A, alfa (proteína de ligação à actina 280) (P21333)	Matriz Extracelular da Cartilagem	0.32	0.41	1.00
FK506 binding protein 1A, 12kDa (P62942)	Síntese de colágeno	1.73	-	-
Follistatin-like 1 (Q12841)	Síntese de colágeno	0.89	0.79	0.99
Gelsolin (amyloidosis, Finnish type) (P06396)	Osteogênese	-	0.95	0.71

(-) não detectado

Exp. 1 – experimento 1; Exp. 2- experimento 2; Exp. 3: experimento 3

Tabela 1. Razão ItRAQ entre ASCs induzido: CPCs

Proteína (Número de acesso ao UniprotKB) Processos Exp. 1 Exp. 2 Exp. 3

Glicoproteína (transmembrana) nmb (Q14956)	Remodelamento da Matriz Extracelular	1.31	-	-
Haptoglobina (P00739)	Inflamação	0.67	1.07	-
Heat shock 10kDa protein 1 (P61604)	Osteogênese	-	1.43	1.62
Proteoglicano heparan sulfato 2 (P98160)	Inflamação	0.55	0.87	0.75
Imunoglobulina (O14498)	Osteogenesis	1.64	0.70	0.69
Insulin-like growth factor binding protein 2 (P18065)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	0.87	1.24
Insulin-like growth factor binding protein 3 (P17936)	Inflamação	1.04	0.84	0.74
Insulin-like growth factor binding protein 4 (P22692)	Inflamação	1.37	0.76	1.04
Insulin-like growth factor binding protein 5 (P24593)	Osteogênese	-	1.37	1.28
Fator de crescimento de insulina (P01344-3)	Inflamação	0.96	-	-
Interleucina 6 (interferon, beta 2) (P05231)	Osteogênese	-	0.82	
Interleucina 8 (P10145)	Inflamação	-	1.45	0.81
Laminina, alfa 4 (Q16363)	Osteogênese	-	1.49	0.84
Laminina, beta 1 (P07942)	Inflamação	-	1.44	1.12
Laminina, gama 1 (formerly LAMB2) (P11047)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	1.50	1.22
Fator de crescimento proteína de ligação beta 1 (Q14766)	Remodelamento da Matriz Extracelular	1.60	1.27	1.18
Fator de crescimento proteína de ligação beta 2 (Q14767)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	1.42	1.15
Lectina, solúvel, 1 (P09382)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	0.83	1.08
Lectina, solúvel, 3 (P17931)	Síntese de colágeno	-	1.14	0.96
Lectina solúvel 3, proteína de ligação (Q08380)	Inflamação	0.89	1.62	1.13
Lumican (P51884)	Inflamação	0.84	0.63	0.71
Lisil oxidase (P28300)	Síntese de colágeno	1.85	0.42	-
Major histocompatibility complex (P01892)	Inflamação	-	1.55	1.19
Receptor de manose, tipo C 2 (Q9UBG0)	Síntese de colágeno	-	1.18	1.04
Matriz metalopeptidase 14 (P50281)	Inflamação	0.91	1.07	1.12
Matriz metalopeptidase 2 (P08253)	Síntese de colágeno	0.62	0.93	1.15
matrix metallopeptidase 3 (stromelysin 1) (P08254)	Síntese de colágeno	-	1.78	1.85
Matrix metallopeptidase 9 (P14780)	Síntese de colágeno	-	2.06	1.43
Proteína associada a microfibras 2 (P55001)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	0.97	-
Miosina, músculo liso e não muscular (P14649)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	1.14	-
Matriz metalopeptidase 2 (72kDa collagenase tipo IV) (P08253)	Síntese de colágeno	0.62	0.93	1.15
matrix metallopeptidase 3 (stromelysin 1) (P08254)	Síntese de colágeno	-	1.78	1.85
Matrix metallopeptidase 9 (P14780)	Síntese de colágeno	-	2.06	1.43
Proteína associada a microfibras 2 (P55001)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	0.97	-
Miosina, músculo liso e não muscular (P14649)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	1.14	-

(-) não detectado

Exp. 1 – experimento 1; Exp. 2- experimento 2; Exp. 3: experimento 3

Tabela 1. Razão ItRAQ entre ASCs induzido:CPCs

Proteína (Número de acesso ao UniprotKB)	Processos	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Neuroblastoma, supressor de tumorigênese 1 (P41271)	Osteogênese	-	0.80	-
Neuropilin 1 (O14786)	Regulador positivo da angiogênese		1.19	1.15
Nidogen 1 (P14543)	Collagen synthesis	-	1.68	1.31
Osteoglicina (P20774)	Osteogênese	1.96	-	-
Isomerase B (ciclofilina B) (P23284)	Osteogenesis	1.17	1.49	1.20
Procollagen C-endopeptidase enhancer (Q15113)	Síntese de colágeno	0.51	0.66	0.56
Prostaglandina 21kDa (brain) (P41222)	Inflamação	-	1.08	1.38
Proteína SETSIP (PODME0)	Osteogênese	-	1.27	-
Ácido retinóico (tazarotene induced) 2 (Q99969)	Inflamação	-	1.76	1.92
Secreted frizzled-related protein 2 (Q96HF1)	Osteogênese	0.78	-	0.78
Osteonectina (P09486)	Osteogênese	0.84	0.57	0.60
Inibidor serpin peptidase (proteína de ligação colágeno 1) (P50454)	Síntese de colágeno	1.36	1.45	1.16
Similar to Complement C3 precursor; complement component 3 (P01024)	Regulador positivo da angiogênese	-	1.37	1.22
Soluble scavenger receptor (A1L4H1)	Remodelamento da Matriz Extracelular	1.71	-	
Estimulador da condrogênese 1 (O75711)	Condrogênese	0.26	0.30	0.14
Tenascina C (P24821)	Remodelamento da Matriz Extracelular	1.88	1.30	1.23
Tioredoxin (P10599)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	0.87	0.94
Trombospondina 1 (P07996)	Síntese de colágeno/ Inibidor angiogênese			1.25
Trombospondina 2 (P35442)	Síntese de colágeno/ Inibidor angiogênese	-	1.37	1.23
tissue factor pathway inhibitor 2 (P48307)	Remodelamento da Matriz Extracelular	-	1.10	1.37
Fator de crescimento, beta induzido (Q15582)	Condrogênese	1.15	1.01	1.03
Tropomiosina 4 (P67936)	Osteogênese	1.21		1.48
Versicana (P13611)	Matriz Extracelular da Cartilagem	2.05	0.87	1.19
Vimentina (P08670)	Condrogênese	2.01	0.91	1.00
WNT1 inducible signaling pathway protein 2 (O76076)	Osteogênese	-	1.54	1.14

(-) Não detectado

Exp. 1 – experimento 1; Exp. 2- experimento 2; Exp. 3: experimento 3.

A fim de facilitar a visualização, foi elaborado um gráfico (gráfico 1) com o número de proteínas identificadas na tabela 1 agrupadas de acordo com sua função.

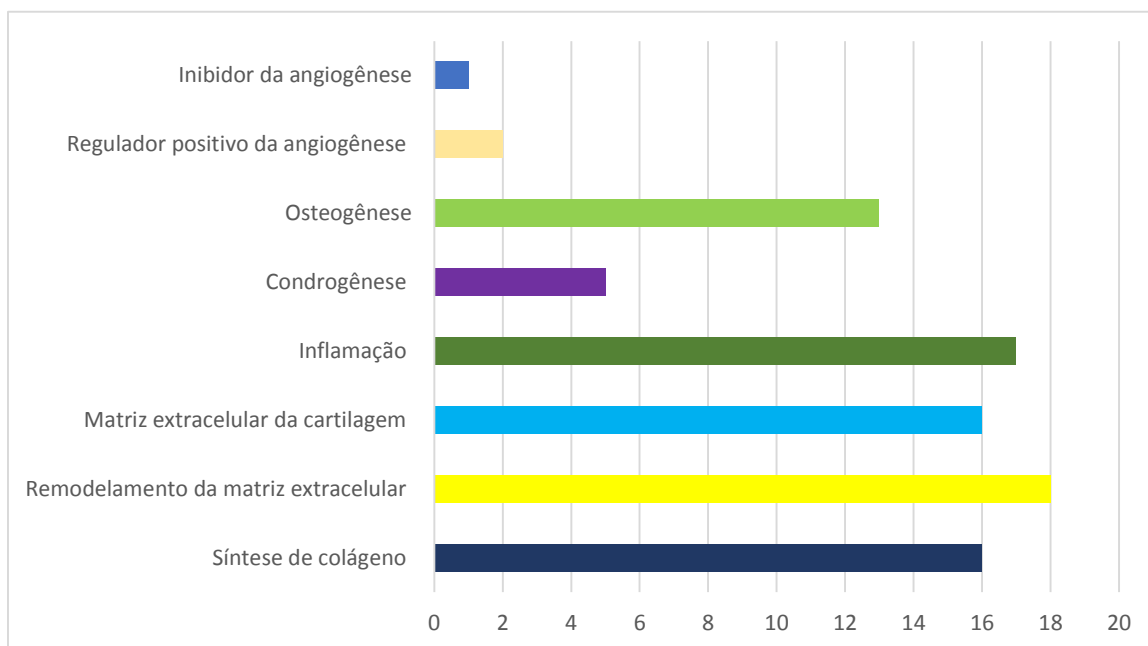


Gráfico 1. Análise do *Gene ontology* (GO) do secretoma de esferas de CPC *versus* ASCs induzido. Foi desconsiderado o experimento 3 para esta avaliação.

5.5 Proteínas com abundância diferencial quando comparado ASCs induzido *versus* CPCs

Este estudo utilizou-se do método Gaussiano normal para estabelecer o corte estatístico utilizado entre as proteínas identificadas. Dessa forma, as proteínas que apresentaram razão acima de 2,0 foram consideradas com alta regulação (Tabela 2) e as que apresentaram razão abaixo de 0,5 foram consideradas de baixa regulação (Tabela 4) em pelo menos um dos experimentos.

Tabela 2 Proteínas com alta taxa de regulação do secretoma de ASCs induzido *versus* CPCs**Proteínas (número de acesso ao UniProt)****Exp.1 Exp.2 Exp.3**

Ativador do receptor de Plasminogênio (Q03405)	Síntese de colágeno	-	2.49	
Colágeno, tipo I, alfa 1 (P02452)	Matriz Extracelular da cartilagem	2.19		
Colágeno, tipo II, alfa 1 (P02458)	Matriz Extracelular da cartilagem	4.73	-	
C-X-C motif chemokine 3 (P19876)	Inflamação	-	2.31	-
Ectonucleotídeo pirofosfatase (Q13822)	Angiogênese	-	2.05	
Fator de diferenciação/crescimento 15 (Q99988)	Condrogênese	-	2.20	
Inibidor de Serpina peptidase (P36955)	Inhibitor of angiogenesis	2.88	-	
Interleucina 6 (interferon, beta 2) (P05231)	Osteogênese	-		2.20
Matriz metalopeptidase 1 (Interstitial collagenase) (P03956)	Síntese de colágeno	-	2.15	
Matriz metaloproteinase-9 (P14780)	Osteogênese	-	2.06	
Proteína oligomérica da matriz da cartilagem (P49747)	Matriz Extracelular da cartilagem	2.53		
Periostina (Q15063-3)	Condrogênese	2.38	-	-
Spondin 2, proteína da matriz extracelular (Q9BUD6)	Inflamação	2.88	-	
Suprabasin (Q6UWP8)	Remodelamento da matriz extracelular	-	2.85	-
Sushi-repeat-containing protein, X-linked (P78539)	Remodelamento da matriz extracelular	2.53	1.55	
Trombospondina 1 (P07996)	Síntese de colágeno/Inibidor de angiogênese		2.46	
Tropomiosina 4 (P67936)	Osteogênese		2.46	
Versicana (P13611)	Matriz Extracelular da cartilagem	2.05	0.87	
Vimentina (P08670)	Condrogênese	2.01	0.91	

(-) Proteína não detectada

Exp. 1 – experimento 1; Exp. 2- experimento 2; Exp. 3: experimento 3

Com o propósito de verificar a relevância de cada proteína com alta taxa de regulação detectada no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos *versus* CPCs, foi gerada uma tabela, contendo informações relativas à cada proteína encontrada (Tabela 3).

Tabela 3- Função das proteínas com alta taxa de regulação no secretoma de ASCs induzidos versus CPCs

Proteína	Função	Referência
Proteína da matriz oligomérica da cartilagem (COMP) (P49747)	Desempenha papel na integridade estrutural da cartilagem através da sua interação com outras proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina. Medeia a interação de condrócitos com a matriz da cartilagem através da interação de receptores de integrina da superfície celular.	UniprotKB
Colágeno, tipo I, alfa 1 (P02452)	Forma as fibrilas do tendão, dos ligamentos e dos ossos. Nos ossos, as fibrilas são mineralizadas com hidroxapatita de cálcio.	UniprotKB
Colágeno, tipo II, alfa 1 (P02458)	Específico de tecido cartilaginoso. É essencial para o desenvolvimento embrionário e desenvolvimento do esqueleto, para o crescimento linear e para capacidade da cartilagem de resistir às forças de compressão.	UniprotKB
Ectonucleotídeo pirofosfatase (Q13822)	Atua como um fator angiogênico estimulando a migração das células musculares lisas e a formação de microtúbulos. Possível envolvimento na proliferação celular e no desenvolvimento do tecido adiposo.	UniprotKB
C-X-C motif chemokine 3 (P19876)	Pode desempenhar um papel na inflamação e exercer seus efeitos sobre as células endoteliais de forma autócrina.	UniprotKB
Fator de diferenciação /crescimento (Q99988)	Pertence à família do TGF- β .	UniprotKB
Matriz metalloproteinase 1 (Interstitial collagenase)	Envolvidas na decomposição da matriz extracelular em processos fisiológicos normais como na angiogênese, remodelação de tecido e também em processos patológicos como na artrite.	UniprotKB
Lisil oxidase (P28300)	É essencial para a integridade de fibras elásticas e de colágeno.	Maki, J.M <i>et al</i> , 2005. Am J Pathol. (2005) Oct; 167(4): 927–936.
Matriz metaloproteinase-9 (P14780)	Envolvidas na decomposição da matriz extracelular em processos fisiológicos normais como na angiogênese, remodelamento de tecido, desenvolvimento ósseo e também em processos patológicos como na artrite.	UniprotKB
Ativador de plasminogênio (Q03405)	Desempenha papel na localização e formação da plasmina.	UniprotKB
Periostina (Q15063-3)	Melhora a incorporação de BMP-1 na matriz de fibronectina e também na ativação proteolítica da lisil oxidase.	UniprotKB
Inibidor de serpina peptidase (P36955)	Potente inibidor da angiogênese.	UniprotKB
Spondin 2, proteína da matriz extracelular (Q9BUD6)	Proteína de adesão celular que promove a adesão e crescimento de neurônios embrionários do hipocampo.	UniprotKB
Suprabasin (Q6UWP8)	Desempenha um papel no processo de diferenciação epidérmica.	UniprotKB

Proteína	Função	Referência
Sushi-repeat-containing protein, X-linked (P78539)	Pode estar envolvido na fagocitose e adesão celular.	UniprotKB
Trombospondina 1 (P07996)	Glicoproteína adesiva que medeia interações célula-célula e célula-matriz. Medeia propriedades antiangiogênicas.	UniprotKB
Versicana (P13611)	Pode desempenhar um papel na sinalização intercelular e na ligação de células com a matriz extracelular. Pode participar também, da regulação da motilidade celular, crescimento e diferenciação.	UniprotKB
Vimentina (P08670)	Pertence à classe de filamentos intermediários encontrada em células não epiteliais, especialmente em células mesenquimais. Regula a condrogênese de células progenitoras derivadas da medula óssea humana.	UniprotKB Bobick, B.E et al., Journal of cell biochemistry. (2010); 109:265–276

Tabela 4 Proteínas com baixa taxa de regulação no secretoma de ASCs induzidas versus CPCs

Proteínas (número de acesso ao UniProt)	Processos	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Agrecana (P16112)	Remodelamento da matriz extracelular	-	0.33	0.31
Serpin peptidase inibidor (P01011)	Inflamação	-	0.34	0.22
Alfa-1-antitripsina (P01009)	Inflamação	-	0.39	0.20
Biglican (P21810)	Matriz Extracelular da cartilagem	0.22	0.43	0.41
Chitinase 3-like 1 (cartilagem glicoproteína-39) (P36222)	Condrogênese	0.13	0.36	0.38
Fator VIII de coagulação, (P00451)	Inflamação	0.08	-	-
Clusterina (P10909)	Inflamação	0.34	0.20	0.21
Decorina(P07585)	Matriz Extracelular da cartilagem		0.46	0.45
Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Q9UBP4)	Condrogênese	0.48		0.47
Família de lectina do tipo 3C, membro B (P05452)	Condrogênese	-		0.38
Epiphykan (Q99645)	Matriz Extracelular da cartilagem	-	0.33	0.23
Fibromodulina (Q06828)	Matriz Extracelular da cartilagem	0.32	0.41	0.40
Lactotransferrina (P02788)	Osteogênese	0.48	0.45	
Lisil oxidase (P28300)	Síntese de colágeno		0.42	
Matrilina 4 (O95460)	Remodelamento da matriz extracelular	-	0.26	0.30
Proteína GLA da matriz (P08493)	Osteogênese	-	0.33	0.22
Prolargin (P51888)	Remodelamento da matriz extracelular	-	0.34	-
Proteína-lisina 6-oxidase (P28300)	Síntese de colágeno		0.42	-
Soluble scavenger receptor (A1L4H1)	Remodelamento da Matriz Extracelular		-	0.46
S100 calcium binding protein A6 (P06703)	Remodelamento da matriz extracelular	0.23	0.23	-
Inibidor de peptidase de leucócito (P03973)	Inflamação	-	0.26	0.13
Estimulador de condrogênese 1 (O75711)	Condrogênese	0.26	0.30	0.14
TIMP inibidor de metalopeptidase 1 (P01033)	Remodelamento da matriz extracelular	0.28		
TIMP inibidor de metalopeptidase 2 (P16035)	Remodelamento da matriz extracelular	0.32	0.37	0.42

(-) Proteína não detectada; Exp. 1 – experimento 1; Exp. 2- experimento 2; Exp. 3: experimento 3

Com o propósito de verificar a relevância de cada proteína com a baixa taxa de regulação detectada no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos *versus* CPCs, foi gerada uma tabela, contendo informações relativas à cada proteína encontrada (Tabela 5).

Tabela 5 Função Proteínas com baixa taxa de regulação do secretoma de ASCs induzidas <i>versus</i> CPCs		
Proteína	Função	Referência
Agrecana (P16112)	Proteoglicano, um importante componente da matriz extracelular da cartilagem. A principal função é resistir à compressão na cartilagem.	UniprotKB
Serpin peptidase inhibitor (Alpha-1-antichymotrypsin) (P01011)	Potente inibidor de angiogênese.	UniprotKB
Alfa-1-antitripsina (P01009)	Inibidor de proteases serina.	UniprotKB
Biglican (P21810)	Está envolvido na síntese da fibra de colágeno.	UniprotKB
Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39) (P36222)	Desempenha papel na remodelação dos tecidos e também na capacidade das células de responder e lidar com as mudanças no seu ambiente.	UniprotKB
Fator VIII de coagulação, componente procoagulante (P00451)	Juntamente com o cálcio e fosfolípidos, atua como um conversor de fatores.	UniprotKB
Clusterina (P10909)	Previne a agregação induzida pelo estresse das proteínas do plasma sanguíneo. Desempenha importante papel na regulação da proliferação celular.	UniprotKB
Decorina (P07585)	Pode afetar a taxa de formação de fibrilas. Liga-se ao colágeno tipo I, II, fibronectina e ao TGF- β .	UniprotKB
Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Q9UBP4)	Em adultos, essa proteína está envolvida na formação óssea e na doença de Alzheimer.	UniprotKB
Epifican (Q99645)	Pode desempenhar papel na formação óssea e também no estabelecimento da estrutura ordenada da cartilagem através da organização da matriz.	UniprotKB
Fibromodulina (Q06828)	Afeta a taxa de formação de fibrilas. Pode ter um papel primário na fibrilogênese do colágeno.	UniprotKB
Lactotransferrina (P02788)	Possui efeitos anabólicos, de diferenciação e anti-apoptóticos sobre osteoblastos e também pode inibir osteoclastogênese desempenhando um papel na regulação do crescimento ósseo.	UniprotKB
Matrilina 4 (O95460)	Componente principal da matriz extracelular da cartilagem.	UniprotKB
Proteína GLA da matriz (P08493)	Associa-se à matriz do osso e da cartilagem. Age para inibir a formação óssea.	UniprotKB
Prolargin (P51888)	Ancora as membranas basais aos tecidos conjuntivos subjacente.	UniprotKB
Proteína-lisina 6-oxidase (P28300)	É essencial para o desenvolvimento e função do sistema respiratório e para a integridade de fibras elásticas e de colágeno.	Maki, J.M <i>et al</i> , 2005. Am J Pathol. 2005 Oct; 167(4): 927–936.

Proteína	Função	Referência
S100 calcium binding protein A6 (P06703)	Pode funcionar como um sensor e modulador de cálcio. Desempenha um papel em vários processos fisiológicos, tais como a reorganização do citoesqueleto e na motilidade celular.	UniprotKB
Inibidor de peptidase de leucócito (P03973)	Desempenha um papel na regulação da ativação de NF-kappa- β e respostas inflamatórias.	(PubMed:10702419, PubMed:24352879)
Estimulador de condrogênese 1 (O75711)	Pode interagir com antígeno de célula estromal da medula óssea aumentando o potencial de diferenciação de células mesenquimais humanas durante a regeneração do tecido ósseo. É responsável por estimular a condrogênese <i>in vitro</i> .	UniprotKB Ochi et al., 2006. OsteoArthritis and Cartilage 14, 30-38
TIMP inibidor de metalopeptidase 1 (P01033)	Inibidor de metaloproteinase que funciona formando complexos com metaloproteinases alvo, tal como colagenase, e inativa-os irreversivelmente. Também funciona como um fator de crescimento que regula a diferenciação celular.	UniprotKB
TIMP inibidor de metalopeptidase 2 (P16035)	Inibidor de metaloproteinase que funciona formando complexos com metaloproteinases alvo, tal como colagenase, e inativa-os irreversivelmente.	UniprotKB

A tabela a seguir (Tabela 6) indica as proteínas detectadas com alta taxa de regulação de proteínas no secretoma de ASCs induzido *versus* ASCs não induzido, de acordo com a linha de corte e relevância estatística.

Tabela 6 Função Proteínas com alta taxa de regulação do secretoma de ASCs induzidas <i>versus</i> ASCs não induzido				
Proteínas (Número de acesso ao UniProt)	Processos	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3
Proteína da matriz oligomérica da cartilagem (P49747)	Síntese de colágeno	2.62		
Colágeno tipo XI alfa I (P12107)	Síntese de colágeno	2.26		
Lisil oxidase (P28300)	Síntese de colágeno	2.22		-
Trombospondina 1 (P07996)	Síntese de colágeno		13.06	

Exp. 1 – experimento 1; Exp. 2- experimento 2; Exp. 3: experimento 3

(-) Proteína não detectada

Com o propósito de verificar qual a relevância de cada proteína com alta taxa de regulação detectada no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos *versus* não induzidos, foi gerada uma tabela, contendo informações relativas à cada proteína encontrada (Tabela 7).

Tabela 7 Função Proteínas com alta taxa de regulação do secretoma de ASCs induzidas *versus* ASCs não induzido

PROTEÍNA	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
Proteína da matriz oligomérica da cartilagem (COMP) (P49747)	Desempenha um papel na integridade estrutural da cartilagem através da sua interação através da sua interação com outras proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina. Medeia a interação de condrócitos com a matriz da cartilagem através da interação de receptores de integrina da superfície celular.	UniprotKB
Colágeno tipo XI, alfa I (P12107)	Desempenha um importante papel na fibrilogênese, controlando o crescimento lateral das fibrilas de colágeno tipo II.	UniprotKB
Lisil oxidase (P28300)	É essencial para a integridade de fibras elásticas e de colágeno.	Maki, J.M <i>et al</i> , 2005. Am J Pathol. 2005 Oct; 167(4): 927–936.
Trombospondina 1(P07996)	Glicoproteína adesiva que medeia interações célula-célula e célula-matriz. Medeia propriedades antiangiogênicas.	UniprotKB

A tabela 8, a seguir, indica as proteínas detectadas com baixa taxa de regulação de proteínas no secretoma de ASCs induzido *versus* ASCs não induzido, de acordo com a linha de corte e relevância estatística.

Tabela 8 Função Proteínas com baixa taxa de regulação do secretoma de ASCs induzidas *versus* ASCs não induzido

Proteínas (Número de acesso ao UniProt)	Processos	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3
TIMP inibidor de metalopeptidase 1 (P01033)	Remodelamento da matriz extracelular		0.35	
Colágeno tipo III, alfa 1 (P02461)	Matriz extracelular da cartilagem	0.47		
Interleucina 8 (P10145)	Inflamação	-	0.21	
lactotransferrina (P02788)	Osteogênese		0.28	
Tioredoxina (P10599)	Remodelamento da matriz extracelular	-	0.48	
Inibidor da via tecidual 2 (P48307)	Remodelamento da matriz extracelular	-	0.35	

(-) Proteína não detectada

Exp. 1 – experimento 1; Exp. 2- experimento 2

Com o propósito de verificar a relevância de cada proteína com baixa taxa de regulação detectada no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos *versus* não induzidos, foi gerada uma tabela (Tabela 9), contendo informações relativas à cada proteína encontrada na tabela 8.

Tabela 9 Função Proteínas com baixa taxa de regulação do secretoma de ASCs induzidas versus ASCs não induzido

PROTEÍNA	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
Inibidor de metalopeptidase 1 TIMP (P01033)	Inibidor de metaloproteínase que funciona formando complexos com metaloproteínas alvo, tal como colagenase, e inativa-os irreversivelmente.. Também funciona como um fator de crescimento que regula a diferenciação celular.	UniprotKB
Colágeno tipo III, alfa 1 (P02461)	Predominante na maioria dos tecidos conjuntivos juntamente com o colágeno tipo I. Está envolvido na regulação do desenvolvimento cortical.	UniprotKB
Interleucina 8 (P10145)	É um fator quimiotático que atrai neutrófilos, basófilos e células T. Está envolvido na ativação de neutrófilos. É liberado de vários tipos de células em resposta a um estímulo inflamatório.	UniprotKB
Lactotransferrina (P02788)	Possui efeitos anabólicos, de diferenciação e anti-apoptóticos sobre osteoblastos e também pode inibir osteoclastogênese desempenhando um papel na regulação do crescimento ósseo.	UniprotKB
Tioredoxina (P10599)	Desempenha um papel na S-nitrosilação reversível de resíduos de cisteína em proteínas alvo contribuindo para a resposta ao óxido nítrico intracelular.	UniprotKB
Tissue factor pathway inhibitor 2 (P48307)	Desempenha um papel na regulação do remodelamento da matriz extracelular mediada por plasmina.	UniprotKB

5.6 Constatação de processos envolvidos durante a diferenciação condrogênica no secretoma de ASCs induzidos

A ferramenta BiNGO (*gene ontology tool of biological networks*) determina quais genes (*gene ontology- GO*) de uma dada amostra estão estatisticamente representados numa rede biológica. Este programa mapeia os temas funcionais predominantes de um dado conjunto de genes e exibe este mapeamento através do *Cytoscape*, *software* que permite a visualização de redes de interação molecular, integrando essas interações com expressão gênica e outros dados genômicos funcionais. O critério de FDR (False Discovery Rate) proposto por Benjamini & Hochberg (1995) expressa a proporção esperada de hipóteses nulas rejeitadas erroneamente. Essa estimativa possibilita o controle dos falsos positivos. Portanto, esta foi a análise estatística utilizada para a análise desses dados.

No presente estudo, foi gerado um gráfico a fim de analisar a rede biológica no conjunto de genes presente no secretoma de ASCs induzido *versus* CPCs. Podemos destacar os grupos em alaranjado com alta relevância estatística, desenvolvimento do sistema esquelético, organização das fibras de colágeno e organização da matriz extracelular, seguido pelas cores em amarelo os grupos de processos metabólicos do colágeno, processos biossintético do colágeno e desenvolvimento da cartilagem envolvido na morfogênese do osso endocondral (Figura 17).

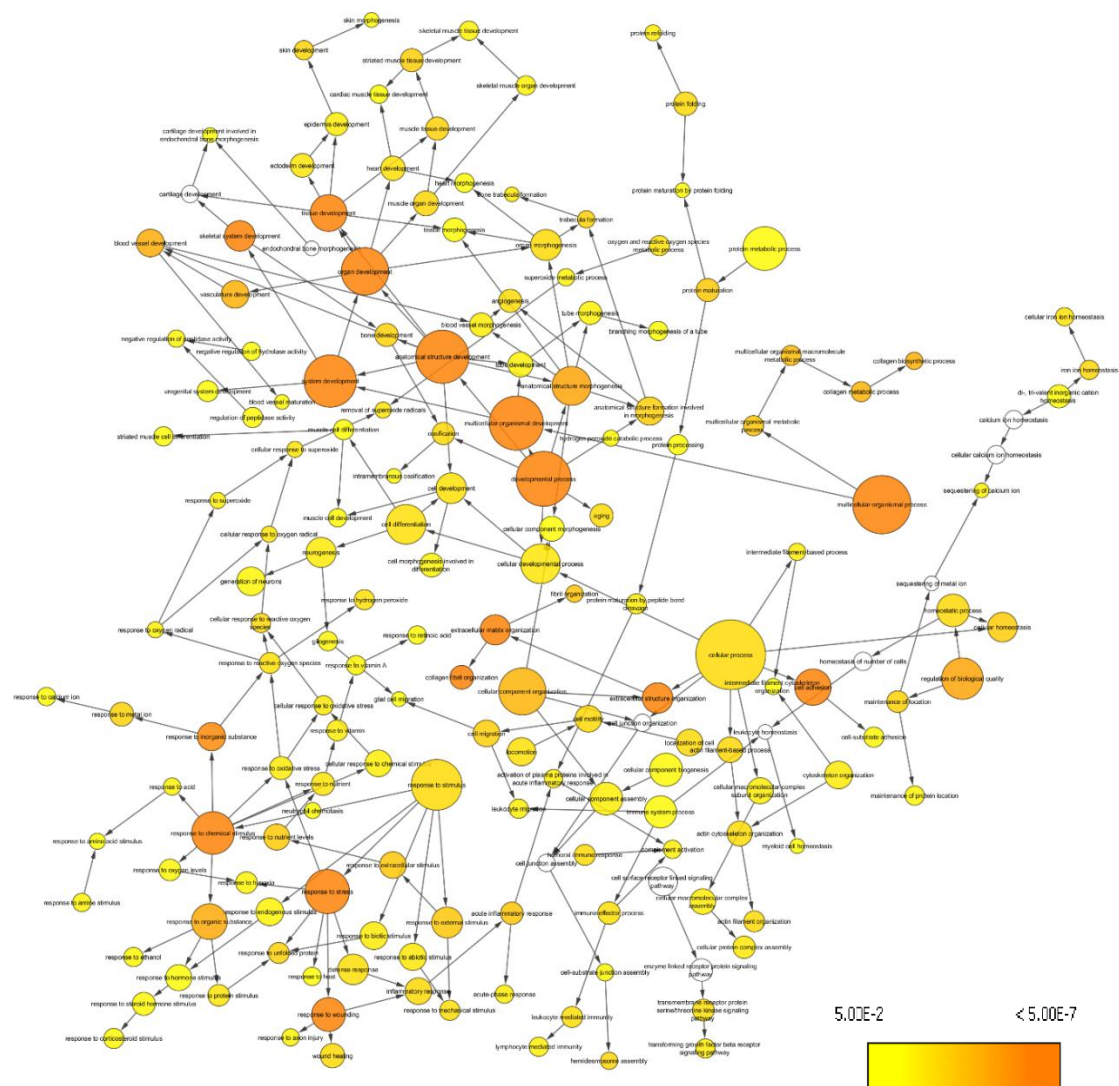


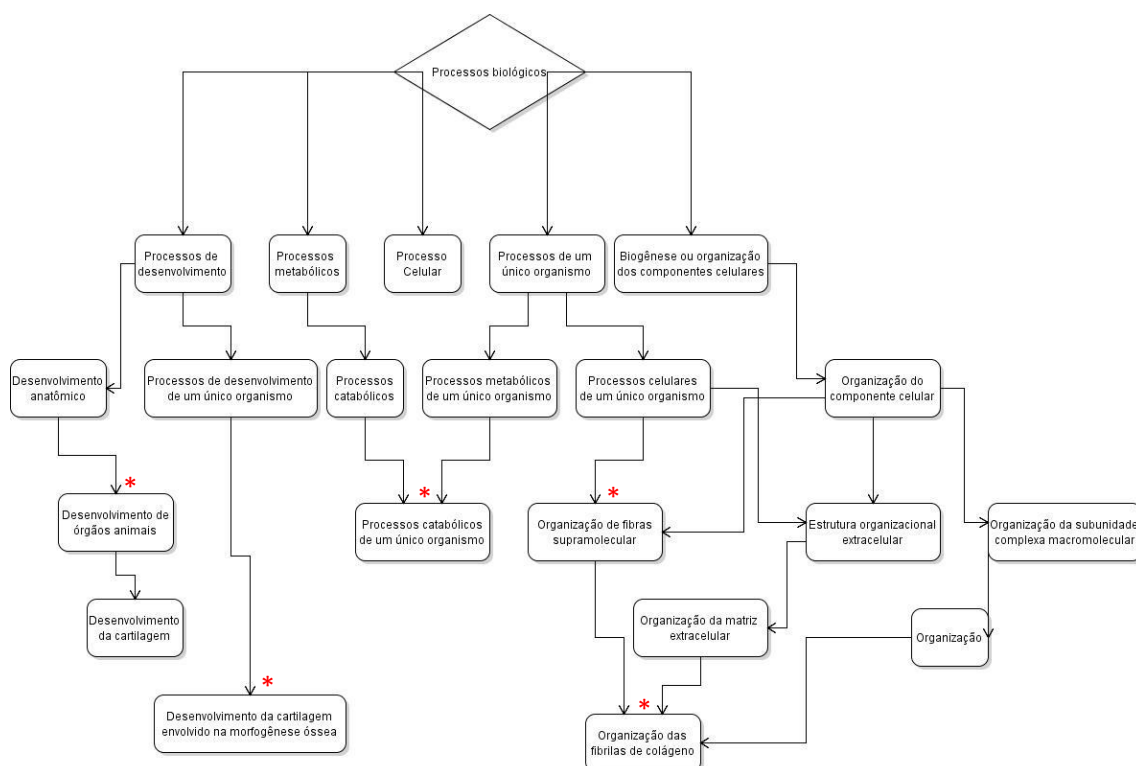
Figura 17. Análise ontológica do secretoma de CPCs *versus* ASCs induzido. Realizado através do software BiNGO ($p < 0,05$), correção de Benjamini-Hochberg, (agrupamento hipergeométrico).

Para melhor visualizar por quais processos é regido o secretoma de CPCs *versus* ASCs induzidas (Figura 18A), além de ASCs não induzida e induzida (Figura 18B). Utilizamos também a análise feita através do aplicativo *Gorilla* (*Gene Ontology enRichment anaLysis and visualiZAtion tool*), que tem como função a identificação e análise de GO através de uma rigorosa análise estatística, com base no valor de *p-value* para cada termo, gerando uma estrutura hierárquica e proporcionando uma visão clara das relações numa representação gráfica eficaz e informativa.

Na análise obtida do secretoma de ASCs induzido *versus* CPCs, os processos envolvidos na condrogênese são os destaques com relação à significância estatística: Desenvolvimento da cartilagem envolvido na morfogênese do osso endocondral, organização das fibras supramoleculares e organização das fibras de colágeno. Foi dado também como significativo os processos de desenvolvimento do órgão animal e processos catabólicos.

Já na figura 18B, houve maior número de processos biológicos com relevância estatística se comparado ao anterior. Foram 10 no total com destaque para os processos de organização supramolecular de fibrilas, organização das fibras de colágeno e organização da matriz extracelular.

A



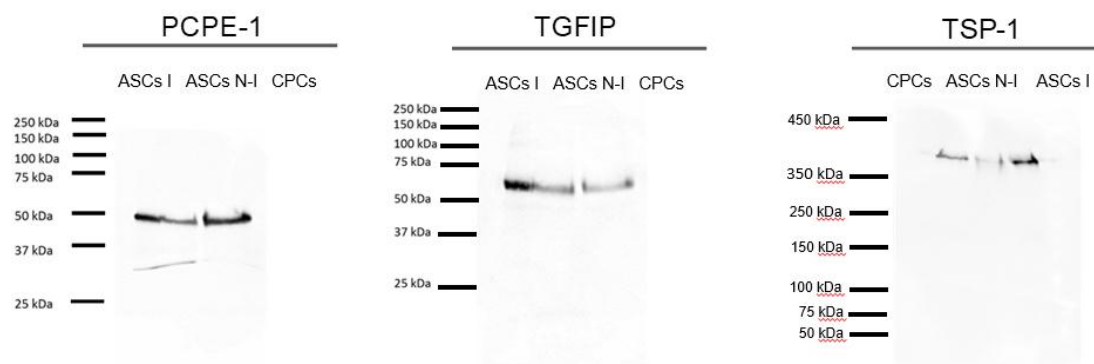


Figura 19. Western blot para as proteínas PCPE-1, TGFIP e TSP-1 do secretoma de esferas de CPCs, ASC induzido e não induzido para a via condrogênica. CPC: cartilage progenitor cells; ASC: adipose tissue stem/ stromal cells; PCPE-1: proteína potenciador de procolágeno C-endopeptidase; TGFIP: proteína induzida pelo fator de crescimento; TSP-1: Trombospondina.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada uma abordagem de análise proteômica com o intuito de comparar o perfil de moléculas que são secretadas no sobrenadante de esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica e não-induzidos, além de esferoides de CPCs, a fim de verificar o potencial condrogênico dos esferoides de ASCs induzidos.

O cultivo 2D é um modelo intensamente utilizado na pesquisa de forma rotineira em milhares de laboratórios pelo mundo. Porém, esse tipo de cultivo celular é primitivo e não reproduz a anatomia ou a fisiologia para um estudo mais robusto (Haycock, 2010). Ou seja, este modelo não reproduz com autenticidade o comportamento fisiológico das células *in vivo*.

Por outro lado, a metodologia utilizando o conceito do cultivo tridimensional está se tornando cada vez mais essencial pois tem a capacidade de reproduzir o microambiente do tecido nativo. Logo é propício a ter respostas mais eficientes, como por exemplo, em modelos de teste de drogas em cultivos tridimensionais com células tumorais, onde estudos apontaram que drogas utilizadas para combater células tumorais foram melhor “ativadas” em cultivo 3D em contrapartida ao modelo 2D (Kapur et al, 2012; Imamura et al., 2015). O arranjo tridimensional pode reproduzir a rede de MEC e consequentemente oferecer suporte ao desenvolvimento do fenótipo e das funções da cartilagem (Shi et al, 2015).

Todavia, os métodos empregados para a geração de esferoides demandam tempo e não há uniformidade do tamanho e formato dos esferoides, ocasionando baixa reprodutibilidade de dados experimentais (Gong et al, 2015). Para sanar esta problemática, utilizamos um método reprodutível para a geração de esferoides uniformes empregando o uso de agarose micromoldada (Napolitano et al, 2007).

Logo, para a formação ou fabricação dos esferoides de ASCs e CPCs, utilizamos no presente estudo o modelo de agarose micromoldada produzida a partir de molde de silicone. O molde de silicone contém 81 ressecções para a semeadura das células. Esse método tem sido amplamente utilizado para formar esferoides a partir de vários tipos celulares (Napolitano et al, 2007; Rivron et al, 2009; Ho et al, 2012; Gong et al, 2015). Ademais, os esferoides de ASCs sintetizam sua própria MEC servindo para aumentar a robustez das células em

tensões mecânicas além de serem cultivadas em hidrogel micromoldado de forma reprodutível e tamanhos consistentes (Kapur *et al*, 2012).

Após 24 horas do plaqueamento das células na agarose micromoldada, foi possível observar a formação dos esferoides em cada uma das 81 ressecções. O modelo possui inúmeras vantagens, como auto-montagem das células sem a necessidade do emprego de forças externas, cuja aplicação pode resultar numa interferência na expressão de moléculas de adesão altamente presentes em esferoides e, por conseguinte nos processos de diferenciação. Quando os esferoides são submetidos a privação de forças externas, passam pelo processo denominado “*self-assembly*” ou auto-montagem através da forte interação célula-célula, dando origem ao esferoide.

As etapas a seguir constituem uma sequência para a formação dos esferoides: (i) contato célula-célula devido a forte proximidade espacial durante o plaqueamento na agarose micromoldada (ii) acúmulo de caderinas (iii) compactação e estabilidade dos esferoides. Steinberg & Foty propuseram, de acordo com o perfil de moléculas de adesão, que as células criam uma afinidade gerando uma dependência entre elas ocasionando então essa forte interação célula-célula. É o que podemos observar no presente estudo no momento em que as células são plaqueadas na agarose micromoldada. Esse aumento no contato entre as células se dá devido às caderinas, presentes durante a agregação celular (Hsu and Huangl, 2013). Já a compactação e estabilidade é devido a MEC que desempenha papel fundamental nas forças biomecânicas e na transdução de sinal (Engler *et al*, 2006) fase esta observada após 24 horas do plaqueamento das células.

Este modelo também possibilitou a formação de esferoides com excelente controle de tamanho. Essa padronização dos esferoides é crítica para a avaliação reprodutível no ensaio de secretoma uma vez que as limitações de difusão variam com o tamanho dos esferoides. O microambiente formado pela agregação é deliberado por oxigênio e gradientes de nutrientes além de metabólitos e gás carbônico. Esse microambiente envolve a adaptação metabólica das células a essa estrutura e modificação no perfil proliferativo e de resposta ao ambiente, desse modo é fundamental a manutenção de um tamanho padronizado de esferoides (Langan *et al*, 2016). Além disso, como a agarose micromoldada é transparente, permite o monitoramento da formação dos

esferoides por microscopia ótica. A agarose foi utilizada devido à biocompatibilidade e a resistência desse material à adesão celular. Utilizando as células de ASCs e CPCs para a formação de esferoides em modelo *scaffold-free* através do método utilizando agarose micromoldada, demonstramos a capacidade de controlar o tamanho dos esferoides. Segundo a literatura, esferoides de diâmetro de pelo menos 400 μm é necessário para reproduzir uma condição de hipóxia, essencial para configurar a via condrogênica (Friedrich *et al*, 2009; Ranga *et al*, 2014). Outro estudo aborda que o limite do diâmetro dos esferoides formados através do método *scaffold-free* varia em torno de 500-600 μm (Chua and Yeong, 2015). No presente estudo o tamanho dos esferoides apresentaram diâmetro entre 500 μm e 700 μm .

O tecido adiposo é o órgão que controla o metabolismo da energia sistêmica e mantém a homeostase. Também configura uma fonte abundante e acessível de uma população de células que possui intensa capacidade proliferativa e também de se diferenciar em múltiplas linhagens (Zuk *et al*, 2002; Fraser *et al*, 2008; Brunnel *et al*, 2008; Zimmerlin *et al*, 2010). São as células-tronco do tecido adiposo (ASCs) cujo interesse vem se intensificando para o uso na engenharia de tecidos e aplicação na medicina regenerativa.

As células progenitoras de cartilagem (CPCs) do septo nasal humano do presente estudo, foram isoladas pelo nosso grupo (Amaral *et al*, 2012) da zona de transição do pericôndrio, que é apontado por ser uma potencial fonte de células condro-progenitoras (Togo *et al*, 2006; Upton *et al*, 1981). Podem ser utilizadas não apenas para uso na aplicação clínica, como implantes, mas também como modelo *in vitro* para estudos de diferenciação condrogênica. Porém, o limitante para a utilização dessa fonte celular é a baixa quantidade de células obtidas no isolamento, devido à baixa disponibilidade de tecido doador.

Já o secretoma corresponde ao grupo de proteínas inseridas no espaço extracelular das células (Makridakis and Vlahou, 2010). Desse modo, estudar e analisar o conjunto de proteínas que formam o secretoma pode nos auxiliar não só na identificação e caracterização das proteínas mas também contribuir na predição do estado fisiológico da célula ou de uma população celular (Wen *et al*., 2011; Yang *et al*, 2012). A utilização de técnicas proteômicas utilizando “*shotgun*” (separação dos peptídeos por cromatografia líquida seguida por espectrometria de massas) é uma poderosa ferramenta para se estudar proteínas em larga

escala. O avanço na melhoria da espectrometria de massas levou ao desenvolvimento de técnicas mais apuradas e também de quantificação relativa de proteínas, como por exemplo o Itraq (*Isobaric Tag for Relative and Absolute quantitative*), utilizado nesse estudo, que permite a comparação direta obtendo informações mais confiáveis e precisas. Os dados quantitativos apresentados no presente estudo se baseia na alteração relativa da proteína entre duas amostras, ou seja, a quantificação relativa é definida em relação a medida da mesma proteína entre as amostras. Em resumo, como consequência da marcação pelo itraq, os peptídeos são ligados pelo tag isobárico junto ao grupo repórter. Estes peptídeos marcados aparecem como picos únicos no espectro de massas e a quantificação relativa dos peptídeos é gerada através de fragmentos desse grupo repórter.

A análise proteômica do presente estudo possibilitou a comparação e identificação de proteínas envolvidas no processo de condrogênese no secretoma dos esferoides de ASCs induzidas quando comparadas ao nosso padrão ouro, as CPCs. A tabela 1 evidencia as proteínas presentes no secretoma de ASCs induzidas para a diferenciação condrogênica comparadas ao secretoma de CPCs, que apresentam razão entre de 0,5 a 2,0, não apresentando relevância estatística, indicando que não houve regulação da quantidade secretada da proteína após comparação entre as amostras.

As distribuições da relação da razão iTRAQ (ASCs induzidas: CPCs) e (ASCs induzidas: ASCs não induzida) foram combinadas com distribuições gaussianas normais para estabelecer o corte estatístico utilizado e identificar as proteínas sintetizadas no secretoma dos esferoides. Consideramos potenciais proteínas, ou seja, que tiveram relevância estatística, aquelas que tiveram relação de marcação pelo itraq acima ou abaixo do corte, em pelo menos um experimento. Ou seja, proteínas que tiveram razão abaixo de 0,5 e razão acima de 2,0 foram consideradas como pouca e altamente reguladas, respectivamente.

A cartilagem articular é constituída por uma MEC altamente especializada cujos principais componentes são o colágeno tipo II e agrecan. Contudo, há colágenos que ocupam uma pequena fração da matriz madura, colágenos tipo VI, XI, XII, XIV, proteínas típicas de cartilagem, detectadas nesse estudo, desempenham papéis fundamentais na estrutura, propriedades mecânicas, organização e forma da cartilagem articular e também em funções biológicas

específicas. Contudo, apesar de ocuparem um escasso espaço na MEC, são essenciais pois cooperam para o bom funcionamento e manutenção da cartilagem articular.

Como esperado, as proteínas mais abundantes da MEC, detectados por análise de proteômica são os colágenos e os proteoglicanos. Dentre essas proteínas detectadas, o colágeno é a macromolécula predominante na maioria dos tecidos conectivos e a proteína mais abundante em mamíferos (30% da massa total de proteína) (BLUM, 2012) e representa a maior fração do peso seco da cartilagem articular (50-80%) (Mow *et al*, 1992) enquanto GAG (glicosaminoglicano) é relatado por apresentar um total de 21% (Anderson *et al*, 1964). E justamente, alcançar construídos com alto teor de colágeno na MEC, é a problemática em estudos envolvendo a engenharia de cartilagem (Whitney *et al*, 2017).

No presente estudo, foi identificado o colágeno tipo II, um dos principais componentes da cartilagem hialina, possui um importante papel na manutenção e função dos condrócitos (Henrotin *et al*, 2013; Bosnakovski *et al.*, 2006). Estudos já demonstraram que o colágeno tipo II pode induzir a proliferação celular, a deposição de MEC e ainda atuar na cicatrização de feridas mediada pelos condrócitos (Nehrer *et al*, 1997; Buma *et al*, 2003; Veilleux *et al*, 2004). Portanto, nossos resultados demonstram que a presença do colágeno tipo II na MEC dos esferoides tem o potencial de estimular a condrogênese.

Além do colágeno tipo II, foram detectados também os colágeno tipo III, que está presente na maioria dos tecido conectivos junto ao colágeno tipo I, e o colágeno tipo V, que é classificado como um colágeno regulador da formação de fibrilas (Birk and Bruckner, 2011).

O colágeno tipo VI representa apenas 1% do colágeno total em uma cartilagem articular de um adulto (Eyre *et al*, 2006). É especialmente responsável por envolver a ligação e a integridade dos condrócitos. É capaz de se ligar à uma grande variedade de proteínas da MEC, dentre elas o colágeno tipo II (Bidanset *et al*, 1992), colágeno tipo XIV (Brown *et al*, 1992), decorina (Bidanset *et al*, 1992) e matrilina-1 (Wiberg *et al*, 2001), propiciando uma rede que ancora o condrócito à matriz pericelular na cartilagem articular. Estudos demonstraram um importante papel do colágeno tipo VI na regulação da fisiologia da articulação sinovial. Por exemplo, a deficiência de colágeno tipo VI acarreta na diminuição

da rigidez e hipertrofia de condrócitos, sugerindo então que o colágeno tipo VI possui papel fundamental na mecânica e tensão osmótica da MEC para os condrócitos (Zelenski *et al*, 2015).

O colágeno tipo XI é abundantemente distribuído na cartilagem articular, tendão e também no músculo esquelético (Mio *et al*, 2007), além de regular o colágeno tipo II na formação da cartilagem (Fichard *et al*, 1994). Esta proteína além de ter uma alta regulação no secretoma dos esferoides ASCs induzidos comparado aos esferoides CPCs, teve também uma alta regulação no secretoma de ASCs induzido comparado ao secretoma de ASCs não induzido. Representa cerca de 3% a 10% do colágeno total da cartilagem adulta e fetal, respectivamente (Eyre *et al*, 2012). Um estudo anterior averigou qual seria o resultado de uma mutação no colágeno tipo XI e a resposta foi um aumento na degradação do colágeno tipo II na cartilagem articular (Lu *et al*, 2002). Já o colágeno tipo XII, também detectado no secretoma dos esferoides ASCs induzidos para a via condrogênica, tem sido descrito por estar envolvido na formação de fibrilas, adesão celular e pode servir como protetor da integridade do tecido quando submetido à alto estresse mecânico (Arai *et al*, 2008). Interage com outros elementos como COMP, decorina e fibromodulina (Font *et al.*, 1996), também detectadas em nosso estudo. Outras análises demonstraram a importância do colágeno tipo XII quanto a formação de um microambiente para suportar a formação da cartilagem hialina (Gregory *et al*, 2001; Taylor *et al*, 2014).

De natureza similar ao colágeno tipo VII, o colágeno tipo XIV é regularmente encontrado em áreas de alto estresse mecânico (Hemmavanh *et al*, 2013) além de possuir um papel na fibrillogênese, mantendo então a integridade e as propriedades mecânicas do tecido de cartilagem (Chen *et al*, 2015).

Já o colágeno tipo XVIII foi identificado em 1994 através de rastreamento com sondas para a suposta descoberta de proteínas semelhantes ao colágeno (Oh *et al*, 1994; Pihlajaniemi *et al*, 1994). Este é um colágeno presente na membrana basal, possui isoformas diferentes e o que distingue dos demais tipos de colágeno é o N-terminal com sequências *non-collagenous* mas também divide domínio C-terminal *non-collagenous* e *collagenous* (Heljasvaara *et al*, 2016).

Juntas, essas proteínas detectadas, sugerem a geração de uma cartilagem no nosso modelo de esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica. A detecção dos diferentes tipos de colágeno, VII, XIV, XVIII, no secretoma de esferoides, no que tange ao trabalho, foi de suma importância pois sustenta nosso modelo, para a realidade de um construído de células diferenciadas para a síntese de cartilagem.

O presente estudo não detectou a síntese do colágeno tipo X no secretoma dos esferoides de CPCs assim como no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos e não induzidos para a via condrogênica. Seu aparecimento no secretoma seria crítico, posto que o colágeno tipo X é sintetizado por condrócitos hipertróficos e é encontrado unicamente na cartilagem hipertrófica e na zona calcificada da cartilagem articular (Gannon *et al*, 1991). É normalmente detectado em cartilagens com sinais de osteoartrite mas não em cartilagens saudáveis (Brew *et al*, 2010). Vários estudos relacionaram o aparecimento do colágeno tipo X à medida que os condrócitos se tornaram hipertróficos (Kwan *et al*, 1991; Shen, 2005; Van de Kraan and Van den Berg, 2012).

Nossos resultados indicam que o não aparecimento do colágeno tipo X e uma alta taxa de regulação de colágeno tipo II fundamentam a hipótese da eficácia da diferenciação condrogênica dos esferoides de ASCs, aumentando a condrogênese dos esferoides e indicando ser um potencial produto terapêutico para a engenharia de tecidos.

Estudos utilizando MSCs para a via de diferenciação condrogênica, demonstrou alta regulação de síntese de agrecan, fibromodulina, decorina e COMP. Versican e agrecan são proteoglicanos com habilidade de se ligarem ao hialurano sendo que a síntese de agrecan é consideravelmente mais robusta na cartilagem. Já versican, faz parte da composição da cartilagem articular (Grover and Roughley, 1993) e tem uma associação com fibroblastos, desempenhando um papel na MEC e na adesão célula-célula (Kawashima *et al*, 1999). Tanto a fibromodulina quanto a decorina desempenham papel na regulação da fibrillogênese do colágeno (Oldberg, 1989). No presente estudo, as proteínas agrecan, decorina, fibromodulina e versican foram detectadas no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica quando comparadas às CPCs, consideradas como referência, evidenciando forte tendência da modulação da MEC para a via condrogênica.

Foi identificado também no presente estudo a *Procollagen C-endopeptidase enhancer* (PCPE-1). É sabido que a regulação da deposição de fibrilas de colágeno na MEC é essencial para a homeostase do tecido saudável. Mutações e defeitos geram desordens associadas à várias doenças degenerativas e fibrose que afetam o coração, pele e fígado (Kisseleva *et al*, 2008; Wynn *et al*, 2012). Um passo elementar na regulação da montagem das fibras de colágeno é a conversão proteolítica de moléculas precursoras solúveis, procólágeno, por remoção de N- e C-propeptídeos (Moali *et al.*, 2009). Esta etapa é realizado principalmente por proteína morfogenética óssea (bone morphogenetic protein- BMP), originalmente identificada por induzir a formação de osso e cartilagem em camundongos (Katagiri *et al*, 2008). BMP é regulada por *procollagen C-proteinase enhancer proteins* (PCPE-1 e -2), propício a aumentar a atividade de BMP num substrato específico (Steiglitiz *et al*, 2002; Petropoulou *et al*, 2005). PCPE-1 e -2 aumentam durante a diferenciação condrogênica por conseguinte, intensifica-se o interesse da utilização PCPE-1 e -2 como possível alvo terapêutico. No presente estudo, a análise feita através da técnica por *Western Blot*, foi possível confirmar a existência da proteína no secretoma dos esferoides.

Foi detectado também a proteína fator de crescimento beta induzido (transforming growth factor beta-induced- TGFIP), componente da MEC expressa em vários tipos de células (Skonier *et al*, 1992; Kim *et al*, 2000; Bae *et al*, 2002). Diversos papéis biológicos foram atribuídos ao TGFIP, entre eles o envolvimento na interação célula-matriz, crescimento celular, diferenciação, regeneração e apoptose (Skolnier *et al*, 1994; Kim *et al*, 2003; Nam *et al*, 2003). Foi descrito também que este fator de crescimento aumenta a síntese e secreção de colágeno e fibronectina (Ignotz and Massague, 1986; Centrella *et al*, 1987). Este fator de crescimento foi detectado no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica apresentando razão (ASCs induzida: CPCs) entre 0,5 e 2,0. A análise feita através de *Western blot* constatou a manifestação desta no secretoma.

As proteínas do citoesqueleto desempenham papéis fundamentais na regulação de diversos processos celulares como: proliferação, migração e diferenciação. Particularmente, a vimentina está entre as proteínas mais expressas em células-tronco mesenquimais (Feldmann *et al*, 2005) pois

representa o seu principal componente do citoesqueleto (Ericksson *et al*, 2009) e tem sido sugerido como marcador de células progenitoras do mesoderma (Wagner *et al*, 2006). Esta proteína regula a diferenciação condrogênica em células progenitoras adultas tais como os envolvidos na formação da cartilagem durante o reparo de fratura óssea (Bobick *et al*, 2009). Esta proteína foi identificada no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos. Baseado nesses dados, nossos resultados corroboram com a hipótese da síntese de cartilagem no nosso modelo experimental.

As principais proteínas envolvidas no remodelamento da MEC do tecido nativo de cartilagem foram detectadas no secretoma dos esferoides ASCs induzidos para a via condrogênica quando comparado ao secretoma do nosso padrão ouro, as CPCs, demonstrando então a eficácia do nosso modelo *in vitro* de diferenciação. De acordo com o gráfico 1 há um predomínio de proteínas incumbidas no processo de remodelamento da MEC. Pode-se empreender a diferenciação das células de ASCs para a via condrogênica dado a grande atividade de moléculas sintetizadas para este processo, pois há inúmeras vias já descritas por governar o remodelamento da MEC em resposta aos estímulos mecânicos (Alenghat and Ingber, 2002).

O uso da marcação pelo Itraq permite a comparação de vários proteomas, cada qual marcados com um marcador de massa isobárica específico, e a intensidade entre os diferentes íons repórter pode ser usada para quantificar um aumento ou diminuição na quantidade dos peptídeos correspondente de cada amostra (Chong *et al*, 2006; Unwin *et al*, 2010; Evans *et al*, 2012).

A tabela 2 evidencia as proteínas que tiveram alta taxa de regulação no secretoma de esferoides de ASCs induzido *versus* nosso padrão ouro, CPCs. A proteína detectada de maior relevância foi o colágeno tipo II. Esta proteína é considerada ser a proteína mais específica da cartilagem articular, além de ser essencial para o desenvolvimento embrionário, crescimento linear, contribuir para as propriedades físicas da matriz madura e propiciar a capacidade da cartilagem de resistir às forças compressivas (Ichimura *et al*, 2000; Heinegard and Saxne, 2011). Como já foi dito, nosso estudo revelou uma maior síntese de COL2 no secretoma de esferoides de ASCs diferenciados para a via condrogênica. Diversos grupos já demonstraram uma propriedade indutiva mais forte do COL2 frente ao COL1 no que diz respeito à manutenção e

principalmente à indução do fenótipo condrogênico em ASCs e MSCs (Lu *et al*, 2008; Bosnakovski *et al*, 2006; Chen *et al*, 2005). A detecção desta proteína no secretoma de ASCs induzido, foi de suma importância pois, evidencia, com mais veracidade, nossa hipótese de síntese de cartilagem em esferoides de ASCs induzido.

Uma proteína de grande relevância que foi detectada com alta taxa de regulação no secretoma dos esferoides de ASCs diferenciados em comparação aos esferoides de CPCs e também com alta regulação no secretoma dos esferoides no nosso modelo induzido *versus* não induzido, foi a trombospondina-1 (TSP-1).

A TSP-1 é uma proteína anti-angiogênica (Good *et al*, 1990; Iruela-Arispe *et al*, 1991) detectada em níveis elevados na cartilagem articular e a resistência desta proteína, contra a invasão de vasos sanguíneos, pode ser mediado pela própria TSP-1 (Blanke *et al*, 2009; Iruela-Arispe *et al*, 1993). Como um inibidor de angiogênese, uma aplicação de TSP-1 no local afetado poderia melhorar os sintomas da osteoartrite. A análise feita através de western blot confirmou a presença da proteína no secretoma de ASCs diferenciadas para a via condrogênica.

Sabe-se que a ossificação endocondral está relacionada à invasão de vasos sanguíneos e a invasão destes é acompanhada pela degradação da MEC da cartilagem. Todavia, o microambiente nativo da cartilagem é de natureza avascular e hipóxico (Malda *et al*, 2003). É sabido que a privação de oxigênio é um fator considerável para manter o metabolismo e fenótipo dos condrócitos (Adesida *et al*, 2012; Lafont *et al*, 2008) e por isso a formação de novos vasos sanguíneos no tecido da cartilagem contribui para a inflamação sinovial e gradativa perda da mesma (Moskowitz *et al*, 1981), além de facilitar a progressão da osteoartrite (Walsh *et al*, 2004). E justamente pelo seu efeito anti-angiogênico, esta proteína se torna um objeto de estudo ideal para uso em terapia de cartilagem visando o impedimento da formação de novos vasos bloqueando então a progressão da osteoartrite.

Possui outras funções além da anti-angiogênica como modulação da migração de adesão celular e é um dos principais ativadores do TGF- β (Bornstein, 1995; Crawford *et al*, 1998). Este importante fator de crescimento

possui função na regulação do crescimento celular e também na imunossupressão, pois inibe a secreção de quimiocinas resultando em bloqueio de infiltração de células do sistema imune e, por conseguinte, a inflamação (Cho *et al.*, 2006). Outros estudos confirmaram o papel do TGF- β e seu intrínseco envolvimento no reparo da cartilagem e consequentemente na melhoria da condrogênese (Wang *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 1989).

Estudos também comprovaram sua eficácia em terapias que visam a supressão de tumores indicando ser uma alternativa eficaz para a terapia de células tumorais (Lawler *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). Um estudo recente investigou a deficiência de TSP-1 em modelo de camundongos e constataram que sua ausência promove remodelamento inapto da MEC, levando a aceleração da progressão do aneurisma aórtico (Satoh *et al.*, 2017).

Outro estudo exibiu a consequência da super expressão de TSP-1 na articulação de camundongos. O resultado deste experimento foi a inibição da osteoartrite neste modelo experimental (Hsieh *et al.*, 2010). A TSP-1 é uma proteína classificada também por regular a MEC emitindo sinais para seu remodelamento, sendo um importante fator regulatório no metabolismo da cartilagem (Lawler, 2002; Heinegard and Oldberg, 1989). Portanto, seu efeito anti-angiogênico não poderia ser o único motivo pela qual inibe efeitos ocasionados pela osteoartrite.

Além da TSP-1 ser anti-angiogênica e contribuir para a inibição da osteoartrite, há um outro imprescindível efeito desta proteína: o efeito anti-osteogênico. Posey e colaboradores (2008) certificaram que a deleção da TSP-1 e TSP-2 ocasionou aumento prematuro da ossificação. Outro estudo verificou anormalidades durante a cicatrização de uma ferida em um experimento realizado em camundongos (Agah *et al.*, 2002). A etapa de ossificação endocondral é um complexo processo biológico que abrange múltiplas moléculas de sinalização. A transição da cartilagem saudável para a cartilagem hipertrófica fundamenta-se na diferenciação de condrócitos terminais controlada por sinalização de moléculas específicas (Goldring *et al.*, 2006) seguida da degradação da matriz proteolítica e invasão vascular (Babarina *et al.*, 2001). Gelse e colaboradores (2011) demonstraram que a aplicação da TSP-1 em lesões da cartilagem fracionada pode inibir substancialmente a hipertrofia de condrócitos induzidas por proteína osteogênica-1.

Muitos trabalhos atestaram a eficácia do uso da trombospondina na manutenção do bom funcionamento da cartilagem. Estudos utilizando a transferência ou *delivery* do gene da TSP-1 visando o reparo da cartilagem, é um potencial alvo para tratamentos da osteoartrite contribuindo para uma melhor qualidade de vida do paciente.

A constatação desta proteína no secretoma de esferoides de ASCs induzido e sua abundante finalidade para o restabelecimento e aperfeiçoamento de uma cartilagem avariada, torna-se uma grande potencial para estudo visando sua aplicabilidade para fins terapêuticos em pacientes que sofrem com problemas de degeneração da cartilagem.

O presente estudo também detectou uma proteína envolvida como regulador positivo da angiogênese: ectonucleotídeo pirofosfatase. Como mencionado, a angiogênese está intimamente ligada à hipertrofia dos condrócitos. Quando há inibição da hipertrofia de condrócitos, por exemplo, a angiogênese e a ossificação endocondral é bloqueada (Karaplis *et al*, 1994). A hipertrofia dos condrócitos pode levar ao aumento da expressão de fatores angiogênicos que estimula a invasão vascular na placa de crescimento (Harper and Klagsbrun, 1999). Contudo, nossos resultados demonstraram que o secretoma dos esferoides de ASCs induzidos para a via obteve maior número de proteínas envolvidos com inibidores da angiogênese como a TSP-1 e 2 e precursor do complemento C3.

A proteína da matriz oligomérica da cartilagem (COMP), detectada na condição acima, foi positivamente regulada no secretoma de ASCs induzido frente às CPCs e também no secretoma de ASCs induzido *versus* não induzido. Esta proteína é também conhecida por trombospondina-5, é encontrada principalmente no tecido da cartilagem e no tecido ósseo (Muller *et al*, 1998). Porém, esta proteína não é limitada somente a esses tecidos, foi encontrada também em tecidos conjuntivos como a pele, tendões e ligamentos (DiCesare *et al*, 1994; Muller *et al*, 1998). A COMP é umas das principais proteínas não-colágenas da cartilagem (Hedbom *et al*., 1992) e estudos apontam que mutações na COMP levam ao quadro de displasia esquelética (Briggs *et al*, 1992; Hecht *et al*, 1992). Sabe-se que a baixa regulação de colágeno tipo II, juntamente com a COMP, reflete num desfavorecimento da montagem, integridade e estabilidade da MEC. Já foi mostrado também que a COMP interage com o colágeno tipo I,

colágeno tipo II, colágeno tipo IX, colágeno tipo XII e colágeno tipo XIV, pró-colágeno 1 e 2 e agrecan (Briggs and Chapman., 2002; Chen *et al*, 2007), desempenhando papel importante na formação e manutenção das fibras de colágeno (Rosenberg *et al*, 1998; Thur *et al*, 2000). No presente estudo, grande parte das proteínas pela qual a COMP interage foi detectada no secretoma dos esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica, evidenciando um conjunto de interação de moléculas, integrando a formação da cartilagem.

Outra proteína relevante detectada no secretoma de ASCs induzida é a lisil oxidase, uma enzima extracelular que cataliza a ligação covalente entre moléculas de colágeno para estabilizar sua estrutura supramolecular (Kai *et al*, 2016). Esta proteína possui importante papel na formação e reparo da MEC através da oxidação da lisina gerando produtos covalentes responsáveis pela estabilização das fibras de elastina na MEC (Smith-Mungo and Kagan, 1998), além de também regular o remodelamento da MEC e atuar na homeostase celular (Payne *et al*, 2007). Outro estudo constatou a importância da lisil oxidase na contribuição para a mecanotransdução mediada por TGF- β em células tumorais (Taylor *et al*, 2011). A percepção dessa proteína no secretoma, embasa nosso modelo, no que tange o aprimoramento e favorecimento para a via de diferenciação condrogênica.

A tabela 4 evidencia as proteínas que tiveram uma baixa taxa de regulação no secretoma dos esferoides de ASCs induzido para a via condrogênica comparado ao secretoma de CPCs. Há maior número de proteínas envolvidas no processo osteogênico, o que sugere regularidade no processo de desenvolvimento e diferenciação para a via condrogênica.

Outro grupo que também apresentou baixa regulação foram as proteínas envolvidas no processo de remodelamento da MEC e também as envolvidas na MEC da cartilagem, talvez pelo início da formação da cartilagem madura. A maioria são proteoglicanos, entre eles o agrecano, biglican, decorina e matrilina, residentes no espaço extracelular. A cartilagem contém cerca de 10% de proteoglicanos e são encontrados em agregados moleculares de alto peso molecular. São essenciais para a hidratação da cartilagem e de atender às exigências mecânicas (Dudhia, 2005; Perrimon and Bernfield, 2001). Há baixa modulação de proteoglicanos no secretoma de ASCs induzidos quando comparado ao nosso padrão de referência. É possível que esse fato ocorra

devido ao início da síntese da cartilagem e pelo consequente avanço para o “amadurecimento” da MEC dos esferoides induzidos, já que a combinação de vários proteoglicanos juntamente com sua organização da MEC é que fornece à cartilagem suas propriedades físicas únicas. Os proteoglicanos podem ser capazes de sequestrar fatores de crescimento e consequentemente atuar na intervenção durante o evento da condensação pré-condrogênica, atuando também na organização da MEC e regulando a expressão do fenótipo dos condrócitos (Knudson and Knudson, 2001).

Poucas proteínas que tiveram baixa taxa de regulação no secretoma de ASCs diferenciados comparado ao ASCs não diferenciados, pertencentes à via condrogênica. Entre elas, podemos citar proteínas relacionadas ao remodelamento da MEC, inflamação, e ligadas à diferenciação para a via osteogênica.

A interleucina IL-8 é uma citocina pró-inflamatória com papel na inflamação mediada por neutrófilos e consequentemente envolvida na destruição da cartilagem sadia contribuindo para fisiopatologia da osteoartrite (Goldring, 2000; Lotz *et al*, 1992). Porém, um estudo realizado por Yoon e colaboradores (2016) demonstrou que uma combinação de IL-8 com medula óssea concentrada induz resposta positiva na regeneração da cartilagem articular de joelho de cachorros da raça *beagle*. Esta foi uma das proteínas que não obteve modulação significativa no secretoma de esferoides ASCs induzidos para a via condrogênica. Podemos inferir que o modelo não amplifica ou modula este processo inflamatório. Além do fato de somente proteínas envolvidas no processo de síntese de colágeno terem sido altamente moduladas no secretoma de esferoides de ASCs induzidos *versus* não induzidos.

As últimas abordagens deste trabalho consistiram na utilização de ferramentas de bioinformática como o *BinGO*, para análise do secretoma dos esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica e ASCs não induzidos. Este programa tem como interface a exibição de conjuntos enriquecidos como uma rede, onde cada conjunto de genes é representado por um nó, os quais se conectam a genes semelhantes em uma estrutura hierárquica em termos de *gene ontology* (GO). Há um encadeamento de processos relevantes para o processo de diferenciação condrogênica, como a organização das fibras de colágeno, organização de fibras, desenvolvimento da cartilagem envolvido na

morfogênese endocondral do osso, além de processos que envolve o remodelamento da MEC como organização e estrutura da MEC, hipóxia, estresse, adesão celular, além de desenvolvimento tecidual, a capacidade de regeneração e receptores de TGF- β . É sabido que tanto os condrócitos como as MSCs são influenciados por moléculas sinalizadoras junto a MEC que incluem hormônios, citocinas, e fatores de crescimento. O balanço da síntese e reabsorção desses fatores de sinalização (GETGOOD *et al*, 2009) possuem significativo impacto para o desenvolvimento da osteoartrite, e esta interação também desempenha papel significativo no processo regenerativo.

Outra abordagem utilizada neste estudo foi a ferramenta *GOrilla* que identifica termos *gene ontology* enriquecidos atribuindo significância estatística aos resultados numa visão hierárquica, facilitando a visualização dos resultados. No presente estudo, foi feita análise com esta ferramenta para o secretoma de ASCs induzido *versus* CPCs. Os processos de maior relevância estatística e que estão envolvidos na via condrogênica são: desenvolvimento da cartilagem envolvido na morfogênese do osso endocondral, organização das fibras supramoleculares e organização das fibras de colágeno. Estes resultados corroboram com o *network* gerado pelo *BinGO* evidenciando forte tendência do comprometimento desses esferoides para a via condrogênica. Outros processos, cuja relevância não foi significativa, mas que estão presentes no diagrama, são o desenvolvimento da cartilagem e organização da MEC que, como mencionado anteriormente, são imprescindíveis para a formação da cartilagem madura.

Também foi gerado um diagrama para o secretoma de esferoides de ASCs induzidos *versus* não induzidos. Houve um maior número de processos se comparado à condição anterior. Apesar de ser a mesma fonte de células, este fato pode ocorrer por estarmos comparando o secretoma de células induzidas para a via condrogênica com as células que não receberam indução, gerando maior diversidade de processos.

Nosso estudo permitiu uma análise apurada do modelo de diferenciação condrogênica *in vitro* através de análises proteômicas verificado por espectrometria de massas pelo método *ltraq*. Através desta técnica foi possível identificar proteínas típicas da cartilagem e envolvidas no processo para a diferenciação condrogênica no secretoma de esferoides de ASCs induzidos para esta via. Proteínas como colágeno tipo II e VI, COMP, TSP-1 e PCPE-1 foram

altamente modulados quando comparados com nosso padrão CPCs de referência. Proteínas envolvidas no processo de inflamação tiveram redução na regulação na mesma comparação. Além de apurar e corroborar a eficácia de síntese de moléculas envolvidas na diferenciação condrogênica desses esferoides, a aplicação clínica das moléculas secretadas conduz para um desenvolvimento seguro e eficaz para estratégias terapêuticas.

7. CONCLUSÕES

- Através do método de cultivo tridimensional em hidrogéis micromoldados, foi possível obter esferoides apresentando homogeneidade de tamanho.
- A análise de proteômica, utilizando a estratégia de marcação Itraq, permitiu a identificação e quantificação relativa de proteínas específicas de esferoides de ASCs induzidos para a via condrogênica quando comparado ao padrão CPCs de referência, possibilitando a discriminação de proteínas mais abundantes e menos abundantes e, por conseguinte, dos principais processos biológicos associados ao secretoma de ASCs quando diferenciadas para a via condrogênica.
- As proteínas secretadas por esferoides de ASCs induzidos desempenham papéis essenciais para a manutenção da MEC, regulação da condrogênese e propriedades anti-angiogênica, fundamentais para o tecido cartilaginoso. Dentre elas destacam-se proteoglicanos, vimentina, colágeno tipo II, colágeno tipo XI e TSP-1, além da ausência do colágeno tipo X.
- O secretoma de ASCs induzido constitui de uma fonte de moléculas promissoras para o uso em terapias visando o reparo da cartilagem danificada.

8. REFERÊNCIAS

ABAZOVA, N; KRIJGSVELD, J. Advances in stem cell proteomics. **Current opinion in Genetics & Development**. v. 46, p. 149-155, 2017.

ACHILLI, T.M; MEYER B.S; MORGAN, J.R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert Opinion on Biological Therapy**. v. 12, p. 1347-1360, 2012.

ADESIDA, A.B; MULET-SIERRA, A; JOMHA, N.M. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Research & Therapy**. v. 3, 2012.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**. v.422, p.198-207, 2003.

AGGARWAL, K; CHOE, L.H; LEE, K.H. Shotgun proteomics using Itraq isobaric tags. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**. v. 5, p. 112-120, 2006.

AGAH, A; KYRIAKIDES, T.R; LAWLER, J; BORNSTEIN, P. The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. **The American Journal of Pathology**. v. 161, p. 831–839, 2002.

ALENGHAT, F; INGBER, D.E. Mechanotransduction: All Signals Point to cytoskeleton, matrix, and integrins. **Sciences stke**. p.1-4, 2002.

AMARAL, R.J.F.C.; PEDROSA, C.S.G.; KOCHEN, M.C.L.; DA SILVA, K.R.; ANICETO, M.; DA SILVA, C.C.; BOROJEVIC, R.; BAPTISTA, L.S. Isolation of human nasoseptal chondrogenic cells: A promise for cartilage engineering. **Stem Cell Research**. v.8, p.292–299, 2012.

ANDERSON, C.E, LUDOWIEG, J; HARPER, H.A; ENGLEMAN, E. The composition of the organic component of human articular cartilage: relationship to age and degenerative joint disease. **J Bone Joint Surg Am**. v. 46, 1964.

ARAI, K; NAGASHIMA, Y; TAKEMOTO, T; NISHIYAMA, T. Mechanical strain increases expression of type XII collagen in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Cell Struct Funct**. v. 33, p. 203-210, 2008.

BABARINA, A.V; MOLLERS, U; BITTNER, K; VISCHER, P; BRUCKNER, P. Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification: endothelial cell derived proteinases derepress late cartilage differentiation in vitro. **Matrix Biology**. v. 20, p. 205-213, 2001.

BADYLAK, S.F; NEREM, R.M; Progress in tissue engineering and regenerative medicine. **Proc Natl Acad.** v. 23, p. 3285-3286, 2010.

BAE, J.S; LEE, S.H; KIM, J.E; CHOI, J.Y; PARK, R.W; PARK, T; PARK, H.S; SOHN, Y.S; LEE, D.S; LEE, B.E. Beta Ig-h3 supports keratinocyte adhesion, migration, and proliferation through alpha3beta1 integrin. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 294, p. 940-948, 2002.

BAKSH, D; SONG, L; TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of cellular and molecular medicine.** v. 8, p. 301-316, 2004.

BAPTISTA, L.S; AMARAL, R.J; CARIAS, ANICETO, M; CLÁUDIO-DA-SILVA, C.S; BOROJEVIC, R. An alternative method to the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirates samples. **Cytotherapy.** v. 11, p. 706-715, 2009.

BAPTISTA, L.S; SILVA, K.R; PEDROSA, C.S.G; AMARAL, R.J.F.C; BELIZARIO, J.V; BOROJEVIC, R. Bioengineered Cartilage in a Scaffold-Free Method by Human Cartilage-Derived Progenitor Cells: A Comparison With Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells. **Artificial organs.** v. 37, p. 1068-1075, 2013.

BARANIAK, P.R; MCDEVITT, T.C. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. **Cell Tissue Res.** v.347, p.701–711, 2012.

BENJAMINI, Y; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society.* v. 57, p. 289-300, 1995.

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T.J.; YARMUSH, M.L. Tissue Engineering and Regenerative. Medicine: History, Progress, and Challenges. **The Annual Review of Chemical and Biomolecular.** v.2, p.403-430, 2011.

BIDANSET, D.J; GUIDRY, C; ROSENBERG, L.C; CHOI, H.U; TIMPL, R; HOOK, M.

Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. **Journal of Biological Chemistry.** v. 267, p. 5250-5256, 1992.

BIDANSET, D.J; GUIDRY, C; ROSENBERG, L.C; CHOI, H.U; TIMPL, R; HOOK, M. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. **Journal of Biological Chemistry.** v. 267, p. 5250-5256, 1992.

BLANKE, M; CARL, H.D; KLINGER, P; SWOBODA, B; HENNIG, F; GELSE, K. Transplanted chondrocytes inhibit endochondral ossification within cartilage repair tissue. *Calcified Tissue International*. v. 85, p. 421- 433, 2009.

BLUM, R. S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspect Biology**. doi: 10.1101/cshperspect.a004978, 2012.

BONASSAR, L.J; VACANTI, C.A. Tissue engineering: the first decade and beyond. **J. Cell. Biochem**. v. 30, p. 297-303, 1998.

BOSNAKOVSKI, D; MIZUNO, M; KIM, G; TAKAGI, S; OKUMURA, M; FUJINAGA, T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. **Biotechnology Bioengineering**. v. 93, p. 1152-1163, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRESLIN, S; O'DRISCOLL, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. **Oncotarget**. 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.9935.

BREW, C.J; CLEGG, P.D; BOOT-HANDFORD, R.P; ANDREW, J.G; HARDINGHAM, T. Gene expression in human chondrocytes in late osteoarthritis is changed in both fibrillated and intact cartilage without evidence of generalised chondrocyte hypertrophy. **Annals of the rheumatic diseases**. v. 69, p. 234-240, 2010.

BIRK, D.E; BRUCKNER, P. Collagens, suprastructures and collagen fibril assembly. **The extracellular matrix: An overview**. v. 1, p. 77–115, 2011.

BRIGGS, M.D; HOFFMAN, S.M; KING, L.M; OLSEN, A.S; MOHRENWEISER, H; LEROY, J.G; MORTIER, G.R; RIMOIN, D.L; LACHMAN, R.S; GAINES, E.S. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. **Nature genetics**. v. 10, p. 330-336, 1995.

BRIGGS, M.D; CHAPMAN, K.L; Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. **Human Mutation**. v. 19, p. 465-478, 2002.

BOBICK, B.E; CHEN, F.H; LE, A.M; TUAN, R.S. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. **Embryo today: Reviews**. v. 87, p. 351-371, 2009.

BORNSTEIN, P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. **The Journal of Cell Biology**. v. 130; p. 503-506, 1995.

BOSNAKOVSKI, D; MIZUNO, M; KIM, G; TAKAGI, S; OKUMURA, M; FUJINAGA, T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 93, p. 1152-1163, 2006.

BROWN, J.C; GOLBIK, R; MANN, K; TIMPL, R. Structure and stability of the triple-helical domains of human collagen XIV. **Matrix Biologic**. v. 14, p. 287-295, 1994.

BUMA, P; PIEPER, J.S; TIENEN, T.V; VAN SUSANTE, J.L.C; VAN DER KRAAN, P.M; VEERKAMP, J.H; VAN DEN BERG, W.B; VETH, R.P.H, KUPPEVELT, T.H. Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects—A study in rabbits. **Biomaterials**. v. 24, p. 3255-3263, 2003.

BUNNELL, B.A; FLAAT, M; GAGLIARDI, C; PATEL, B; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. **Methods**. v.45, p. 115-120, 2008.

CAPLAN, A.L. New MSC: MSCs as pericytes are sentinels and gatekeepers. *J Orthop res*. v. 35, p.1151-1159, 2017.

CAPLAN, A.L. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. v. 9, p. 641-450, 1991.

CENTRELLA, M; MC CARTHY, T.L; CANALIS, E. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. **The journal of biological chemistry**. v. 262, p. 2869-2874, 1987.

CHAIT, B.T. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? **Science**. v. 314, p.65-66, 2006.

CHENC, C.W; TSAI, Y.H; DENG, W.P; SHIH, S.N; FANG, C.L; BURCH, J.G; CHEN, W.H; LAI, W.F. Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. **Journal Orthopaedic Research**. v. 23, p. 446-453, 2005.

CHEN, P; TAO, J; ZHU, S; CAI, YOUZHI; MAO, Q; YU, D; DAI, J; OUYANG, H. Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing. **Biomaterials**. v. 39, p. 114-123, 2015.

CHEN, F.H; HERDON, M.E; PATEL, N; HECHT, J.T; TUAN. R.S, LAWLER, J. Interaction of cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 with aggrecan. **Journal of biological chemistry**. v. 282, p. 24591-24598, 2007.

CHO, M.L; MIN, S.Y; CHANG, S.H. Transforming growth factor β 1(TGF- β 1) down-regulates TNF α -induced RANTES production in rheumatoid synovial fibroblasts through NF κ B mediated transcriptional repression. **Immunol Lett**. v. 105, p. 159-166, 2006.

CHONG, P.K; GAN, C.S; PHAM, T.K; WRIGHT, P.C. **Journal of proteome research**. v. 5, p. 1232-1240, 2006.

CRAWFORD, S.E; STELLMACH, V; MURPHY-ULLRICH, J.E; RIBEIRO, S.M.F; LAWLER, J. HYNES, R.O; BOIVIN, G.P; BOUCK, N. Thrombospondin-1 Is a Major Activator of TGF- β 1 In Vivo. **Cell**. v. 93, p. 1159-1170, 1998.

CREANEY, J; DICK, I.M; LEON, J.S; ROBINSON, B.W. A Proteomic Analysis of the Malignant Mesothelioma Secretome Using iTRAQ. **Cancer genomics proteomics**. v. 14, p. 103-117, 2017.

CRISAN, M; YAP, S; CASTEILLA, L; CHEN, C.W; CORSELLI, M; PARK, T.S; ANDRIOLO, G; SUN, B; ZHENG, B; ZHANG, L; NOROTTE, C. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell stem cell**. v. 3, p. 301-313, 2008.

COLNOT, C. Cellular and Molecular Interactions Regulating Skeletogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 95, p. 688-697, 2005.

DA SILVA-MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v.119, p.2204-2213, 2006.

DELLAVALLE, A.; SAMPAOLESI, M.; TONLORENZI, R.; TAGLIAFICO, E.; SACCHETTI, B.; PERANI, L.; INNOCENZI, A.; GALVEZ, B.G.; MESSINA, G.; MOROSETTI, R.; LI, S.; BELICCHI, M.; PERETTI, G.; CHAMBERLAIN, J.S.; WRIGHT, W.E.; TORRENTE, Y.; FERRARI, S.; BIANCO, P.; COSSU, G. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. **Nature Cell Biology**. v.9, p.255-267, 2007

DERFOUL, A; PERKINS, G.L; HALL, D.J; TUAN, R.S. Glucocorticoids Promote Chondrogenic Differentiation of Adult Human Mesenchymal Stem Cells by

Enhancing Expression of Cartilage Extracellular Matrix Genes. **Stem Cells**. v. 24, p. 1487-1495, 2006.

DESHPANDE, R.S; GRAYSON, W.L; SPECTOR, A.A. A Modeling Insight into Adipose-Derived Stem Cell Myogenesis. **PloS One**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137918>, 2015.

DE SOUZA, L.E; MALTA, T.M; KASHIMA, H.S; COVAS, D.T. Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To what extent are they related. *Stem Cell Dev.* v. 25, p. 1843-1852, 2016.

DIAZ-FLORES, L; GUTIERREZ, R; MADRID, J.F; VARELA, H. VALLADARES, F; ACOSTA, E; MARTIN-VASALLO, P; DIAZ-FLORES, L, Jr. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. **Histology and histopathology**. v. 24, p. 909-969, 2009.

DICESARE, P; HAUSERB, N; LEHMAN, D; PASUMARTIA, S; PAULSSONB, M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. **FEBS letters**. v.354, p. 237-240, 1994.

DOZIN, B; MALPELI, M; CAMARDELLA, L; CANCEDDA, R; PIETRANGELO, A. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. **Matrix biology**. v. 21, p. 449-459, 2002.

DOWTHWAITE, G.P; BISHOP, J.C; REDMAN, S.N; KHAN, I.M, ROONEY, P; EVANS, D.J.R; HAUGHTON, L; BAYRAM, Z; BOYER, S; THOMSON, B; WOLFE, M.S, ARCHER, C.W. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. **Journal of Cell Science**. v. 117, p. 889-897, 2004.
DUDHIA, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. **Cellular and molecular life sciences**. v. 62, p. 2241-2256, 2005.

EMMETT, M.R; CAPRIOLI, R.M. Microelectrospray mass spectrometry: Ultra-high sensitivity analysis of peptides and proteins. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 5, p. 605-613, 1994.

ENGLER, A.J; SEN, S; SWEENEY, L; DISCHER, D.E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**. v. 126, p. 677-689, 2006.

ESTRADA, R.; LI, N.; SAROJINI, H.; AN, J.; LEE, M.; WANG, E. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. **Journal of Cellular Physiology**. v.219, n.3, p.563–571, 2009.

EVANS, C; NOIREL, J; OW, S.Y; SALIM, M; PEREIRA-MEDRANO, A.G; COUTO, N; PANDHAL, J; SMITH, D; PHAM, T.K; KARUKARAN, E. An insight into iTRAQ: where do we stand now? **Anal Bioanal Chem.** v. 404, p. 1011–1027, 2012.

ERICKSON, G.R; GIMBLE, J.M; FRANKLIN, D.M; RICE, H.E; AWAD, H; GUILAK, F. Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and in Vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 290, p. 763-769, 2002.

ERICKSSON, J.E; DECHAT, T; GRIN, B; HELFAND, B; MENDEZ, M; PALLARI, H.M; GOLDMAN, R.D. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. **The journal of clinical investigation.** v. 119, p. 1763-1771, 2009.

EYRE, D.R; WEIS, M.A; WU, J.J. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?. **European Cells and Materials.** v. 12, p. 57-63, 2006.

EYRE, D. Collagen of articular cartilage. **Arthritis Research.** v. 4, p. 30-35, 2012.

FELDMANN, R. E.; BIEBACK, K.; MAURER, M. H.; KALENKA, A.; BURGERS, H. F.; GROSS, B.; HUNZINGER, C.; KLUTER, H.; KUSHINSKY, W.; EICHLER, H. Stem cell proteomes: A profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. **Electrophoresis.** v.14, p. 2749-2758, 2005.

FERNÁNDEZ-PUENTE, P; CALAMIA, V; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, L; LOURIDO, L; CAMACHO-ENCINA, M; OREIRO, N; RUIZ-ROMERO, C; BLANCO, F.J. Multiplexed mass spectrometry monitoring of biomarker candidates for osteoarthritis. **Journal of Proteomics.** v. 152, p. 216-225, 2017.

FELL, H.B. The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic. **Morphol Physiol.** v. 40. p. 417-459, 1925.

FENN, J.B; MANN, M; MENG, C.K; WONG, S.F; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science.** v. 246, p. 64-71, 1989.

FICHARD, A; KLEMAN, J.P; RUGGIERO, F. Another look at collagen V and XI molecules. **Matrix Biology.** v. 14, p. 515–531, 1994.

FRASER, J.K; ZHU, M; WULUR, I; ALFONSO, Z. Adipose-Derived Stem Cells. **Methods in Molecular Biology.** v. 449, p. 59-67, 2008.

FREITAS, G.P; LOPES, H.B; ALMEIDA, A.L.G; ABUNA, R.P.F; GIMENES, R; SOUZA, L.E.B; COVAS, D.T; BELOTI, M.M; ROSA, A.L. Potential of Osteoblastic Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue Associated with a Polymer/Ceramic Composite to Repair Bone Tissue. **Adv Health Mater**. doi: 10.1002/adhm.201601378, [Epub ahead of print], 2017.

FRIEDRICH, J.; SEIDEL, C.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L.A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**. V. 4, p.309324, 2009.

FONT, B; EICHENBERGER, D; ROSEBERG, L.M; van der REST, M. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. **Matrix Biology**. v. 15, p. 341-348, 1996.

FUCHS, J.R; NASSERI, B.A; VACANTI, J.P. Tissue engineering: a 21 st century solution to surgical reconstruction. **The annals of thoracic surgery**. v. 72, p. 577-591, 2001.

GANNON, J.M; WALKER, G; FISCHER, M; CARPENTER, R; THOMPSON, R.C; OEGEMA, T.R. Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. **Journal orthopaedic research**. v.9; p. 485-494, 1991.

GELSE, K; KLINGER, P; KOCH, M; SURMANN-SCHITT, C; MARK, K; SWOBODA, B; HENNIG, F.F; GUSINDE, J. **Tissue Engineering part A**. v. 17, p. 2101-2112, 2011.

GETGOOD, A; BROOKS, R.; FORTIER, L.; RUSHTON, N. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? **The Bone & Joint Journal**. v.91, p. 565-576, 2009.

GIMBLE, J.M; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**. v. 5, p. 362-369, 2003.

GIGY, S.P; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Curr opin chem boil**. v. 4; p. 489-494, 2000.

GO, G; HAN, J; ZHEN, J; ZHENG, S; YOO, A; JEON, M.J; PARK, J.O; PARK, S. A Magnetically Actuated Microscaffold Containing Mesenchymal Stem Cells for Articular Cartilage Repair. **Foot Ankle Clinics**. v. 21, doi: 10.1016/j.fcl.2016.07.015, 2017.

GOLDRING, M.B; TSUCHIMOCHI, K, IJIRI, K. The control of chondrogenesis. **Journal of cellular biochemistry**. v. 97, p. 33-44, 2006.

GOLDRING, M. B. The Role of the Chondrocyte in Osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**. v. 43, p. 1916-19

GONG, X; LIN, C; CHENG, J; SU, J; ZHAO, H; LIU, T; WEN, X; ZHA, P. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. **PLoS ONE**. v. 10, e0130348.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130348>, 2015.

GOOD, D.J; POLVERINI, P.J; RASTINEJAD, F; LE BEAU, M.M; LEMONS, R.S; FRAZIER, W.A; BOUCK, N.P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America**. v. 87, p. 6624-6628, 1990.

GRAVES, P.R; HAYSTEAD, T.A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Ver**. v. 66, p. 39-63, 2002

GREGORY, K.E; KEENE, D.R; TUFA, S.F; LUNSTRUM, G.P, MORRIS, N.P. Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 16, p. 2005-2016, 2001.

GREENWOOD, H.L.; SINGER, P.A.; DOWNEY G.P.; MARTIN, D.K.; THORSTEINSDÓTTIR, H.; DAAR, A. S.; Regenerative medicine and the deloping world. **Plos medicine**. v.3(9), 2006.

GRIFFITH, L.G; SWARTZ, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.7, p. 211-224, 2007.

GROVER, J; ROUGHLEY, P.J. Versican gene expression in human articular cartilage and comparison of mRNA splicing variation with aggrecan. **Biochemical journal**. v. 291, p. 361-367, 1993.

GUO, X; ZHENG, Q; YANG, S. Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor β 1 gene. **Biomedical Materials**. v. 14, p. 206-2015, 2006.

HARPER, J; KLAGSBRUN, M. Cartilage to bone—Angiogenesis leads the way. **Nature medicine**. v. 5, p. 617-618, 1999.

HAART, M. Optimization of chondrocyte expansion in culture. **Acta orthop scand**. v. 70, p. 55-61, 1999.

HASS, W. FAHERTY, B.K; GERBER, S.A; ELIAS, J.E; BEAUSOLEIL, S.A; BAKALARSKI, C.E. Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics. **Cell Proteomics**. v. 5, p. 1326-1337, 2006.

HATHOUT, Y. Approaches to the study of the cell secretome. **Expert Review of Proteomics**. v.4, n.2, p.239-248, 2007.

HAYCOCK, J.W. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. **Methods in Molecular Biology**. v. 695, p, 1-15, 2010.

HECHT, J.T; NELSON, L.D; CROWDER, E; WANG, Y; ELDER, F.F; HARRISON, W.R; FRANCOMANO, C.A; PRANGE, C.K; LENNON, G.G.M; DEERE, M; LAWLER, J. Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. **Nature genetics**. v. 10, p. 325-329, 1995.

HEDBOM, E; ANTONSOON, P; HJERPE, A; AESCHLIMANN, PAULSSON, D; ROSA-PIMENTEL, M; SOMMARIN, E; WENDEL, Y; OLDBERG, A, HEINEGA, D. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. **Journal of biological chemistry**. v. 267, p. 6132-6136, 1992.

HEINEGARD, D; SAXNE, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. v. 7, p. 50–56, 2011.

HEINEGARD, D; OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. **FASEB**. v. 3, p. 2042-2051, 1989.

HELJASVAARA, R; AIKIO, M; RUOTSALAINEN, H; PIHLAJANEMI, T. Collagen XVIII in tissue homeostasis and Dysregulation-Lessons learned from model organisms and human patients. **Matrix Biology**. v. 1301, p. 1-21, 2016.

HEMMAVANH, C; ESPANA, E; BIRK, D. Collagen XII regulates collagen fibril packing, lamellar organization, stromal architecture and corneal function. **Investigative ophthalmology & visual science**. v. 54, 2013.

HENROTIN, Y; CHEVALIER, X; DEBERG, M; BALBLANC, J.C; RICHETTE, P; MULLEMAN, D. Early decrease of serum biomarkers of type II collagen degradation (Coll2-1) and joint inflammation (Coll2-1 NO2) by hyaluronic acid intra-articular injections in patients with knee osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 31, p. 901-907, 2013.

HINDERER, S; LAYLAND, S.L; SCHENKE-LAYLAND, K.E. ECM and ECM-like materials — Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. **Advanced Drug Delivery**. v. 97, p. 260-269, 2015.

HIPP, J; ATALA, A. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. **Stem cell reviews**. v. 4, p. 3-11, 2008.

HO, W.Y; YEAP, S.K; HO, C.L; RAHIM, R.A; ALITHEEN, N.B. Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) Culture from Breast Cancer Cell and a High Throughput Screening Method Using the MTT Assay. **PLoS ONE**. v. 7, e44640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044640>, 2012.

HSIEH, J.L; SHEN, P.C; SHIAU, A.L; JOU, I.M; LEE, C.H; WANG, C.R; TEO, M.L; WU, C.L. Intraarticular gene transfer of thrombospondin-1 suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 28, p. 1300-1306, 2010.

HSU, S.H; HUANG, G.S. Substrate-dependent Wnt signaling in MSC differentiation within biomaterial-derived 3D spheroids. **Biomaterials**. v. 34, p. 4725-4738, 2013.

HUTMACHER, D.W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science*. **Polymer Edition**. v.12, p.107-124, 2000.

ICHIMURA, S; WU, J.J; EYRE, D.R. Two-dimensional peptide mapping of cross-linked type IX collagen in human cartilage. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 378, p. 33-39, 2000.

IGNOTZ, R.A; MASSAGUÉ, J. Transforming growth factor stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. **The journal of biological chemistry**. v. 261, p. 4337-4345, 1986.

IMAMURA, Y; MUKOHARA, T; SHIMONO, Y; FUNAKOSHI, Y; CHAYAHARA, N; TOYODA, M; KIYOTA, N; TAKAO, S; KONO, S; NAKATSURA, T; MINAMI, H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology reports**. v. 33, p. 1837-1843, 2015.

IRUELA-ARISPE, M.L; BORNSTEIN, P; SAGE, H. Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. **Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America**. v. 88; p. 5026-5030, 1993.

JAISWAL, N; HAYNESWORTH, S.E; CAPLAM, A.L; BRUDER, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. **Bioengineering e translational medicine**. v.64, p. 295-312, 1997.

JONSSON, A.P; AISSOUNI, Y; PALMBERG, C; PERCIPALLE, P; NORDLING, DANEHOLT, B; JORNVALL, H, BERGMAN, T. Recovery of Gel-Separated Proteins for In-Solution Digestion and Mass Spectrometry. **Analytical chemistry**. v. 73, p. 5370-5377, 2001.

KAI, F; LAKLAI, H; WEAVER, V.M. **Trends in cell biology**. v. 26, p. 486-497, 2016.

KAPUR, S.K; WANG, X; SHANG, H; YUN, S; LI, X; FENG, G; KHURGEL, M; KATZ, A.J. Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids. **Biofabrication**. v. 4, p. 1-13, 2012.

KARAPLIS, A.C; LUZ, A; GLOWACKI, J; BRONSON, R.T; TYBULEWICZ, V.L; KRONENBERG, H.M; MULLIGAN, R.C. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. **Genes & development**. v. 8, p. 277-289, 1994.

KATAGIRI, T; SUDA, T; MIYAZONO, K; DERYNCK, R; MIYAZONO, K. The bone morphogenetic proteins. The TGF- β Family. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. p. 121-149, 2008.

KAWASHIMA, H; LI, Y.F; WATANABE, N; HIROSE, J. HIROSE, M; MIYASAKA, M. Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. I. Versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan, is a ligand for L-selectin. **International immunology**. v. 11, p. 393-405, 1999.

KHORUZHENKO, A.I. 2D- and 3D-cell culture. **Biopolymers and Cell**. v. 27, p. 17-24, 2011.

KIANI, C; CHEN, L; JIONG, Y; YEE, A.J; YANG, B.B. Structure and function of aggrecan. **Cell Research**. v. 12, p. 19-32, 2002.

KIERSZENBAUM, A.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular**. v.3, p.128-132, 2012.

KIM, J.E; KIM, E.H; HAN, E.H; PARK, R.W; PARK, I.H; JUN, S.H; KIM, J.C; YOUNG, M.F; KIM, I.S. A TGF-beta-inducible cell adhesion molecule, beta Ig-h3, is downregulated in melorheostosis and involved in osteogenesis. **Journal of cellular Biochemistry**. v. 77, p. 169-178.

KIM, J.E; KIM, S.J; JEONG, H.W; LEE, B.H; CHOI, J.Y; PARK, R.W; PARK, J.Y; KIM, I.S. RGD peptides released from beta Ig-h3, a TGF-beta-induced cell-adhesive molecule, mediate apoptosis. **Oncogene**. v. 22, p. 2045-2053, 2003.

KNUDSON, C.B; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. **Seminars in Cell & developmental biology**. v. 12, p. 69-78, 2001.

KISSELEVA, T; BRENNER, D.A. Mechanisms of fibrogenesis. **Experimental Biology and medicine**. v. 233, p. 109-122, 2008.

KÖGLER, G.; SENSKEN, S.; AIREY, J.A.; TRAPP, T.; MÜSCHEN, M.; FELDHAHN, N.; LIEDTKE, S.; SORG, R.V.; FISCHER, J.; ROSENBAUM, C.; GRESCHAT, S.; KNIPPER, A.; BENDER, J.; DEGISTIRICI, Ö.; GAO, J.; CAPLAN, A.I.; COLLETTI, E.J.; ALMEDA-PORADA, G.; MÜLLER, H.W.; ZANJANI, E.; WERNET, P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **Journal of Experimental Medicine**. v. 200, p.123-135, 2004.

KOLF, C.M; CHO, E; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**. v.9, DOI: 10.1186/ar2116, 2007

KWAN, A.P; CUMMINGS, C.E; CHAPMAN, M.E; GRANT, M.E. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. **The journal of cell biology**. v. 114, p. 597-604, 1991.

LAFONT, J.E; TALMA, S; HOPFGARTEN, C; MURPHY, C.L. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. **Journal of Biological Chemistry**. v. 283, p. 4778-4786, 2008.

LANGAN, L.M.; DODD, N.J.; OWEN, S.F.; PURCELL, W.M.; JACKSON S.K.; JHA, A.N. Direct Measurements of Oxygen Gradients in Spheroid Culture System Using Electron Parametric Resonance Oximetry. **PLoS One**. V.11, n.2, 2016.

LANGER, R. Tissue Engineering: Perspectives, Challenges and Future Directions. **Tissue Engineering**. v.13(1), p.1-2. 2007.

LAWER, J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 6, p. 1-12, 2002.

LAWRENCE, R.C; FELSON, D.T; HELMICK, C.G; ARNOLD, L.M; CHOI, H; DEYO, R.A. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions In the United States. **Arthritis Rheumatoid**. v. 58, p. 26-35, 2008.

LEBOY, P.S. Rapid chondrocytes maturation by serum-free culture with BMP-2 and ascorbic acid. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 66, p. 394-403, 1997.

LEE, C.H; WU, C.L; SHIAU, A.L. Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. **Cancer Gene Therapy**. v. 12, p. 175-184, 2005.

LEE, J.S; LEE, J.M; IM, G.I. Electroporation-mediated transfer of Runx2 and Osterix genes to enhance osteogenesis of adipose stem cells. **Biomaterials**. v. 32, p. 760-768, 2011.

LIN, R.Z; CHANG, H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology**. v.3, p. 1172-1184, 2008.

LONG, M.W. Osteogenesis and bone marrow-derived cells. **Blood Cells**. Mol Dis. V.27, p. 677-690, 2001.

LOTZ, M; MOATS, T; VILLIGER, P.M. Leukemia inhibitory factor is expressed in cartilage and synovium and can contribute to the pathogenesis of arthritis. **The journal of clinical investigation**. v. 90, p. 888-896, 1992.

LU, T; LY, Y; CHEN, T. Fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**. v. 8, p. 337-350, 2013.

LU, S; CARLSEN, S; HANSSON, A.S; HOLMDAHL, R. Immunization of rats with homologous type XI collagen leads to chronic and relapsing arthritis with different genetics and joint pathology than arthritis induced with homologous type II collagen. **J Autoimmun**. v. 18, p. 199-211, 2002.

LU, Z.F; ZANDIEH, D.B; WUISMAN, P.I; BANK, R.A; HELDER, M.N. Influence of collagen type II and nucleus pulposus cells on aggregation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 12, p. 2812-2822, 2008.

LUO, Y; SINKEVICIUTE, D; HE, Y; KARSDAL, M; HENROTIN, Y; MOBASHERI, A; ONNERGJORD; BAY-JENSEN, A. The minor collagens in articular cartilage. **Protein cell**. v. 8, p. 560-572, 2017.

MACKAY, A.M; BECK, S.C; MURPHY, J.M; BARRY, F.P, CHICHESTER, C.O; PITTENGER, M.F. Chondrogenic Differentiation of Cultured Human Mesenchymal Stem Cells from Marrow. **Tissue Engineering**. v.4, p. 415-428, 2007.

MALDA, J; MARTENS, D.E; TRAMPER, J; BLITTERSWIJK, C.A; RIESLE, J. Cartilage tissue engineering: controversy in the effect of oxygen. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 23, p. 175-194, 2003.

MAKRIDAKIS, M; VLAHOU, A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. **Journal of Proteomics**. v. 73, p. 2291-2305, 2010.

MCCMAHON, K.M; VOLPATO, M; CHI, H. Y; MUSIWARO, P; POTERLOWICZ, K; PENG, Y; SCALLY, A.J; PATTERSON, L.H; PHILLIPS, R.M; SUTTON, C.W. Characterization of Changes in the Proteome in Different Regions of 3D Multicell Tumor Spheroids. **J proteome research**. v. 11, p. 2863-2875, 2012.

MIO, F; CHIBA, K; HIROSE, Y; KAWAGUCHI, Y; MIKAMI, Y; OYA, T; MORI, M; KAMATA, M; MATSUMOTO, M; OZAKI, K; TANAKA, T; TAKAHASHI, A; KUBO, T; KIMURA, T; TOYAMA, Y; IKEGAWA, S. A functional polymorphism in COL11A1, which encodes the alpha 1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. **Am J Hum Genet**. v. 81, p. 1271-1277, 2007.

MOALI, C; HULES, D.J.S. Extracellular and cell surface proteases in wound healing: new players are still emerging. **European journal of dermatology**. v. 19, 552-564, 2009.

MORADI, M.; HOOD, B.; MORADI M.; ATALA, A. The potential role of regenerative medicine in the management of traumatic patients. **Journal of Injury and Violence Research**. v.7(1), p.27–35, 2015.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J.; HUGHES, H. Regulatory Mechanisms Review in Stem Cell Biology. **Cell**. v.88, n.3, p. 287- 298, 1997.

MOSKOWITZ, R.W; GOLDBERG, V.M; MALEMUD, C.J. Metabolic responses of cartilage in experimentally induced osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 40; p. 584-592, 1981.

MOW, V.C; RATCLIFFE, A; POOLE, A.R. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. **Biomaterials**. v. 13, p. 67–97, 1992.

MULLER, G; MICHEL, A; ALTENBURG, E. COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) is Synthesized in Ligament, Tendon, Meniscus, and Articular Cartilage. **Connective tissue research**. v. 39; p. 233-244, 1998.

NAM, J.O; KIM, J.E; JEONG, H.W; LEE, S.J; LEE, B.H; CHOI, J.Y; PARK, R.W; PARK, J.Y; KIM, I.S. Identification of the alphavbeta3 integrin-interacting motif of

beta Ig-h3 and its anti-angiogenic effect. **The journal of biological chemistry**.v. 278, p. 25902-25909, 2003.

NAPOLITANO, A.P; DEAN, D.M; MAN, A.J; YOUSSEF, J; HO, D.N; RAGO, A.P; LECH, M.P; MORGAN, J.R. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. **BioTechniques**. v. 43, p. 494-500, 2007.

NEHRER, S; BREINAN, H.A; RAMAPPA, A; SHOTKROFF, S; YOUNG, G; MINAS, T; SLEDGE, S.B; YANNAS, I.V; SPECTOR, M. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated In Vitro. **Journal of biomedical materials research**. v, 38, p. 95-104, 1997.

NELSON, A.E; JORDAN, J.M. Osteoarthritis: Epidemiology and classification. **Rheumatology**. v. 2, p. 1433-1440, 2014.

OH, S.P; YAMAGATA, Y; MURAGAKI, Y; TIMMONS, S; OOSHIMA, A; OLSEN, B.R. Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. **PNAS**. v. 91, p. 4229-4233, 1994

OLSEN, J.V; BLAGOEV, B; GNAD, F; MACEK, B; KUMAR, C; MORTENSEN, P; MANN, M. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. **Cell**. v. 127, p. 635-648, 2006.

OLDBERG, A; ANTOSSON, O; LINDBLOM, K; HEINEGARD. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). **The EMBO journal**. v. 8, p. 2601-2604, 1989.

ORLANDO, G.; WOOD, K.J.; COPPI, P.; BAPTISTA, P.M.; BINDER, K.W.; KHALIL, B.N.; BREUER, C.; BURNETT, L.; CHRIST, G.; FARNEY, A.; FIGLIUZZI, M.; HOLMES, J.H.; KOCH, K.; MACCHIARINI, P.; SANI, S.H.M.; OPARA, E.; REMUZZI, A.; ROGERS, J.; SAUL, J.M.; SELIKTAR, D.; SCHWEITZER, K.S.; SMITH, T.; SOLOMON, D.; DYKE, M.V.; YOO, J.J.; ZHANG, Y.; ATALA, A.; STRATTA, R.J.; SOKER, S. Regenerative medicine as applied to general surgery. **Ann Surg**. v.5, p.867-880, 2012.

PAMPALONI, F; REYNAUD, E.G; STELZER, E.H; The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. v.8, p. 839-845, 2007.

PAUL, G; ANISIMOV, S.V. The secretome of mesenchymal stem cells: potential implications for neuroregeneration. **Biochimie**. v. 95, p. 2246-2256, 2013.

PERRIMON, N; BERNFIELD, M. Cellular functions of proteoglycans—an overview. **Seminars in Cell & developmental biology**. v. 12, p. 65-67, 2001.

PIHLAJANIEMI, T; REHN, M. Two New Collagen Subgroups: Membrane-associated Collagens and Types XV and XVIII. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. v. 50, p. 225-262, 1995.

PHINNEY, D.G; PROCKOP, D.J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. **Stem cells**. v. 25, p. 2896-2902, 2007.

POOLE, C.A; GILBERT, R.T; AYAD, S. Immuno-localisation of type VI collagen, decorin and fibromodulin in articular cartilage and isolated chondrons. **Transactions of the Orthopaedic Research Society**. v. 18, 1993.

POOLE, A.R. Cartilage in health and disease. **Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology**. p. 223-269, 2005.

POSEY, K.L; HANKENSON, K; VEERISSETTY, A.C; BORNSTEIN, P; LAWLER, J; HECHT, J.T. Skeletal abnormalities in mice lacking extracellular matrix proteins, thrombospondin-1, thrombospondin-3, thrombospondin-5, and type IX collagen. **Am J Pathol**. v. 172, 1664, 2008.

RANGA, A.; GJOREVSKI, N.; LUTOLF, M.P. Drug discovery through stem cell-based organoid models. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2014; V.69-70, p.19-28, 2014

RANKIN, S. Mesenchymal stem cells. **Thorax**. v.67, p.565-566, 2012.

RAGGIO, O. The myth of Prometheus: \Z survival and metamorphoses up to the Eighteenth Century. **Journal of the Warburg and Courtauld Institutes**. v.21, p. 44-62, 1958.

REDDI, A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. **Nature Biotechnology**. v.3, p.247-52, 1998.

RICHARDSON, S. M.; HOYLAND, J. A.; MOBASHERI, R.; CSAKI, C.; SHAKIBAE, M. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering. **Journal cell physiology**. v.222, p. 23-32, 2010.

RIVRON, N.C. Tissue assembly and organization: developmental mechanisms in microfabricated tissues. **Biomaterials**. v.30, p. 4851-4858, 2009.

ROSENBERG, K; OLSSON, H; MORGELIN, M; HEINEGA, D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. **Journal of biological chemistry**. v. 273, p. 20397-20403, 1998.

ROSS, P.L; HUANG, Y.N; MARCHESE, J.N; WILLIAMSON, B; PARKER, K; HATTAN, S; KHAINOVSKI, N; PILLAI, S; DEY, S; DANIELS, S; PURKAYASTHA, S; JUHASZ, P; MARTIN, S; BARTLET-JONES, M; HE, F; JACOBSON, A; PAPPIN, D.J. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Mol. Cell. Proteomics**. v. 3, p. 1154-1169, 2004.

SACCHETI, B; FUNARI, A; MICHIEZI, S. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. **Cell**. v.131, p. 324-336, 2007.

SANCHEZ, C; BAY-JESEN, A.C; PAP, T; DVIR-GINZBERG, M; QUASNICHKA, H; BARRET-JOLLEY, R; MOBASHERI, A; HENROTIN, Y. Chondrocyte secretome: a source of novel insights and exploratory biomarkers of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 25, p. 119-1209, 2017.

SATOH, M; NASU, T; OSAKI, T; HITOMI, S. Thrombospondin-1 contributes to slower aortic aneurysm growth by inhibiting maladaptive remodeling of extracellular matrix. **Clinical Science**. v. 131, p. 1283-1285, 2017.

SENNA, E.R; BARROS, A.L.P; SILVA, E.O; COSTA, I.F; PEREIRA, L.V.B, CICONELLI, R.M; FERRAZ, M.B. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The journal of rheumatology**. v. 31, p. 594-597, 2004.

SHADFORTH, I.P; DUNKLEY, T.P.J, KATHRYN, S.L; BESSANT, C. i-Tracker: For quantitative proteomics using iTRAQ™. **BCM genomics**. v. 6, DOI: 10.1186/1471-2164-6-145, 2005.

SCHULTZ, O; SITTINGER, M; HAEUPL, T; BURMESTER, G.R. Emerging strategies of bone and joint repair. **Arthritis Res**. v. 2, p. 433-436, 2000.

SCHWAB, K.E; GARGETT, C.E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. **Human reproducibility**. v. 22, p. 2913-2911, 2007.

SHI, S; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **J bone miner**. v. 18, p. 696-704.

SHI, Y; MA, J; ZHANG, X; LI, H; JIANG, L; QIN, J. Hypoxia combined with spheroid culture improves cartilage specific function in chondrocytes. **Integrative biology**. v. 7, p. 289-297, 2015.

SHEN, G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. **Orthodontics & Craniofacial research**. v.8, p. 11-17, 2005.

SILVA, K.R; LIECHOCKI, S; CARNEIRO, J.R ; CLAUDIO-DA-SILVA, C.S; MAYA-MONTEIRO, C.M; BOROJEVIC, R; BAPTISTA, L.S. 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. 1-10, 2015.

SMITH-MUNGO, L.I; KAGAN, H.M. Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology. **Matrix Biology**. v. 16; p. 387–398, 1998.

SKONIER, J; BENNETT, K; ROTHWELL, V; KOSOWSKI, S; PLOWMAN, G; WALLACE, P; EDELHOFF, S; DISTECHE, C; NEUBAUER, M; MARQUARDT, H. Beta-Ig-h3: a transforming growth factor-beta-responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment in-vitro and suppresses the growth of cho cells in nude-mice. **DNA Cell Biol**. v. 13, p. 571-584, 1994.

SKONIER, J; NEUBAUER, M; MADISEN, L; BENNETT, K; PLOWMAN, G.D; PURCHIO, A.F. cDNA cloning and sequence analysis of beta Ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. **DNA Cell Biology**. v. 11, p. 511-522, 1992.

STEIGLITZ, B.M; KEENE, D.R; GREENSPAN, D.S. PCOLCE2 encodes a functional procollagen C-proteinase enhancer (PCPE2) that is a collagen-binding protein differing in distribution of expression and post-translational modification from the previously described PCPE1. **Journal of biochemistry**. v. 277, p. 49820-49830, 2002.

STOLTZ, J.F.; HUSELSTEIN, C.; SCHIAVI, J.; LI, Y.Y.; BENSOUSSAN, D.; DECOT, V.; ISLA N. Human Stem Cells and Articular Cartilage Tissue Engineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.13, p.2682-2691, 2012.

STREM, B.M; HICOK, K.C; ZHU, M; WULUR, I; ALFONSO, Z; SCHREIBER, R.E; FRASER, J.K; HEDRICK, M.H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med**. v. 54, p. 132-141, 2005.

TABATA, Y. Recent progress in tissue engineering. **Drug discovery today**. v. 6, p. 483-487, 2001.

TAN, E.W; SCHON, L.C. Mesenchymal Stem Cell-Bearing Sutures for Tendon Repair and Healing in the Foot and Ankle. **Foot and ankle clinics**. v. 21, p. 885-890, 2016.

TAYLOR, M.A; AMIN, J.D; KIRSCMANN, D.A; SCHIEMANN, W.P. Lysyl Oxidase Contributes to Mechanotransduction-Mediated Regulation of Transforming Growth Factor- β Signaling in Breast Cancer Cells. **Neoplasia**. v. 13, p. 406-418, 2011.

TAYLOR, D.W; AHMED, N; PARRENO, J; LUNSTRUM, G.P; GROSS, A.E; DIAMANDIS, E.P; KANDEL, R.A. Collagen type XII and versican are present in the early stages of cartilage tissue formation by both redifferentating passaged and primary chondrocytes. **Tissue Engineering Part. A**. v. 21, p. 683-693, 2014.

THUR, J; ROSENBERG, K; NITSCHKE, D.P; PIHLAJAMAA, T; ALA-KOKKO, L; HEINEGA, D; PAULSSON, M; MAURER, P. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II and IX. **Biol. Chem.** v. 276, p. 6083-6092, 2000.

TOGO, T; UTANI, A; NAITOH, M; OHTA, M; TSUJI, Y; MORIKAWA, N; NAKAMURA, M; SUZUKI, S. Identification of cartilage progenitor cells in the adult ear perichondrium: utilization for cartilage reconstruction. **Laboratory Investigation**. v. 86, p.445-457, 2006.

TRAKTUEV, D.O; MERFELD-CLAUSS, S; LI, J; KOLONIN, M; ARAP, W; PASQUALINI, R. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. **Circulation research**. v. 102, p. 77-85, 2008.

TZANAKAKIS, E.S; HANSEN, L.K; HU, W,S. The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil.* **Cytoskeleton**. v. 48, p. 175-189, 2001.

PALUKURU, U.P; MCGOVERIN, C.M; PLESHKO, N. Assessment of hyaline cartilage matrix composition using near infrared spectroscopy. **Matrix biology**. v. 38, p. 3-11, 2014.

UNWIN, R.D; GRIFFITHS, J.R; WHETTON, A.D. Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS. **Nature Protocols**. v. 5, p. 1574–1582, 2010.

UPHOLT, W.B. The type II collagen gene. **Molecular biology**. p. 31-49, 1989.

UPTON, J; STEPHEN, A.S; GLOWACKI, J. Neocartilage Derived from Transplanted Perichondrium: What Is It? **Plastic and reconstructive surgery**. v. 68, p. 166-172, 1981.

VAN DER KRAAN, P.M; VAN DEN BERG, W.B. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? **Osteoarthritis Cartilage**. v. 20. p. 223-232, 2012.

VEILLEUX, N.H; YANNAS, I.V; SPECTOR, M. Effect of passage number and collagen type on the proliferative, biosynthetic, and contractile activity of adult canine articular chondrocytes in type I and II collagen-glycosaminoglycan matrices in vitro. **Tissue Engineering**. v. 10, p. 119-127, 2004.

WAGNER, W.; FELDMANN, R. E.; SECKINGER, A.; MAURER, M. H.; WEINA, F.; BLAKE, J.; KRAUSE, U.; KALENKA, A.; BURGERS, H. F.; SAFFRICH, R.; WUCHTER, P.; KUSHINSKY, W.; HO, A. D. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. **Experimental Hematology**. v. 34, p. 536-548, 2006.

WALSH, D.A. Angiogenesis in osteoarthritis and spondylosis: successful repair with undesirable outcomes. **Current Opinion in Rheumatology**. v. 16, p. 609-615, 2004.

WANG, H; CHANG-WONG, T; TANG, H.Y; SPEICHER, D.W. Comparison of extensive protein fractionation and repetitive LC-MS/MS analyses for complex proteomes. **Journal proteome research**. v. 9, p. 1032-1040, 2010.

WANG, W; RIGUEUR, D; LYONS, K.M. TGF- β Signaling in Cartilage Development and Maintenance. **Birth defects research (part C)**. v. 102, p. 37-51, 2014.

WEN, Y. T.; TSOU, C. C.; KUO, H. T.; WANG, J. S.; WU, J. J.; LIAO, P. C. Differential Secretomics of *Streptococcus pyogenes* Reveals a Novel Peroxide Regulator (PerR)–Regulated Extracellular Virulence Factor Mitogen Factor 3 (MF3). **Mol. Cell Proteomics**, 2011.

WETIE, A.G.N; SOLOWSKA, I; WOODS, A.G; WORMWOOD K.L; PATEL, S.P; CLARKSON B.D; DARIE, C.C. Automated Mass Spectrometry–Based Functional Assay for the Routine Analysis of the Secretome. **Sage Journals**. DOI: **10.1177/2211068212454738**. 2015

WIBERG, C; HEDBOM, E; KHAIRULLINA, A; LAMANDÉ, S.R; OLDBERG, Å; TIMPL, R; MORGELIN, M; HEINEGARD, D. Biglycan and decorin bind close to the N-terminal region of the collagen VI triple helix. **Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p.18947-18952, 2001.

WHITNEY, A.G; KEAN, T; FERNANDES, R.J; WALDMAN, S; TSE, M.Y; PANG, S.C; MANSOUR,J.M; DENNIS, J.E. Thyroxine Increases Collagen Type II Expression and Accumulation in Scaffold-Free Tissue-Engineered Articular Cartilage. **Molecular medicine reports**. v.16, p. 1837-1845, 2017.

WIESE, S; REIDEGEL, K.A; MEYER, H.E; WARSCHEID, B. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. **Proteomics**. v. 7, p. 340-350, 2007.

WILM, M.S; MANN, M. Electrospray and Taylor-Cone theory, dole's beam of macromolecules at last? **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**. v. 136, p. 167-180, 1994.

WOODFIELD, T.B.F.; BEZEMER, J. M.; PIEPER, J.S.;BLITTERSWIJK, C.A.; RIESLE, J. Scaffolds for Tissue Engineering of Cartilage. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**. v.12, p.1-28, 2002.

WYNN, T.A; RAMALINGAM, T.R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. v. 18, p. 1028-1040, 2012.

YANG, F.; JENSEN, J. D.; SVENSSON, B.; JORGENSEN, H. J.; COLLINGE, D. B.; FINNIE, C. Secretomics Identifies Fusarium graminearum Proteins Involved in the Interaction with Barley and Wheat. **Mol. Plant Pathol**. v. 13, p. 445–453, 2012.

YANG, G; ROTHRAUFF, B.B; LIN, H; GOTTARDI, R; ALEXANDER, P.G; TUAN, R.S. Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon-derived extracellular matrix. **Biomaterials**. v. 34, p. 9295-9306, 2013.

YARMUSH, M.L.; JAYARAMAN, A. Advances in proteomic technologies. **Annual review of Biomedical Engineering**. v.4, p. 349-373, 2002.

YOON, D.S; LEE, K.M; KIM, S.H; KIM, S.H; JUNG, Y; KIM, S.H; PARK, K.H; CHOI, Y; RYU, H.A; CHOI, W.J; LEE, J.W. Synergistic Action of IL-8 and Bone Marrow Concentrate on Cartilage Regeneration Through Upregulation of Chondrogenic Transcription Factors. **Tissue engineering part A**. v. 22, p. 363-674, 2015.

YU, G; WU, X; DIETRICH, M.A; POLK, P; SCOTT, K; PTITSYN, A.A; GIMBLE, J.M. Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes. **Cytotherapy**. v.21, p. 538-546, 2010.

ZANNETTINO, A.C; PATON, S; ARTHUR, A; KHOR, F; ITESCU, S; GIMBLE, J.M; GRONTHOS, S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. **Journal of cellular physiology**. v. 214, p. 413-421, 2008.

ZELENSKI, N.A.; LEDDY, H.A.; SANCHEZ-ADAMS, J.; ZHANG, J.; BONALDO, P.; LIEDTKE, W.; GUILAK, F. Type VI collagen regulates pericellular matrix properties, chondrocyte swelling, and mechanotransduction in mouse articular cartilage. **Arthritis Rheumatology**. v. 67, p. 1286-1294, 2015.

ZIMMERLIN, L.; DONNENBERG, V. S.; PFEIFER, M. E.; MEYER, E. M.; PÉAULT, B.; RUBIN, J. P.; DONNENBERG, A. D. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. **Cytometry A**, v. 77, p. 22-30, 2010

ZHANG L.; HU J.; ATHANASIOU, K.A. The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**. v.37 p.1-57, 2009.

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. 4279-4295, 2002.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, B.S.J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**. v.7, n.2, p.211-228, 2001.

9. Material Suplementar

9.1 Tabela geral de proteínas do secretoma de esferas de ASCs induzidas *versus* CPCs e ASCs induzido *versus* ASCs não induzido, referente ao primeiro experimento.

PROTEÍNA
<i>deoxiribonuclease II, lisosomal</i>
<i>immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat</i>
<i>microtubule associated serine/threonine kinase family member 4</i>
calumenina
endothelin converting enzyme 2
estimulador de condrogênese 1
lactato desidrogenase A
superoxido dismutase 1
<i>coagulation factor VIII, procoagulant component</i>
<i>phosphoglycerate kinase 1</i>
<i>complement component 1, r subcomponent</i>
haptoglobina
alfa-2-macroglobulina
TIMP metalopeptidase inibitor 1
cistatina C
colágeno, tipo I, alfa 1
colágen, tipo II, alfa 1
colágen, tipo III, alfa 1
keratina 14
keratina 6A
albumina
transferrina

lactotransferrina
aldolase A, fructose-bisphosphate
keratina 1
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like 6;</i>
<i>heat shock 27kDa protein-like 2 pseudogene; heat shock 27kDa protein 1</i>
colágen, tipo V, alfa 2
hypothetical LOC728026; prothymosin, alpha
S100 calcium binding protein A6
enolase 1, (alfa)
<i>nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 21;</i>
tropomiosina 3
anexina A2 pseudogene 3
protease, serine, 1 (trypsin 1); trypsinogen C
decorina
profilina 1
trombospondina 1
colágen, tipo I, alfa 2
<i>matriz metalopeptidase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa tipo IV collagenase)</i>
<i>antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5</i>
<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>
<i>complement component 1, s subcomponent</i>
clusterina
<i>hypothetical gene supported by AF216292; NM_005347; heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>
colágen, tipo XI, alfa 1
colágeno, tipo VI, alfa 1

colágeno, tipo VI, alfa 2
colágen, tipo VI, alfa 3
versicana
<i>keratina 5</i>
<i>similar to Pyruvate kinase, isozymes M1/M2</i>
<i>heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1</i>
elastina
TIMP metalopeptidase inibitor 2
<i>histone cluster 1, H1b</i>
<i>histone cluster 1, H1d</i>
<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i>
osteoglicina
colágeno, tipo V, alfa 1
filamin A, alpha (actin binding protein 280)
biglicana
<i>insulin-like growth factor binding protein 4</i>
fibulina 1
<i>peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)</i>
<i>ribosomal protein S3 pseudogene 3; ribosomal protein S3</i>
cofilina 1 (non-muscle)
lisil oxidase
<i>myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>
Vimentina
peroxiredoxina 6
keratina 9
fibrilina 1
miosina
keratina 2

<i>chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)</i>
<i>serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1</i>
Proteína oligomérica da matriz
<i>matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)</i>
<i>serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)</i>
lumican
<i>heat shock 70kDa protein 2</i>
<i>phospholipid transfer protein</i>
<i>TPI1 pseudogene; triosephosphate isomerase 1</i>
actina, beta
<i>S100 calcium binding protein A10</i>
beta-2-microglobulina
<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide</i>
<i>similar to 14-3-3 protein epsilon (14-3-3E) (Mitochondrial import stimulation factor L subunit)</i>
<i>thymosin-like 2 (pseudogene); thymosin-like 1 (pseudogene); thymosin beta 4, X-linked</i>
<i>FK506 binding protein 1A, 12kDa</i>
<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
<i>eukaryotic translation initiation factor 5A; eukaryotic translation initiation factor 5A-like 1</i>
thimosina beta 10
<i>Y box binding protein 1</i>
tropomiosina 4
<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha-like 7</i>
hemoglobina, beta
<i>sushi-repeat-containing protein, X-linked</i>

dermcidina
<i>heparan sulfate proteoglycan 2</i>
<i>nucleobindin 1</i>
<i>caldesmon 1</i>
fibromodulina
<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein</i>
<i>AHNAK nucleoprotein</i>
<i>A kinase (PRKA) anchor protein 13</i>
<i>folliculin-like 1</i>
<i>mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>
<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>
glicoproteína (transmembrana) nmb
periostina, fator específico de osteoblasto
<i>procollagen C-endopeptidase enhancer</i>
<i>reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain</i>
<i>transforming growth factor, beta-induced, 68kDa</i>
<i>insulin-like growth factor binding protein 7</i>
<i>extracellular matrix protein 1</i>
<i>zinc finger protein 630</i>
<i>heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 3 (pseudogene)</i>
<i>SCAN domain containing 3</i>
suprabasin
CD109 molécula
tubulina, alfa 1a
keratina 77
<i>AE binding protein 1</i>
<i>solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 3</i>

<i>golgi membrane protein 1</i>
<i>olfactory receptor, family 5, subfamily A, member 2</i>
<i>HtrA serine peptidase 1</i>
<i>secreted frizzled-related protein 2</i>
colágeno, tipo XII, alfa 1
spondina 2, proteína da matriz extracelular
<i>chromosome 12 open reading frame 49</i>
<i>chromodomain helicase DNA binding protein 8</i>
CD248 molécula, endosialina
tropomodulina 2 (neuronal)
<i>dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)</i>
elastina
Insulina, isoforma 2
Periostina
<i>Insulin-like growth factor II</i>
<i>Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D</i>
Tenascina
Periostina
Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D
Tenascina
Insulina, isoforma 2
<i>Insulin-like growth factor II</i>

9.2. Tabela geral de proteínas do secretoma de esferas de ASCs induzidas *versus* CPCs e ASCs induzido *versus* ASCs não induzido, referente ao segundo experimento.

PROTEÍNA
deoxiribonuclease II, lisosomal
<i>quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1</i>
immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat
neuropilina 1
<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like</i>
actinina, alfa 4
estimulador de condrogênese 1
WNT1 inducible signaling pathway protein 2
calsintenina 1
<i>protease, serine, 23</i>
matrilina 4
lactato dehidrogenase A
superóxido dismutase 1, soluble
<i>ceruloplasmin (ferroxidase)</i>
<i>complement component 1, r subcomponent</i>
Haptoglobina
serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 1
<i>serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiprotease, antitrypsin), member 3</i>
<i>alpha-2-macroglobulin</i>
<i>similar to Complement C3 precursor; complement component 3; hypothetical protein LOC100133511</i>
TIMP metallopeptidase inhibitor 1
cistatina C

<i>proenkephalin</i>
<i>major histocompatibility complex, class I, A</i>
colágeno, tipo I, alfa 1
colágeno, tipo III, alfa 1
lamina A/C
<i>retinol binding protein 4, plasma</i>
albuminA
Transferrina
Lactotransferrina
matriz metalopeptidase 1
<i>secretory leukocyte peptidase inhibitor</i>
<i>aldolase A, fructose-bisphosphate</i>
<i>superoxido dismutase 2, mitochondrial</i>
<i>keratina 1</i>
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like 6;</i>
<i>metallothionein 1L (gene/pseudogene);</i>
<i>heat shock 27kDa protein-like 2 pseudogene; heat shock 27kDa protein 1</i> <i>amiloide beta (A4) proteína precursora</i>
<i>eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa</i>
interleucina 6 (interferon, beta 2)
proteína ribosomal
C-type lectin domain family 3, member B
colágeno, tipo V, alfa 2
gelsolin (amyloidosis, Finnish type)
<i>S100 calcium binding protein A6</i>
enolase 1, (alpha)
nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 21;

serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
lactato desidrogenase B
prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
catepsina D
annexin A2 pseudogene 3; annexin A2; annexin A2 pseudogene 1
Tubulina
Decorina
Prosaposin
catepsina B
<i>heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2; heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1</i>
laminina, beta 1
trombospondina 1
colágeno, tipo I, alfa 2
<i>heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1</i>
<i>matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)</i>
matriz metalopeptidase 3
<i>superoxide dismutase 3, extracellular</i>
Proteína da matriz Gla
<i>complement factor H</i>
Vimentina
<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 1</i>
<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>
tropomiosina 1 (alpha)
<i>complement component 1, s subcomponent</i>
<i>ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)</i>
interleucina 8

tioredoxina
<i>heat shock 60kDa protein 1</i>
Clusterin
<i>hypothetical gene supported by AF216292; NM_005347; heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>
laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
colágeno, tipo XI, alfa 1
colágeno, tipo VI, alfa 1
colágeno, tipo VI, alfa 2
colágeno, tipo VI, alfa 3
<i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>
chemokine (C-C motif) ligand 2
Versicana
keratina 10
<i>protein disulfide isomerase family A, member 4</i>
<i>protein kinase C substrate 80K-H</i>
nidogen 1
<i>similar to Pyruvate kinase, isozymes M1/M2 (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) (THBP1); pyruvate kinase, muscle</i>
heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle
matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
TIMP metalloproteinase inhibitor 2
CD44 molecule (Indian blood group)
Agrecana
O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
Lectina
insulin-like growth factor binding protein 3

insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa
phosphoglycerate mutase 1 (brain)
Miosina
chemokine (C-X-C motif) ligand 3
colágeno, tipo V, alfa 1
filamin A, alpha (actin binding protein 280)
Biglicana
<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1</i>
<i>insulin-like growth factor binding protein 4</i>
fibulina 1
<i>peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)</i>
<i>ribosomal protein S3 pseudogene 3; ribosomal protein S3</i>
cofilin 1 (non-muscle)
<i>eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2; eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2-like</i>
<i>insulin-like growth factor binding protein 6</i>
<i>insulin-like growth factor binding protein 5</i>
tenascina C
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
Moesin
<i>S100 calcium binding protein A4</i>
<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide</i>
<i>Calreticulin</i>
<i>microtubule-associated protein 4</i>
Calnexina
lisil oxidase
granulin

peroxiredoxina 3
<i>ribosomal protein L12 pseudogene 2;</i>
<i>protein disulfide isomerase family A, member 3</i>
<i>syndecan 4</i>
<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein,</i>
<i>S100 calcium binding protein A11; S100 calcium binding protein A11 pseudogene</i>
trombospondina 2
keratina 9
fibrillina 1
myosin, heavy chain 9, non-muscle
keratina 2
chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
<i>serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1</i>
<i>similar to RNA binding motif protein, X-linked; similar to hCG2011544; RNA binding motif protein, X-linked</i>
colágeno, tipo XVIII, alfa 1
prostaglandin D2 synthase, hematopoietic; prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)
neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1
chemokine (C-X-C motif) ligand 5
similar to RAN binding protein 1; RAN binding protein 1
tissue factor pathway inhibitor 2
Proteína da matriz oligomérica da cartilagem
<i>matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)</i>
<i>serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)</i>
<i>Lumican</i>

<i>roline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>
<i>stanniocalcin 1</i>
<i>heat shock 70kDa protein 2</i>
<i>microfibrillar-associated protein 2</i>
<i>TPI1 pseudogene; triosephosphate isomerase 1</i>
<i>actin, beta</i>
<i>heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)</i>
<i>beta-2-microglobulin</i>
<i>Niemann-Pick disease, type C2</i>
<i>SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (S. cerevisiae) pseudogene; SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (S. cerevisiae); SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (S. cerevisiae)</i>
<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K; similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide</i>
<i>calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta); calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)</i>
<i>thymosin-like 2 (pseudogene); thymosin-like 1 (pseudogene); thymosin beta 4, X-linked</i>
<i>histone cluster 1</i>
<i>ribosomal protein S28 pseudogene 6; ribosomal protein S28 pseudogene 9; ribosomal protein S28</i>
<i>similar to TRIMCyp</i>
<i>ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1</i>
<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
<i>eukaryotic translation initiation factor 5A; eukaryotic translation initiation factor 5A-like 1</i>
<i>thymosin beta 10</i>
<i>Y box binding protein 1</i>
<i>tropomiosina 4</i>

<i>sushi-repeat-containing protein, X-linked</i>
<i>nucleobindin 2</i>
<i>brain abundant, membrane attached signal protein 1</i>
<i>DiGeorge syndrome critical region gene 2</i>
<i>heparan sulfate proteoglycan 2</i>
<i>nucleobindin 1</i>
<i>ribosomal protein L6 pseudogene 27; ribosomal protein L6 pseudogene 19; ribosomal protein L6; ribosomal protein L6 pseudogene 10</i>
<i>lamin B2</i>
<i>plasminogen activator, urokinase receptor</i>
<i>caldesmon 1</i>
colágeno, tipo XIV, alfa 1
Fibromodulina
peroxiredoxina 1
<i>cytoskeleton-associated protein 4</i>
<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein</i>
adenilato ciclase 2
AHNAK nucleoprotein
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
follistatin-like 1
PTK7 protein tyrosine kinase 7
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)
latent transforming growth factor beta binding protein 1
latent transforming growth factor beta binding protein 2
LIM and SH3 protein 1
periostina, fator específico do osteoblasto
<i>protein disulfide isomerase family A, member 6</i>

<i>procollagen C-endopeptidase enhancer</i>
<i>similar to Plectin 1 (PLTN) (PCN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1); plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa</i>
<i>transforming growth factor, beta-induced, 68kDa</i>
<i>myosin light chain kinase</i>
<i>insulin-like growth factor binding protein 7</i>
<i>laminina, alfa 4</i>
<i>Proteína da matriz extracelular 1</i>
<i>melanoma inhibitory activity</i>
<i>histone cluster 3, H3</i>
<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2</i>
<i>fibronectin type III domain containing 1</i>
<i>cell division cycle associated 8</i>
<i>Vasorin</i>
<i>polymerase I and transcript release factor</i>
<i>Suprabasin</i>
<i>Tubulina</i>
<i>ABI family, member 3 (NESH) binding protein</i>
<i>THO complex 4</i>
<i>AE binding protein 1</i>
<i>solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 3</i>
<i>carboxypeptidase X (M14 family), member 2</i>
<i>golgi membrane protein 1</i>
<i>thioredoxin domain containing 5 (endoplasmic reticulum); muted homolog (mouse)</i>
<i>olfactory receptor, family 5, subfamily A, member 2</i>
<i>Titin</i>
<i>histone cluster 1, H2ba</i>

chromatin modifying protein 4C
collagen triple helix repeat containing 1
<i>reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain</i>
<i>TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog B (S. cerevisiae)</i>
<i>Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7</i>
<i>Epiphycan</i>
colágeno, tipo XII, alfa 1
<i>retinoic acid receptor responder (tazarotene induced)</i>
<i>growth differentiation factor 15</i>
<i>stromal cell derived factor 4</i>
<i>chromosome 2 open reading frame 40</i>
CD248 molécula, endosialina
reticulon 4
<i>olfactomedin-like 3</i>
<i>ubiquitin specific peptidase 40</i>
<i>taste receptor, type 2, member 13</i>
<i>ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)</i>
<i>mannose receptor, C type 2</i>
<i>dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)</i>
cathepsin Z
fibulina 5
<i>coronin, actin binding protein, 1C</i>
<i>C-type lectin domain family 11, member A</i>
<i>elastin microfibril interfacier 1</i>