

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA DE CÉLULAS
ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE DIFERENTES FONTES*

Aluno: Nathália Forti Francisco

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud
Brofman

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Fracaro

Curitiba, março/ 2023

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA DE CÉLULAS
ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE DIFERENTES FONTES*

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Slud
Brofman

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Fracaro

Curitiba, março/2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo amor e apoio, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço ao meu noivo Carlos Bot e minha enteada Malu, por toda paciência, incentivo e sensação de férias todos os dias, durante esses anos.

Agradeço imensamente aos meus companheiros de laboratório: Ana Selenko, Milena Lima e Gabriel Moraes sem vocês eu não teria a paciência, foco e diversão!

Agradeço imensamente também minhas amigas da vida: Isabella Santos, Ana Soethe, Kátia Cristina, Cassiane Caroline, Thaís Lacerda e Amanda Sartor por todo o suporte fora do ambiente de trabalho, vocês foram essenciais.

Agradeço ao Dr. Paulo Roberto Slud Brofman por me acolher na equipe.

Agradeço ao CAPES pelo fomento que recebi.

Agradeço a Paula e Vanessa, secretarias do Programa de Pós-Graduação da PUCPR, por todo suporte burocrático.

Agradeço a equipe do LECC, e a todos que passaram por lá e fizeram parte dos meus dias de alguma forma, por toda ajuda que me deram em todos os caminhos que estive com vocês.

Agradeço a equipe da Patologia Experimental da PUCPR pelo auxílio no desenvolvimento histológico do projeto.

Agradeço imensamente a Dra. Alexandra Cristina Senegaglia por ter me apresentado esse mundo da pesquisa, por ter me acolhido tantas vezes, e por todos os ensinamentos e incentivos nesses anos de graduação e pós!

Agradeço imensamente também a Dra. Fabiane Barchiki por todos os conselhos e pelo seu dom de ouvir e segurar pontas. Obrigada pelos ensinamentos, pelas conversas e pelos incentivos!

Gostaria em especial de agradecer minha coorientadora, Dra. Letícia Fracaro pela sua força de vontade e sua decisão em caminhar comigo nesse projeto. Sem sua ajuda nada daqui seria possível. Agradeço por sua luz de aprender e ensinar, ela é cativante e me fez reconectar com algo que eu já havia perdido. Obrigada de verdade por me acolher e conseguir ver o melhor em mim. Obrigada pelos ensinamentos, pela confiança e por todo conhecimento. Eu realmente não tenho palavras pra descrever o quanto você fez por mim!

“Last but not least, I wanna thank me. I wanna thank me for believing in me. I wanna thank me for doing all this hard work. I wanna thank me for having no days off. I wanna thank me for, for never quitting. I wanna thank me for always being a giver, and tryna give more than I receive. I wanna thank me for tryna do more right than wrong. I wanna thank me for just being me at all times” – Snoop Dogg



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina e Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 31 dias do mês de março de 2023 às 08:00, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGENICA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE DIFERENTES FONTES" apresentado por **Nathalia Forti Francisco** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman - Presidente	
Profa. Dra. Caroline Busatta Vaz de Paula (PUCPR)	
Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura (UFRN)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Profa. Dra. Caroline Busatta Vaz de Paula
Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura

Conceito: **Aprovado**
Conceito: **Aprovado**
Conceito: **Aprovado**

Parecer Final: **Aprovado**

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a normatização Vancouver. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório Experimental de Cultivo Celular, no Núcleo de Tecnologia Celular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente dissertação.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Características das CTM quanto às fontes que podem ser encontradas e suas definições pela ISCT.	26
Figura 2. Células presentes na medula óssea.....	28
Figura 3. Células presentes no tecido adiposo.	29
Figura 4. Células presentes no tecido de cordão umbilical.	30
Figura 5. Células presentes na polpa de dente.....	31
Figura 6. Desenho de estudo	36
Figura 7. Análises de diferenciação celular que serão realizadas em todos os grupos (CTM-MO, CTDA, DPSC e CTM-TCU) após a indução a diferenciação condrogênica.	43
Figura 8. Processo de preparo histológico das amostras até a análise em microscópio óptico.	44
Figura 9. Processo de preparo imunohistoquímico das amostras.....	48
Figura 10. Representação esquematizada do processo de ensaio de sanduíche para a espectrofotometria do kit Human Sox9 ELISA.....	50
Figura 11. Morfologia das Células estromais mesenquimais.....	51
Figura 12. Expressão dos marcadores utilizados para caracterização das CTM, apresentado em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão, nos quatro grupos do estudo: DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO.....	52
Figura 13. Expressão dos marcadores condroprogenitores utilizados na CTM, apresentado em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão, nos quatro grupos do estudo: DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO.....	53
Figura 14. Expressão dos marcadores condroprogenitores nos célula condroprogenitoras, utilizados como controle positivo, apresentado em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão.	54
Figura 15. Expressão do marcador de membrana CD105.....	56
Figura 16. Expressão do marcador de membrana CD44.....	57
Figura 17. Expressão do marcador de membrana CD49c.	58
Figura 18. Expressão do marcador de membrana CD151.....	59
Figura 19. Expressão do marcador de membrana Sulfato de Condroitina.	60
Figura 20. Amostras de CTM coradas com Azul de Toluidina após a diferenciação condrogênica.....	61

Figura 21. Amostras de CTM coradas com Tricrômio de Mallory após a diferenciação condrogênica.....	63
Figura 22. Amostras de CTM coradas com Tricrômio de Masson após a diferenciação condrogênica.....	65
Figura 23. Amostras de CTM coradas com Picrosirius Hematoxilina após a diferenciação condrogênica.....	69
Figura 24. Imagens representativas de cada grupo, das diferenciações condrogênicas, com as diferentes colorações utilizadas no estudo.	74
Figura 25. Imagens representativas de cada grupo, das diferenciações condrogênicas na técnica de imunohistoquímica, com os antígenos Colágeno tipo II.	76
Figura 26. Imagens representativas de cada grupo, das diferenciações condrogênicas na técnica de imunohistoquímica, com os antígenos Agrecano.....	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Quantificação da deposição colágena, quanto a média $\pm$ desvio padrão.....	66
Gráfico 2. Quantificação da deposição de colágeno tipo I. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.....	71
Gráfico 3. Quantificação da deposição de colágeno tipo III. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.....	72
Gráfico 4. Expressão de Sox9 no sobrenadante das amostras diferenciadas e não diferenciadas a linhagem condrogênica.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tipos de cartilagem e suas características, localização e representação histológica.....	22
Quadro 2. Marcadores utilizados para a caracterização imunofenotípica das CTM antes da indução a diferenciação condrogênica.....	41
Quadro 3. Marcadores condroprogenitores utilizados para a avaliação das células antes da indução a diferenciação condrogênica.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de p das análises de citometria de fluxo dos marcadores de membrana utilizados no estudo.	94
---	----

LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS

7-AAD – 7-aminoactinomicina

APC – Aloficocianina (do inglês, *allophycocyanin*)

BR – Brasil

CD – Cluster de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CNT – Grupo Controle

CO₂ – Dióxido de Carbono

CT – Célula estromal

CTDA – Célula estromal mesenquimal derivada do tecido adiposo

CTM – Célula estromal mesenquimal

CTM-MO – Célula estromal mesenquimal derivada da medula óssea

CTM-TCU – Célula estromal mesenquimal derivada do tecido de cordão umbilical

DAB – Cromógeno 3,3'-diaminobenzidina

DIF – Grupo induzido à diferenciação

DMEM - Meio de Dulbecco modificado por Eagle (do inglês *Dulbecco's Medium Eagle Modified*)

DMEM F12 - Meio de Dulbecco modificado por Eagle suplementado com meio Ham F12 (do inglês *Dulbecco's Medium Eagle Modified*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNase – Enzima de degradação do ácido desoxirribonucleico

DP – Polpa Dental (do inglês, *dental pulp*)

DPSC – Célula estromal mesenquimal derivada da polpa de dente permanente (do inglês *Dental Pulp Stromal Cell*)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *thylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EUA – Estados Unidos da América

Et. alii. – Et ali (em português, e outros)

Fig - Figura

FITC – Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*)

GAGs – Glicosaminoglicanas

hMSC – Células Estromais Mesenquimais Humanas (do inglês, *Human Mesenchymal Stromal Cell*)

h – Hora

HE – Hematoxilina e eosina

HRP – Horseradish peroxidase

IgG1 – Imunoglobulina tipo G1

IGF-1 – Fator de crescimento tipo Insulina - 1 (do inglês Insulin-like growth factor-1)

IL-1 – Interleucina 1

IMDM – Meio de Dulbecco modificado por Iscove (do inglês Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

ISCT – Sociedade Internacional de Terapia Celular Gênica (do inglês *International Society For Cell and Gene Therapy*)

MAL – Tricrômio de Mallory

MAS – Tricrômio de Masson

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *major histocompatibility complex*)

Min - Minuto

PA – Alta Pureza

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, *phosphate-buffered saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)

PE – Ficoeritrina (do inglês, *phycoerythrin*)

PerCP – Proteína de clorofila peridina (do inglês, *peridinin chlorophyll protein*)

pH – Potencial hidrogeniônico

PH – Picrosirius Hematoxilina

PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

RNA – Ácido ribonucleico

RNase – Enzima de degradação do ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

SBF – Soro Bovino Fetal

SP – São Paulo

TA – Tecido Adiposo

T.A. – Temperatura ambiente

TB – Azul de Toluidina

TBS – Tampão Tris Salino (do inglês, *tris-buffered saline*)

TCU – Tecido de cordão umbilical

TGF – Fator de crescimento transformador (do inglês *Transforming growth factor*)

LISTA DE SÍMBOLOS

% – por cento

TM – Marca registrada (do inglês, *trademark*)

® – Marca registrada em uma agência governamental apropriada

= – Igual

< – Menor do que

± – Mais ou menos

β – Beta (letra grega)

g – Grama

Mg – Miligrama

μl – Microlitro

mL – Mililitro

μm – Micrômetro

cm² – Centímetro quadrado

mm² – Milímetro quadrado

μm² – Micrômetro quadrado

U – Unidades

g – Força gravitacional

°C – Grau Celsius

RESUMO

A limitação da capacidade de regeneração dos tecidos cartilagosos, os torna atraentes para a medicina regenerativa. Para isso a utilização das células estromais mesenquimais (CTM) tem se tornado cada vez mais vantajosa. As CTM são células adultas multipotentes que mantêm sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em várias linhagens celulares, e podem ser encontradas em diversas fontes, como tecido de cordão umbilical (CTM-TCU), medula óssea (CTM-MO), tecido adiposo (CTDA) e polpa de dente permanente (DPSC). A capacidade de diferenciação condrogênica *in vitro* dessas células tem sido estudada devido ao seu potencial clínico, porém, por existir uma grande variedade de fontes para obtenção dessas células, ainda existem dúvidas sobre qual delas apresenta maior potencial de diferenciação em condrócitos. Dessa forma, um estudo comparativo torna-se essencial a fim de investigar a existência de uma fonte com melhores características para a condrogênese. Este estudo comparou o potencial condrogênico de quatro fontes de CTM (CTM-TCU, CTDA, DPSC e CTM-MO). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (5.080.289). CTM de quatro fontes foram isoladas e induzidas a diferenciação condrogênica. Após 21 dias, as amostras foram analisadas por imunofenotipagem para marcadores condrogênicos específicos: CD44, CD49c, CD151 e Condroitina; por técnicas histológicas para avaliação da deposição de colágeno por Tricrômio de Mallory (MAL), Tricrômio de Masson (MAS), Picrosirius Hematoxilina (PH) e a coloração clássica por Azul de Toluidina (TB). Também foi analisada por espectrofotometria a proteína Sox9 solúvel. Todos os resultados foram analisados no *GraphPad Prism* 9.0. Nas análises de imunofenotipagem, as fontes não apresentaram diferença entre os marcadores avaliados. Na coloração de TB, foi possível observar as lacunas ao redor dos condrócitos jovens, mas não a deposição de proteoglicanos. Na coloração de MAL foi possível observar a deposição colágena. Após a quantificação da coloração de MAS, a CTM-MO apresentou maior deposição colágena. Para coloração PH, ao comparar todos os grupos, a CTM-MO apresentou maior deposição de colágeno tipo I, e os grupos CTDA e CTM-TCU apresentaram maior deposição colágeno tipo III. Em todas as fontes analisadas por imunohistoquímica não foi possível observar a marcação para colágeno tipo II. A análise de Sox9 solúvel, em todos os grupos, não apresentou diferença. A partir das análises de marcadores condroprogenitores, Sox9 solúvel, colágeno tipo II e agregano não foi possível concluir qual fonte é a mais eficiente para a diferenciação condrogênica. A partir dos protocolos de coloração pudemos observar também que a coloração de TB utilizada como padrão para caracterização das CTM não foi a mais informativa quando comparada com as demais (MAS, MAL, PH). E com a análise de todos os resultados obtidos por esse estudo, pudemos concluir então, que, dentre todas as fontes, a MO foi a que apresentou um potencial condrogênico mais elevado.

Palavras-chave: Condrogênese, Medula Óssea, Tecido Adiposo, Tecido de Cordão Umbilical, Polpa de Dente Permanente.

ABSTRACT

The limitation of cartilage tissue's ability to regenerate makes them attractive for regenerative medicine. Using mesenchymal stromal cells (MSC) has become increasingly advantageous. MSCs are multipotent adult cells that maintain their capacity for self-renewal and differentiation in several cell lineages and can be found in different sources, such as umbilical cord tissue (UC-MSC), bone marrow (BM-MSC), adipose tissue (ADSC) and permanent tooth pulp (DPSC). The in vitro chondrogenic differentiation capacity of these cells has been studied due to their clinical potential; however, because there is a wide variety of sources for obtaining these cells, there are still doubts about which source has the most significant potential for differentiation into chondrocytes. Thus, a comparative study becomes essential to investigate the existence of a source with better characteristics for chondrogenesis. This study compared the chondrogenic potential of four MSC sources (BM-MSC, UC-MSC, ADSC, DPSC). This study was approved by the Research Ethics Committee of PUCPR (5,080,289). MSCs from four sources were isolated and induced chondrogenic differentiation. After 21 days, samples were analyzed by immunophenotyping for specific chondrogenic markers: CD44, CD49c, CD151 and Chondroitin; by histological techniques to evaluate collagen deposition by Mallory's Trichrome (MAL), Masson's Trichrome (MAS), Picrosirius Hematoxylin (PH) and the classic staining by Toluidine Blue (TB). Soluble Sox9 protein was also analyzed by spectrophotometry. All results were analyzed in GraphPad Prism 9.0. The sources showed no difference between the evaluated markers in the immunophenotyping analyses. In the TB stain, it was possible to observe the gaps around the young chondrocytes but not the deposition of proteoglycans. In the MAL staining, it was possible to observe collagen deposition. After quantification of MAS staining, BM-MSC showed more significant collagen deposition. For PH staining, when comparing all groups, the BM-MSC showed a more significant deposition of type I collagen, and the ADSC and UC-MSC groups showed greater deposition of type III collagen. In all sources analyzed by immunohistochemistry, it was not possible to observe the labeling for type II collagen. The soluble Sox9 analysis in all groups showed no difference between them. From the analysis of chondroprogenitor markers, soluble Sox9, and immunohistochemistry, it was not possible to conclude which source is the most efficient for chondrogenic differentiation. From the staining protocols, we could also observe that the TB stain used as a standard for characterizing the MSC was not the most informative when compared to the others (MAS, MAL, PH). And with the analysis of all the results obtained by this study, we were able to conclude that, among all the sources, the OM was the one that presented a higher chondrogenic potential.

Keywords: Chondrogenesis, Bone Marrow, Adipose Tissue, Umbilical Cord Tissue, Permanent Dental Pulp.

RESUMO POPULAR

A dificuldade de cicatrização do tecido cartilaginoso é um atrativo para estudos de novos tratamentos. A utilização de células estromais/tronco mesenquimais (CTM), células que atuam na manutenção dos órgãos e tecidos do corpo humano, têm se mostrado vantajosa. Essas células podem ser encontradas em diferentes fontes como no tecido de cordão umbilical (CTM-TCU), medula óssea (CTM-MO), tecido adiposo (gordura) (CTDA) e polpa de dente permanente (DPSC), como os dentes do siso (terceiros molares). As CTM podem ser isoladas e cultivadas em laboratório, mantendo suas características de diferenciação em outros tipos celulares e capacidade de estimular a renovação celular do tecido onde são aplicadas. A utilização dessas células para tratamentos de lesões de cartilagem, faz necessário avaliar o potencial de diferenciação das CTM em células residentes do tecido cartilaginoso, os condrócitos, a partir da condrogênese realizada em laboratório (*in vitro*). Já que existem diferentes fontes para obtenção das CTM, deve ser avaliado se alguma delas possui um potencial mais elevado para condrogênese, assim o presente estudo comparou as fontes CTM-TCU, CTM-MO, CTDA e DPSC, para avaliar e comparar seus potenciais de condrogênese. Neste estudo, aprovado pelo comitê de ética da PUCPR (número 5.080.289), foram usadas células de quatro fontes diferentes. Essas células foram estimuladas a se transformarem em células de cartilagem. Após 21 dias, as amostras foram examinadas para verificar a presença de certas substâncias específicas de cartilagem, como CD44, CD49c, CD151 e Condroitina. Também foram usadas técnicas para observar como as células se comportavam e para detectar a presença de proteínas como o colágeno. Os resultados mostraram que as diferentes fontes de células não apresentaram diferenças significativas nos marcadores de cartilagem avaliados. Em certas colorações, como o Azul de Toluidina, foi possível observar espaços ao redor das células jovens de cartilagem, mas não a presença de certas substâncias da cartilagem. Outras colorações, como o Tricrômio de Mallory, mostraram a deposição de colágeno. A fonte de células chamada CTM-MO apresentou uma maior quantidade de colágeno, conforme observado na coloração de Tricrômio de Masson. análises adicionais mostraram que a fonte de células CTM-MO teve mais colágeno do tipo I, enquanto os grupos CTDA e CTM-TCU tiveram mais colágeno do tipo III, de acordo com diferentes técnicas de coloração. A análise da proteína Sox9 solúvel não mostrou diferenças significativas entre os grupos. No geral, com base nos marcadores de células de cartilagem, na presença de colágeno e em outras análises realizadas, não foi possível determinar com certeza qual fonte de células é a mais eficaz para se transformar em células de cartilagem. Foi também observado que a coloração de Azul de Toluidina não foi tão informativa quanto outras colorações como o Tricrômio de Mallory, o Tricrômio de Masson e a Hematoxilina de Picrosirius. Assim, considerando todos os resultados do estudo, concluiu-se que, entre as diferentes fontes de células testadas, as células da fonte MO parecem ter um potencial maior para se transformarem em células de cartilagem.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
2. ESTADO DA ARTE.....	22
2.1.TECIDO CARTILAGINOSO	22
2.3.CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS	25
2.4.FONTES DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS	27
2.4.1. Células Estromais Mesenquimais Derivadas da Medula Óssea	27
2.4.2. Células Estromais Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo	28
2.4.3. Células Estromais Mesenquimais Derivadas do Tecido do Cordão Umbilical	30
2.4.4. Células Estromais Mesenquimais Derivadas de Polpa de Dente Permanente	31
3. OBJETIVO GERAL	35
3.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. METODOLOGIA.....	36
4.1.ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS .	37
4.1.1. Isolamento de Célula Estromal Mesenquimal de Medula Óssea	37
4.1.2. Isolamento de Célula Estromal Mesenquimal de Tecido Adiposo	37
4.1.3. Isolamento de Célula Estromal Mesenquimal de Tecido do Cordão Umbilical	38
4.1.4. Isolamento de Célula Estromal Mesenquimal de Polpa de Dente Permanente	39
4.1.5. Isolamento de Células Condroprogenitoras.....	39
4.1.6. Cultivo e Expansão das CTM.....	40
4.2.CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTM	40
4.2.1. Imunofenotipagem Pré-Indução à Diferenciação Condrogênica.....	41
4.3.INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO EM CONDRÓCITOS	42
4.4.AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA	43

4.4.1.	Imunofenotipagem Pós-Indução à Diferenciação Condrogênica	43
4.4.2.	Avaliações Histológicas	44
4.4.3.	Quantificações Histológicas	46
4.4.4.	Avaliação do Colágenos II e Agrecano	47
4.4.5.	Quantificação de Sox9 Solúvel.....	48
4.4.6.	Análises Estatísticas	50
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1.	ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CTM	51
5.2.	CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS FONTES DE CTM.....	52
5.3.	EXPRESSÃO DE MARCADORES CONDROPROGENITORES - PRÉ-INDUÇÃO À CONDRÓGÊNESE	53
5.4.	EXPRESSÃO DE MARCADORES CONDROPROGENITORES – PÓS-INDUÇÃO À CONDRÓGÊNESE	55
5.4.1.	Marcador CD105	55
5.4.2.	Marcador CD44	56
5.4.3.	Marcador CD49c	57
5.4.4.	Marcador CD151	58
5.4.5.	Marcador Sulfato de Condroitina	59
5.5.	COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÕES	60
5.5.1.	Azul de Toluidina	60
5.5.2.	Tricrômio de Mallory	62
5.5.4.	Picrosirius Hematoxilina	68
5.5.5.	Comparação das Colorações Histológicas.....	73
5.6.	IMUNOHISTOQUÍMICA	75
5.7.	AVALIAÇÃO DE Sox9 SOLÚVEL.....	78
6.	CONCLUSÃO.....	80
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS, PERSPECTIVAS E CONTRIBUIÇÃO ORIGINAL PARA A CIÊNCIA	81
7.1.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81

7.2.PERSPECTIVAS	82
7.3.CONTRIBUIÇÃO ORIGINAL PARA A CIÊNCIA.....	82
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	84
Apêndice I.....	94
Apêndice 2	95
Anexo 1	96
Anexo 2	97
Anexo 3	98

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O tecido cartilaginoso é um tecido especializado, de consistência rígida, que desempenha função de suporte de tecidos moles e revestimento de superfícies articulares ¹. Considerado um tecido avascular, com poucas células, os condroblastos, caracterizados por sua capacidade de sintetizar uma matriz extracelular abundante ^{2, 3}. Esse tecido possui capacidade limitada de regeneração e por esse motivo tem atenção especial na medicina regenerativa, uma vez que esta estuda maneiras de substituir e/ou reestabelecer a função de tecidos e órgãos danificados pela idade, doença ou trauma ⁴. Embora os condrócitos tenham sido extensivamente estudados na reparação da cartilagem dentro da medicina regenerativa, a utilização de células estromais mesenquimais (CTM) expandidas *in vitro* tornou-se uma opção mais vantajosa diante de outros tratamentos disponíveis ⁵.

As CTM são células adultas, multipotentes e funcionalmente definidas por apresentarem características de autorrenovação, diferenciação em diversas linhagens celulares e extensa atividade parácrina e imunomoduladora ⁶⁻⁸. São células essenciais para a manutenção de tecidos e órgãos e podem ser encontradas em diversas fontes, como tecido do cordão umbilical ⁹, tecido adiposo ¹⁰, tecidos dentários ¹¹, e medula óssea ¹². Na medicina regenerativa, todas essas fontes têm sido estudadas e aplicadas em diversas terapias, e seus resultados têm se mostrado promissores ¹³⁻¹⁷.

O potencial de diferenciação das CTM na linhagem condrogênica já tem sido demonstrado em diversos estudos ¹³⁻¹⁹. Esta diferenciação é realizada em um agregado de alta densidade celular, o que resulta na produção de proteoglicanos altamente sulfatados e diferentes tipos colágenos, principalmente o colágeno tipo II, sendo ele aproximadamente 80% do tecido cartilaginoso total ^{18, 19}.

A baixa vascularização desse tecido, reflete sua capacidade limitada de regeneração, fazendo com que a cartilagem seja altamente estudada com o intuito de promover

tratamentos que recuperem sua função após lesões ou disfunções causadas por traumas, doença ou pela idade. A utilização de CTM visando a diferenciação condrogênica para uso na medicina regenerativa é um importante passo para o tratamento de lesões que envolvem o tecido cartilaginoso. Porém, por existir uma grande diversidade de fontes para obtenção dessas células, ainda existem dúvidas sobre qual fonte apresenta um maior potencial de diferenciação em condrócitos, uma vez que para as outras diferenciações, as mesmas células podem apresentar comportamentos diferentes.

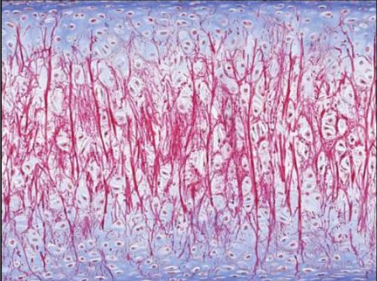
Sendo assim, obter a melhor fonte para diferenciação condrogênica é um importante passo dentro da medicina regenerativa, para que as pesquisas e o desenvolvimento dos tratamentos sejam realizados com maior especificidade visando a utilização de células que expressem os fatores necessários para formação e recuperação de um tecido cartilaginoso saudável e funcional. Dessa forma, um estudo comparativo entre as fontes mais utilizadas pela medicina regenerativa, torna-se essencial a fim de investigar a fonte com melhores características para a condrogênese.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. TECIDO CARTILAGINOSO

O tecido cartilaginoso é um tecido conjuntivo especializado, de consistência rígida, que desempenha função de suporte de tecidos moles, revestimento de superfícies articulares, absorção de choques, e deslizamento dos ossos nas articulações ¹. É um tecido não irrigado, considerado avascular, com poucas células. Os condroblastos, por exemplo, são as células que possuem a capacidade de sintetizar uma matriz extracelular abundante, composta essencialmente por colágeno tipo II, proteoglicanos e ácido hialurônico ²⁰. Quando maduras, essas células passam a ficar isoladas pela matriz extracelular, em lacunas, nesse momento já são consideradas condrócitos maduros, que vão participar da homeostase e manutenção do tecido ²⁻³.

O tecido cartilaginoso pode ainda ser dividido entre: cartilagem hialina, cartilagem elástica e cartilagem fibrosa ou fibrocartilagem (Quadro 1).

		
Cartilagem Hialina - Primeira estrutura esquelética do embrião; - Responsável pelo crescimento de ossos longos; - Encontrada na parede nasal, traqueia, brônquios, extremidade ventral das costelas e recobrimdo as superfícies articulares de ossos longos.	Cartilagem Elástica - Encontrada na orelha externa e interna, epiglote e laringe - Constituída por colágeno tipo II, fibras elásticas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas; - Tem a função principal de promover sustentação e flexibilidade.	Fibrocartilagem - Encontrada nos discos intervertebrais, sínfise púbica, tendões e ligamentos musculares; - Associada ao tecido conjuntivo denso; - Possui grande quantidade de colágeno tipo I e matriz extracelular; - Tem a função principal de promover sustentação e resistência.

Quadro 1. Tipos de cartilagem e suas características, localização e representação histológica. Cartilagem Hialina: coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) de traqueia, aumento de 1000x, pode-se observar os condrócitos nas lacunas, ainda em grupos isógenos, e matriz cartilaginosa ao redor; Cartilagem Elástica: coloração de Tricrômio de Masson de cartilagem da orelha, aumento de 400x, pode-se observar condroblastos, condrócitos isolados em lacunas e matriz colágena em azul com fibras elásticas ao redor coradas em rosa escuro; Fibrocartilagem: coloração em HE de tendão, aumento de 400x, pode-se observar os condrócitos em lacunas, alinhados, e matriz fibrosa ao redor. Adaptado de: Atlas de Histologia EdiPUCRS ²¹.

Na cartilagem ainda são encontrados diversos fatores de crescimento, transcrição e citocinas secretados pelas células residentes, que participam diretamente na indução da diferenciação dos condrócitos jovens para condrócitos maduros, atuando também na formação da matriz da cartilagem. Exemplos desses fatores são: a Sox9; a IL-1 (interleucina-1) que estimula a síntese e liberação de estromelisina, capaz de ativar a pró-colagenase dentro da cartilagem ²²; a glicoproteína estrutural de adesão condronectina, que proporciona a ligação dos condrócitos, fibras colágenas do tipo I, II e III, e glicosaminoglicanas (GAG) ¹; a IGF-1 (do inglês *Insulin-like growth factor-1*) e TGF- β (do inglês *Transforming growth factor-beta*), que estimulam a síntese de Agrecano, colágeno e participam também na maturação dos condrócitos ²³.

A capacidade desse tecido de resistir às cargas compressivas é dada pela predominância da proteoglicana Agrecano, encontrada cartilagem hialina, trabalhando juntamente com GAG ²⁴, uma vez que estas constituem a matriz extracelular da cartilagem articular, como o sulfato de condroitina e o ácido hialurônico, desempenhando um papel na hidratação da matriz, o que proporciona sua propriedade viscoelástica ²⁵.

Enquanto os condrócitos estão envolvidos principalmente na manutenção da cartilagem através da síntese de matriz extracelular, acredita-se que a homeostase geral da cartilagem seja o produto de uma interação entre a mecânica, fatores de crescimento, hormônios e envelhecimento, uma vez que a composição do tecido cartilaginoso muda durante a progressão para a idade adulta, resultando em uma organização das camadas de cartilagem, e no geral, essa maturação resulta em um aumento na reticulação do colágeno, e um aumento na tração e módulo de compressão ^{20, 26}.

Por ser um tecido rico em matriz extracelular e avascular, o tecido cartilaginoso possui uma taxa de regeneração limitada, o que o torna foco de diversos estudos para tratamento de lesões e doenças, sendo seu comprometimento um sinônimo de limitação de movimento e,

por consequência, baixa qualidade de vida ^{20, 27}. Neste contexto diversos estudos elegem as CTM como uma alternativa de tratamentos recorrentes, como raspagens ou enxertos cartilaginosos, para traumas e lesões da cartilagem ²⁸⁻³¹.

2.2. MEDICINA REGENERATIVA

As terapias disponíveis, em sua grande parte, apenas retardam o desenvolvimento da doença, e por muitas vezes não apresentam uma melhora clínica do paciente. Com a necessidade de tratamentos mais efetivos e duradouros, a medicina regenerativa estuda tratamentos para substituir e/ou recuperar tecidos e órgãos danificados pela idade, doença ou trauma. Uma alternativa promissora de tratamento é a utilização das CTM e seus derivados ⁴. Embora os condrócitos tenham sido extensivamente estudados e usados na reparação da cartilagem dentro da medicina regenerativa, a utilização de CTM tornou-se uma opção vantajosa diante de outros tratamentos disponíveis ⁵. Dados pré-clínicos e clínicos promissores demonstraram a possibilidade de tratamento de doenças agudas e crônicas, especialmente do tecido cartilaginoso ³²⁻³⁶.

A diversidade de fontes de CTM e seu amplo aspecto de aplicações faz com que sejam altamente utilizadas na medicina regenerativa ³⁷. Sabe-se que as diferentes fontes têm potências de ação distintos, o que torna importante observar qual fonte é a mais apropriada para cada tratamento e garantir o sucesso da medicina regenerativa baseada em células ³⁸⁻⁴⁰.

Os tratamentos disponíveis atualmente com foco em lesões de cartilagem compreendem cirurgias de preservação, tratamentos não cirúrgicos e cirurgias paliativas (raspagens) ⁴¹, métodos que possuem resultados de baixa eficácia, sendo necessárias novas intervenções na tentativa de manter o bem-estar e a funcionabilidade do tecido ⁴². Estudos de nível clínico e pré clínico já demonstraram a efetividade do uso das CTM em lesões de cartilagem ⁴³⁻⁴⁶.

2.3. CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

As CTM são células adultas, multipotentes e são funcionalmente definidas por apresentarem as seguintes características: capacidade de autorrenovação, capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares sob estímulo e extensa atividade parácrina e imunomoduladora ⁶⁻⁸. São células essenciais para a manutenção da homeostase de tecidos e órgãos e podem ser isoladas de diversas fontes, como tecido do cordão umbilical ⁹, tecido adiposo ¹⁰, tecidos dentários ¹¹, e medula óssea ¹².

Essas células são caracterizadas, de acordo com os critérios definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (ISCT – do inglês *International Society For Cell and Gene Therapy*), por sua adesão ao plástico quando as células são cultivadas *in vitro*; expressão de marcadores de superfície celular CD73, CD90, CD105 e ausência de CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79α, CD34, CD45 e HLA-DR e capacidade de se diferenciar *in vitro* em pelo menos três linhagens: osteogênica, adipogênica e condrogênica ⁷. Estas células têm localização perivascular e estão presentes em diversos tecidos do organismo adulto. Apesar de serem multipotentes por possuírem uma menor capacidade de diferenciação comparativamente às células-tronco embrionárias, são consideradas mais seguras e de fácil obtenção para a utilização em pacientes ^{7,8} (Fig. 1).

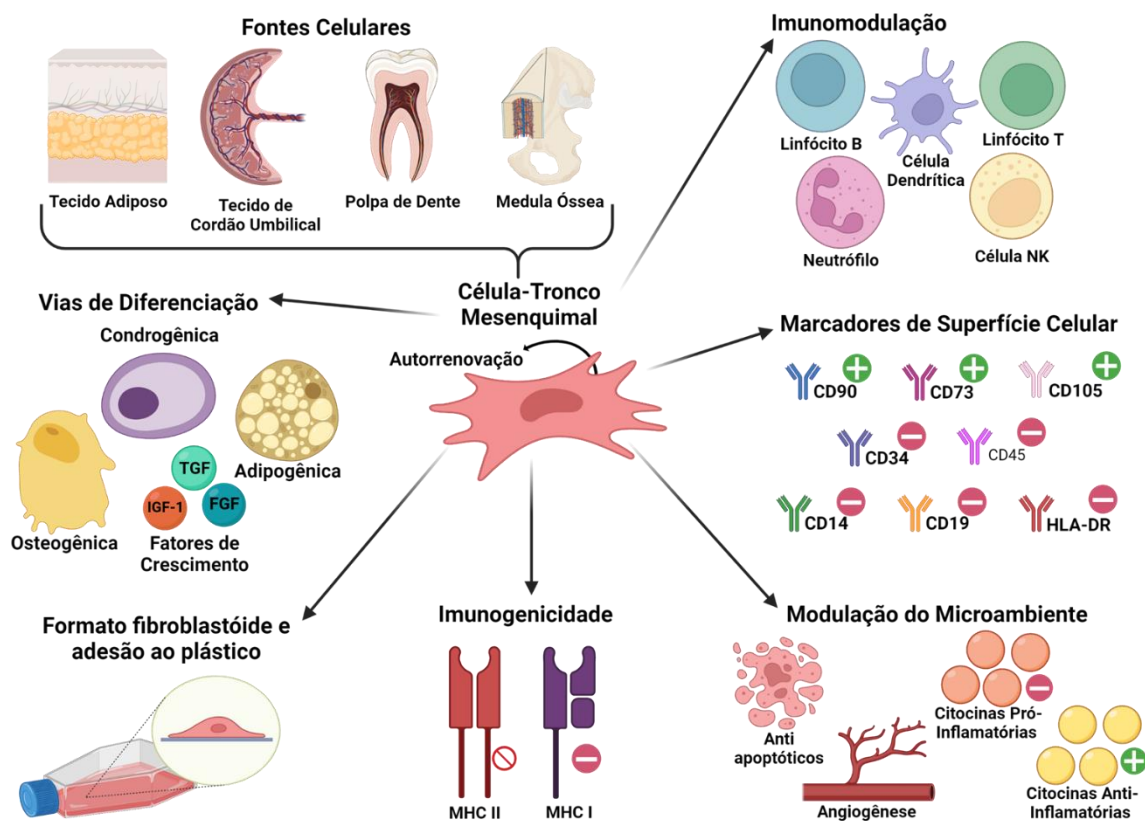


Figura 1. Características das CTM quanto às fontes que podem ser encontradas e suas definições pela ISCT. CTM: Células estromais mesenquimais; ISCT: Sociedade Internacional de Terapia Celular Gênica. Criado com BioRender pela autora.

Recentemente, as CTM isoladas de diversas fontes têm sido aplicadas na medicina regenerativa, em diferentes disfunções que necessitam de regeneração e restauração funcional de um tecido lesionado¹³ como queimaduras⁴⁸, lesão de medula espinhal^{49, 50}, miocardiopatia isquêmica⁵¹, e reparo de lesões de cartilagem^{31, 52}. Desta forma, a terapia celular, dentro da medicina regenerativa, propõe o restabelecimento funcional do tecido lesionado por meio do transplante autólogo, alogênico ou xenogênico de CTM que têm se mostrado promissor¹⁷.

Estudos sugerem que as CTM não apresentam potencial de diferenciação *in vivo*, quando usadas em terapias, mas sim promovem uma alteração do microambiente, tornando-o propício para a regeneração através da liberação fatores bioativos que reparam o tecido

danificado, e além de apresentam efeitos anti-apoptóticos, estimulam a angiogênese e apresentam potencial imunomodulador ⁵³.

A imunomodulação, realizada pelas CTM, ocorre em tipos celulares tanto do sistema imune inato como do sistema imune adaptativo, tais como células dendríticas, células *natural killer*, neutrófilos, linfócitos T e B. Isso ocorre devido ao contato célula-célula juntamente com a liberação de fatores solúveis pelas CTM, promovendo a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias tanto *in vitro* como *in vivo* ⁵⁴. São consideradas pouco imunogênicas, devido à baixa expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - do inglês *major histocompatibility complex*) de classe I, de moléculas coestimulatórias e ausência de MHC classe II na superfície celular, podendo ser administradas de forma autóloga ou alogênica ⁵⁵.

2.4. FONTES DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

2.4.1. Células Estromais Mesenquimais Derivadas da Medula Óssea

A medula óssea é coletada por aspiração da crista ilíaca ou esterno, por meio de uma agulha de Jamshidi ⁵⁶. O microambiente onde encontra-se as CTM abriga também células hematopoiéticas, imunológicas e adipócitos, sustentadas por uma matriz extracelular altamente vascularizada (Fig. 2) ^{57, 58}. O isolamento das células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea (CTM-MO) é realizado por gradiente de densidade, onde são encontradas no anel de células mononucleares, após centrifugação ⁵⁷. As CTM-MO podem se diferenciar em células como adipócitos, osteoblastos, condrócitos, além das células do estroma da medula óssea que também suportam a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas. Características estas que as tornam potencialmente úteis para a terapia celular ⁵⁶. Seu potencial de diferenciação condrogênica *in vitro* é conhecido, tendo diversos

estudos de avaliação comparando esta e as demais fontes além de estudo *in vivo* com objetivo do reparo de lesões de cartilagem ⁵⁷.

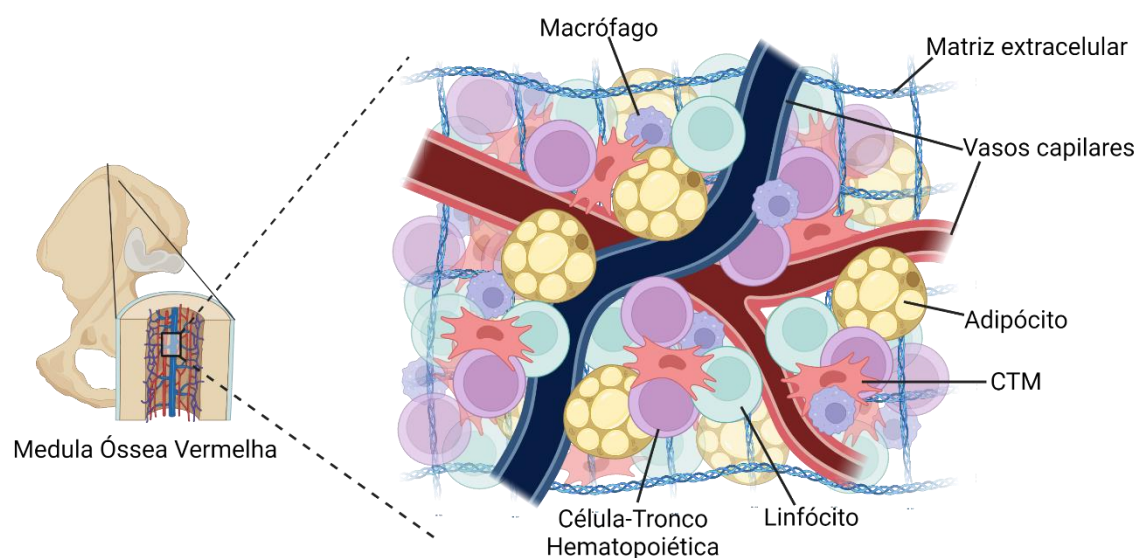


Figura 2. Células presentes na medula óssea. Criado com BioRender pela autora. Adaptado de: Nayak e colaboradores ⁵⁸.

Apesar de ser a fonte mais explorada pelos estudos de pesquisa básica, pré-clínica e clínica, a coleta da medula óssea é considerada invasiva, dolorosa e com riscos para o doador. Além disso, o rendimento de células isoladas é de aproximadamente 0,005%, podendo ser influenciada ainda por fatores como a presença de patologias, uso de medicamentos e a idade do doador ^{56, 57}. Devido a essas características fez necessário a procura por novas fontes de CTM com coleta menos invasivas, mais seguras e com maior rendimento celular.

2.4.2. Células Estromais Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo

O tecido adiposo é composto não apenas por adipócitos, mas também células imunológicas, fibroblastos, células endoteliais, que são sustentadas por uma matriz extracelular, sendo um tecido altamente vascularizado ⁵⁹.

Além disso, é uma fonte rica de CTM também conhecidas como células estromais derivadas do tecido adiposo (CTDA) (Fig. 3.).

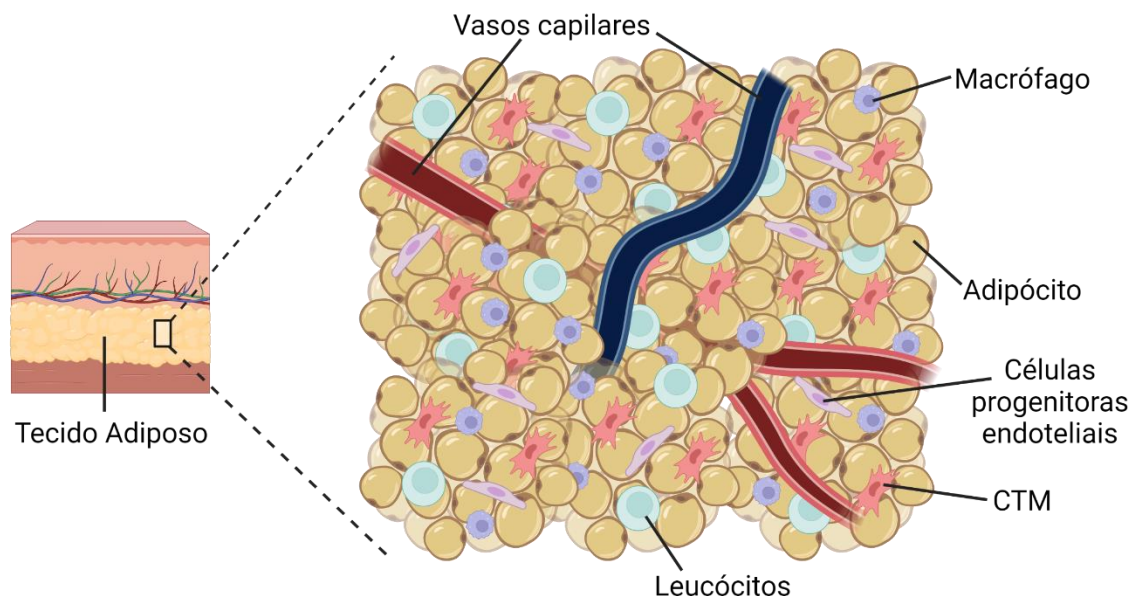


Figura 3. Células presentes no tecido adiposo. Criado com BioRender pela autora. Adaptado de: AMBROSE Cell Therapy, 2022 ⁶⁰.

O tecido adiposo é um grande candidato como fonte de células estromais mesenquimais para a medicina regenerativa. Sua coleta, por meio da lipoaspiração ou dermolipectomia, sendo considerado resíduo cirúrgico, tem baixa porcentagem de mortalidade para o paciente/doador e o rendimento de CTM é alto após o isolamento (1% a 10% de células estromais mesenquimais) ⁶¹⁻⁶³. Como as CTDA são de origem mesodérmica sabe-se de seu potencial para se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteoblastos ^{64, 65}. Devido à sua plasticidade, isto é, capacidade de gerar vários tipos de tecidos, sua utilização parece ser extremamente promissora como opção para a obtenção de CTM.

Por sua alta capacidade de proliferação, fácil manipulação *in vitro* e potencial condrogênico comprovado, as CTDA tornam-se atrativas para a regeneração tecidual da cartilagem, como descrito por Peltari ⁶⁶, IM ⁶⁷ e colaboradores. A utilização *in vivo* destas células, já é bem explorada e apresenta bons resultados em estudos pré-clínicos, como descrito por Erickson e colaboradores ⁶⁸, onde observaram a capacidade das CTDA em

produzir moléculas características da matriz de cartilagem, *in vivo* e *in vitro*, mostrando seu potencial para a medicina regenerativa.

2.4.3. Células Estromais Mesenquimais Derivadas do Tecido do Cordão Umbilical

O tecido de cordão umbilical (TCU), é um carreador de nutrientes, entre mãe e feto, composto por uma rígida parede de células epiteliais e mesenquimais, que protege duas artérias e uma veia, que ficam envoltas em uma substância denominada de geleia de Wharton ⁶⁹ (Fig. 4).

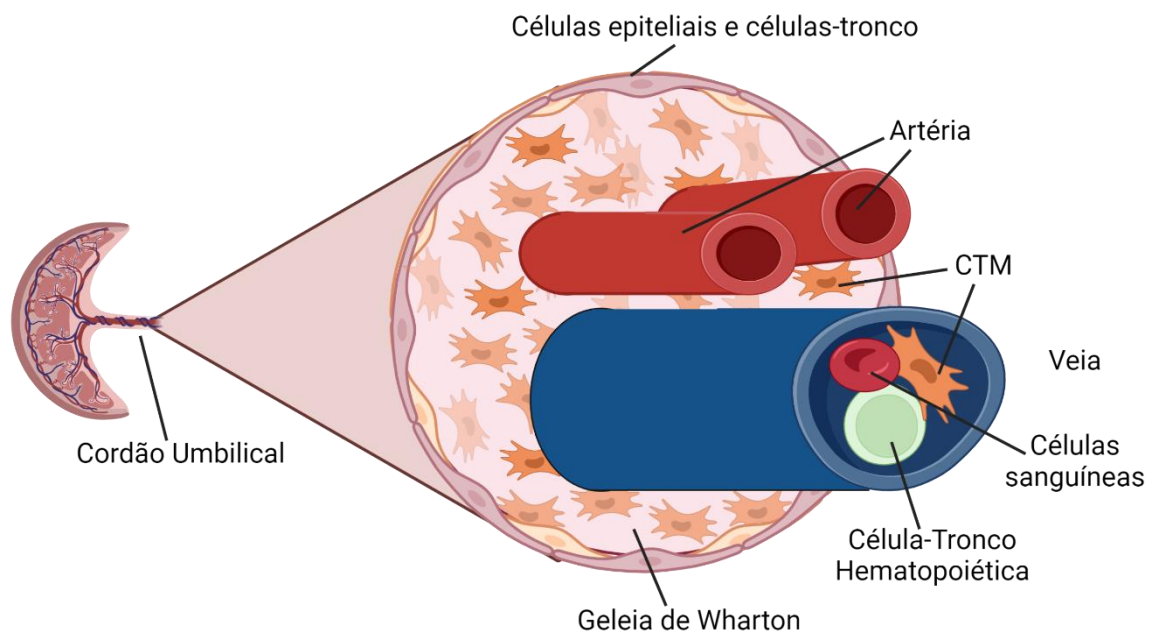


Figura 4. Células presentes no tecido de cordão umbilical. Criado com BioRender pela autora. Adaptado de: Americord ⁷⁰.

Esse tecido é uma fonte de células estromais mesenquimais (CTM-TCU) que pode ser obtida de maneira fácil, e não invasiva sem prejuízos para a mãe ou para o bebê, considerada um resíduo cirúrgico. As CTM podem ser obtidas a partir da geleia de Wharton, do sangue da veia ou do tecido total do cordão, sendo a geleia de Wharton utilizada na maior parte dos estudos ⁶⁹. O isolamento das CTM é realizado por explante e/ou digestão enzimática. As células obtidas têm o mesmo potencial de diferenciação, imunomodulação e liberação de fatores bioativos quando comparadas a outras fontes como a medula óssea ⁷¹, além de uma

alta capacidade de expansão o que as torna essas células importantes para a utilização na terapia celular ⁷².

Em relação à diferenciação condrogênica é observado o mesmo potencial, independente da porção do cordão umbilical de onde as células foram isoladas ⁴², já sendo também amplamente estudada *in vitro* e *in vivo*, na área da medicina regenerativa, para a regeneração do tecido cartilaginoso ⁷³.

2.4.4. Células Estromais Mesenquimais Derivadas de Polpa de Dente Permanente

A polpa dentária é um tecido rico em células pré-odontoblásticas, pericitos, fibroblastos e CTM, que são sustentadas por uma matriz celular vascularizada e com presença de fibras nervosas (Fig. 5) ⁷⁴.

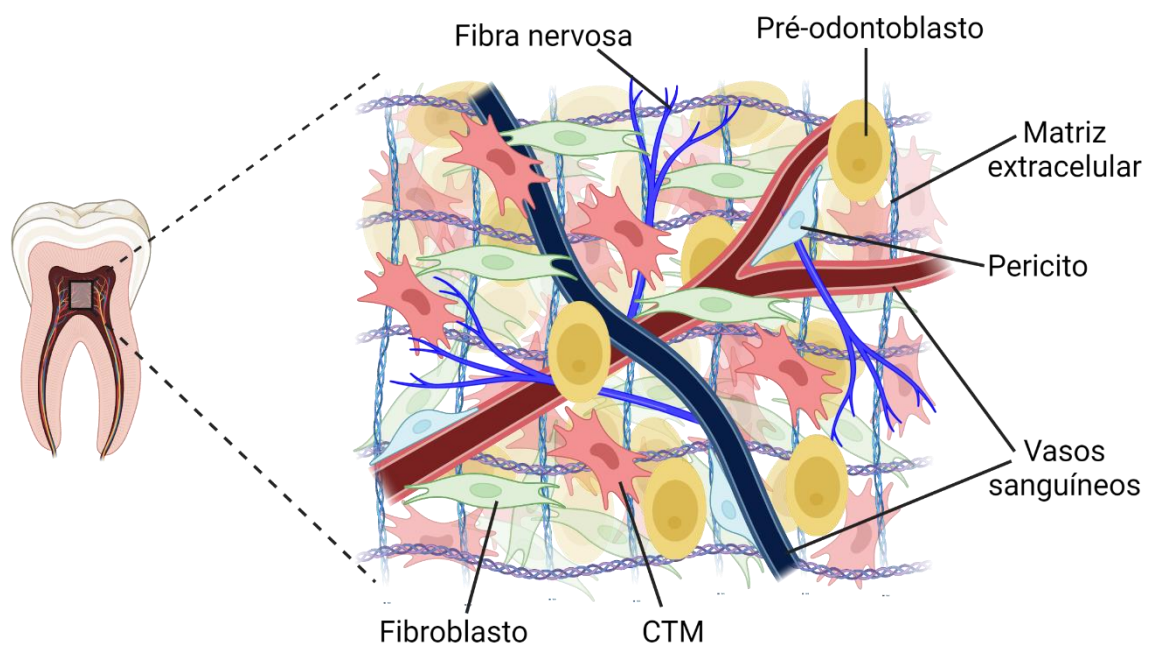


Figura 5. Células presentes na polpa de dente. Criado com BioRender pela autora. Adaptado de: Baranova e colaboradores ⁷⁵.

As CTM derivadas da polpa dentária (DPSC do inglês *dental pulp stem cells*) são uma fonte considerada rica, única e acessível de fácil obtenção, uma vez que podem ser isoladas de terceiros molares, extraídos rotineiramente sem riscos ao doador. Os terceiros molares

podem ser uma fonte promissora pois são diariamente extraídos e descartados como resíduos cirúrgicos ⁷⁶.

Todas as CTM isoladas de tecidos dentários possuem origem na crista neural, porém as polpas isoladas de terceiros molares possuem uma vantagem significativa sobre os dentes completamente formados, pois a polpa deste dente não está completamente desenvolvida e, portanto, as células isoladas a partir deste tecido apresentam um fenótipo mais imaturo. A polpa de dente tem vantagens em relação ao rendimento de células isoladas quando comparada com outras fontes, cerca de 5% de CTM ⁷⁷⁻⁸⁰.

O potencial condrogênico das DPSC para aplicações dentro da medicina regenerativa permanece pouco explorado, já que a maioria dos estudos abordaram sua condrogênese apenas como parte de seu potencial de diferenciação multilinhagem. Um exemplo é o estudo realizado por Longoni e colaboradores ⁷⁹, onde avaliaram a diferenciação condrogênica de CTM derivadas da polpa de dente *in vitro*. A partir de análises de expressão gênica e imunohistoquímica, observaram a presença de glicosaminoglicanos, agrecano e formação de matriz colágena após indução à diferenciação, característica do tecido cartilaginoso.

2.5. DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA *IN VITRO*

A diferenciação condrogênica *in vitro* das CTM é considerada um processo multifatorial, sendo a dinâmica da célula, a interação entre célula-matriz, o contato célula-célula e o ambiente que são cultivadas, os aspectos que vão determinar como serão as respostas aos sinais biomecânicos e/ou bioquímicos de indução a diferenciação ^{80,81}. Sabe-se que as CTM podem ser diferenciadas para células semelhantes a condroprogenitoras, mimetizando a condrogênese *in vivo* através da indução à diferenciação com fatores específicos ⁸².

Comumente a indução à diferenciação condrogênica é realizada em cultivo de agregado celular de alta densidade, chamado também de cultura em micromassa, com meio específico sem a adição de soro bovino fetal (SBF), suplementado com fator de crescimento transformador (TGF – do inglês *transforming growth factor*). O TGF atua na regulação da homeostase, na integridade e no desenvolvimento celular, participando ativamente das vias de diferenciação^{80, 81}.

O contato célula-célula mimetiza a fase de condensação das células condroprogenitoras no tecido cartilaginoso, e todo processo de desenvolvimento. Além desse contato deve-se também mimetizar os fatores de crescimento presentes na cartilagem, sendo os mais explorados da superfamília TGF, o TGF- β 1 e TGF- β 3. Ambos os processos estão relacionados à estimulação da diferenciação condrogênica *in vitro*, desencadeando uma regulação positiva da expressão de genes específicos do tecido cartilaginoso, em específico da cartilagem hialina. Esses genes atuam na indução da produção de matriz extracelular e aumento da síntese de glicosaminoglicanos sulfatado, como por exemplo a condroitina, e proteínas como colágeno tipo II, considerado o principal colágeno da cartilagem hialina, e o colágeno tipo III que é geralmente encontrado em associação com o tipo I. O colágeno I é conhecido por ser o mais abundante no corpo humano, presente em ossos, pele, tendão, pericôndrio e outros tecidos fibrosos, que em conjunto com outros componentes da matriz, atuam diretamente na integridade do tecido e desempenham da função de sustentação e resistência⁸³⁻⁸⁷.

Estas produções e expressões específicas de proteínas, colágenos e fatores de crescimento da cartilagem, acontecem por meio de cascatas de sinalização intracelular, ativada por diferentes quinases e regulada por sinais extracelulares⁸⁰, além disso contam com a atuação de fatores de transcrição, em particular o Sox9, expresso por condroblastos. Esse fator de transcrição é conhecido pela sua atuação na formação do tecido cartilaginoso

através da sua capacidade de sinalização à indução da diferenciação condrogênica, influenciando a condensação das células e a expressão de outras proteínas envolvidas na condrogênese ^{81, 88}.

Ainda em nível celular, sabe-se que as CTM expressam, em sua membrana celular, alguns marcadores em comum com condrócitos articulares. Esses marcadores são considerados marcadores condrogênicos, que além de auxiliarem a detecção da diferenciação, atuam ativamente nessa via ⁸⁹, como o CD44, que atua em interações célula-célula, adesão e migração celular, além de ser um receptor de ácido hialurônico, também pode interagir com outros ligantes, como osteopontina e tipos de colágeno ^{90, 91}; o CD49c, que atua também na interação célula-célula, mas também atua na organização estrutural da matriz extracelular ^{87, 92}; o CD151 que desempenha um papel na regulação do desenvolvimento celular, ativação, crescimento e motilidade, envolvido também em processos de adesão celular e pode regular o tráfego e/ou função da integrina responsável pela interação da família TGF ^{93, 94}. A expressão desses marcadores pode auxiliar na caracterização das células induzidas a diferenciação condrogênica e identificar qual fonte tem maior potencial para diferenciação neste tipo celular.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de diferenciação condrogênica de quatro fontes diferentes de CTM (tecido adiposo, polpa de dente permanente, tecido do cordão umbilical e medula óssea).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar e caracterizar as CTM isoladas de tecido adiposo, polpa de dente permanente, tecido do cordão umbilical e medula óssea;
- Induzir a diferenciação condrogênica das CTM isoladas de tecido adiposo, polpa de dente permanente, tecido do cordão umbilical e medula óssea;
- Comparar o potencial de diferenciação condrogênica das CTM isoladas de tecido adiposo, polpa de dente permanente, tecido do cordão umbilical e medula óssea.
- Avaliar qual método de coloração é o mais eficiente para observar a diferenciação condrogênica de CTM.

4. METODOLOGIA

O presente estudo tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) - Parecer: 1.047.248 e 5.080.289 e foi realizado no Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUCPR, conforme o desenho do estudo (Fig. 6).

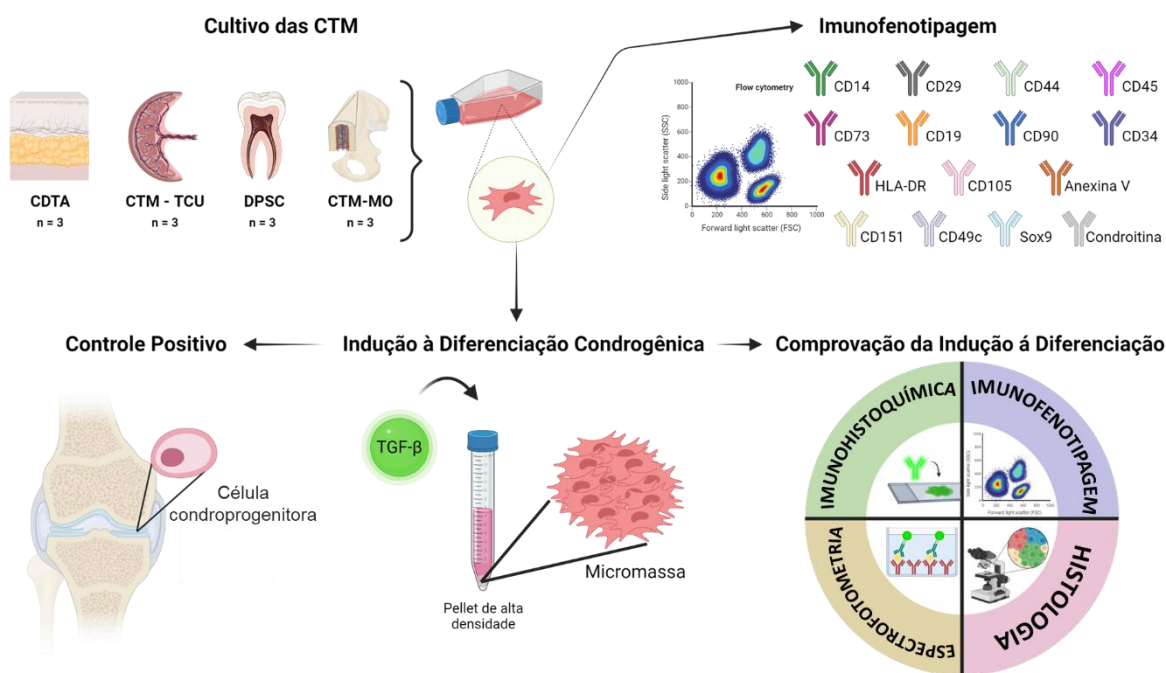


Figura 6. Desenho de estudo. Criado com BioRender pela autora.

As células foram isoladas de diferentes fontes, cultivadas e induzidas a diferenciação condrogênica. A indução a diferenciação das CTM foi realizada em micromassa, com meio de cultivo específico, suplementado com TGF- β3. Quatro fontes diferentes de CTM foram escolhidas para avaliação: medula óssea, tecido adiposo, polpa de dente permanente e tecido de cordão umbilical, cada uma representada por três amostras. Todas as fontes foram divididas entre: grupo controle, no qual as amostras foram cultivadas utilizando IMDM (Meio de Dulbecco modificado por Iscove) para TCU, MO e DP; DMEM-F12 (Meio de Dulbecco modificado por Eagle suplementado com meio de Ham F12) para TA; ou DMEM (Meio de Dulbecco modificado por Eagle) para células condroprogenitoras; todos

suplementado 15% SBF; e grupo diferenciação, no qual as amostras foram cultivadas com meio específico para diferenciação condrogênica. O estudo também obteve um controle positivo para a diferenciação, utilizando células condroprogenitoras isoladas de cartilagem de joelho humano.

4.1. ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

As CTM utilizadas para o estudo foram isoladas de quatro fontes diferentes: medula óssea, tecido de cordão umbilical, tecido adiposo e polpa de dente permanente.

4.1.1. Isolamento de Célula Estromal Mesenquimal de Medula Óssea

O isolamento de três amostras de CTM-MO foi realizado a partir da técnica de gradiente de densidade (Histopaque 1077 – Sigma Aldrich, Missouri, EUA) onde após a diluição em IMDM (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA), na proporção de 1:2, a medula óssea foi adicionada lentamente ao gradiente de densidade e então a solução foi centrifugada por 30 min a 460 *g* sem aceleração e freio, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o anel de células mononucleares formado foi transferido para outro tubo, e lavado com meio IMDM e centrifugada novamente, a 400 *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em IMDM e plaqueadas em frascos com meio de cultivo IMDM suplementado com 1% de antibióticos (ATB - penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml)) e 15% de SBF.

4.1.2. Isolamento de Célula Estromal Mesenquimal de Tecido Adiposo

O isolamento das três amostras CTDA foi realizado utilizando o método de digestão enzimática, de acordo com a técnica padronizada no Núcleo de Tecnologia Celular da

PUCPR. Brevemente, 100 mL de tecido adiposo (lipoaspirado) foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) e a digestão enzimática foi realizada com colagenase tipo I durante 30 minutos, 37°C sob agitação, seguido por filtração utilizando filtros *Cell Strainer* (BD Falcon, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) de 100 e 40-µm. As células obtidas foram cultivadas em DMEM-F12 (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA) suplementado com 15% de SBF e 1% de ATB (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA).

4.1.3. Isolamento de Célula Estromal Mesenquimal de Tecido do Cordão Umbilical

O isolamento das três amostras de CTM-TCU foi realizado de acordo com a técnica padronizada no Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR. Primeiramente o cordão umbilical foi lavado em tampão fosfato salina (PBS) e 1% de ATB (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA). O tecido de cordão umbilical foi macerado com o auxílio de bisturi e em seguida passou por uma digestão enzimática com colagenase tipo II (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA). O material obtido foi mantido em estufa a 37°C por 16 horas sob homogeneização constante. Após este período o material foi lavado com PBS e então foi realizada a digestão enzimática com 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA) por 15 min, a 37°C. Após a tripsina foi inativada com SBF, a solução foi centrifugada por 10 min a 440 *g*. Então as células foram plaqueadas em frasco de cultura de 75 cm², cultivadas em IMDM (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA) com 15% de SBF (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA), 1% de ATB (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA).

4.1.4. Isolamento de Célula Estromal Mesenquimal de Polpa de Dente Permanente

A coleta e o isolamento das três amostras de DPSC foram realizadas conforme Fracaro e colaboradores ⁹⁵. Para a coleta de dente permanente, erupcionados e com raiz completamente formada, o cirurgião dentista solicitou que o paciente realizasse previamente um enxague bucal com clorexidina (Periogard, Colgate®) para remover possíveis contaminantes, garantindo a integridade do material coletado. Após a extração, o dente foi acondicionado em um frasco com IMDM (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA), e fluconazol (120µg/ml). O dente (3º molar) após retirado do frasco de coleta foi lavado em PBS, e, em placa de petri, os fragmentos de polpa de dente foram removidos mecanicamente com auxílio de uma lima endodôntica. A polpa retirada foi processada por digestão enzimática com collagenase tipo II (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA), sob agitação, a 37°C, por 1 hora e após, centrifugada em PBS. As células foram então ressuspensas e plaqueadas em frascos com meio de cultivo IMDM suplementado com 1% de ATB (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA) e 20% SBF (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA).

4.1.5. Isolamento de Células Condroprogenitoras

Após a coleta da cartilagem articular de joelho humano, o isolamento das células condroprogenitoras foi realizada a partir de técnica padronizada no Núcleo de Tecnologia Celular. Primeiramente a amostra passou por três lavagens iniciais com PBS suplementado com 1% de ATB (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA), então o tecido foi segmentado com auxílio de bisturi e pinça, em uma placa de Petri, até os fragmentos estarem com aproximadamente 1-3mm². Após isso, foi realizada uma nova lavagem com PBS, então toda

a solução com os fragmentos foi transferida para um tubo de 15 mL, para ser centrifugada por 5 min à 400 *g*.

Após a remoção do meio com auxílio de pipeta Pasteur, então foi realizado o processo de digestão enzimática com 0,01g de colagenase II (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA) diluída em 10 mL de DMEM suplementado com 1% de ATB (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA). Os fragmentos foram incubados por 3h em estufa 37°C, sob homogeneização constante e suave, em seguida as amostras foram homogeneizadas com auxílio de Vortex e então centrifugadas por 10 min a 400 *g*. O sobrenadante foi descartado e então foi adicionado DMEM com 10% SBF (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA) e 1% de ATB (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA). O material foi filtrado em *cell strainer* (BD Falcon, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) de 100 µm, e centrifugado à 400 *g* à 22°C.

4.1.6. Cultivo e Expansão das CTM

Após o isolamento das CTM de todas as fontes, e das células condroprogenitoras, as células obtidas foram plaqueadas em frasco de cultura de 25 cm² e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂, realizando trocas do meio de cultura duas a três vezes por semana. Quando as células atingiram a confluência de 80-90%, foi realizado o processo de dissociação com a enzima tripsina-EDTA 0,25% (Gibco™ Invitrogen, Nova York, EUA) para que pudessem ser replaqueadas e o cultivo expandido até atingirem a quarta ou quinta passagem.

4.2. CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTM

Para a marcação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos, descritos no Quadro 2, por 30 minutos no escuro. Para analisar as células em apoptose e viabilidade foi utilizado o anticorpo Anexina V e o corante vital 7-Aminoactinomicina D

(7-AAD), respectivamente. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 500 µL de uma solução contendo 1% de paraformaldeído. Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle. As células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur™ (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA) e analisadas por meio do software FlowJo™ (v 10.1).

Marcador	Marca	Catálogo	Fluorocromo	Diluição
CD14	BD Pharmingen	560976	FITC	1:20
CD19	BD Pharmingen	560994	FITC	1:20
CD 29	BD Pharmingen	561794	APC	1:20
CD 34	BD Pharmingen	560940	APC	1:20
CD45	BD Pharmingen	560976	FITC	1:20
CD73	BD Pharmingen	561014	PE	1:10
CD90	BD Pharmingen	555596	PE	1:100
CD 105	BD Pharmingen	562408	APC	1:20
HLA-DR	BD Pharmingen	551375	PerCP	1:33

Quadro 2. Marcadores utilizados para a caracterização imunofenotípica das CTM antes da indução a diferenciação condrogênica. CD: Grupamento de diferenciação (do inglês, Cluster of differentiation; FITC: Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, *Fluorescein isothiocyanate*), PE: Ficoeritrina (do inglês, *Phycoerythrin*), APC: Aloficocianina (do inglês, *Allophycocyanin*), PerCP: Proteína de clorofila peridina (do inglês, *Peridinin chlorophyll protein*).

4.2.1. Imunofenotipagem Pré-Indução à Diferenciação Condrogênica

Pré-indução a diferenciação condrogênica, foi também utilizado marcadores condroprogenitores para a avaliação imunofenotípica das CTM. Para a marcação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos, apresentados no Quadro 3, por 30 minutos no escuro. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 500 µL de uma solução contendo 1% de paraformaldeído. Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle. As células marcadas foram adquiridas

pelo citômetro de fluxo FACS Calibur™ (Becton, Dickinson, Nova Jersey, EUA) e analisadas por meio do software FlowJo™ (V 10.1).

Marcador	Alvo	Marca	Catálogo	Fluorocromo	Diluição
CD44	Receptor de ácido hialurônico em condrócitos de cartilagem hialina	BD Pharmingen	560411	FITC	1:5
CD49c	Marcador condroprogenitor	BD Pharmingen	556025	PE	1:5
CD151	Marcador condroprogenitor	BD Pharmingen	556057	PE	1:5
Condroitina	Componente da matriz extracelular responsável pela estruturação e resistência à compressão da cartilagem	BD Pharmingen	562413	FITC	1:20

Quadro 3. Marcadores condroprogenitores utilizados para a avaliação das células antes da indução a diferenciação condrogênica. CD: Grupamento de diferenciação (do inglês, Cluster of differentiation; FITC: Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, *Fluorescein isothiocyanate*), PE: Ficoeritrina (do inglês, *Phycoerythrin*), APC: Alofocianina (do inglês, *Allophycocyanin*), PerCP: Proteína de clorofila peridinina (do inglês, *Peridinin chlorophyll protein*).

4.3. INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO EM CONDRÓCITOS

A indução à diferenciação condrogênica foi realizada a partir do método de cultura em micromassa, onde cerca de $1,5 \times 10^6$ células de todas as fontes de CTM e células condroprogenitoras, padronizado para este estudo, foram cultivadas em um tubo cônico para formar um agregado celular, para os grupos controle e diferenciação. Foi utilizado o meio específico de diferenciação condrogênico (Differentiation Basal Medium-Chondrogenic, Lonza, EUA), suplementado com hMSC Chondrogenic SingleQuots (Lonza, EUA) conforme fabricante. Durante o cultivo foi adicionado ao meio TGF- β 3 (Lonza, EUA), na concentração de 10 ng/ml, e as células foram mantidas em cultivo durante 21 dias, com trocas de meio três vezes por semana, portanto essas células fazem parte do grupo “diferenciação”. Os controles foram cultivados por 21 dias com meio IMDM suplementado com 15% de SBF, portanto são parte do grupo “controle”. O meio foi trocado três vezes por

semana. Após este período, o agregado celular foi analisado por meio de diferentes técnicas a fim de avaliar o potencial de diferenciação condrogênica de cada uma das fontes de CTM.

4.4. AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA

Para comprovação e comparação entre as fontes da diferenciação condrogênica, as amostras foram avaliadas por técnicas de colorações histológicas, imunohistoquímica, imunofenotipagem e espectrofotometria (Fig. 7).

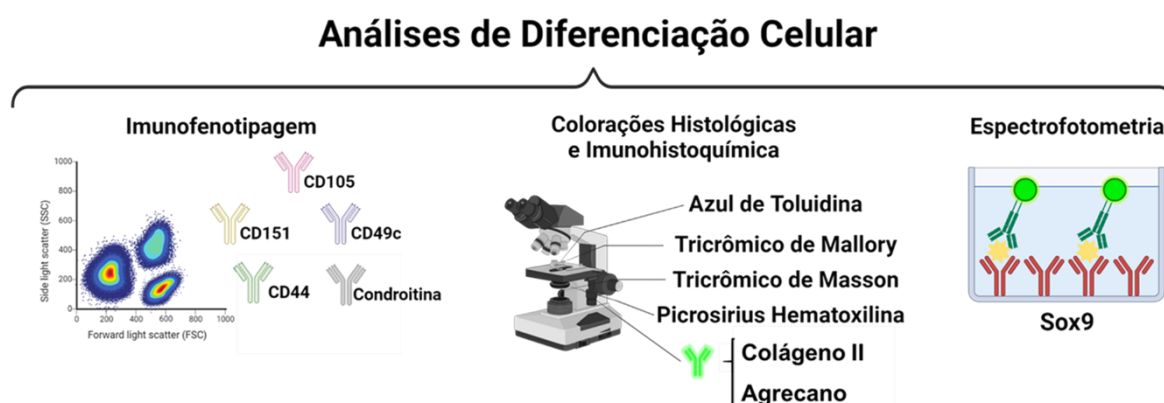


Figura 7. Análises de diferenciação celular que serão realizadas em todos os grupos (CTM-MO, CTDA, DPSC e CTM-TCU) após a indução a diferenciação condrogênica. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical. Criado com BioRender pela autora.

4.4.1. Imunofenotipagem Pós-Indução à Diferenciação Condrogênica

Após indução a diferenciação condrogênica, foram desfeitos os agregados de células para que pudessem ser caracterizados por imunofenotipagem. Para a marcação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos, apresentados no Quadro 3, por 30 minutos no escuro. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 500 µL de uma solução contendo 1% de paraformaldeído. Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle. As células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur™ (Becton, Dickinson, Nova Jersey, EUA) e analisadas por meio do software FlowJo™ (V 10.1).

4.4.2. Avaliações Histológicas

Para as avaliações histológicas, as micromassas, dos grupos controle e diferenciação, de todas as amostras foram previamente fixadas em formalina 10%, para que então pudessem ser emblocadas em parafina histológica. Os cortes histológicos foram realizados com 4µm de espessura, e as colorações foram realizadas pelo Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR e analisadas no Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR (Fig. 8).

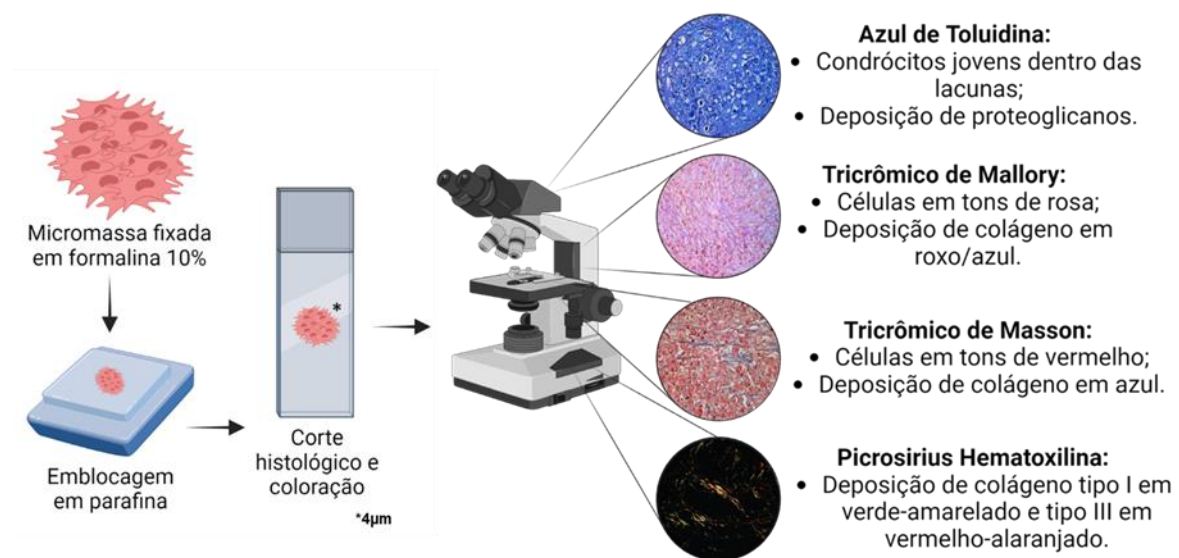


Figura 8. Processo de preparo histológico das amostras até a análise em microscópio óptico. Criado com BioRender pela autora.

Para a coloração histológica, todas as amostras passaram pelo processo de remoção da parafina em dois banhos em xilol PA por 5 minutos, seguido pelo processo de hidratação, passando por banhos decrescentes de álcool (99%, 90% e 70%), por 2 minutos em cada até água por dois minutos. Seguindo então, para seus protocolos e corantes específicos, passando por uma última lavagem em água para remoção do resíduo dos corantes, seguindo para o processo de desidratação (com exceção da coloração de Azul de Toluidina) em banhos de álcool crescente (70%, 95% e 99%) por 2 minutos cada, e pôr fim a diafanização em xilol PA por 5 minutos para serem seladas com resina histológica.

Os protocolos de coloração de cada técnica realizada foram:

- **Azul de Toluidina:**

Coloração realizada com corante azul de toluidina por 40 segundos, lavadas em água corrente, e desidratadas mecanicamente em estufa 45°C por 1 hora, então diafanizadas e seladas.

Esta coloração é frequentemente utilizada para comprovação da diferenciação condrogênica de CTM, corando os proteoglicanos e glicosaminoglicanos em tom de lilás/roxo, sem distinção das proteínas, favorecendo a observação das lacunas ao redor dos condrócitos jovens.

- **Tricrômio de Mallory:**

Coloração realizada por fucsina ácida por 5 minutos, seguido pela solução de Mallory (azul de anilina, laranja G e ácido fosfotungstico) por 20 minutos, seguido por uma lavagem em água corrente por 2 minutos.

Esta coloração é utilizada para tecido conjuntivo, onde pode-se observar núcleos e cartilagem em tom avermelhado, fibrilas de colágeno em azul e fibras elásticas em tom rosa pálido-amarelo.

- **Tricrômio de Masson (com azul de anilina):**

Esta coloração foi realizada com o uso do kit de coloração HistoKit EasyPath (EasyPath, Indaiatuba, SP/BR), que conta com 5 reagentes.

A coloração começa pela junção dos reagentes A e B, ambas hematoxilinas férricas de Weigert, por 10 minutos. Após uma lavagem em água corrente, as lâminas foram então

coradas com Fucsina (reagente C) por 4 minutos, lavadas novamente com água e coradas com ácido fosfomolibdico (reagente D) por 5 minutos, e por fim coradas com azul de anilina (reagente E) por 5 minutos.

Esta coloração é utilizada para tecido conjuntivo, onde pode-se observar o colágeno total corado em azul, as células em tom avermelhado e os núcleos em preto.

- **Picrosirius Hematoxilina:**

Coloração realizada com a solução de Picrosirius hematoxilina diluída em ácido pícrico por 10 minutos, submetida a uma lavagem em água corrente e então coradas com hematoxilina por 5 minutos.

Esta coloração permite a observação de colágeno tipo I e III, por meio de luz polarizada, sendo o colágeno I de tom vermelho-alaranjado e o III de tom esverdeado.

4.4.3. Quantificações Histológicas

As quantificações histológicas foram realizadas a partir das imagens das lâminas histológicas, todas em aumento de 400x.

As colorações com Tricrômio de Masson e imunohistoquímicas foram fotografadas com auxílio do microscópio óptico Nikon Eclipse Ni-E (Nikon™, Minato, Tóquio, Japão), e a coloração com Picrosirius-Hematoxilina no microscópio óptico Axio Scope.Z1, sob luz polarizada (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

A deposição do colágeno total, colágeno específico (I e III), por citoquímica e de Colágeno II e Agrecano, por imunohistoquímica, foram quantificadas pelo programa Image Pro-Plus 5.1 (Media Cybernetics, Rockville, EUA), onde, a partir da seleção de cores correspondente às proteínas avaliadas em cada método de coloração, obtinha-se a porcentagem de deposição colágena, em relação à área da micromassa em μm^2 (Tricrômio

de Masson, Colágeno II e Agrecano) e a porcentagem dos tipos colágenos (Picrosirius Hematoxilina – colágeno I ou III) em relação exclusiva aos seus tipos na micromassa.

4.4.4. Avaliação do Colágeno II e Agrecano

Para a comprovação da indução à diferenciação condrogênica os grupos também passaram pelo processo de imunohistoquímica, um método de localização de antígenos com base no princípio da ligação específica de anticorpos. Os antígenos utilizados para marcação foram: o colágeno tipo II e Agrecano.

Para avaliação do colágeno tipo II e Agrecano, os cortes histológicos de cada micromassa foram colocados em lâminas eletricamente carregadas. Resumidamente, as lâminas foram imersas em xilol, duas vezes por 10 minutos, três vezes em álcool etílico por 1 minuto, uma vez em álcool etílico 80% por 1 minuto para desparafinizar o material. Em seguida, para fazer o bloqueio da enzima peroxidase endógena, as lâminas foram mergulhadas em Imuno Retrifer (Bio SD, Goleta, Califórnia, EUA) (pH 6/9), para recuperação antigênica, em cuba de banho-maria à 99 °C, por 25 minutos e resfriadas em temperatura ambiente. As lâminas então foram lavadas em água destilada, e após secar os cortes, estes foram contornados com caneta hidrofóbica. Depois de diluídos, os anticorpos – com o pH 6, na diluição de 1:200, para o Agrecano (BD Pharmingen, Nova Jersey, EUA); e pH 9, na diluição 1:200, para o Colágeno tipo II (BD Pharmingen, Nova Jersey, EUA) – foram adicionados às amostras e as lâminas incubadas em câmara úmida entre 2°C e 8°C em geladeira, overnight. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com tampão TBS Tris (pH 7.3), para que fosse aplicado o reagente Spring Reveal Complement™ (Spring Bio Solution, Piscataway, Nova Jersey, EUA) sob as amostras, as quais foram incubadas, em temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com TBS Tris

(pH 7.3) e, sob elas aplicado o Spring Reveal Conjugate™ (Spring Bio Solution, Piscataway, Nova Jersey, EUA), e incubadas por 15 minutos.

As lâminas foram lavadas novamente com tampão, e foi adicionado o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB - Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) (1:1) até visualização da cor castanha. As células foram contracoradas com Hematoxilina de Harris, por 5 minutos. Então iniciou-se a desidratação com três lavagens de álcool etílico absoluto por 1 minuto e a diafanização com xilol por três vezes de 5 minutos, então as lâminas foram seladas com resina histológica (Histolan™) (Fig. 9).

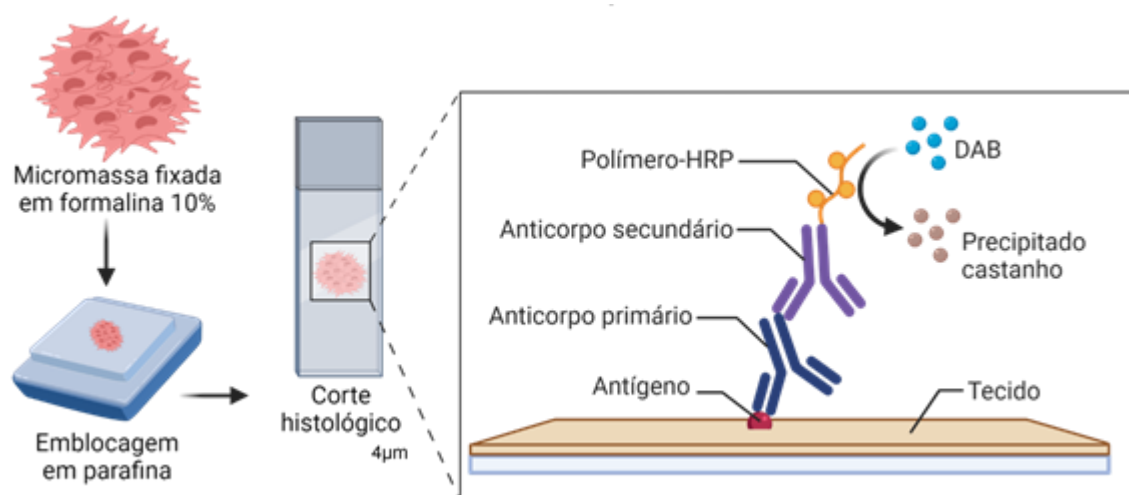


Figura 9. Processo de preparo imunohistoquímico das amostras. DAB: cromógeno 3,3'-diaminobenzidina; HRP: horseradish peroxidase. Criado pela autora com BioRender.

4.4.5. Quantificação de Sox9 Solúvel

O sobrenadante dos cultivos foi coletado no 21º dia da diferenciação condrogênica, para avaliação dos fatores produzidos e secretados pelas células. As dosagens foram realizadas por Leitora de Microplaca (ELISA), por espectrofotometria, através do Kit Human Sox9 ELISA (Sigma-Aldrich San Louis, Missouri, EUA), uma vez que a Sox9 é considerada essencial para a diferenciação de condrócitos e formação de cartilagem.

Antes de iniciar o procedimento, foi realizado um *pool* do sobrenadante de cada grupo, e então essas amostras foram concentradas com auxílio do filtro de centrífuga

Amicon™ Ultra 15 mL (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA). O procedimento da espectrofotometria foi realizado por ensaio sanduíche, conforme figura 10, seguindo o protocolo disponibilizado pelo kit. Resumidamente, 100 µl do sobrenadante das amostras e do controle foi adicionado em triplicata na placa de 96 poços, já tratada com anticorpo, e incubado por 2,5 horas sob agitação suave. Em seguida, após a inversão da placa, foram realizadas quatro lavagens com 300 µl de solução tampão de lavagem e após a última lavagem, removeu-se completamente a solução e a placa foi invertida novamente contra toalhas de papel limpas. Em seguida foi adicionado 100 µl de anticorpo Sox9 a cada poço, incubado por 1 hora em TA (temperatura ambiente) sob agitação suave. O processo de lavagem com solução tampão foi repetido, então adicionado 100 µl da solução de estreptavidina-HRP (do inglês *horseadish peroxidase*) preparada a cada poço e incubado novamente, por 45 minutos em TA com agitação suave. Após outro processo de lavagem com solução tampão, foi então adicionado 100 µl de reagente de substrato a cada poço e incubado por 30 minutos à TA no escuro com agitação suave. Por fim, para a análise, foi adicionado 50 µl de solução de parada a cada poço e a placa foi analisada na leitora de microplaca VersaMax™ (Molecular Devices, San José, Califórnia, EUA) na absorbância de 450 nm.

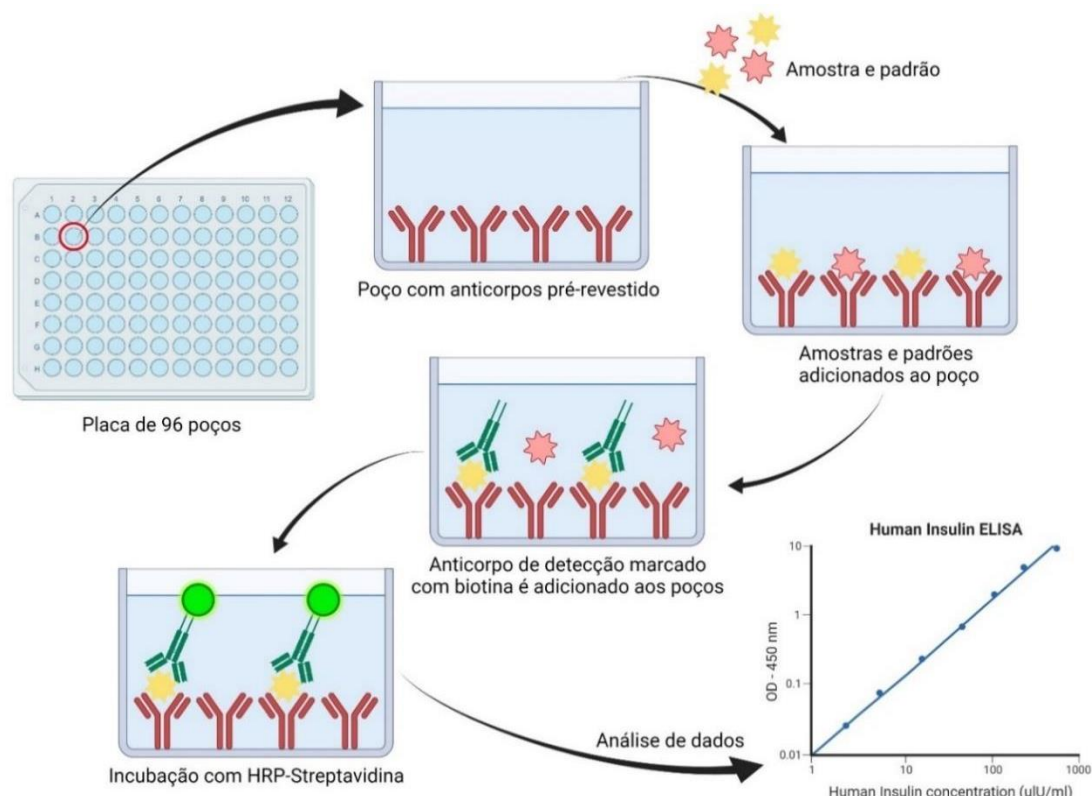


Figura 10. Representação esquematizada do processo de ensaio de sandwich para a espectrofotometria do kit Human Sox9 ELISA. Criado pela autora com BioRender.

4.4.6. Análises Estatísticas

Para dados não paramétricos, os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva e estão demonstrados em porcentagem (%). Para a análise estatística dos dados foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, em seguida utilizado o teste de Kruskal-Wallis/Mann-Witney.

Para os marcadores de superfície utilizados pré e pós diferenciação condrogênica, quantificação das colorações histológicas e quantificação do Sox9 solúvel, todos os valores obtidos a partir das análises realizadas foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão, para cada fonte de CTM do estudo. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism versão 9 para Windows (GraphPad, La Jolla, EUA). Os resultados foram considerados significativos com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CTM

Foram isoladas CTM de quatro fontes: CTM-MO (Fig. 11 – A), CTM-TCU (Fig. 11 – B), DPSC (Fig. 11 – C), CTDA (Fig. 11 - D). As células isoladas de cada grupo, foram cultivadas até a quarta/quinta passagem, para que pudessem ser induzidas à diferenciação condrogênica.

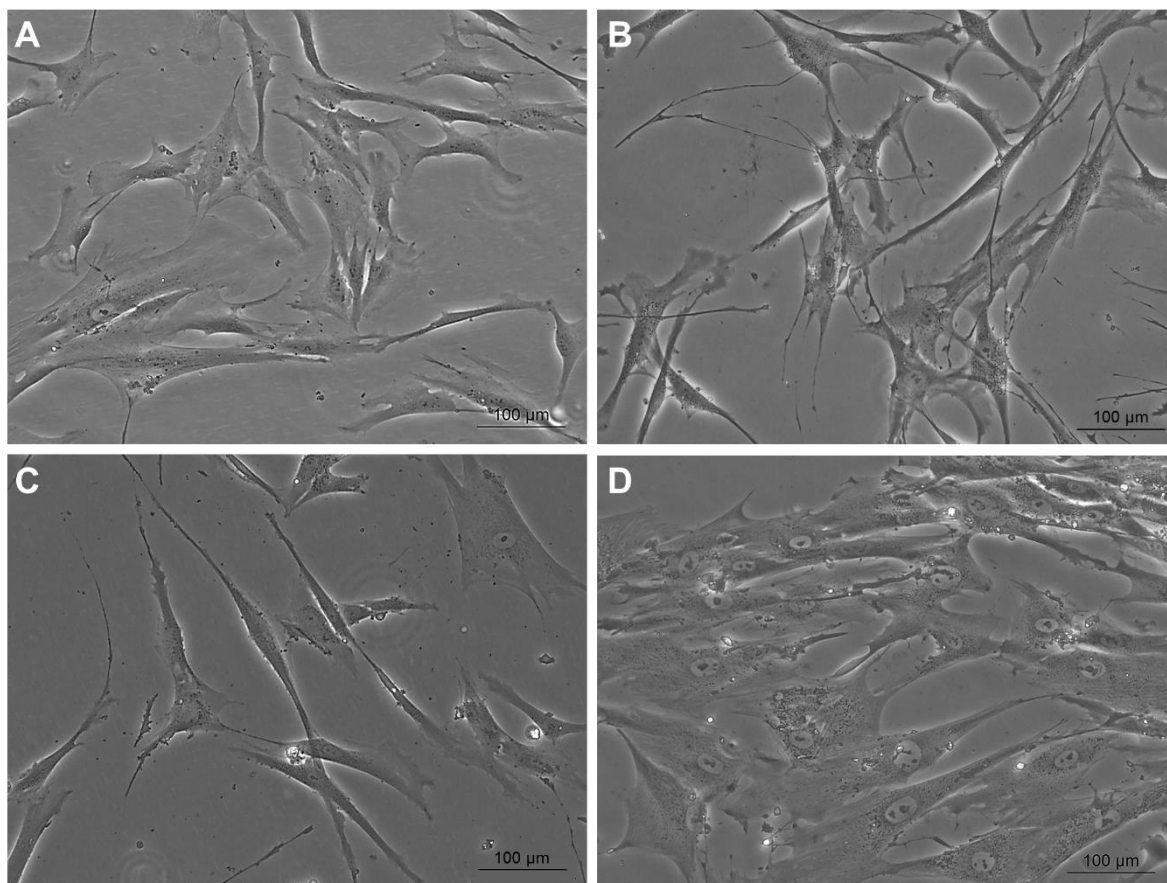


Figura 11. Morfologia das células estromais mesenquimais. (A): CTM-MO; (B): CTM-TCU; (C): DPSC; (D): CTDA. Aumento:200x. Barra: 100µm. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical.

As amostras de todas as fontes de CTM apresentaram morfologia fibroblastóide, além da adesão ao plástico, sendo essas características definidas pela ISCT para a caracterização das CTM ⁷.

5.2. CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS FONTES DE CTM

As amostras de CTM obtidas foram caracterizadas por imunofenotipagem a fim de garantir que as células utilizadas no estudo estivessem de acordo com os critérios mínimos definidos pela ISCT para células estromais mesenquimais ⁷.

A caracterização imunofenotípica das CTM-MO, CTDA, CTM-TCU e DPSC mostrou que as células apresentaram uma expressão positiva (maior que 95%), para os marcadores CD29, CD73, CD90 e CD105 e expressão reduzida (menor que 2%) para os marcadores CD14, CD19, CD34, CD45, e HLA-DR. (Fig. 12).

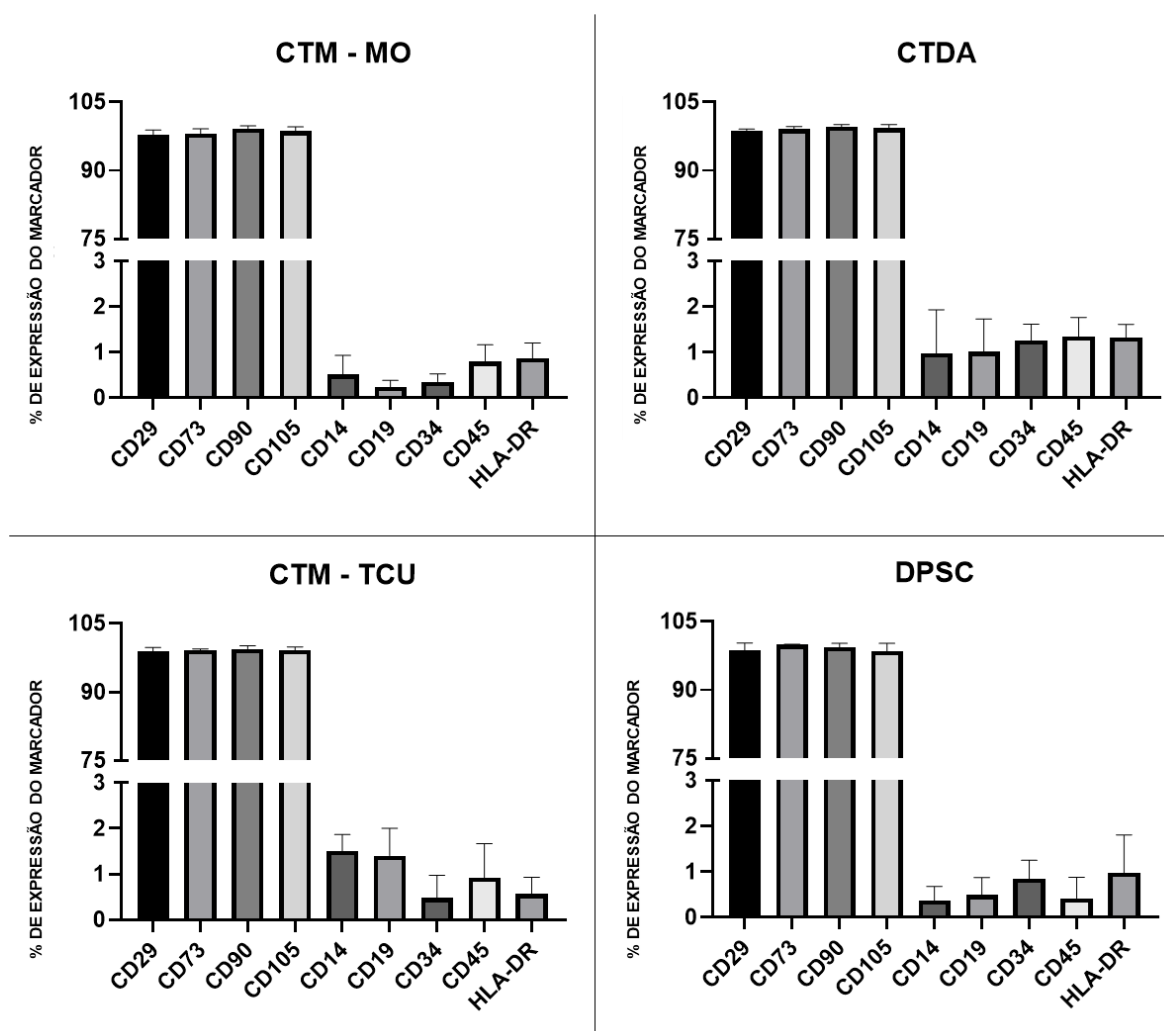


Figura 12. Expressão dos marcadores utilizados para caracterização das CTM, apresentado em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão, nos quatro grupos do estudo: DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical.

Segundo Dominici e colaboradores ⁷, essas expressões estão dentro dos padrões definidos pela ISCT. O CD29, um marcador não utilizado como padrão, mas também considerado um marcador de CTM, apresentou expressão positiva nas quatro fontes estudadas. Este perfil imunofenotípico para CD29 também foi observado em outros estudos 97-99.

5.3. EXPRESSÃO DE MARCADORES CONDROPROGENITORES - PRÉ-INDUÇÃO À CONDRÓGENESE

Para caracterizar as amostra pré-indução a diferenciação foram utilizados marcadores específicos, considerados condroprogenitores, que participam de alguma forma na via de diferenciação condrogênica. As amostras de CTM de todas as fontes utilizadas foram positivas para os marcadores CD44, CD49c, CD151, e apresentaram uma expressão reduzida para a condroitina (Fig. 13).

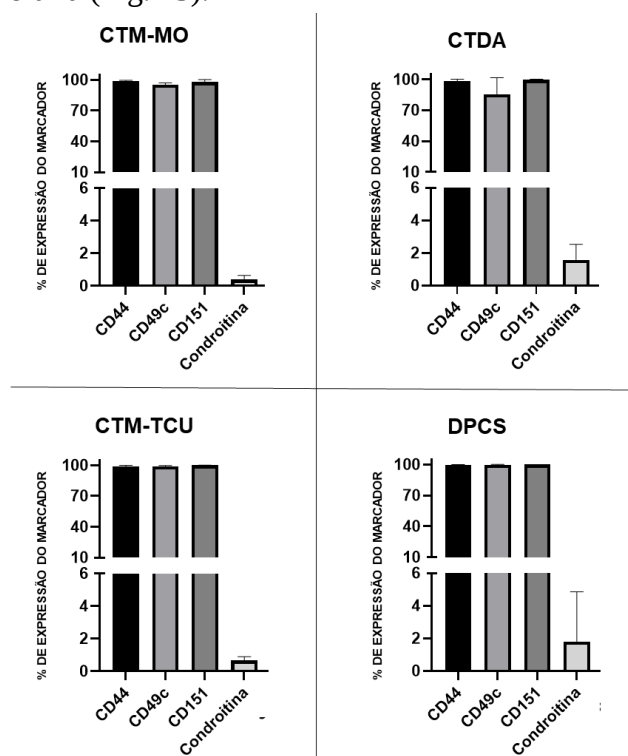


Figura 13. Expressão dos marcadores condroprogenitores utilizados na CTM, apresentado em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão, nos quatro grupos do estudo: DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical.

Esses marcadores utilizados são considerados condroprogenitores, pois possuem papéis de ativação da via de diferenciação condrogênica, como mostraram os estudos de Brito ⁹⁹, Ponta ¹⁰⁰ e colaboradores. Sendo o CD44, um receptor de ácido hialurônico; o CD49c, atuando na organização estrutural da matriz extracelular; o CD151 regulando o tráfego e/ou função da interação da família TGF; e a Condroitina ou Sulfato de Condroitina, que desempenha a estruturação e resistência da matriz cartilaginosa.

A menor expressão de condroitina pode estar associada ao fato de ser uma proteína responsável pela estruturação de resistência às compressões do tecido cartilaginoso já com uma matriz extracelular estruturada, como descrito por Aisenbrey e colaboradores ¹⁰¹.

Já para as células condroprogenitoras utilizadas como controle positivo, também cultivadas em micromassa, foi observada a expressão positiva para os marcadores CD44, CD49c e CD151 e expressão reduzida para condroitina (Fig. 14).

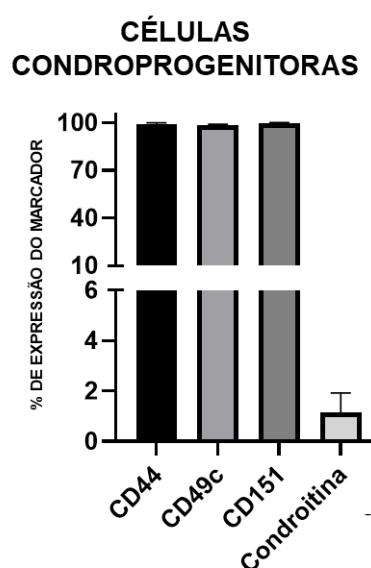


Figura 14. Expressão dos marcadores condroprogenitores nas células condroprogenitoras, utilizados como controle positivo, apresentado em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão.

A expressão dos marcadores positivos é esperada nas células condroprogenitoras, utilizadas como controle positivo, e corrobora com o observado por Nicoll ¹⁰² e Knudson ¹⁰³ e colaboradores, o que faz desses marcadores serem conhecidos como marcadores

condroprogenitores. A baixa expressão de condroitina, como já descrito por Aisenbrey e colaboradores ¹⁰¹, pode também estar associada à sua característica de estruturação e resistência do tecido cartilaginoso às compressões, o que sugere que nossos controles ainda permaneciam em uma fase inicial da condrogênese.

5.4. EXPRESSÃO DE MARCADORES CONDROPROGENITORES – PÓS-INDUÇÃO À CONDRÓGÊNESE

Os mesmos marcadores pré-indução à condrogênese, considerados condroprogenitores pois participam de alguma forma na via de diferenciação condrogênica, foram utilizados na caracterização das amostras pós-indução à condrogênese (CD44, CD49c, CD105, CD151 e Condroitina) por citometria de fluxo.

5.4.1. Marcador CD105

O CD105 é um marcador de membrana conhecido para caracterização das CTM, expresso em altos níveis em células humanas. Lee e colaboradores ¹⁰⁴ após o procedimento da indução à diferenciação condrogênica, observaram que a expressão desse marcador diminuía. Porém no presente estudo, a análise por citometria de fluxo não apresentou diferença estatística significativa entre o controle (micromassa cultivada com IMDM e 15% de SBF) e a diferenciação (micromassa cultivada com meio específico para diferenciação condrogênica) nos grupos analisados (Fig. 15 – A).

Analisando apenas as células diferenciadas dos grupos observamos também, que estatisticamente não houve diferença significativa entre eles (Fig. 15 – B). (Valores de *p* – apêndice 1).

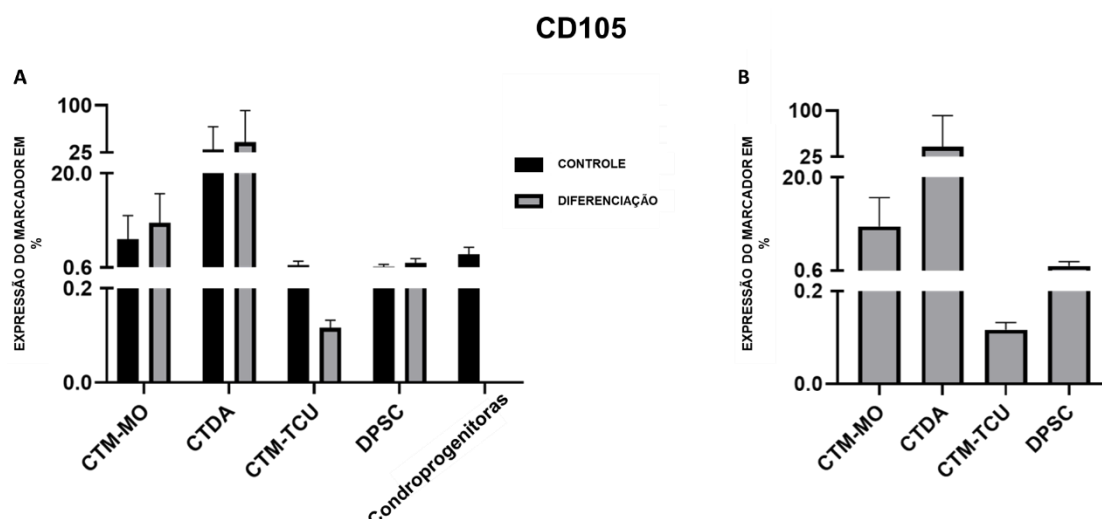


Figura 15. Expressão do marcador de membrana CD105. (A): relação da expressão do marcador entre os grupos controle e diferenciação, das DPSC, CTDA, CTM-TCU, CTM- MO e células Condroprogenitoras (B): expressão do marcador apenas no grupo diferenciação, das DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO. Todos os resultados estão apresentados em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão. Grupo Controle: células cultivadas com meio de cultivo + 15% de SBF. Grupo Diferenciação: Células cultivadas com meio específico para diferenciação condrogênica. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical.

5.4.2. Marcador CD44

O marcador de membrana CD44 é um receptor de ácido hialurônico, conhecido também por ser um receptor de fatores de crescimento, sendo expresso em altos níveis em células humanas. O estudo de Lee e colaboradores ¹⁰⁴, apresentou uma diminuição da expressão após a diferenciação condrogênica. No presente estudo, a análise por citometria de fluxo desse marcador não apresentou diferença estatística significativa entre o controle (micromassa cultivada com IMDM e 15% de SBF) e a diferenciação (micromassa cultivada com meio específico para diferenciação condrogênica) dos grupos analisados (Fig. 16 – A) possivelmente devido a variabilidade das amostras.

Analizando exclusivamente as células diferenciadas de cada grupo, podemos observar também que não houve diferença estatística significativa entre eles (Fig. 16 – B). (Valores de p – apêndice 1).

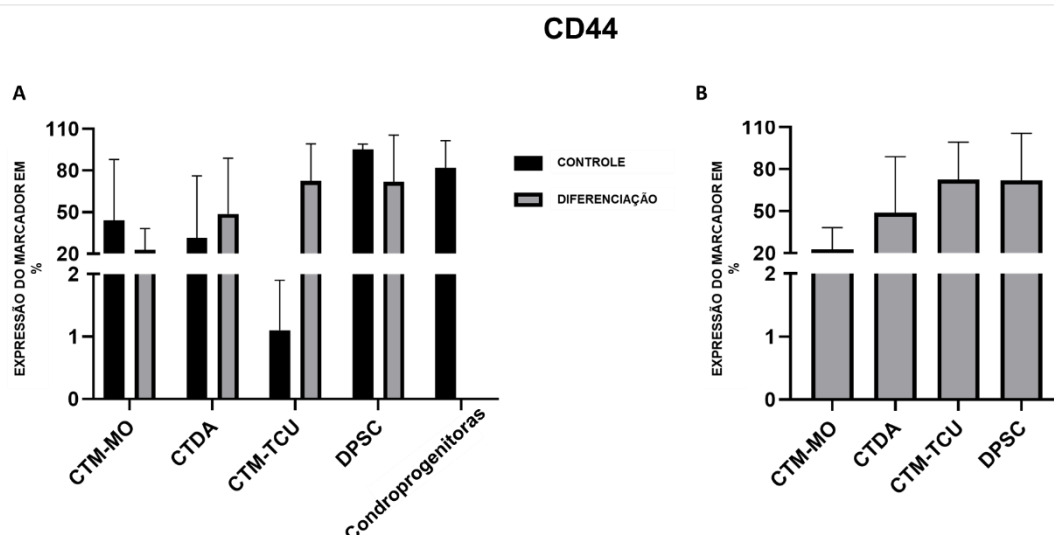


Figura 16. Expressão do marcador de membrana CD44. (A): relação da expressão do marcador entre os grupos controle e diferenciação, das DPSC, CTDA, CTM-TCU, CTM- MO e células Condroprogenitoras. (B): expressão do marcador apenas no grupo diferenciação, das DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO. Todos os resultados estão apresentados em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão. Grupo Controle: células cultivadas com meio de cultivo + 15% de SBF. Grupo Diferenciação: Células cultivadas com meio específico para diferenciação condrogênica. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical.

5.4.3. Marcador CD49c

O marcador de membrana CD49c, presente na interação célula-célula e na organização estrutural da matriz extracelular, é altamente expresso em células humanas. Lee e colaboradores ¹⁰⁴ apresentaram uma menor expressão desse marcador após a diferenciação condrogênica. No presente estudo, após a análise por citometria de fluxo, não foi encontrada diferença estatística significativa entre o controle (micromassa cultivada com IMDM e 15% de SBF) e a diferenciação (micromassa cultivada com meio específico para diferenciação condrogênica) dos grupos analisados, possivelmente devido a variabilidade das amostras (Fig. 17 – A).

Analisando exclusivamente as células diferenciadas dos grupos, estatisticamente também não houve diferença significativa entre eles (Fig. 17 – B). (Valores de *p* – apêndice 1).

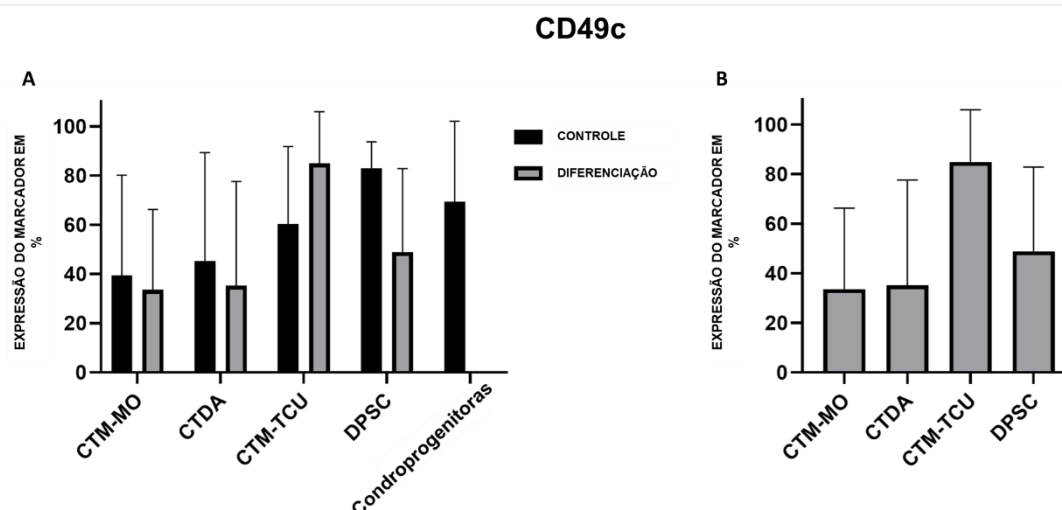


Figura 17. Expressão do marcador de membrana CD49c. (A): expressão nos grupos controle e diferenciação, dos cinco grupos do estudo (DPSC, CTDA, CTM-TCU, CTM- MO e Condroprogenitoras). (B): expressão apenas no grupo diferenciação, dos quatro grupos do estudo (DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO) Todos os resultados estão apresentados em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão. Grupo Controle: células cultivadas com meio de cultivo + 15% de SBF. Grupo Diferenciação: Células cultivadas com meio específico para diferenciação condrogênica. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical.

5.4.4. Marcador CD151

O marcador de membrana CD151, responsável pela regulação do desenvolvimento e adesão celular, além de regular o tráfego e/ou função da integrina responsável pela interação da família TGF, é altamente expresso em células humanas. A análise por citometria de fluxo, no presente estudo, não apresentou diferença estatística significativa entre o controle (micromassa cultivada com IMDM e 15% de SBF) e a diferenciação (micromassa cultivada com meio específico para diferenciação condrogênica) dos grupos analisados possivelmente devido a variabilidade das amostras (Fig. 18 – A).

Analisando exclusivamente as células diferenciadas dos grupos, não observamos diferença estatística significativa entre eles (Fig. 18 – B). (Valores de p – apêndice 1).

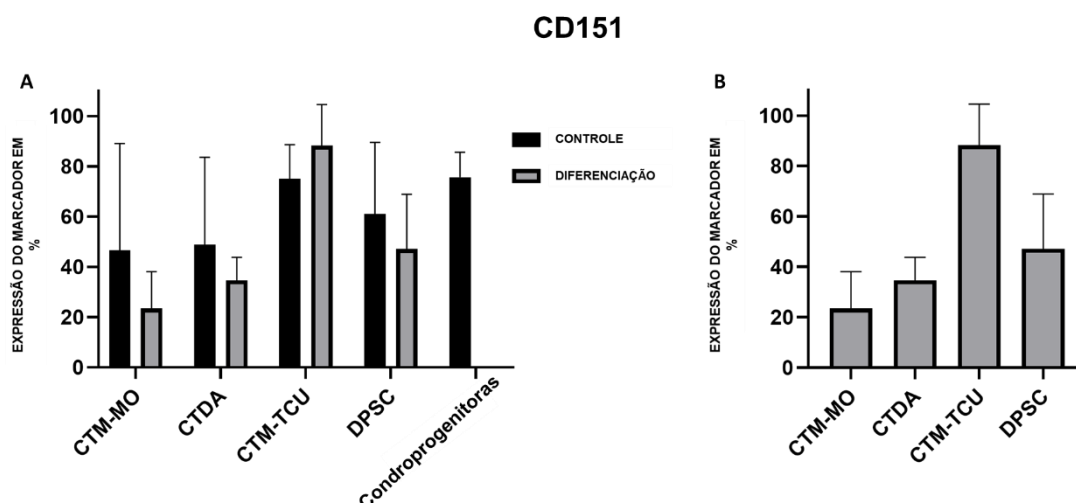


Figura 18. Expressão do marcador de membrana CD151. (A): expressão nos grupos controle e diferenciação, dos cinco grupos do estudo (DPSC, CTDA, CTM-TCU, CTM- MO e Condroprogenitoras). (B): expressão apenas no grupo diferenciação, dos quatro grupos do estudo (DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO) Todos os resultados estão apresentados em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão. Grupo Controle: células cultivadas com meio de cultivo + 15% de SBF. Grupo Diferenciação: Células cultivadas com meio específico para diferenciação condrogênica. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical.

5.4.5. Marcador Sulfato de Condroitina

O sulfato de condroitina é uma proteína que atua na hidratação da matriz cartilaginosa, proporcionando sua propriedade viscoelástica. A análise realizada por citometria de fluxo não apresentou diferença estatística significativa entre o controle e a diferenciação entre os grupos. Houve uma variabilidade entre as amostras na expressão deste marcador (Fig. 19 – A).

Analisando exclusivamente as células diferenciadas dos grupos, estatisticamente não houve diferença significativa entre eles (Fig. 19 – B). (Valores de p – apêndice 1).

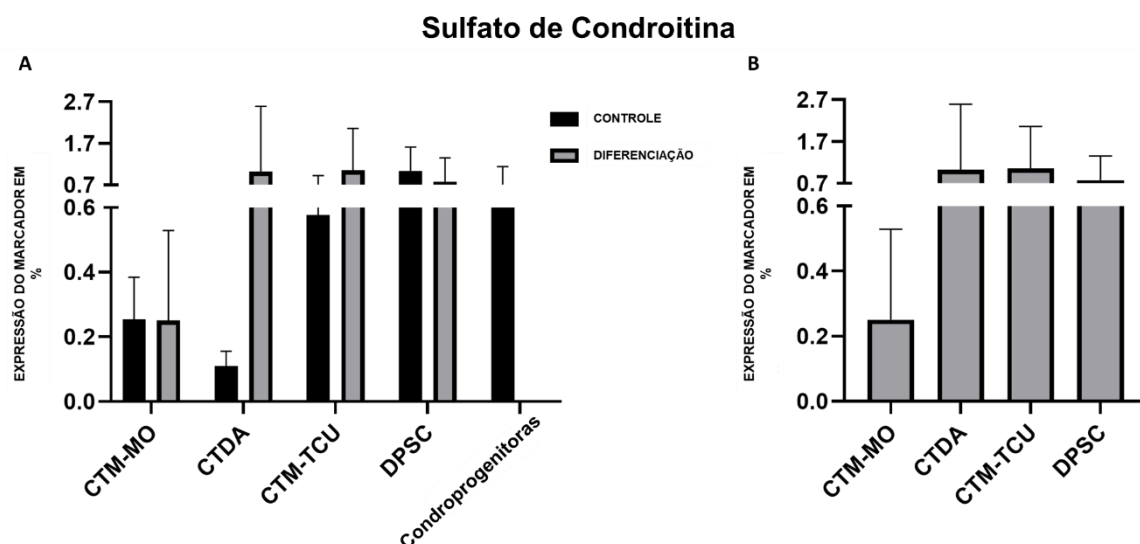


Figura 19. Expressão do marcador de membrana Sulfato de Condroitina. (A): expressão nos grupos controle e diferenciação, dos cinco grupos do estudo (DPSC, CTDA, CTM-TCU, CTM- MO e Condroprogenitoras). (B): expressão apenas no grupo diferenciação, dos quatro grupos do estudo (DPSC, CTDA, CTM-TCU e CTM- MO). Todos os resultados estão apresentados em porcentagens e média $\pm$ desvio padrão. Grupo Controle: células cultivadas com meio de cultivo + 15% de SBF. Grupo Diferenciação: Células cultivadas com meio específico para diferenciação condrogênica. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas de Medula Óssea; CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical.

5.5. COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÕES

Após os 21 dias de indução à diferenciação condrogênica com meio específico, sem SBF, suplementado com TGF- β 3, as amostras foram observadas após as seguintes colorações histológicas: Azul de Toluidina, Tricrômio de Mallory, Tricrômio de Masson e Picrosirius Hematoxilina.

5.5.1. Azul de Toluidina

A coloração de azul de Toluidina foi realizada por ser o método mais utilizado pelos estudos envolvendo CTM para a comprovação da indução da diferenciação condrogênica

79, 105-109.

Foi possível observar as lacunas ao redor das células diferenciadas, corados em tons de azul, quando comparado os controles e as diferenciações, sendo as lacunas mais evidentes no grupo CTM-TCU (Fig. 20).

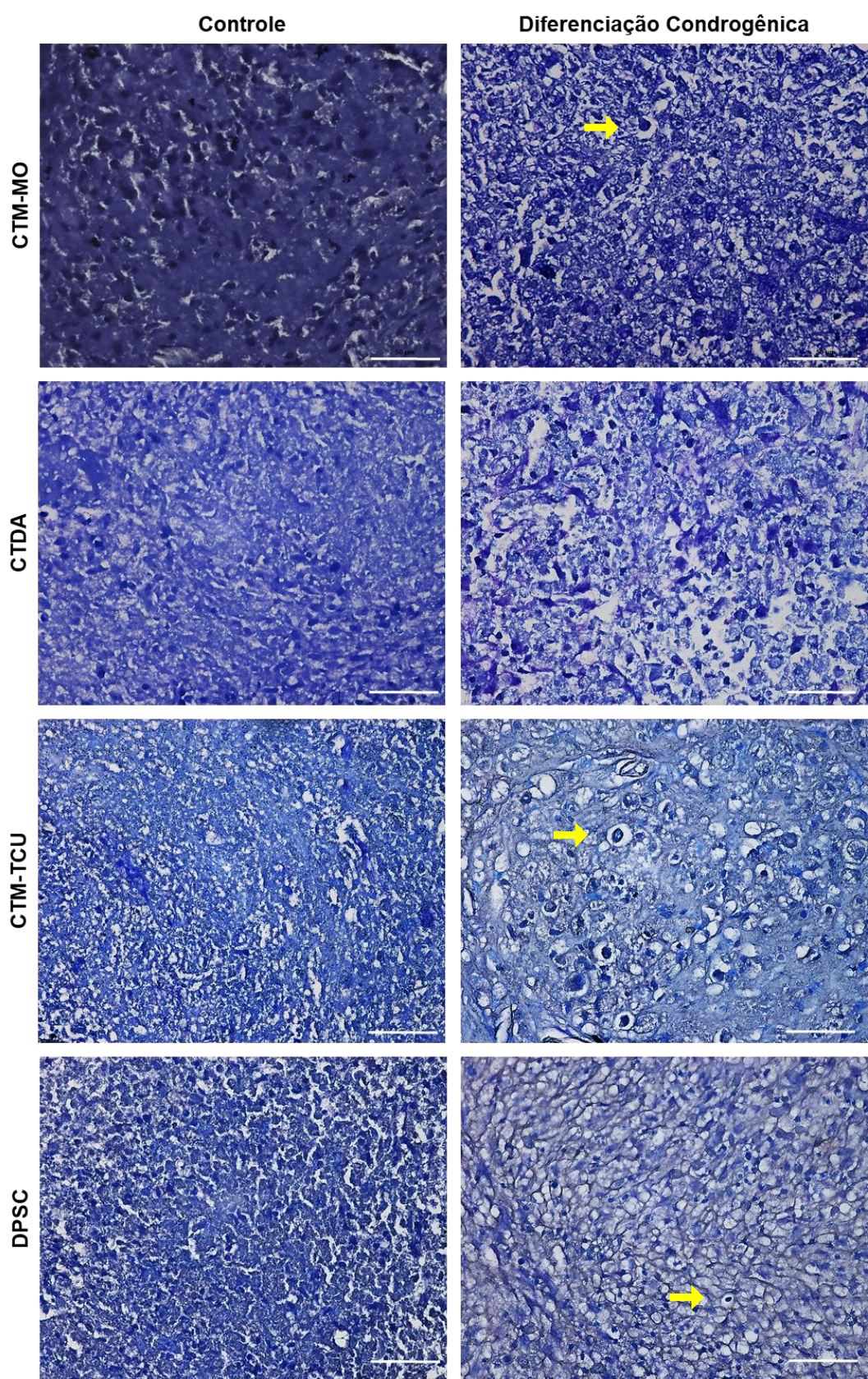


Figura 20. Amostras de CTM coradas com Azul de Toluidina após a diferenciação condrogênica. As setas amarelas indicam as células diferenciadas nas lacunas. Imagens representativas de cada grupo do estudo. Controles e diferenciação condrogênica. A seta amarela mostra os condrócitos jovens dentro das lacunas. Todas as imagens em aumento de 400x. CTM-MO: CTM derivadas da Medula Óssea. CTDA: CTM derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: CTM derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: CTM derivadas de Polpa de Dente.

A avaliação da diferenciação condrogênica utilizando esta coloração é subjetiva. Segundo Bergholt ¹¹⁰, Vidal ¹¹¹ e colaboradores, essa coloração é considerada padrão e informativa, além de ser uma técnica que precisa ser realizada com precisão e controle, principalmente do pH, para que se possa ver os proteoglicanos em tons de roxo. Neste estudo, mesmo realizando a técnica com todos os critérios para que se pudesse obter um resultado íntegro, foi observado nas amostras uma coloração azulada em todas as amostras, sendo possível apenas a observação das lacunas ao redor das células diferenciadas, deixando clara a subjetividade e a variabilidade da técnica.

A avaliação quantitativa não foi realizada pela semelhança das cores, sendo a intensidade dos tons de azul/lilás uma variável que dificulta a especificidade do programa de quantificação utilizado.

5.5.2. Tricrômio de Mallory

A coloração de Tricrômio de Mallory foi utilizada com fim de observar as fibrilas de colágeno em tom de azul. Utilizando esta coloração, pôde-se observar a deposição de colágeno, após a indução da diferenciação condrogênica, em todas as fontes de CTM, assim como as lacunas ao redor das células diferenciadas, quando comparadas com seus respectivos controles. Comparando todas as fontes podemos observar uma deposição colágena em todos os grupos (Fig. 21).

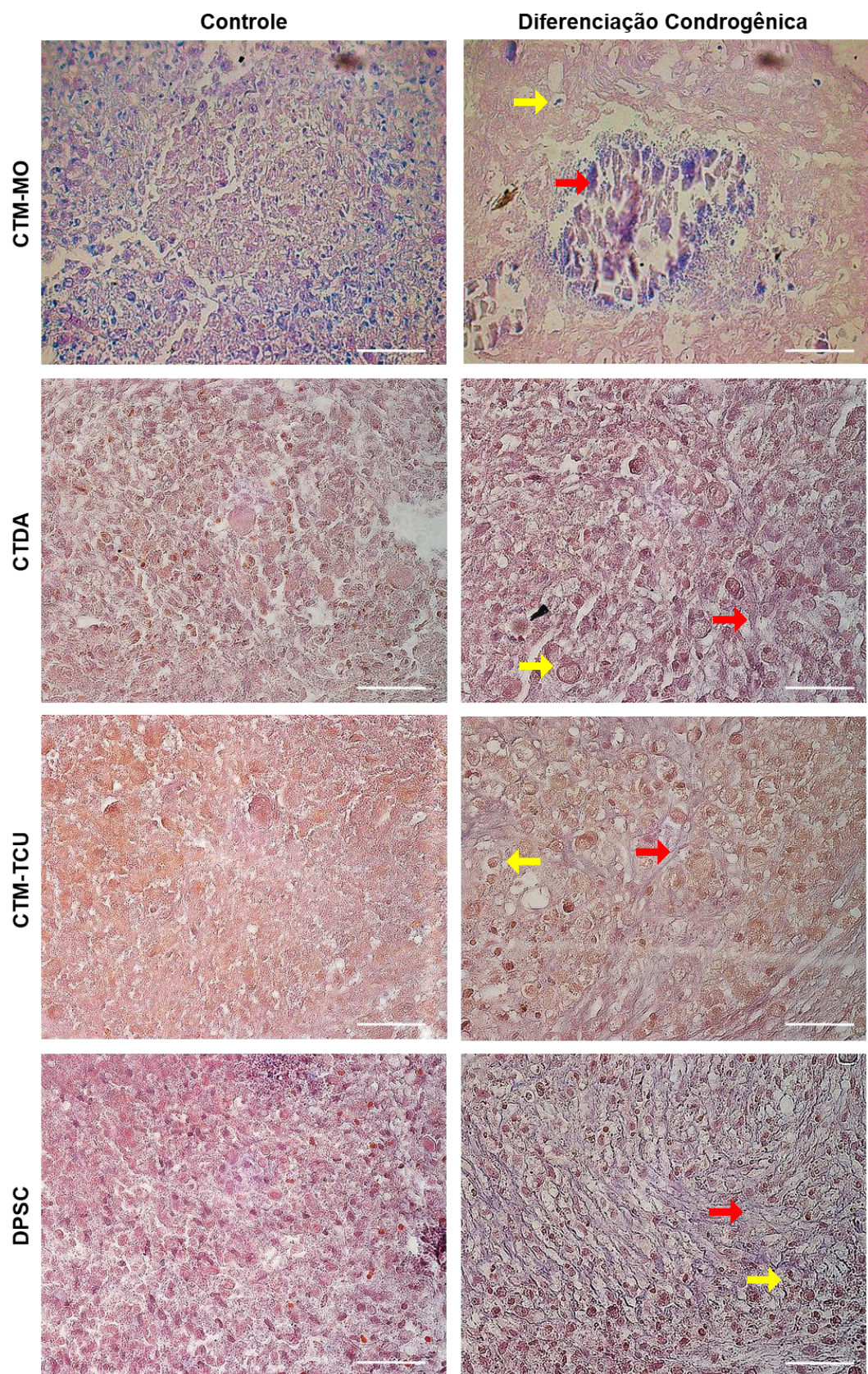


Figura 21. Amostras de CTM coradas com Tricrômio de Mallory após a diferenciação condrogênica. As setas amarelas indicam as células diferenciadas nas lacunas e as setas vermelhas indicam as deposições colágenas. Imagens representativas de cada grupo do estudo. Controles e diferenciação condrogênica. Todas as imagens em aumento de 400x. CTM-MO: CTM derivadas da Medula Óssea. CTDA: CTM derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: CTM derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: CTM derivadas de Polpa de Dente. (CTM: Célula Estromal Mesenquimal).

Por ser uma coloração não aplicada para a avaliação da diferenciação condrogênica de CTM, não se têm informações sobre sua relação com a indução à condrogênese, porém o Tricrômio de Mallory é uma coloração altamente utilizada para análise de fibroses e a deposição colágena em diversos tipos de tecidos, como especificado por Elrashidy e colaboradores ¹¹². Qualitativamente mostrou ser uma coloração informativa, deixando a deposição colágena em tons de roxo/lilás, porém quantitativamente não foi possível realizar a análise de deposição colágena por conta dos tons muito próximos entre células e fibras de colágeno, a mesma dificuldade encontrada na coloração em Azul de Toluidina.

5.5.3. Tricrômio de Masson com Azul de Anilina

Após a coloração em Tricrômio de Masson com azul de anilina, foi possível observar o colágeno total depositado após a indução à diferenciação condrogênica, em tom azulado, juntamente com as células em tom avermelhado. Houve deposição colágena, quando comparando com os controles, em todos os grupos do estudo (Fig. 22).

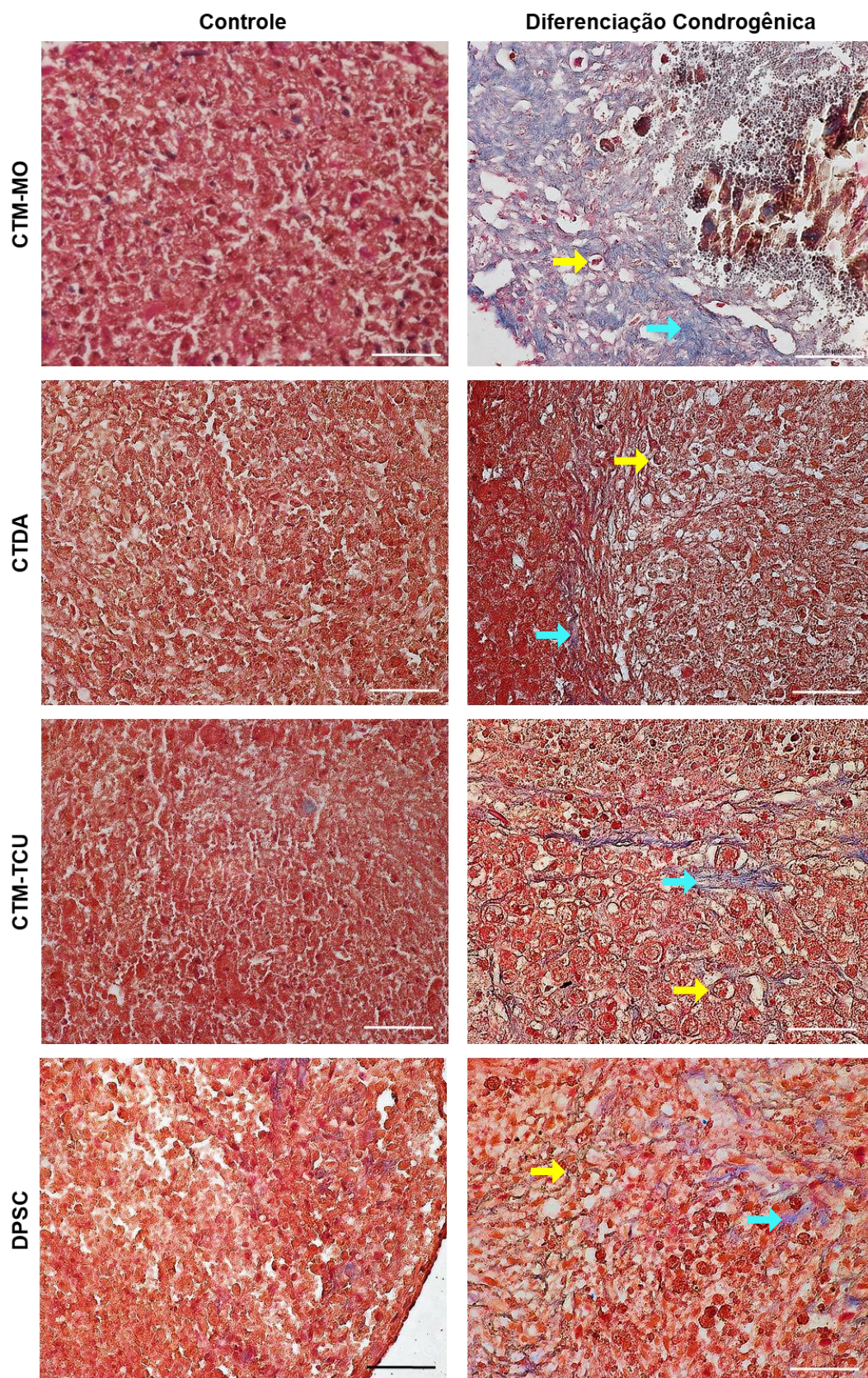


Figura 22. Amostras de CTM coradas com Tricrômio de Masson após a diferenciação condrogênica. As setas amarelas indicam as células diferenciadas nas lacunas e as setas azuis claras indicam as fibras colágenas. Imagens representativas de cada grupo do estudo. Controles e diferenciação condrogênica. Todas as imagens em aumento de 400x. CTM-MO: CTM derivadas da Medula Óssea. CTDA: CTM derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: CTM derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: CTM derivadas de Polpa de Dente. (CTM: Célula Estromal Mesenquimal)

Como o Tricrômio de Mallory, o Tricrômio de Masson também não é uma coloração aplicada para a avaliação da diferenciação condrogênica de CTM, por isso não se têm referencias para fim de comprovação da diferenciação condrogênica utilizando a histologia. Heirani-Tabasi e colaboradores ¹¹³, porém demonstraram que essa coloração amplamente é utilizada para análises em tecidos cartilagosos na pesquisa e na clínica. No presente estudo, o Tricrômio de Masson mostrou-se altamente informativo, apresentando grande potencial para avaliações quantitativas de deposição colágena, uma vez que os tons dessa coloração são distintos.

Após a quantificação da coloração em Tricrômio de Masson, foi possível observar uma maior deposição de colágeno nas CTM-MO induzidas a diferenciação. Observou-se também uma diferença significativa entre os grupos CTDA x CTM-MO ($p < 0,0001$); DPSC x CTDA ($p < 0,0001$); CTM-TCU x CTDA ($p < 0,0001$); CTM-TCU x CTM-MO ($p = 0,0001$); DPSC x CTM-MO ($p = 0,0003$). Não houve diferença significativa entre os grupos DPSC x CTM-TCU ($p = 0,2887$). (Gráfico 1).

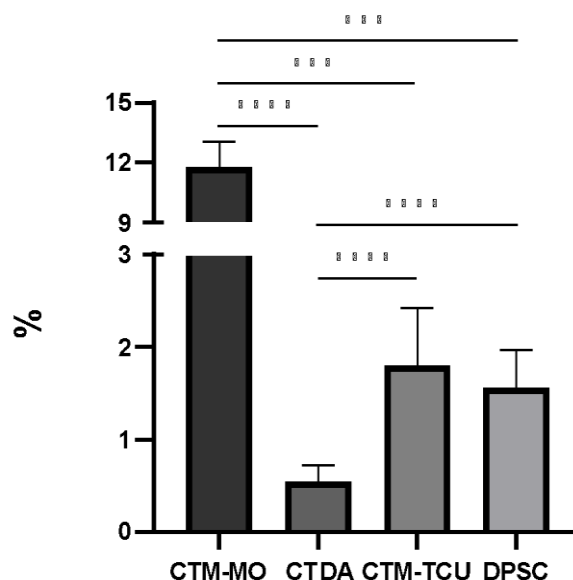


Gráfico 1. Quantificação da deposição colágena, quanto a média $\pm$ desvio padrão. A diferença significativa CTDA vs CTM-MO (**** $p < 0,0001$); DPSC vs CTDA ($p < 0,0001$); CTM-TCU vs CTDA ($p < 0,0001$); CTM-TCU vs CTM-MO (*** $p = 0,0001$); DPSC vs CTM-MO ($p = 0,0003$). Não havendo diferença significativa entre os grupos DPSC vs CTM-TCU ($p = 0,2887$).

A diferenciação condrogênica está intimamente associada à especialização das CTM, sendo que, fontes consideradas mais imaturas demonstram um maior potencial de condrogênese ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Neste estudo duas fontes são consideradas imaturas: a polpa de dente permanente isolada de terceiros molares e o tecido de cordão umbilical ^{115, 116}. Depois da medula óssea, essas duas fontes foram as que mais apresentaram maior deposição colágena.

O potencial de diferenciação condrogênica das células estromais derivadas da medula óssea já foi estudado a partir de outras técnicas de avaliação. Bernardo e colaboradores ¹⁰⁵ demonstraram, quando comparando CTM derivadas da medula óssea com CTM derivadas da placenta e fígado, um maior potencial dessa via de diferenciação nas CTM-MO, acreditando-se que essa vantagem seja dada por conta de alterações funcionais nas células. Sekiya e colaboradores ¹¹⁷ também demonstraram que o potencial condrogênico das CTM-MO está relacionado às passagens das amostras, portanto, quanto maior a passagem, menor o potencial condrogênico dessas células.

A indução a diferenciação condrogênica das DPSC também foi explorada por Isobe e colaboradores ¹¹⁸, mostrando que apesar de demonstrarem a capacidade de condrogênese, são células que apresentam um potencial mais elevado para tecidos originados da ectoderme, sendo a mesma origem embrionária das DPSC ¹¹⁹.

Apesar de TCU ter apresentado uma menor deposição colágena, quando comparada com a MO, Wang e colaboradores ¹²⁰ demonstraram que as CTM-TCU apresentaram resultados mais atrativos que as CTM-MO, além disso demonstraram que as CTM-TCU ainda necessitam de um conjunto modificado de sinais, como uma maior concentração de suplemento da família TGF, por exemplo, para a condrogênese ideal.

O tecido adiposo foi o que menos apresentou deposição colágena. Mehlhorn e colaboradores ¹²¹ observaram que esse resultado pode dar-se pelo fato da indução a condrogênese mediada por TGF- β prosseguir mais lentamente ou de maneira menos efetiva

nas CTDA. Isso pelo fato de expressarem quantidades diminuídas de receptores para a superfamília TGF, ou até mesmo por exibirem um estado mais imaturo de precursores condrogênicos.

5.5.4. Picrosirius Hematoxilina

A coloração de Picrosirius Hematoxilina foi realizada com o objetivo de observar os tipos de colágenos produzidos após a indução à diferenciação condrogênica, sendo o colágeno tipo I de birrefringência laranja- amarelado a laranja e vermelha e o colágeno III de birrefringência verde ou verde-amarela, observados em microscópio óptico por meio de luz polarizada. A partir da comparação entre os grupos, pode-se observar a deposição dos colágenos tipo I e III em todos os grupos que foram induzidos a diferenciação condrogênica, porém com maior intensidade nos grupos CTM-MO e CTM-TCU (Fig. 23).

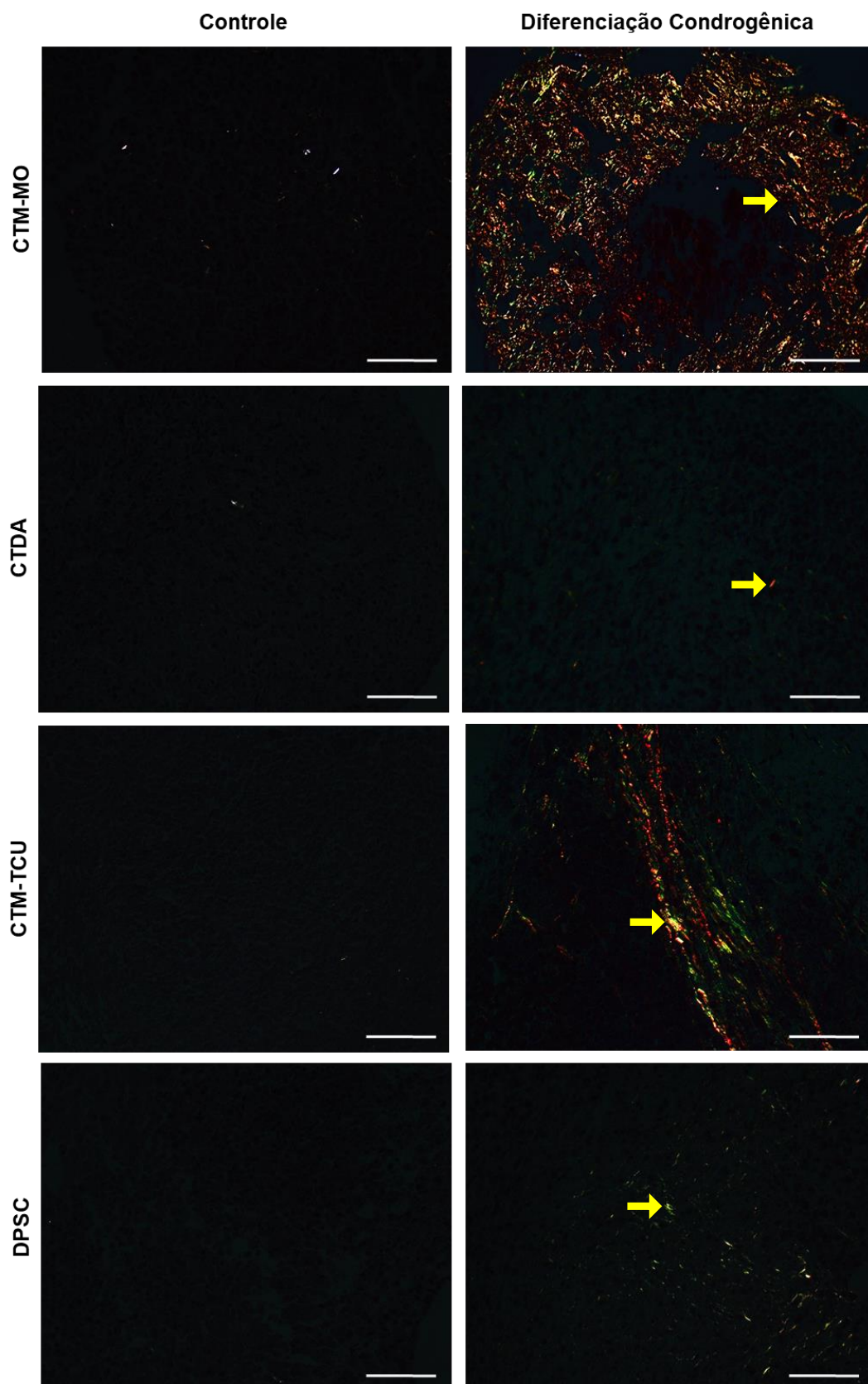


Figura 23. Amostras de CTM coradas com Picrosirius Hematoxilina após a diferenciação condrogênica. As setas indicam as fibras colágenas, onde o colágeno tipo I têm tom laranja- amarelado/vermelha e o colágeno III têm tom verde ou verde-amarela. Imagens representativas de cada grupo do estudo. Controles e diferenciação condrogênica. Todas as imagens m aumento de 400x. CTM-MO: CTM derivadas da Medula Óssea. CTDA: CTM derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: CTM derivadas do Tecido do Cordão Umbilical; DPSC: CTM derivadas da Polpa de Dente Permanente. (CTM: Célula Estromal Mesenquimal).

A coloração de Picrosirius Hematoxilina não é comumente utilizada para a comprovação da deposição colágena na indução à diferenciação condrogênica, porém, segundo López e colaboradores ¹²² é considerada uma técnica padrão para avaliação de colágeno em tecidos, além de a mais direta e fácil para detecção dos tipos de colágeno. Essa coloração é passível de quantificação, e descrita como vantajosa, não apenas clinicamente, mas também por ser estável, bastante sensível e confiável, conforme Courtoy e colaboradores ¹²³.

Além disso, quando realizada em conjunto com a coloração de Tricrômio de Masson, como apresentado neste estudo, podemos ter maior acurácia nos resultados comparando as áreas de deposição de colágeno, uma vez que a coloração de Masson apresenta a deposição de colágeno total, e Picrosirius apresenta os colágenos específicos I e III.

Após a quantificação dos colágenos, pudemos observar que, quanto ao colágeno tipo I, existe uma maior deposição no grupo CTM-MO. Foi constatada também uma diferença significativa entre os grupos, CTM-MO x CTDA ($p=0,0022$), CTM-MO x DPSC ($p=0,0029$), CTM-MO x CTM-TCU ($p=0,0010$), CTM-TCU x CTDA ($p<0,0001$) e CTM-TCU x DPSC ($p<0,0001$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos DPSC x CTDA ($p < 0,1020$) (Gráfico 2).

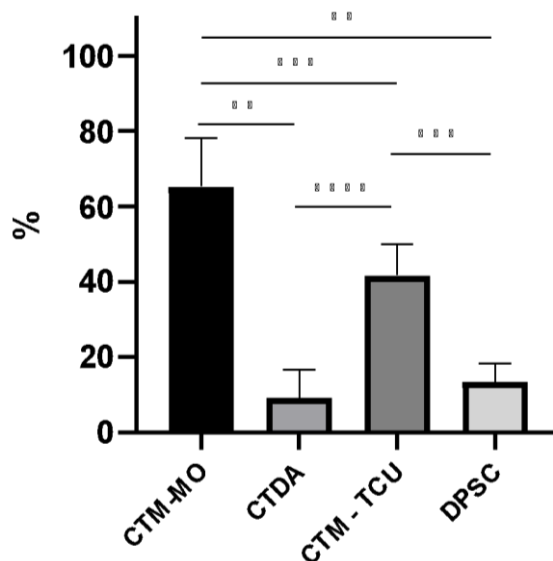


Gráfico 2. Quantificação da deposição de colágeno tipo I. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. A diferença significativa está entre os grupos: CTM-MO x CTDA (** $p=0,0022$), CTM-MO x DPSC (** $p=0,0029$), CTM-MO x CTM-TCU (*** $p=0,0010$), CTM-TCU x CTDA (**** $p<0,0001$) e CTM-TCU x DPSC (**** $p<0,0001$). Não houve diferença significativa entre os grupos DPSC x CTDA ($p < 0,1020$). CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas da Medula Óssea. CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente.

Quanto ao colágeno III foi possível observar uma maior deposição nos grupos DPSC e CTDA. Foi observado uma diferença significativa entre os grupos, CTM-MO x DPSC ($p=0,0029$), CTM-MO x CTDA ($p=0,0044$), CTM-TCU x CTM-MO ($p=0,0010$), CTM-TCU x DPSC ($p<0,0001$) e CTM-TCU x CTDA ($p=0,0001$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos DPSC x CTDA ($p < 0,0515$) (Gráfico 3).

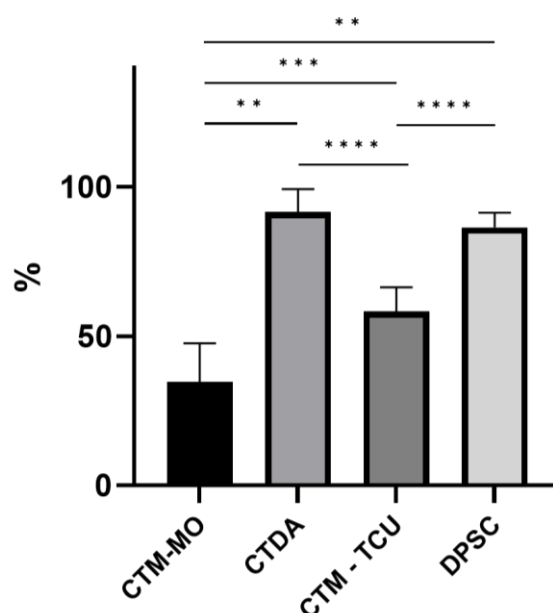


Gráfico 3. Quantificação da deposição de colágeno tipo III. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. A diferença significativa está entre os grupos: CTM-MO x DPSC ($p=0,0029$), CTM-MO x CTDA ($p=0,0044$), CTM-TCU x CTM-MO ($p=0,0010$), CTM-TCU x DPSC ($p<0,0001$) e CTM-TCU x CTDA ($p=0,0001$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos DPSC x CTDA ($p < 0,0515$). CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas da Medula Óssea. CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente.

Os tipos de colágeno estão associados à estruturação e a maturação do tecido cartilaginoso, e profundamente associado com a capacidade de renovação. O colágeno tipo I é considerado um colágeno maduro, presente em tecidos já formados e estáveis; o colágeno tipo III é um colágeno mais imaturo, presente em tecidos com alta capacidade de renovação

124.

A coloração de Picrosirius não é utilizada para a comprovação da diferenciação condrogênica, e não há dados da realização da quantificação em cortes histológicos. Usualmente esses tipos de colágenos são analisados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *polymerase chain reaction*), como mostram diversos estudos^{79, 99, 125, 126}. Os resultados deste estudo têm demonstrado que a produção desses tipos colágenos, I e III, após a indução à condrogênese podem ser utilizados para a definição do sucesso da indução desta via, uma vez que são altamente encontrados no tecido

cartilaginoso, por fazerem parte da estruturação e suporte de outros tecidos. Os resultados obtidos, neste estudo, demonstraram que a CTM-MO apresentou maior deposição de colágeno I, quando comparada com as outras fontes, o que a torna mais vantajosa para um transplante em lesões condrais por conseguir formar um colágeno mais estável para estruturação do novo tecido que será formado.

5.5.5. Comparação das Colorações Histológicas

Quando comparadas todas as colorações foi possível observar que a coloração de Azul de Toluidina, utilizada como padrão para a caracterização de CTM na indução a diferenciação condrogênica, não é a mais informativa. As outras colorações realizadas foram mais efetivas para demonstrar qualitativamente a condrogênese a partir da coloração de Tricrômio de Mallory pois foi possível observar lacunas ao redor de células diferenciadas; e de modo quantitativo a partir das colorações em Tricrômio de Masson e Picrosirius Hematoxilina, observando a deposição colágena.

A avaliação da indução à diferenciação condrogênica por colorações histológicas, utilizando todos os protocolos deste estudo, permite uma maior precisão na análise dos resultados (Fig. 24). A utilização de um método qualitativo e um quantitativo traz uma acurácia dos resultados, pois desta maneira os resultados se complementam.

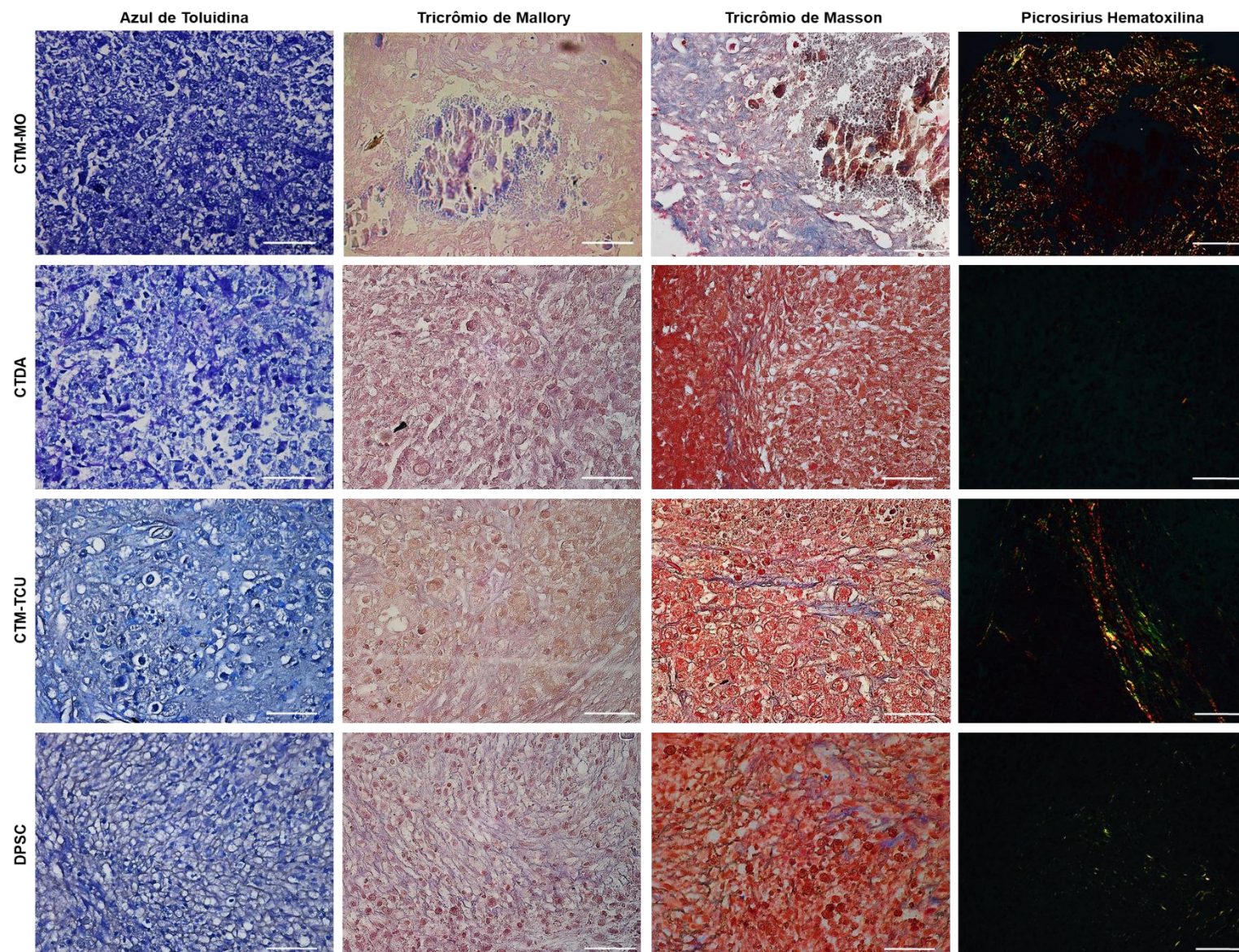


Figura 24. Imagens representativas de cada grupo, das diferenciações condrogênicas, com as diferentes colorações utilizadas no estudo. Todas as imagens em aumento de 400x. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas da Medula Óssea. CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente.

Podemos observar também, que, mesmo quando obtido a formação de lacunas ao redor das células diferenciadas, e uma possível deposição de proteoglicanos demonstrada pela coloração de Azul de Toluidina, isso não indica uma diferenciação condrogênica efetiva. A partir da utilização de outras técnicas para embasamento de resultado pudemos então observar qual fonte realmente demonstrou um maior potencial condrogênico quando comparando com as demais.

5.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a comprovação da diferenciação condrogênica, também foi realizada a técnica de imunohistoquímica com os antígenos para: colágeno tipo II, o colágeno mais abundante na cartilagem hialina, considerado também o mais importante na estruturação da matriz extracelular; e a proteína Agrecano, uma proteína de participa na estrutura de resistência á compressões das articulações.

Em nenhum dos grupos observamos a deposição de colágeno tipo II, nem a presença da proteína Agrecano, em todas as fontes do estudo (Fig. 25 e 26 respectivamente). Nessa técnica de coloração é característico observarmos a reação da ligação antígeno e anticorpo em tons de castanho.

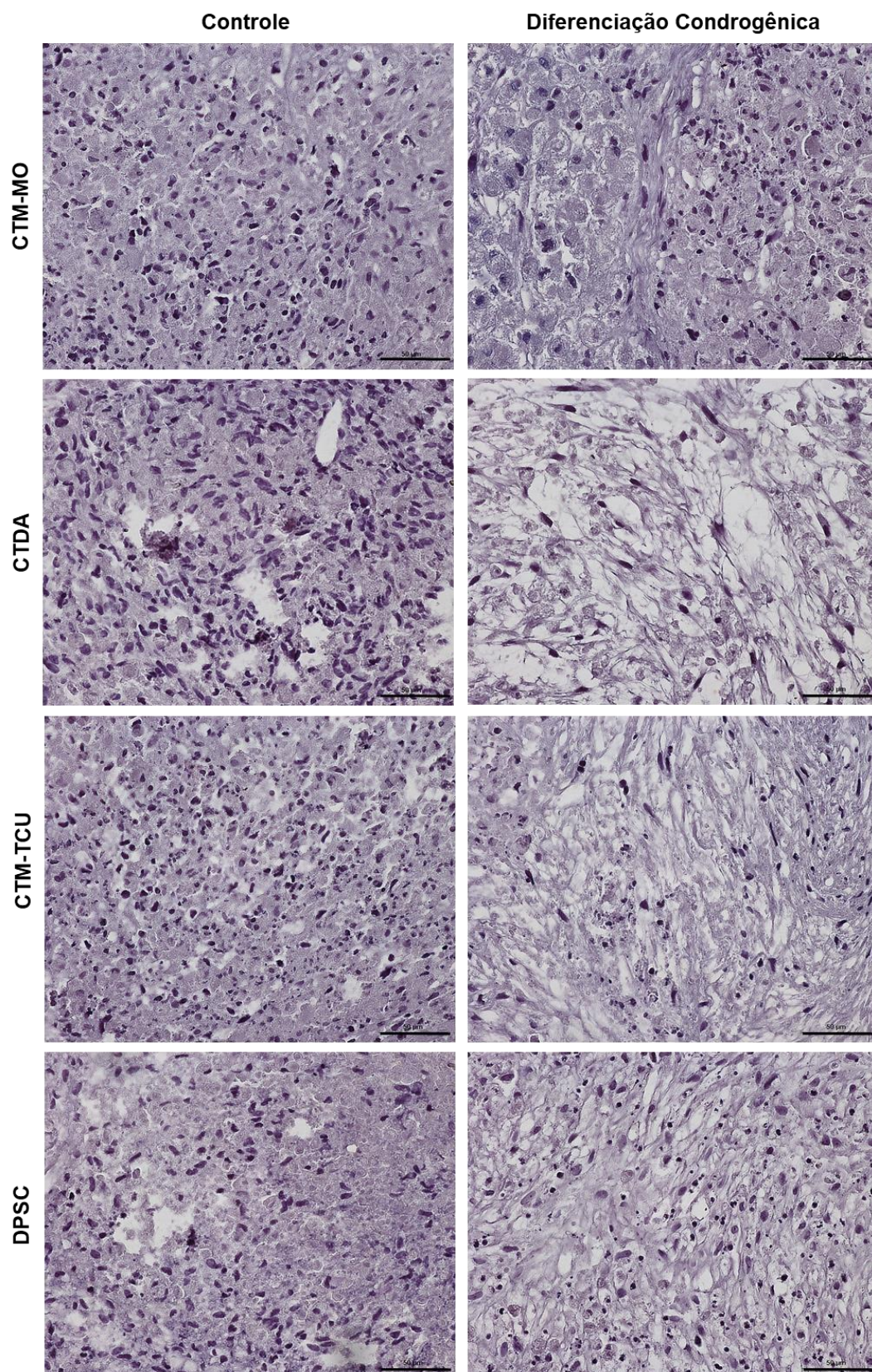


Figura 25. Imagens representativas de cada grupo, das diferenciações condrogênicas na técnica de imunohistoquímica, com os antígenos Colágeno tipo II. Todas as imagens em aumento de 400x. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas da Medula Óssea. CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente. Controle positivo – Apêndice 2.

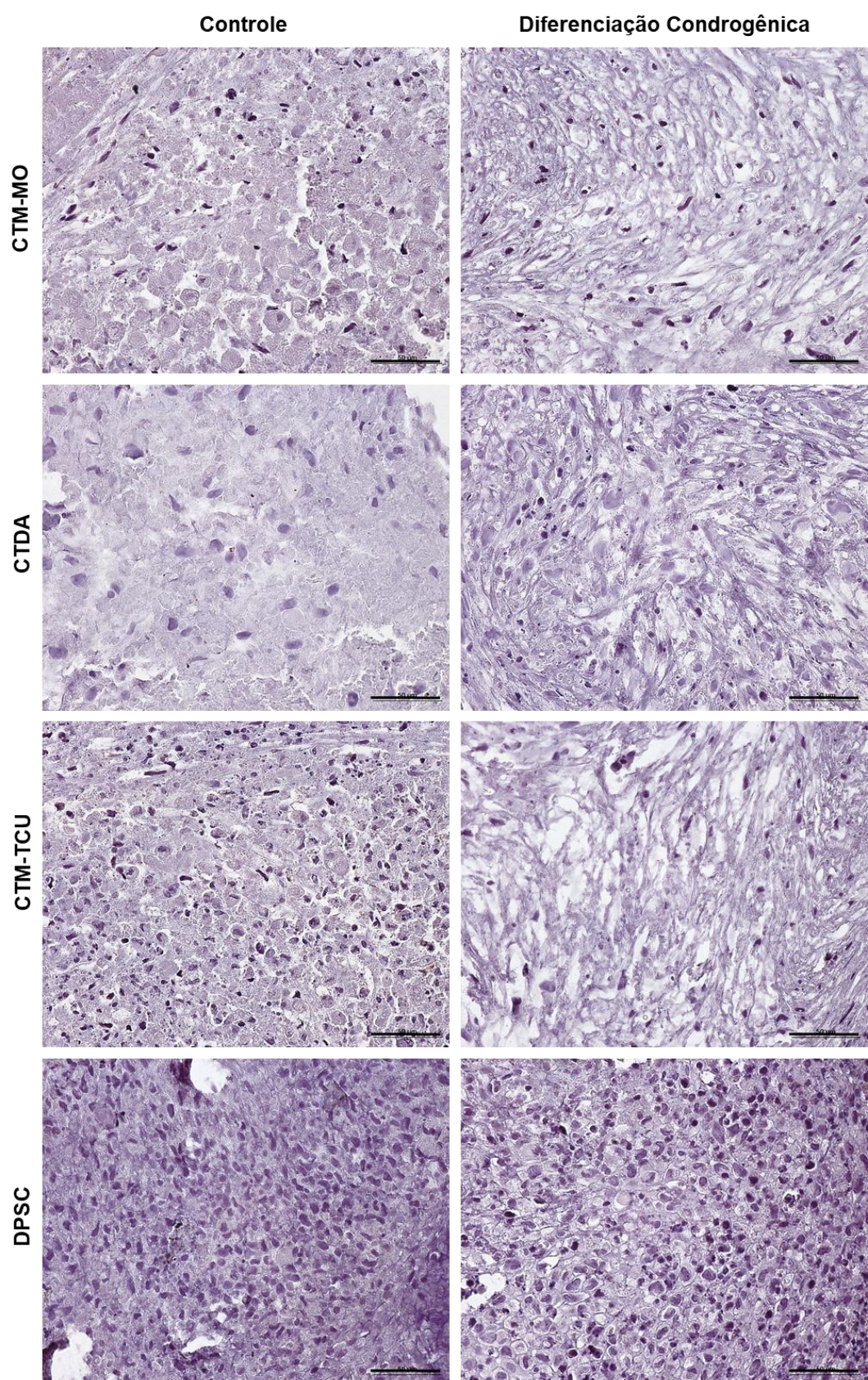


Figura 26. Imagens representativas de cada grupo, das diferenciações condrogênicas na técnica de imunohistoquímica, com os antígenos Agrecano. Todas as imagens em aumento de 400x. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas da Medula Óssea. CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente. Controle positivo – Apêndice 2.

A técnica de imunohistoquímica é altamente utilizada devido a especificidade que se pode obter a partir dos anticorpos, sendo assim possível analisar estruturas e proteínas alvo de maneira mais rápida. Diversos estudos utilizam o marcador de colágeno tipo II para a comprovação da condrogênese, em todas as fontes celulares aqui utilizadas (CTM-MO, CTM-TCU, CTDA e DPSC) ^{68, 127-129}.

A ausência da deposição castanha nas amostras, neste estudo, gerou a hipótese de que pode ter havido um problema na realização da técnica, uma vez que o colágeno tipo II é altamente estudado e esperado na indução à diferenciação condrogênica.

5.7. AVALIAÇÃO DE Sox9 SOLÚVEL

Foi avaliada a presença de Sox9 solúvel no sobrenadante das amostras. O Sox9 participa diretamente na indução da diferenciação dos condrócitos maduros e na formação da matriz da cartilagem, atuando na condrogênese. Avaliando os valores absolutos da absorbância, não pudemos observar diferença estatística entre as amostras, nas análises entre controle (micromassas cultivadas com meio de cultivo + 15% SBF) e diferenciação (micromassas cultivadas com meio específico para diferenciação condrogênica) e nas análises entre as diferenciações (micromassas cultivadas com meio específico para diferenciação condrogênica) (Gráfico 4).

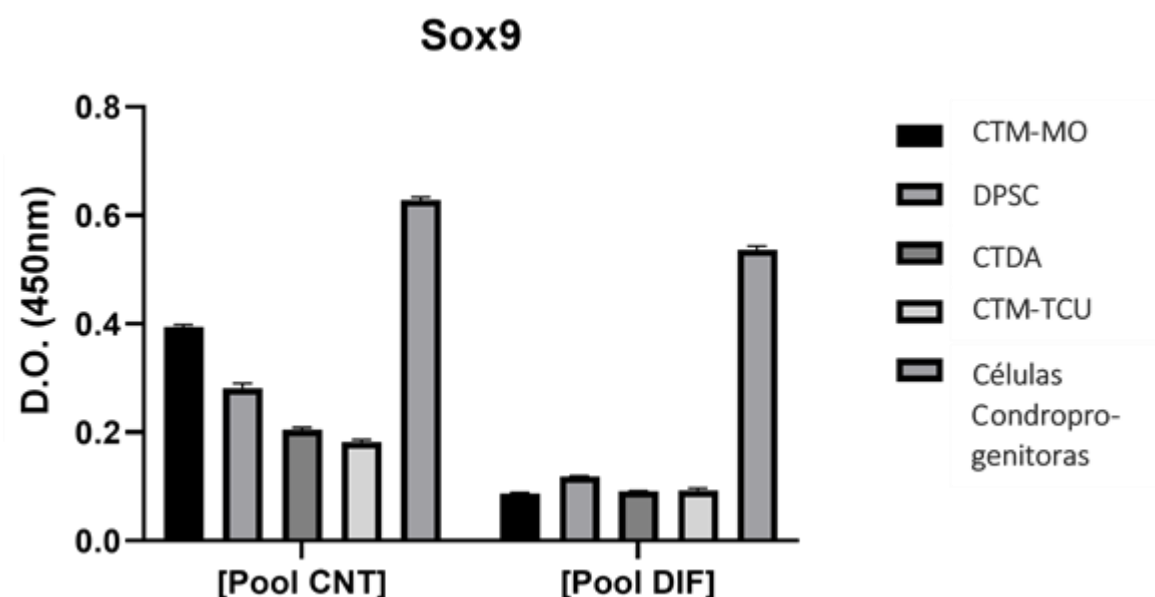


Gráfico 4. Expressão de Sox9 no sobrenadante das amostras diferenciadas e não diferenciadas a linhagem condrogênica. Valores expressos em média e desvio padrão referentes a densidade óptica (D.O.). CTM-MO: Célula-tronco mesenquimal derivada da medula óssea. CTM-MO: Células estromais mesenquimais derivadas da Medula Óssea. CTDA: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido Adiposo; CTM-TCU: Células estromais mesenquimais derivadas de Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: Células estromais mesenquimais derivadas de Polpa de Dente.

Não há estudos de quantificação de Sox9 solúvel, sendo suas análises realizadas quase exclusivamente por PCR¹³⁰⁻¹³³. Nossa hipótese para os resultados observados é que, esse fator de transcrição possa ser observado em outros estágios da diferenciação condrogênica, como por exemplo nos estágios iniciais, por ser um indutor de maturação de condrócitos e de sintetização de matriz extracelular. Outra hipótese é que o Sox9 não esteja presente de maneira solúvel, mas apenas presente no agregado celular.

6. CONCLUSÃO

- Foi possível cultivar as CTM derivadas das quatro fontes do estudo, (TCU, MO, TA, DP) e todas apresentaram características de acordo com o estabelecido pela ISCT, quanto a expressão dos marcadores de membrana e aderência ao plástico.
- Todas as fontes foram induzidas à diferenciação condrogênica, a partir da técnica de cultivo de agregado de alta densidade (micromassa).
- A partir das análises de marcadores condroprogenitores, Sox9 solúvel e imunohistoquímica, não foi possível concluir qual fonte é a mais eficiente para a diferenciação condrogênica. Porém após as análises das quantificações da deposição colágena, a medula óssea foi a fonte que apresentou maior quantidade de colágeno total, quando comparada com as outras fontes, além de maior quantidade de colágeno tipo I, considerado um colágeno maduro.
- Foram realizadas quatro técnicas de colorações histológicas, incluindo o protocolo de coloração de Azul de Toluidina, o mais utilizado para a comprovação da indução de CTM à diferenciação condrogênica. Nas colorações de Azul de Toluidina e Tricrômio de Mallory foi possível observar as lacunas ao redor dos condrócitos jovens e colágeno, porém sem possibilidade de quantificação. Já nas colorações de Tricrômio de Masson e Picrosirius Hematoxilina pudemos observar a deposição colágena, total e específica (colágenos tipo I e III) sendo possível realizar a quantificação. Para avaliar a diferenciação de CTM na linhagem condrogênica, essas colorações podem ser complementares pela possibilidade de comprovar a presença de colágenos específicos (Picrosirius Hematoxilina) e colágeno total (Tricrômio de Masson).
- A partir das análises de todos os resultados das técnicas realizadas, concluímos que a MO mostrou ser a fonte com maior potencial para a condrogênese.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS, PERSPECTIVAS E CONTRIBUIÇÃO ORIGINAL PARA A CIÊNCIA

7.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a realização do projeto, pudemos avaliar diferentes métodos para a comprovação da indução a diferenciação condrogênica. Esta via de diferenciação é importante dentro da medicina regenerativa pois está intimamente ligada ao bem-estar da população, saber como realizar tratamentos efetivos quanto à cartilagem é essencial, assim a pesquisa de base torna-se ainda mais necessária.

Utilizando o método de citometria de fluxo, pudemos observar que os resultados não apresentaram diferenças significativas, uma vez que ainda não possuímos marcadores específicos para a condrogênese. Além disso, as CTM expressam uma alta diversidade de marcadores, deixando o processo da análise e escolha dos marcadores mais difícil. Tivemos também dificuldade para a realização da técnica de imunofenotipagem, uma vez que as micromassas deveriam ser desfeitas para que pudéssemos marcar as células, o que deixava a viabilidade muito baixa, e os eventos mais reduzidos.

As colorações histológicas mostraram que a considerada como padrão (Azul de Toluidina) não é a mais informativa dentre as colorações específicas utilizadas cotidianamente para análise do tecido cartilaginoso. As colorações em Tricrômio de Masson/Mallory e Picrosirius Hematoxilina mostram a diversidade de componentes existente no tecido cartilaginoso, fazendo com que se obtenha maior precisão e acurácia na comprovação da via de diferenciação condrogênica. Tivemos problemas com a realização da técnica histológica, fazendo com que houvesse a necessidade da padronização no cultivo, quanto a quantidade de células utilizadas para fazer o agregado de alta densidade, para que as micromassas apresentassem um tamanho suficiente para realizar umas técnicas de coloração adequadamente.

A técnica para análise do Sox9 solúvel, proteína escolhida por desempenhar o papel de sinalização para diferenciação durante condrogênese, não apresentou resultados suficientes para avaliar o potencial de diferenciação condrogênica das fontes de CTM. Sua expressão diminuída na análise dos sobrenadantes dos cultivos geraram dois cenários: sua expressão foi retida devido aos fatores de crescimento contidos no meio de diferenciação utilizado; ou essa proteína não é solúvel, sendo sua expressão atuante apenas no tecido/célula. A falta de estudos utilizando esse kit, e de análises por espectrofotometria do Sox9, dificultam a comparação com outros resultados.

Durante todo o processo da realização dessa pesquisa, ficou clara a variabilidade das amostras de um mesmo grupo, o que dificultou a análise estatística, principalmente no protocolo da citometria de fluxo, trazendo a necessidade de futuramente aumentar o *n* amostral das fontes utilizadas.

7.2. PERSPECTIVAS

Este projeto gerou novas perguntas para este tema que tem sido altamente explorado. A busca por uma fonte de CTM que seja compatível com os tipos de tratamentos disponíveis e que ainda estão sendo testados é importante. Futuramente será necessário comprovar a efetividade das CTM derivadas da medula óssea com outras técnicas, porém ainda deve-se levar em consideração o método que essa fonte é obtida. Avaliar por outras técnicas as fontes, TCU e polpa dentária, utilizadas neste estudo, também é importante pois essas fontes têm coleta menos invasiva e apresentaram bons resultados para a diferenciação condrogênica.

7.3. CONTRIBUIÇÃO ORIGINAL PARA A CIÊNCIA

A partir desse estudo pudemos concluir:

- A coloração de Azul de Toluidina, utilizada atualmente como a padrão para a diferenciação condrogênica, não é a mais informativa. Outras colorações podem demonstrar resultados de maior qualidade e veracidade, como Tricrômio de Masson e Picrosirius Hematoxilina. Essas duas colorações podem ser utilizadas como complementares, uma vez que se pode observar o colágeno total e colágenos específicos.
- As células de CTM-MO obtiveram um melhor desempenho a partir das avaliações das técnicas utilizadas nesse estudo.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica: texto e atlas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2023; 12: 359 – 370.
2. Bassleer C, Gysen P, Foidart JM, Bassleer R, Franchimont P. Human chondrocytes in tridimensional culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology*. 1986; 22 (3): 113 – 119.
3. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley, PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice & Research: Clinical Rheumatology*. 2008; 2 (22): 351 – 84.
4. Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 112 (47): 14452 – 14459.
5. Somoza RA, Welter JF, Correa D, Caplan AI. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2014; 20 (6): 596 – 608.
6. Pittenger MF, Macka AM, Beck SC, Jaiswal K, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 5411 (284): 13 – 147.
7. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini, F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Hoerwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*. 2006; 4 (8): 315 – 317.
8. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology*. 2009; 217 (2): 318 – 324.
9. Bieback K, Kern S, Klüer H, Eichler H. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells*, 2004; 4 (22): 625 – 634.
10. Zuk PA. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cellbased therapies. *Tissue Engineering*. 2001; 7 (2); 211 – 228.
11. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 25 (97): 13625 – 13630.
12. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow- derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine*. 1999; 3 (5): 309 – 313.
13. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. (414): 2001.
14. Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma S, Afrin F, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009; 13 (11-12): 4385 – 402.

15. Chen Y, Shao J-Z, Xiang L-X, Dong X-J, Zhang G-R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008; 40 (5): 815 – 820.
16. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019; 8 (8): 886.
17. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology Medicine*. 2008; 7 (233): 901 – 913.
18. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*. 2001; 7 (6): 259 – 64.
19. Augello, A.; De Bari, C. The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Human Gene Therapy*. 2010; 21(10): 1226 – 1238.
20. Martínez-Moreno D, Jiménez G, Gálvez-Martín P, Rus G, Marchal JA. Cartilage biomechanics: A key factor for osteoarthritis regenerative medicine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2019; 1865 (6): 1067 – 75.
21. Atlas De Histologia. Tecido Cartilaginoso. Disponível em: <https://editora.pucrs.br/edipucrs/acessolivre/livros/atlas-de-histologia/tecido-cartilaginoso.html#cartilagem-hialina>. Acesso em: 5 nov. 2021.
22. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, De Crombrugghe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*. 1999; 1 (22): 85 – 89.
23. Rezende MU, Hernandez AJ, Camanho GL, Amatuzzi MM. Cartilagem articular e osteoartrose. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2000; 2 (8).
24. Roughley PJ, Mort JS. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *Journal of Experimental Orthopaedics*. 2014; 1 (1).
25. Vincent TL, Wann AKT. Mechanoadaptation: articular cartilage through thick and thin. *The Journal of Physiology*. 2018; 597 (5): 1271 – 1281.
26. Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013; 21 (12): 1824 – 33.
27. Chahla J, Dean CS, Moatshe G, Pascual-Garrido C, Serra Cruz R, Laprade RF. Concentrated Bone Marrow Aspirate for the Treatment of Chondral Injuries and Osteoarthritis of the Knee. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2016; 1 (4).
28. Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi LBS, Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2022; (8): 3.
29. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2009; 17 (11): 1289 – 1297.
30. Li YY, Cheng HW, Cheung KMC, Chan D, Chan BP. Mesenchymal stem cell-collagen microspheres for articular cartilage repair: Cell density and differentiation status. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10 (5): 1919 – 1929.
31. Fellows CR, Matta C, Zakany R, Khan IM, Mobasheri A. Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. *Frontiers in Genetics*. 2016; (7): 213.

32. Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013; 9 (10): 584 – 594.
33. Kurth TB, Dell’Accio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, De Bari C. Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium in vivo. *Arthritis & Rheumatism*. 2011; 63 (5): 1289 – 1300.
34. Neybecker P, Henrionnet C, Pape E, Mainard D, Galois L, Loeuille D, et al. *In vitro* and in vivo potentialities for cartilage repair from human advanced knee osteoarthritis synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018; 9 (1).
35. Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, Helqvist S, Ekblond A, Ng M, et al. In Vivo MRI Tracking of Mesenchymal Stromal Cells Labeled with Ultrasmall Paramagnetic Iron Oxide Particles after Intramyocardial Transplantation in Patients with Chronic Ischemic Heart Disease. *Stem Cells International*. 2019; 2019: 1 – 10.
36. Rossello-Gelabert M, Gonzalez-Pujana A, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. Clinical progress in MSC-based therapies for the management of severe COVID-19. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2022
37. Rajabzadeh N, Fathi E, Farahzadi R. Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investigation*. 2019; 6: 19 – 9.
38. Song L, Baksh D, Tuan RS. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cytherapy*. 2004; 6 (6): 596 – 601.
39. Patterson TE, Kumagai K, Griffith L, Muschler GF. Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2008; 1 (90): 111 – 119.
40. Shammaa R, El-Kadiry AE-H, AbEUArah J, Rafei M. Mesenchymal Stem Cells Beyond Regenerative Medicine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 72.
41. Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Uckwalter JA. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *Journal of Orthopedy and Trauma*. 2006; 10 (20): 739 – 44.
42. Ding C, Garnero P, Cicuttini F, Scott F, Cooley H, Jones G. Knee cartilage defects: association with early radiographic OA, decreased cartilage volume, increased joint surface area and type II collagen breakdown. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005; 13: 198 – 205.
43. Marquass B, Schulz R, Hepp P, Zscharnack M, Aigner T, Schmidt S, et al. Matrix-Associated Implantation of Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells Versus Articular Chondrocytes. *The American Journal of Sports Medicine*. 2011; 39 (7): 1401 – 1412.
44. Erickson IE, Kestle SR, Zellars KH, Dodge GR, Burdick JA, Mauck RL. Improved cartilage repair via *in vitro* pre-maturation of MSC-seeded hyaluronic acid hydrogels. *Biomedical Materials*. 2012; 7 (2): 024110.
45. Lee WY, Wang B. Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives. *Journal of Orthopaedic Translation*. 2017; 9: 76 – 88.

46. Khalilifar MA, Baghaban Eslaminejad MR, Ghasemzadeh M, Hosseini S, Baharvand H. *In vitro* and In Vivo Comparison of Different Types of Rabbit Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. *Cell journal*. 2019; 21 (2): 150 – 160.
47. Tan SSH, Tjio CKE, Wong JRY, Wong KL, Chew JRJ, Hui JHP, Toh WS. Mesenchymal Stem Cell Exosomes for Cartilage Regeneration: A Systematic Review of Preclinical In Vivo Studies | *Tissue Engineering Part B: Reviews*. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2021; 27 (1): 1 – 13.
48. Franck CL, Senegaglia AC, Leite LMB, De Moura SAB, Francisco NF, Ribas Filho JM. Influence of Adipose Tissue-Derived Stem Cells on the Burn Wound Healing Process. *Stem Cells International*. 2019; 2019: 1 – 10.
49. Silva TGFS. et al. Avaliação sensitiva, motora e cistométrica de cães com lesão medular crônica, submetidos ao transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. *Pesq. Vet. Bras*. 2018; 10 (38): 1955 – 1965.
50. Villanova JAJ, Fracaro L, Rebelatto CLK, Silva AJ, Barchiki F, Senegaglia AC, Dominguez AC, Moura SAB, Pimpao CT, Brofman PRS, Dittrich RL. Recovery of motricity and micturition after transplantation of mesenchymal stem cells in rats subjected to spinal cord injury. *Neuroscience Letters*. 2020; (135134).
51. Brofman PR, Carvalho KA, Guarita-Souza LC, Rebelatto C, Hansen P, Senegaglia AC, Olandoski M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 2004; 3 (19): 261 – 266.
52. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, et al. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Reserach Therapy*. 2012; 25 (3).
53. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell stem cell*. 2008; 3 (3): 229 – 230.
54. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. N,108, v. 6, p. 2114 – 21120, 2006.
55. Han SW, Carvalho ACC, Souza CF. Células-tronco: Novas Perspectivas Terapêuticas em Cardiologia. Rio de Janeiro: Atheneu editora. 2011; (258).
56. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Jung JS. Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2004; 14 (4 – 6): 311 – 324.
57. Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User's Guide. *Stem Cells and Development*. 2010 19 (10): 1449 – 1470.
58. Nayak, Arabinda SP, Kanani, A, Bhargav P. Function of stem cells and their future roles in healthcare. *International Journal of Pharmacy and Technology*. 2014; 6: 2852 – 2895.
59. Jeffery E, Wing A, Holtrup B, Sebo Z, Kaplan Jennifer L, Saavedra-Peña R, et al. The Adipose Tissue Microenvironment Regulates Depot-Specific Adipogenesis in Obesity. *Cell Metabolism* [Internet]. 2016 Jul [cited 2023 Feb 13];24(1):142–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27320063/>

60. Ambrose Cell Therapy. Why Adipose Tissue? (The Skinny on Fat) | Ambrose Cell Therapy. 2022.
61. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Diseases of the colon and rectum*. 2009; 52 (1): 79 – 86.
62. Arboleda D, Forostyak S, Jendelova P, Marekova D, Amemori T, Pivonkova H, et al. Transplantation of Predifferentiated Adipose-Derived Stromal Cells for the Treatment of Spinal Cord Injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2011; 31 (7): 1113 – 1122.
63. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*. 2012; (812693).
64. Mizuno H. Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration: Ten Years of Research and a Literature Review. *Journal of Nippon Medical School*. 2009; 76 (2): 56 – 66.
65. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp*. 2016; 64 (6): 443 – 454.
66. Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury*. 2008; 39 (1): S58-65.
67. Im GI. Chondrogenesis from mesenchymal stem cells derived from adipose tissue on the fibrin scaffold. *Current Applied Physics*. 2005; 5 (5): 438 – 443.
68. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells *in vitro* and *in Vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 290 (2): 763 – 769.
69. Safari F, Fani N, Eglin D, Alini M, Stoddart MJ, Baghaban Eslaminejad M. Human umbilical cord-derived scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2019; 107 (8): 1793 – 1802.
70. Americord. Umbilical Cord Tissue Stem Cell Banking | Americord®. Americord Registry. 2018.
71. Ramzan F, Ekram S, Frazier T, Salim A, Mohiuddin OA, Khan I. Decellularized Human Umbilical Tissue-Derived Hydrogels Promote Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering*. 2022; 9 (6): 239.
72. Jin AH, Yong-Beom P, Chul WH, Jin AK, Seongchan K, Yong-Geun P. Comparison of Undifferentiated Versus Chondrogenic Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Umbilical Cord Blood for Cartilage Repair in a Rat Model. *The American Journal of Sports Medicine*. 2019; 33 (11): 1580 – 1586.
73. Gómez-Leduc T, Hervieu M, Legendre F, et al. Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Science Repository*. 2016; (6): 327 – 386.
74. Zainal Ariffin SH, Kermani S, Megat Abdul Wahab R, Senafi S, Zainal Ariffin Z, Abdul Razak M. *In vitro* Chondrogenesis Transformation Study of Mouse Dental Pulp Stem Cells. *The Scientific World Journal*. 2012; 2012: 1 – 7.

75. Baranova, Juliana & Büchner, Dominik & Götz, Werner & Schulze, Margit & Tobiasch, Edda. Tooth Formation: Are the Hardest Tissues of Human Body Hard to Regenerate?. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 4031.
76. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research*. 2002; 81 (8): 531 – 535.
77. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development*. 2016; 143 (13): 2273 – 2280.
78. Kruijt Spanjer EC, Bittermann GKP, Van Hooijdonk IEM, Rosenberg A, Gawlitta D. Taking the Endochondral route to craniomaxillofacial bone Regeneration: a logical approach? *J Craniomaxillofac Surg*. 2017; (45): 1099 – 1106.
79. Longoni A, Utomo L, van Hooijdonk IEM, Bittermann GKP, Vetter VC, Kruijt Spanjer EC, Ross J, Rosenberg AJWP. The chondrogenic differentiation potential of dental pulp stem cells. *European Cells and Materials*. 2020; (39): 121 – 135
80. Ma X, Yang R, Wang P, Liu S, Xu H, Ye Z, et al. Bioinspired dual dynamic network hydrogels promote cartilage regeneration through regulating BMSC chondrogenic differentiation. *Materials Today Chemistry*. 2022; 23: 100648.
81. Li J, Dong S. The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. *Stem Cells International*. 2016; 2016: 1 – 12.
82. Lo W-C, Chen W-H, Lin T-C, Hwang S-M, Zeng R, Hsu W-C, et al. Preferential therapy for osteoarthritis by cord blood MSCs through regulation of chondrogenic cytokines. *Biomaterials*. 201; 34 (20): 4739 – 4748.
83. Treilleux I, Mallein-Gerin F, Guellec DL, Herbage D. Localization of the Expression of Type I, II, III Collagen, and Aggrecan Core Protein Genes in Developing Human Articular Cartilage. 1992; 12 (3): 221 – 232.
84. Blaney Davidson EN, Van Der Kraan PM, Van Den Berg WB. TGF-beta and Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; (15): 597 – 604.
85. Danisovic L, Lesny P, Havlas V, Teyssler P, Syrova Z, Kopani M, Fujerikova G, Trc T, Sykova E, Jendelova P. Chondrogenic differentiation of human Bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Appl. Biomed*. 2007; (5): 139 – 150.
86. Danisovic L, Varga I, Zamborsky R, Böhmer D. The tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffolds and stimulating factors. *Exp Biol Med*. 2012; 237 (1): 10 – 7.
87. Jung CK. Articular Cartilage: Histology and Physiology. *Techniques in Cartilage Repair Surgery*. 2014; 17–21.
88. Yang X, Tian S, Fan L, Niu R, Yan M, Chen S, et al. Integrated regulation of chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells and differentiation of cancer cells. *Cancer Cell International*. 2022; 22 (1): 169.
89. Li J, Dong S. The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. *Stem Cells International*. 2016; 2016: 1 – 12.
90. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Experimental Cell Research*. 2001; 268 (2): 189 – 200.

91. Tan AR, Alegre-Aguarón E, O'Connell GD, VandenBerg CD, Aaron RK, Vunjak-Novakovic G, et al. Passage-dependent relationship between mesenchymal stem cell mobilization and chondrogenic potential. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015; 23 (2): 319 – 327.
92. Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, Ruponen M, Hovatta O, Koistinaho J, et al. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013; 45 (8): 1802 – 1812.
93. Fujita Y, Shiomi T, Yanagimoto S, Matsumoto H, Toyama Y, Okada Y. Tetraspanin CD151 is expressed in osteoarthritic cartilage and is involved in pericellular activation of pro-matrix metalloproteinase 7 in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2006; 54 (10): 3233 – 3243.
94. Gorain B, Bhattamishra SK, Choudhury H, Nandi U, Pandey M, Kesharwani P. Overexpressed Receptors and Proteins in Lung Cancer. *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*. 2019; 39 – 75.
95. Fracaro L, Senegaglia AC, Herai RH, Leitolis A, Boldrini-Leite LM, Rebelatto CLK, et al. The Expression Profile of Dental Pulp-Derived Stromal Cells Supports Their Limited Capacity to Differentiate into Adipogenic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21 (8): 2753.
96. Kawashima, N. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? *Arch. Oral Biol*. 2012; 57: 1439 – 1458.
97. Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: From immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry Part A*. 2012; 83A (1): 48 – 61.
98. Wang X, Ma Y, Gao Z, Yang J. Human adipose-derived stem cells inhibit bioactivity of keloid fibroblasts. *Stem. Cell Res. Ther*. 2018; 9: 40.
99. Brito Barrera YA, Husteden C, Alherz J, Fuhrmann B, Wölk C, Groth T. Extracellular matrix-inspired surface coatings functionalized with dexamethasone-loaded liposomes to induce osteo- and chondrogenic differentiation of multipotent stem cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2021; 131: 112516.
100. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: From adhesion molecules to signaling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;4 (1): 33 – 45.
101. Aisenbrey EA, Bryant SJ. The role of chondroitin sulfate in regulating hypertrophy during MSC chondrogenesis in a cartilage mimetic hydrogel under dynamic loading. *Biomaterials*. 2019; 190 – 191: 51 – 62.
102. Nicoll SB, Barak O, Csóka AB, Bhatnagar RS, Stern R. Hyaluronidases and CD44 Undergo Differential Modulation during Chondrogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 292 (4): 819 – 825.
103. Knudson CB. Hyaluronan and CD44: Strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2003; 69 (2): 174 – 196.
104. Lee HJ, Choi BH, Min B-H, Park SR. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes *in vitro*. *Arthritis & Rheumatism*. 2009; 60 (8): 2325 – 2332.

105. Bernardo, M. E., Emons, J. A. M., Karperien, M., Nauta, A. J., Willemze, R., Roelofs, H., et al. Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow Display a Better Chondrogenic Differentiation Compared with Other Sources. *Connective Tissue Research*. 2007; 48 (3): 132 – 140.
106. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009; 1176 (1): 101 – 117.
107. Araña M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, and Characterization. *Methods in Molecular Biology*. 2013; 47 – 61.
108. Bergholt NL, Lysdahl H, Lind M, Foldager CBA Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage*. 2019; 370 – 374.
109. Lind M. A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage*. 2019; 10 (3): 370 – 374.
110. Bergholt NL, Lysdahl H, Lind M, Foldager CB. A Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. *Cartilage*. 2018;10 (3): 370 – 374.
111. Vidal B de C, Mello MLS. Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications. *Acta Histochemica*. 2019; 121 (2): 101 – 112
112. Elrashidy RA, Hasan RA. Cilostazol preconditioning alleviates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in male rats: Mechanistic insights into SIRT1 signaling pathway. *Life Sciences*. 2021; 266: 118822.
113. Heirani-Tabasi A, Hosseinzadeh S, Rabbani S, Ahmadi Tafti SH, Jamshidi K, Soufizomorrod M, et al. Cartilage tissue engineering by co-transplantation of chondrocyte extracellular vesicles and mesenchymal stem cells, entrapped in chitosan–hyaluronic acid hydrogel. *Biomedical Materials*. 2021; 16 (5): 055003.
114. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006; 24 (5): 1294 – 1301.
115. Struys T, Moreels M, Martens W, Donders R, Wolfs E, Lambrichts I. Ultrastructural and Immunocytochemical Analysis of Multilineage Differentiated Human Dental Pulp- and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 2010; 193 (6): 366 – 378.
116. Stanko P, Kaiserova K, Altanerova V, Altaner C. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomedical Papers*. 2014; 158 (3): 373 – 377.
117. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99 (7): 4397 – 4402.
118. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2016; 45 (1): 124 – 1231.

119. Al Madhoun A, Sindhu S, Haddad D, Atari M, Ahmad R, Al-Mulla F. Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021; 9: 717624.
120. Wang L, Tran I, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. A Comparison of Human Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord–Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. 2009;15 (8): 2259 – 2266.
121. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, Finkenzeller G, Stark GB, Südkamp NP, et al. Differential Expression Pattern of Extracellular Matrix Molecules During Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue. *Tissue Engineering*. 2006; 12 (10): 2853 – 2862.
122. López De Padilla CM, Coenen MJ, Tovar A, De la Vega RE, Evans CH, Müller SA. Picrosirius Red Staining: Revisiting Its Application to the Qualitative and Quantitative Assessment of Collagen Type I and Type III in Tendon. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2021; 69 (10): 633 –643.
123. Courtoy GE, Leclercq I, Froidure A, Schiano G, Morelle J, Devuyst O, et al. Digital Image Analysis of Picrosirius Red Staining: A Robust Method for Multi-Organ Fibrosis Quantification and Characterization. *Biomolecules*. 2020; 10 (11): 1585.
124. Coleman, R. Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochem*. 2011; (113): 231 – 233.
125. Cappato S, Giacomelli F, Tonachini L, Ravazzolo R, Bocciardi R. Identification of reference genes for quantitative PCR during C3H10T1/2 chondrogenic differentiation. *Molecular Biology Reports*. 2019; 46 (3): 3477 – 3485.
126. Lin I-Chan, Wang T-J, Wu C-L, Lu D-H, Chen Y-R, Yang K-C. Chitosan-cartilage extracellular matrix hybrid scaffold induces chondrogenic differentiation to adipose-derived stem cells. *Regenerative Therapy*. 2020; 14: 238 – 244.
127. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. *In vitro* Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Experimental Cell Research*. 1998; 238 (1): 265 – 272.
128. Huang J, Kazmi N, Durbhakula M, Hering T, Yoo J, Johnstone B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005; 23 (6): 1383 – 1389.
129. Limin Wang, Ivy Tran, Kiran Seshareddy, Mark L. Weiss, and Michael S. Detamore. A Comparison of Human Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord–Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue. *Tissue Engineering Part A*. 2021; 15 (8): 2259 – 2266.
130. Tsuchiya H, Kitoh H, Sugiura F, Ishiguro N. Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 301 (2): 338 – 343.
131. Cao L, Yang F, Liu G, Yu D, Li H, Fan Q, et al. The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2011; 32 (16): 3910 – 3920.

132. Zhi Z, Zhang C, Kang J, Wang Y, Liu J, Wu F, et al. The therapeutic effect of bone marrow–derived mesenchymal stem cells on osteoarthritis is improved by the activation of the KDM6A/SOX9 signaling pathway caused by exposure to hypoxia. *Journal of Cellular Physiology*. 2020; 235 (10): 7173 – 7182.
133. Wang ZH, Li XL, He XJ, Wu BJ, Xu M, Chang HM, et al. Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an *in vitro* model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2014; 47 (4): 279 – 286.

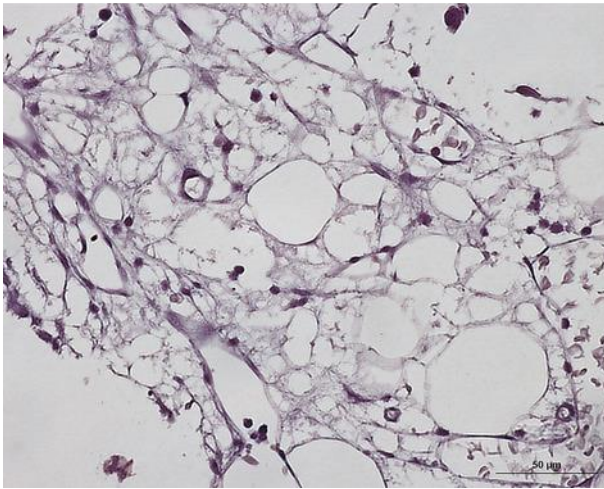
Apêndice I

Tabela 1. Valores de p das análises de citometria de fluxo dos marcadores de membrana utilizados no estudo. CTM-MO: Célula estromal mesenquimal derivada da Medula Óssea; CTDA: Célula Estromal mesenquimal derivada do Tecido Adiposo; CM-TCU: Célula estromal mesenquimal derivada do Tecido de Cordão Umbilical; DPSC: Célula estromal mesenquimal derivada da Polpa de Dente.

Grupos - Diferenciação	Valores de <i>p</i>					
	CD105	CD44	CD49c	CD151	Condroitina	Sox9
CTDA x DPSC	<0,10	<0,40	>0,99	>0,99	<0,70	<0,70
CTDA x CTM-TCU	<0,20	<0,40	<0,20	<0,10	>0,99	<0,70
CTDA x CTM-MO	<0,70	<0,70	>0,99	<0,40	>0,99	<0,70
CTM-TCU x CTM-MO	<0,10	<0,10	<0,20	<0,10	<0,70	<0,70
CTM-TCU x DPSC	<0,10	>0,99	>0,99	<0,20	>0,99	<0,70
CTM-MO x DPSC	<0,20	<0,20	<0,70	<0,20	<0,40	<0,80
Célula condroprogenitora x CTM-TCU	<0,10	<0,70	<0,70	<0,40	>0,99	<0,70
Célula condroprogenitora x CTM-MO	<0,40	<0,10	<0,20	<0,10	<0,20	<0,70
Célula condroprogenitora x DPSC	<0,20	<0,70	<0,40	<0,20	>0,99	<0,70
Célula condroprogenitora x CTDA	<0,40	<0,20	<0,20	<0,10	>0,99	>0,99

Apêndice 2

Controle positivo - Agrecano



Controle positivo – Colágeno tipo II

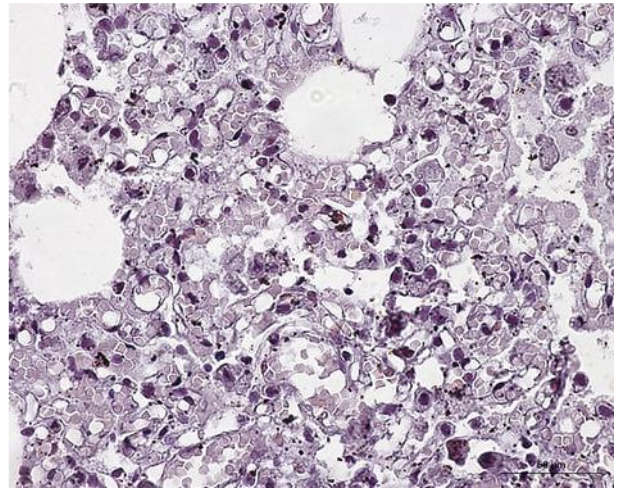


Figura 27. Imagens representativas dos controles positivos da técnica de imunohistoquímica realizada para os marcadores de colágeno tipo 2 e Agrecano. Aumento de 400x.

Anexo 1

Apresentação dos resultados parciais no XVII Congresso ABTCel-Gen (2022).

26

CHONDROGENIC POTENTIAL OF DIFFERENT SOURCES OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS EVALUATED BY COLLAGEN DEPOSITION

N. F. Francisco¹, A. C. Senegaglia¹, P. R. S. Brofman¹, L. Fracaro¹

¹Core for Cell Technology, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Introduction: Mesenchymal stromal cells (MSC) are adult, multipotent cells that maintain their ability to self-renew and differentiate into several cell lineages. They are essential for the maintenance of tissues and organs and can be found in several sources, such as umbilical cord tissue (UCTSC), adipose tissue (ADSC), and dental pulp (DPSC). The capacity for chondrogenic differentiation in vitro of these MSC sources has been studied due to its possible clinical use. Identifying which MSC source is most suitable for each type of therapy is essential. In order to use MSC in the treatment of joint injuries, this study compared the chondrogenic potential of three different sources of MSC (UCTSC, ADSC, and DPSC).

Methods: This study was approved by the Local Research Ethics Committee (5.080.289). MSC from three sources were isolated and cultivated in a high cell density pellet, treated with TGF- β 3 in hMSC Chondrogenic Differentiation medium (Lonza). After 21 days, samples were fixed in formalin 10%, and embedded in paraffin. The histological sections were stained with Toluidine Blue (TB) to identify proteoglycans and gaps; Masson's Trichrome (MAS) and Malory's Trichrome (MAL) to identify collagen deposition, and Picrosirius Red (PSR) to identify the deposits and collagen types (I and III). PSR and MAS stainings were quantified with ImageProPlus 5.1 and analyzed on GraphPad Prism 9.0.

Results: In the TB staining, qualitatively, it was possible to observe the gaps around the young chondrocytes, but the deposition of proteoglycans was not observed in all groups. After quantification in the MAS staining, when all groups were compared, there was a statistically significant difference ($p < 0.0001$) between DPSC vs. ADSC and UCTSC vs. ADSC. There was no significant difference between the DPSC vs. UCTSC ($p < 0.289$). For PSR staining, when comparing all groups, there was a statistically significant difference ($p < 0.0001$) between the DPSC vs. UCTSC and ADSC vs. UCTSC. No significant difference was observed between the DPSC vs. ATSC ($p = 0.102$). About collagen III, statistically significant difference ($p < 0.0001$) was observed between the DPSC vs. UCTSC and ATSC vs. UCTSC. No significant difference was found between the DPSC vs. ADSC ($p < 0.051$).

Conclusion: Complementary staining protocols were used to assess chondrogenic differentiation and compare the three sources. When collagen deposition was evaluated, the UCTSC presented better results in the induction of chondrogenic differentiation. We could also observe that the TB staining used as a standard for the MSCs characterization was not the most informative among the others (MAS, MAL, PRS).

Keywords: Differentiation, Toluidine blue staining, Picrosirius red staining, Masson's trichrome staining, Mallory's trichrome staining

Publicado na revista Cytotherapy – Fator de impacto: 6.196 (2021).

Volume 24, Issue 10, Supplement S10-S11 - Abstracts of the XII Congress of ABTCel-

Gen. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1465-3249\(22\)00869-6](https://doi.org/10.1016/S1465-3249(22)00869-6)

CYTOTHERAPY®

THE OFFICIAL JOURNAL OF ISCT® INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELL & GENE THERAPY



CHONDROGENIC POTENTIAL OF DIFFERENT SOURCES OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS EVALUATED BY COLLAGEN DEPOSITION

N.F. Francisco, A.C. Senegaglia, P.R.S. Brofman, L. Fracaro

Published in issue: October 2022

S10-S11

[PDF](#)

Anexo 2

Apresentação dos resultados parciais no III Simpósio Araucária (2022).



AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO COLÁGENA DE DIFERENTE FONTES DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS APÓS INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGENICA

Nathália Forti Francisco¹, Alexandra Cristina Senegaglia¹, Paulo Roberto Slud Brofman¹, Leticia Fracaro¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Núcleo de Tecnologia Celular, Curitiba, Paraná, Brasil.

E-mail: nathalia.francisco@pucpr.edu.br

Células estromais mesenquimais (CTM) são células adultas, multipotentes com potencial de autorrenovação e diferenciação em várias linhagens. Podem ser encontradas em fontes como, tecido do cordão umbilical (CTM-TCU), tecido adiposo (CTDA), polpa dentária (DPSC) e medula óssea (CTM-MO). O potencial da condrogênese *in vitro* das CTM tem sido estudado devido ao seu uso clínico, logo identificar qual fonte de CTM é mais adequada para cada tipo de terapia é essencial. Este estudo comparou o potencial condrogênico por deposição de colágeno nas fontes de CTM citadas. Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, as CTM foram isoladas e cultivadas em micromassa, com meio específico e TGF- β 3. Após 21 dias, as amostras foram fixadas e os cortes histológicos foram corados com Azul de Toluidina (TB) para identificação de proteoglicanos e lacunas; Tricrômico de Masson (MAS) e Tricrômico de Malory (MAL) para identificar a deposição de colágeno total e Picrosirius Hematoxilina (PS) para identificar a deposição e os tipos de colágeno I e III. Na coloração de TB, observou-se lacunas ao redor dos condrócitos jovens, mas a deposição de proteoglicanos não foi observada. Na coloração de MAL observou-se a deposição colágena, mas a quantificação não pode ser realizada pela semelhança de tons entre células e fibras colágenas. A quantificação da coloração de MAS apresentou diferença estatística na deposição de colágeno entre DPSCxCTDA, CTM-TCUxCTDA, CTM-MOxDPSC, CTM-MOxCTM-TCU e CTM-MOxCTDA. Para coloração PSR, houve diferença estatística na deposição de colágeno tipo I entre CTDAxCTM-TCU, DPSCxCTM-TCU, CTM-TCUxCTM-MO, CTDAxCTM-MO e DPSCxCTM-MO; e colágeno tipo III, entre DPSCxCTM-TCU, CTDAxCTM-TCU, CTM-TCUxCTM-MO, CTDAxCTM-MO, DPSCxCTM-MO. Neste estudo, quando avaliada a deposição de colágeno por protocolos complementares de colorações, observamos que as CTM-MO apresentaram melhores resultados. Pudemos observar também que a coloração de TB utilizada como padrão para caracterização das CTM não foi a mais informativa quando comparada com as demais.

Palavras-chave: Condrogênese; micromassa; colágeno

Anexo 3

Apresentação dos resultados parciais no 1º Encontro de Rotas Biotecnológicas (2022).



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

Avaliação do potencial condrogênico de diferentes fontes de células estromais mesenquimais para tratamento de lesões articulares

dos autores:

Nathália Forti Francisco, Alexandra Cristina Senegaglia, Paulo Roberto Slud Brofman, Letícia Fracaro

foi apresentado na forma de PÔSTER RESUMO no Encontro de Rotas Biotecnológicas – Terapias e Diagnósticos Avançados realizado no período de 18 a 20 de outubro de 2022, na Federação das Indústrias do Estado do Paraná – Fiep, Curitiba-PR.

Curitiba, 27 de outubro de 2022.



João Arthur Mohr
Gerente de Assuntos Estratégicos
Federação das Indústrias do Estado do Paraná – Fiep



Prof. Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho
Coordenadora Científica do Encontro de Rotas Biotecnológicas – Terapias e Diagnósticos Avançados