Isabele Camargo Brindo da Cruz

**Efeito terapêutico da administração de células tronco mesenquimais
estimuladas com colágeno V na cartilagem articular de coelhos com
osteoartrite**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Walcy Paganelli
Rosolia Teodoro

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cruz, Isabele Camargo Brindo da

Efeito terapêutico da administração de células tronco mesenquimais estimuladas com colágeno V na cartilagem articular de coelhos com osteoartrite / Isabele Camargo Brindo da Cruz . -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas.

Orientador: Walcy Paganelli Rosolia Teodoro.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Colágeno tipo V 3.Osteoartrite 4.Coelhos
5.Cartilagem 6.Técnicas de cultura de células

USP/FM/DBD-096/17

Aos meus pais, Valéria de Camargo Brindo da Cruz e Mauricio Brindo da Cruz, pela orientação, por acreditarem em mim e proporcionarem sempre o melhor a mim e aos meus irmãos. Vocês são minha eterna admiração.

Aos meus irmãos, Daniel Camargo Brindo da Cruz e Maria Clara Vieira Cruz (*in memoria*), por me apoiarem, pelas risadas e confissões em todos os momentos de minha vida.

Ao meu namorado Rafael Rinaldini Rodrigues, por seu companheirismo, compreensão e suporte nos momentos mais frágeis.

À minha tia Nenê, Márcia de Camargo, pelo amor que me acompanha desde o anúncio da minha existência e por acreditar no meu melhor.

Às minhas irmãs de coração, Nalim, Lilo e Marie, a quem sou eternamente grata pelo companheirismo e pela felicidade mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro por sempre ter acreditado no meu potencial, por ter me dado a oportunidade de crescimento profissional, pela confiança e amizade ao longo da minha jornada.

À Dra Ana Paula Pereira Velosa pela sua paciência, participação e auxílio constantes, por estar sempre disposta a esclarecer dúvidas e a clarear minha mente, além da de sua humildade e amizade em todo esse período.

À Ms. Solange Carrasco por ter me ensinado os princípios de cultura de células, pela amizade e por ter se tornado alguém de grande confiança.

Ao Dr Ricardo Fuller por suas incríveis considerações, pela visão ampla sobre o trabalho e por acreditar no potencial deste estudo.

À Professora Dra Vera Luiza Capelozzi pela sua atenção, disponibilidade, carisma e conhecimento que foram essenciais para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Dr Samuel Katsuyuki Shinjo pelas suas considerações bastante importantes para a melhora deste trabalho e pelo apoio prestado além do laboratório, à quem sou imensamente grata.

Às professoras Dra Eloisa Bonfá e Dra Rosa Maria Rodrigues Pereira pela oportunidade dada a mim para a realização deste trabalho e pelo meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Biotério da Disciplina de Reumatologia, Pesquisador Antonio dos Santos Filho, Valter Marques da Silva e Valdeci Francisco da Silva e, aos funcionários do Centro de Bioterismo da FMUSP, Dr Eduardo Pompeu, Vicente de Paula Silveira e Claudionor Donizete Vidotti pelo grande auxílio na manutenção, manipulação e experimentação animal, que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

À Dra Denise Frediane Barbeiro, por dedicar seu tempo a me auxiliar na Biologia Molecular e ser sempre prestativa.

Aos amigos pesquisadores dos laboratórios de Matriz Extracelular e Imunologia Celular, Silvana Ramos Atayde, Tatiana Vasconcelos Peixoto, Lais Araújo dos Santos, Vanessa Martins, Marcelo Antunes, Isadora Begalli Mendes, Natasha Ugriumov, Priscila Cristina Andrade, Jurandir Tomaz, Verônica Protoceovich Toledo, Sara Xavier, Jackeline Couto Alvarenga, Marilda Guimarães, pelo companheirismo, pela amizade e pelo suporte sempre prestados.

Às queridas Maria Aparecida A. Ferraz, Juraci Pereira e Ângela Maria de Souza por toda ajuda.

A todos meus familiares e amigos,

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.
(Artur Schopenhauer)

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ASPECTOS GERAIS DA OSTEOARTRITE	1
1.2	CARTILAGEM ARTICULAR	4
1.2.1	Constituição da cartilagem articular	4
1.2.2	Colágeno	7
1.2.3	Colágeno na cartilagem articular	12
1.2.4	Proteoglicanos na cartilagem articular	15
1.2.5	Histoarquitetura e homeostase da cartilagem articular	18
1.3	CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA	21
1.4	ASPECTOS GERAIS DA TERAPEUTICA NA OSTEOARTRITE	25
1.5	CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	27
1.5.1	Células tronco mesenquimais e osteoartrite	31
1.6	COLÁGENO TIPO V	33
2	OBJETIVO	37
3	MÉTODOS	38
3.1	ANIMAIS	38
3.2	COLETA DO TECIDO ADIPOSOS	38
3.2.1	Obtenção das células tronco mesenquimais de coelhos	39
3.2.2	Caracterização das células tronco mesenquimais de coelhos	40
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO TIPO V	42
3.3.1	Padronização da concentração de colágeno tipo V em cultura de células tronco mesenquimais de coelhos	44
3.3.2	Avaliação do potencial condrogênico das células tronco mesenquimais de coelhos estimuladas com colágeno V em cultura	45

3.4	INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE.....	50
3.4.1	Protocolo terapêutico	51
3.4.2	Coleta das articulações	53
3.4.3	Avaliação da espessura da cartilagem	53
3.4.4	Avaliação da densidade de condrócitos.....	54
3.4.5	Avaliação dos proteoglicanos.....	55
3.4.6	Avaliação do processo de apoptose celular na cartilagem	58
3.4.7	Avaliação do colágeno tipo II na cartilagem	59
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
4	RESULTADOS.....	63
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS ADSCs DE COELHOS	63
4.1.1	Análise do Potencial de Diferenciação.....	63
4.1.2	Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Imunofluorescência	65
4.2	ANÁLISE DA DOSE/RESPOSTA PARA COLÁGENO V EM CULTURA DE ADSCs.....	67
4.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CONDROGÊNICO DAS ADSCs DE COELHOS ESTIMULADAS COM COLÁGENO V	69
4.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COLÁGENO DO TIPO II PELAS ADSCs DE COELHOS ESTIMULADAS COM COLÁGENO V, COMPARADA A OUTROS ESTÍMULOS	71
4.5	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO COLÁGENO DO TIPO II NAS ADSCs DE COELHOS	73
4.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES COL2A1, ACAN E POU5F1 NAS ADSCs ESTIMULADAS COM COLÁGENO DO TIPO V	73
4.7	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO EFEITO DA TERAPÊUTICA CELULAR NA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA	76
4.8	ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PARAMETROS MORFOLÓGICOS APÓS A TERAPÊUTICA CELULAR NA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA.....	78
4.8.1	Aumento da Espessura Cartilaginosa Após a Terapia Celular	78
4.8.2	Aumento da Celularidade Após a Terapia Celular	80

4.9	ANÁLISE MORFOLÓGICA DA TERAPIA CELULAR NOS	
	PROTEOGLICANOS DA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA.....	82
4.9.1	Terapia com ADSCs estimuladas com colágeno V induz o aumento de proteoglicanos na cartilagem osteoartrítica.....	82
4.10	ANÁLISE DA TERAPIA CELULAR NA SÍNTESE DO COLÁGENO	
	DO TIPO II NA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA POR	
	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	85
4.10.1	Terapia com ADSCs estimuladas com colágeno V induz a síntese de colágeno II na cartilagem osteoartrítica	85
4.11	ANÁLISE DA TERAPIA CELULAR NO MECANISMO DE APOPTOSE	
	DA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA POR IMUNOHISTOQUÍMICA	87
4.11.1	Terapia com ADSCs estimuladas com colágeno V diminui a expressão de Fas-L na cartilagem osteoartrítica	87
5	DISCUSSÃO.....	89
6	CONCLUSÃO	95
7	ANEXO	96
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da cartilagem articular.....	6
Figura 2 – Representação tridimensional da cartilagem articular e divisão histológica.	6
Figura 3 – Esquema ilustrativo da estrutura molecular de colágeno fibrilar.....	11
Figura 4 – Diagrama esquemático da biossíntese dos colágenos fibrilares.....	11
Figura 5 – Ilustração da estrutura molecular do colágeno do tipo IX.	14
Figura 6 – Modelo da fibrila heterotípica de colágeno na cartilagem.	15
Figura 7 – Ilustração do agregado de agregcano.	17
Figura 8 – Tipos de matriz e seus componentes.....	20
Figura 9 – Cartilagem hialina corada com Hematoxilina-Eosina (H&E) e esquema representativo da morfologia e estrutura nas suas diferentes zonas.	21
Figura 10 – Ilustração da cartilagem articular saudável e afetada pela Osteoartrite.	25
Figura 11 – Imagem ilustrativa dos tipos de células tronco e suas principais fontes de obtenção.....	28
Figura 12 – Desenho esquemático da constituição do colágeno tipo V.	34
Figura 13 – Tricotomia (A) e lipectomia (B) na região interescapular de coelho Nova Zelândia Branco, para a obtenção de células tronco mesenquimais.....	39
Figura 14 – Imunoblot para colágeno V padrão comercial.	44
Figura 15 – Imagem representativa da análise de imagens pelo <i>software Image-Pro Plus 6.0</i> , mostrando a imunomarcagem do colágeno do tipo II no precipitado celular (verde fluorescente) e delimitação da área imunomarcada (vermelho) para quantificação.....	47
Figura 16 – Indução de osteoartrite em coelho por menissectomia parcial na região lateral do joelho direito.....	51
Figura 17 – Injeção intra-articular administrada nos grupos tratados com ADSCs e ADSCs/ColV, após a cirurgia de indução de osteoartrite com reforços mensais por 22 semanas.....	52
Figura 18 – Esquema do delineamento do estudo.	52
Figura 19 – Esquema da coleta de material.....	53
Figura 20 – Ilustração da análise da espessura da cartilagem pelo <i>Software Image-Pro Plus 6.0</i>	54

Figura 21 – Ilustração da contagem de condrócitos pelo <i>Software Image-Pro Plus 6.0</i> , pelo método estereológico de contagem de pontos (<i>point-counting method</i>).	55
Figura 22 – Ilustração da análise dos proteoglicanos da cartilagem pelo <i>Software Image-Pro Plus 6.0</i> , utilizando os recursos de seleção de cores.	57
Figura 23 – Ilustração da contagem de condrócitos em apoptose, marcados pelo FasL, através do <i>Software Image-Pro Plus 6.0</i> , pelo método estereológico de contagem de pontos (<i>point-counting method</i>).	59
Figura 24 – Ilustração da imunomarcacão do Colágeno II e quantificacão através do <i>Software Image-Pro Plus 6.0</i>	61
Figura 25 – Caracterizacão de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo através da diferenciacão em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.	64
Figura 26 – Micrografias eletrônicas (A-H) e imunomarcacão (I-L) de cultura de células tronco mesenquimais.	66
Figura 27 – Imunofluorescência para vimentina, CD34, colágenos I, II e III em ADSCs controle e após estímulo com colágeno V.	68
Figura 28 – Coloraçã para proteoglicanos e colágeno e, imunofluorescência para proteína de formacão óssea em ADSCs controle e após estímulo com colágeno V.	70
Figura 29 – Imunofluorescência para colágeno do tipo II em ADSCs controle e estimuladas com ColV, ColV+TGF- β 1, TGF- β 1, ColII e ColII+ TGF- β 1.	72
Figura 30 – Representaçã gráfica da quantidade relativa da expressã dos genes COL2A1, POU5F1 e ACAN de ADSCs sem estímulo e cultivadas com TGF- β 1 e ColV por qRT-PCR.	75
Figura 31 – Fotos representativas do cõndilo do joelho direito dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V, corados em H&E e avaliados por microscopia óptica.	77
Figura 32 – Fotos representativas da cartilagem articular do cõndilo direito dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V corados com Safranina-O/fast green.	84
Figura 33 – Imunofluorescência para colágeno do tipo II da cartilagem articular do cõndilo direito dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V.	86
Figura 34 – Imunohistoquímica da cartilagem articular do cõndilo direito dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V imunomarcados com Fas-L.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de colágenos, genes e estrutura molecular.	9
Tabela 2 – Classificação dos tipos de colágenos e estrutura supramolecular.....	10
Tabela 3 - Sequência de oligonucleotídeos.	49
Tabela 4 - Quantificação relativa da expressão dos genes COL2A1, POU5F1 e ACAN e em ADSCs cultivadas sem estímulo (controle), estimuladas com TGF- β 1 e com colágeno V.....	76
Tabela 5 - Medida da espessura da cartilagem expressa em % de células/ μm^2 no côndilo e platô dos joelhos direito (JD) e esquerdo (JE) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V avaliados através da coloração de H&E.	78
Tabela 6 - Contagem de condrócitos na cartilagem expressos em % de células/ μm^2 no côndilo e platô dos joelhos direito (JD) e esquerdo (JE) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V avaliados através da coloração de H&E.	80
Tabela 7 - Quantificação da perda de proteoglicanos na cartilagem articular no côndilo e platô dos joelhos direito (JD) e esquerdo (JE) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V, avaliados através da coloração de Safranina O/fast green e expressos em fração de área (%).....	83
Tabela 8 - Análise quantitativa da síntese colágeno do tipo II no côndilo do joelho direito (JD) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V por imunofluorescência.....	85
Tabela 9 - Quantificação da expressão de Fas-L no côndilo do joelho direito (JD) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V por imunohistoquímica.	87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise gráfica da quantificação do colágeno do tipo II por imunofluorescência das ADSCs cultivadas com DMEM suplementado e estimuladas com Col V.....	73
Gráfico 2 - Representação gráfica da espessura da cartilagem articular dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V.	79
Gráfico 3 - Representação gráfica da porcentagem de condrócitos da cartilagem articular dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V.....	81

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor que
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
µm ²	micrômetro quadrado
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
g	grama
h	hora
kD	quilodalton
kg	quilograma
kV	quilovolt
M	Molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	Milimolar
N	Normalidade
Na ⁺	Sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
rcf	força centrífuga relativa
rpm	rotação por minuto
v/v	volume por volume
α	alfa
β	beta

LISTA DE SIGLAS

ACAN	Gene do agrecano
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ADSCs	<i>Adipose Derived Stem/Stromal Cells</i>
AH	Ácido hialurônico
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
ASCs	<i>Adult Stem Cells</i>
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i>
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDMPs	<i>Cartilage-derived morphogenic proteins</i>
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Col V	Colágeno tipo V
Col	Colágeno
COL11A2	Gene da cadeia alfa 2 do colágeno do tipo XI
COL2A1	Gene da cadeia alfa 1 do colágeno do tipo II
COMP	Proteína oligomérica da matriz cartilaginosa
COPCORD	<i>Community Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindole
DC	Domínio colagenoso
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMOAD	<i>Disease-modifying osteoarthritis drug</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESCs	<i>Embryonic Stem Cells</i>
FACIT	Colágeno associado à fibrilas com tripla hélice interrompida
FasL	Fas ligante
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAG	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
H&E	Hematoxilina & Eosina
HCl	Ácido clorídrico
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HSCs	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>
Hyl	Hidroxilisina
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
JD	Joelho direito
JE	Joelho esquerdo
K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MAGP-1	<i>Microfibril-associated glycoprotein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEC	Matriz Extracelular
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
Mi	Mitocôndria
MMPs	Metaloproteinases
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>

N	Núcleo
NBT	<i>Nitro-blue tetrazolium chloride</i>
NC	Não colagenoso
Nu	Nucléolo
OA	Osteoartrite
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PG	Proteoglicanos
pH	potencial hidrogeniônico
POU5F1	POU domain, class 5, transcription factor 1
PRP	Plasma rico em plaqueta
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
RE	Retículo Endoplasmático
RGD	<i>Arginylglycylaspartic acid</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RUNX	<i>Runt-related transcription factor</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOX9	<i>SRY-related high mobility group-box gene 9</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIMPs	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VP	Vesículas pinocíticas
WAT	<i>White Adipose Tissue</i>
β -TCP	Beta fosfato tricálcio

RESUMO

Cruz ICB. Efeito terapêutico da administração de células tronco mesenquimais estimuladas com colágeno V na cartilagem articular de coelhos com osteoartrite [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: As células-tronco são células indiferenciadas que apresentam capacidade de auto renovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, o que proporciona uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, possui também, a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares. Desta forma, acredita-se que células tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria. Atualmente tem aumentado o número de estudos que envolvem a utilização de células tronco mesenquimais de tecido adiposo (ADSCs) na medicina regenerativa e curativa, estando o avanço desta terapia ligado à identificação de mecanismos e de moléculas que controlam e mediam a diferenciação de uma linhagem específica. Entre estas moléculas está o colágeno, proteína estrutural responsável pelas propriedades mecânicas, forma e organização tecidual. Dentre os 28 tipos de colágeno, o tipo V (Col V) e o XI são considerados nucleadores da fibrilogênese e modulam a adesão e proliferação celular. Além disso, o Col V é altamente expresso em tecido embrionário, sugerindo que ele possa atuar na interação célula-matriz no remodelamento e reparo de tecidos lesados, como a cartilagem. Dentre as doenças com acometimento articular, a osteoartrite (OA) é considerada a artropatia mais comum e, ainda, sem tratamento eficaz, culminando, em casos avançados, em intervenção cirúrgica. Estudos recentes mostram que as ADSCs seriam uma alternativa no restabelecimento do tecido cartilaginoso. Por esta razão a proposta do estudo foi avaliar a resposta das ADSCs, frente ao estímulo com Col V *in vitro*, e se o transplante autólogo dessas células poderia apresentar um efeito na regeneração da cartilagem articular na OA induzida em coelhos. **Métodos:** Foram cultivadas ADSCs, derivadas do tecido adiposo de coelhos (CEUA 123/14), estimuladas com Col V, para a avaliação da síntese dos principais componentes da matriz cartilaginosa: proteoglicanos e colágeno II. A preservação do fenótipo celular frente ao estímulo com Col V foi avaliada através da expressão do colágeno dos tipos I, II, III, CD34 e vimentina e dos genes COL2A1, ACAN e POU5F1. Os animais (n=24) foram submetidos à indução de OA, por menissectomia parcial, e divididos nos grupos: **OA** (n=8), sem tratamento; **OA/ADSCs** (n=8), tratado com injeções mensais de ADSCs, e **OA/ADSCs/V** (n=8), tratado com injeções mensais de ADSCs, estimuladas previamente com Col V. As articulações foram coletadas após 22 semanas, descalcificadas e coradas com Hematoxilina e Eosina para histomorfometria da celularidade e espessura da cartilagem, perda de proteoglicanos pela Safranina O/*Fast green* e imunomarcação para colágeno II e Fas-L, usando o *software Image Pro-Plus 6.0®*. **Resultados:** As células estimuladas com Col V apresentaram-se negativas para colágeno I, III e CD34 e positivas para vimentina, colágeno total e proteoglicanos *in vitro*. Ainda, foi obtido um aumento significativo da expressão de colágeno II e dos genes COL2A1 e ACAN e a expressão de POU5F1 não foi significativa após estímulo. A análise morfológica da cartilagem indicou aumento da quantidade de condrócitos, da espessura da cartilagem e diminuição da perda de proteoglicanos nos grupos **OA/ADSCs/V** e **OA/ADSCs**, em relação ao grupo **OA**. Também foi observado um aumento da quantidade de colágeno II e diminuição de condrócitos apoptóticos no grupo **OA/ADSCs/V**. **Conclusão:** O Col V atua como mediador da condrogênese *in vitro*, estimulando colágeno II e proteoglicanos, além de aumentar a expressão dos

genes COL2A1 e ACAN. A terapia com ADSCs estimuladas com Col V atenuou significativamente o processo osteoartrítico em coelhos, sugerindo uma nova perspectiva para o tratamento da OA.

Descritores: células-tronco; colágeno tipo V; osteoartrite; coelhos; cartilagem; técnicas de cultura de células.

ABSTRACT

Cruz ICB. Therapeutic effect of the administration of mesenchymal stem cells stimulated with collagen V in the articular cartilage of rabbits with osteoarthritis [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Stem cells are undifferentiated cells that are capable of self-renewal, that is, they are capable of multiplying maintaining their undifferentiated state, which provides an active replacement of their population in a constant way in the tissues; stem cells also have the ability to differentiate into several cell types. Thus, it is believed that stem cells present in tissues have a regenerative role when they suffer an injury. The number of studies involving the use of adipose-derived stem cells (ADSCs) in regenerative medicine has increased and the progress of this therapy is linked to the identification of mechanisms and molecules that control and mediate the specific lineage's differentiation. Collagen is among these molecules and it is a structural protein responsible for the mechanical properties, shape and tissue organization. Among 28 types of collagen, type V (Col V) and XI are considered nucleators of fibrillogenesis and they modulate cell adhesion and cell proliferation. In addition, Col V is highly expressed in embryonic tissue, suggesting that it may act on cell-matrix interaction in remodeling and repair of damaged tissues such as cartilage. Osteoarthritis (OA) is the most common arthropathy among the diseases with joint involvement and, it has no effective treatment that results in surgical intervention in advanced cases. Recent studies show that ADSCs would be an alternative in restoring cartilaginous tissue. Therefore, the aim of this study was to evaluate the response of ADSCs to the Col V stimulus *in vitro* and the effect of these autologous cells on the regeneration of articular cartilage of rabbits with OA. **Methods:** ADSCs from rabbit (CEUA 123/14) were cultured with Col V to evaluate the synthesis of the main components of the cartilaginous tissue as proteoglycans, collagen type II. The preservation of the cellular phenotype was evaluated through the collagen I, II, III, CD34 and vimentin expression and COL2A1, ACAN and POU5F1 genes. Rabbits (n=24) were submitted to OA induction through partial meniscectomy and divided into the following groups: **OA** (n=8), without treatment; **OA/ADSCs** (n=8), treated with monthly injections of ADSCs and **OA/ADSCs/V** (n=8), monthly injections of ADSCs previously treated with Col V. Joints were collected after 22 weeks, decalcified and stained with H&E for cellular histomorphometry and cartilage thickness. Safranin O/fast green staining was used for proteoglycan evaluation and immunostaining for collagen type II and Fas-L expression using *Image Pro Plus 6.0 software*. **Results:** ADSCs stimulated with Col V were negative for collagen I, III and CD34 and positive for vimentin, total collagen and proteoglycans *in vitro*. Furthermore, a significant increase in the expression of collagen II, COL2A1 and, ACAN genes was obtained, but the POU5F1 gene expression was not significant after stimulation. Morphological analysis of cartilage indicated increased in the number of chondrocytes, cartilage thickness, and decrease in loss of proteoglycans in the **OA/ADSCs/V** and **OA/ADSCs** groups, compared to the **OA** group. In addition, an increase in the amount of collagen II and decrease of apoptotic chondrocytes in the **OA/ADSCs/V** group was observed. **Conclusion:** Col V acts as a mediator of chondrogenesis *in vitro* stimulating collagen II, proteoglycans and COL2A1, ACAN

genes expression. Therapy with Col V-stimulated ADSCs significantly attenuate the osteoarthritic process in rabbits, suggesting a new perspective for the treatment of OA.

Descriptors: stem cells; collagen type V; osteoarthritis; rabbits; cartilage; cell culture techniques.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma enfermidade que envolve as articulações móveis e é caracterizada por estresse celular e degradação da matriz extracelular (MEC). O acometimento das articulações é gerado por micro e macro-lesões, que ativam respostas de reparação mal adaptativas, incluindo vias pró-inflamatórias da imunidade inata. A doença manifesta-se pela primeira vez como um desarranjo molecular (metabolismo do tecido articular anormal) seguido por anatômico, e/ou de distúrbios fisiológicos, caracterizada pela degradação da cartilagem, remodelação do osso, formação de osteófitos, inflamação das articulações e perda de função articular normal. Este processo resulta em danos ou total perda do tecido cartilaginoso, comprometendo suas propriedades biomecânicas, podendo ser acompanhado de alterações em outras estruturas articulares, como a sinóvia, menisco, ligamentos, gordura de Hoffa e músculos periarticulares ^{(1) (2) (3) (4) (5)}.

Segundo Burgos-Vargas e colaboradores (2014) e estudos feitos de acordo com a *World Health Organization/International League Associations for Rheumatology Community Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases* (COPCORD), a prevalência da OA no Brasil é de 4,1% ⁽¹⁾. Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2008, a OA é a artropatia mais frequente, correspondendo a 30-40% dos casos em ambulatórios de Reumatologia no Brasil, representando 7,5% dos casos totais de afastamento profissional e com 6,2% é a quarta doença determinante para aposentadoria.

Clinicamente, o sintoma mais comum da OA é a dor articular e está associada com a redução da qualidade de vida do paciente, provocando grande impacto na vida social e em atividades diárias, devido à morbidade decorrente da doença. Com o aumento da expectativa de vida, há a preocupação de investimento em pesquisas, visto que esta doença resulta na diminuição da força de trabalho e aumento da aposentadoria precoce pois compromete, em sua maioria, idosos e pessoas de meia idade ^{(6) (7)}. Pode-se ainda mencionar os grandes custos direcionados à reabilitação pela utilização de próteses, tratamento médico e/ou cirúrgico, hospitalização, incapacitação profissional, entre outros, caracterizando um impacto socioeconômico significativo ^{(8) (9) (10)}.

O joelho é a articulação mais comumente afetada pela doença, sendo que a prevalência é de 1770/100 mil homens e 2693/100 mil mulheres ⁽¹⁾. Segundo Palmer e Goodson (2015), a OA – de joelho - afeta mundialmente cerca de 2,5-7% indivíduos, com idade entre 45-59 anos e, 7-15% indivíduos com faixa etária entre 60-69 anos ⁽⁷⁾.

Embora a etiologia da OA seja desconhecida, existem alguns fatores que podem interferir negativamente para o desencadeamento da doença, sendo considerada uma condição multifatorial, sistêmica ou local. Os principais fatores sistêmicos incluem predisposição genética, predileção pelo sexo feminino, idade avançada, etnia, fatores hormonais, metabólicos e nutricionais. Estudos sugerem que a hiperglicemia e a hipercolesterolemia estão relacionadas ao aumento da frequência e da gravidade da doença, além disso, a falta de vitaminas C e D também podem contribuir para a progressão da OA ^{(2) (8) (9) (10) (11) (12)}. Apesar da predileção pelo sexo feminino, a prevalência das articulações acometidas, varia de acordo com o sexo, como por exemplo: o quadril é mais acometido em homens e, em mulheres, observa-se maior frequência de comprometimento isolado nas mãos e joelhos. A prevalência aumenta com o avanço da idade, sendo um risco tanto para a OA sintomática quanto radiográfica (> 40 anos em mulheres e > 50 anos em homens). Adicionalmente, existem estudos controversos a respeito de fatores hormonais, onde a maioria dos trabalhos sugere que a osteoporose, doença caracterizada pela perda de massa óssea, apresente efeito protetor no desencadeamento da OA, visto que, possivelmente, uma maior densidade mineral óssea está relacionada com o aumento da doença em joelhos, quadril e mãos e, que a reposição estrogênica não apresenta significância estatística na proteção de joelhos sobre o desenvolvimento da OA ^{(8) (13)(14)}.

A obesidade, fraqueza muscular, lesões e sobrecarga articular são fatores biomecânicos locais que interferem no funcionamento efetivo da articulação. Considerando-se que a OA de joelho possui uma prevalência de quatro a cinco vezes maior em indivíduos obesos, além do desenvolvimento precoce de sintomas clínicos e avanço de OA radiográfica mais grave, muitas vezes por lesões como ruptura do ligamento cruzado anterior e deformidades adquiridas (ex. displasia acetabular, displasia do desenvolvimento do quadril, doença de Legg-Calvé-Perthes, entre outras). Ainda, a ausência de prática de exercícios ou dano articular causado por intensa atividade física pode levar ao aumento da pressão nas articulações ^{(2) (8) (9) (11) (12) (14)}.

A OA pode ser classificada como uma doença primária ou idiopática, quando não há a identificação de fatores predisponentes ou, secundária, quando existem agentes locais ou sistêmicos que alteram as características biomecânicas da articulação que favorecem a perda da função articular, comprometendo seu funcionamento adequado. Ainda, a OA, primária ou secundária, pode ocorrer de maneira localizada ou generalizada. A forma localizada corresponde ao acometimento de até dois grupos articulares, como por exemplo, na OA idiopática localizada pode-se ter o acometimento de articulações periféricas, como mãos e pés. A forma generalizada se caracteriza pelo acometimento de três ou mais grupos articulares, sendo que na OA idiopática generalizada há denominações próprias como, por exemplo, osteoartrose nodal (doença de Kellegren) e hiperostose esquelética difusa idiopática. A forma secundária da doença geralmente acomete poucas articulações, como as que suportam carga, entre elas: joelhos, coxofemorais e coluna vertebral ^{(8) (11) (14)}.

Além da dor, é bastante comum o paciente apresentar rigidez matinal de curta duração, limitação de movimento e, em estágio avançado da doença, instabilidade da articulação acometida ⁽⁸⁾.

O padrão de dor, conhecido como mecânico-desencadeado pelo uso da articulação, é utilizado como diagnóstico diferencial, pois ao contrário do observado em doenças articulares inflamatórias (ex. artrite reumatoide), a dor aparece com o início do movimento e tende a melhorar com o repouso. Entretanto, em alguns casos de OA há inflamação sinovial aguda ou subaguda, caracterizando, eventualmente, dor inflamatória ^{(8) (14)}.

Os mecanismos de dor na OA podem ser causados por diversos fatores como periostite nos locais de remodelamento ósseo, inflamação da sinóvia, microfraturas subcondrais, aumento da pressão vascular no osso subcondral, compressão de nervos por osteófitos, distensão da cápsula articular, entre outros ^{(8) (14)}.

A rigidez matinal de curta duração (menor que 15 minutos) também é um fator que auxilia no diagnóstico, pois enquanto que na OA ela dura alguns minutos, em doenças inflamatórias sua duração pode ultrapassar o período de uma hora ^{(8) (14)}.

Com a progressão da OA, pode haver a limitação de movimento e instabilidade articular, decorrente de fatores como bloqueio mecânico, causado pela presença de osteófitos ou corpos livres intra-articulares ^{(8) (14)}.

Geralmente, é possível notar o aumento do volume articular, crepitações das articulações à mobilização, limitação de movimento e atrofia muscular durante o exame físico do paciente. A alteração do volume articular pode estar associada ao aumento na quantidade de líquido sinovial (derrame), caracterizando uma sinovite secundária ou, pela presença de osteófitos. As crepitações são presentes em mais de 90% dos pacientes com OA de joelhos e resultam da perda do tecido cartilaginoso e da irregularidade das superfícies articulares opostas; adicionalmente, estas características, junto com a formação de osteófitos e espasmo ou contratura da musculatura periarticular comprometem a amplitude de movimento articular. Ainda, o enfraquecimento muscular está associado às formas mais graves de acometimento de joelho, devido à redução de mecanismos protetores musculares e instabilidade da articulação ⁽⁸⁾.

A presença de sinais inflamatórios durante o exame físico é menos frequente, com pouco edema local e calor e, em alguns casos, acompanhado de derrame intra-articular. Nas formas mais graves da doença, nota-se a presença de deformidades e subluxação, resultante da perda do tecido cartilaginoso, colapso do osso subcondral, formação de cistos/calos ósseos etc ⁽⁸⁾.

1.2 CARTILAGEM ARTICULAR

1.2.1 *Constituição da cartilagem articular*

A cartilagem articular, ou cartilagem hialina, é um tecido denso e avascular, cuja principal função é absorver e dissipar as cargas mecânicas nas articulações. Sua nutrição é mediada por forças mecânicas (movimento), que permitem a passagem de substâncias, por difusão, do líquido sinovial. Este tecido é constituído por aproximadamente 5% de células, denominadas condrócitos, que são responsáveis pela síntese e manutenção da MEC intersticial, sendo considerado, por esta razão, o centro metabólico deste tecido (Figura 1) ^{(10) (11) (15)}.

A MEC intersticial é abundante e basicamente composta por colágeno e proteoglicanos, as principais macromoléculas, outras proteínas não collagenosas e água. O colágeno e proteoglicanos representam aproximadamente 10-30% e 5-10%, respectivamente, do peso seco do tecido. A água representa cerca de 65-85% e, é nela que estão adsorvidos sais inorgânicos, como o Na⁺, Ca²⁺, KCl (Figura 1) ^{(11) (15)}.

A cartilagem articular morfologicamente é dividida em zonas: superficial, de transição, profunda e calcificada, que diferem entre si na orientação e densidade celular, assim como na distribuição dos proteoglicanos e na organização espacial da rede fibrilar de colágeno ^{(4) (10)} (Figura 2).

A zona superficial ou tangencial é a região periférica, onde ocorre o deslizamento da articulação e apresenta condrócitos alongados, pequena quantidade de proteoglicanos e, ao contrário, elevada quantidade de fibras de colágeno, densamente compactadas e distribuídas paralelamente à superfície. Embora essa região apresente maior quantidade de condrócitos do que as outras, estes parecem estar metabolicamente inativos, tornando o reparo tecidual mais difícil neste local (Figura 2) ^{(4) (10) (15)}.

A zona de transição é caracterizada pela disposição das fibras de colágeno em rede, com direção oblíqua em relação à superfície, aumento da quantidade de proteoglicanos, distribuídos de forma homogênea, e por poucos condrócitos, com fenótipo arredondado, e organelas celulares metabolicamente ativas (ex. retículo endoplasmático granular, mitocôndria, complexo de Golgi), sugerindo maior capacidade de reparo tecidual (Figura 2) ^{(4) (10) (15)}.

A zona profunda possui menor quantidade de condrócitos, uma malha de fibras de colágeno, perpendicular à superfície articular e com distribuição variável de proteoglicanos, e pouca quantidade de água. Já a zona calcificada é constituída por uma matriz mineralizada com cristais de sais de cálcio, condrócitos escassos e hipertróficos e, uma quantidade reduzida de proteoglicanos. A zona calcificada é separada da profunda por uma zona ou linha basófila, denominada linha de crescimento, limite entre o osso subcondral e a cartilagem hialina, ancorando-a firmemente ao osso e contribuindo para a resistência da interface cartilagem/osso (Figura 2) ^{(4) (10) (15)}.

Figura 1 – Representação esquemática da cartilagem articular.

(A) Organização dos principais componentes da cartilagem articular da superfície à interface com o osso subcondral. (B) Articulação de joelho, mostrando a cartilagem articular recobrindo o osso subcondral do fêmur e da tíbia.

Figura 2 – Representação tridimensional da cartilagem articular e divisão histológica.

Imagem tridimensional (à esquerda) das zonas da cartilagem articular (superficial, transição, profunda e calcificada) e da linha de crescimento. À direita esquema representativo da organização dos condrocitos, colágeno e proteoglicanos nas diferentes zonas da cartilagem articular hialina. Adaptado de Hardin e col., 2015 ⁽¹⁶⁾.

1.2.2 Colágeno

O colágeno inclui uma família de glicoproteínas constituintes da MEC, importantes na manutenção da integridade estrutural e funcional dos tecidos, conferindo resistência aos mesmos, além de interagir e regular a proliferação, migração e diferenciação celular⁽¹⁷⁾.

Atualmente são descritos 28 tipos de colágeno (Tabela 1), nomeados com algarismos romanos (I-XXVIII) em ordem cronológica de descoberta. De acordo com a sua estrutura molecular e função, o colágeno é classificados em vários grupos: fibrilar, reúne os tipos de colágeno formadores de fibrilas (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII); associados a fibrilas, com tripla-hélice-interrompida (FACIT) (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII); formadores de rede (IV, VIII, X); filamentos frisados (VI, XXVI, XXVIII); de ancoragem (VII); transmembrana (XIII, XVII, XXIII, XXV) e tríplice hélice com múltiplos domínios (MULTIPLEXINS) (XV, XVIII) (Tabela 2)^{(17) (18) (19)}.

As moléculas de colágeno apresentam três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , com tamanho variável entre 662 até 3152 aminoácidos, entrelaçadas em forma de tripla hélice. Estas cadeias são formadas por uma série de repetições da sequência de Gly-X-Y, sendo Gly, glicina e X e Y geralmente prolina e 4-hidroxiprolina, respectivamente, que atribuem alto grau de estabilidade à molécula. As cadeias polipeptídicas podem ser homotrímeras, quando as três cadeias α são idênticas ou heterotrímeras, quando a composição das cadeias α diferem entre si, sendo estas as mais frequentes^{(17) (19) (20)}.

As pontes de hidrogênio intercadeia conferem às moléculas de colágeno uma alta estabilidade, rigidez e aspecto em forma de bastão. Ainda, o colágeno apresenta em sua composição duas regiões: uma fibrilar ou domínio colagenoso (DC), caracterizada pelo arranjo helicoidal das três cadeias polipeptídicas, e a não fibrilar ou domínio não colagenoso (NC), que não possui o arranjo tripla hélice helicoidal, podendo apresentar-se com disposição globular em alguns tipos de colágeno (Figura 3). As extensões terminais NC, definidas por sequências adicionais de 15 a 20 aminoácidos, são denominadas N (amino, NH₂) -propeptideo e C (carboxi, COOH) -propeptideo. O N-propeptideo exibe dados importantes para a regulação final do diâmetro das fibrilas de colágeno e, o domínio C-propeptideo apresenta informações essenciais para a formação da tríplice hélice^{(11) (19)}.

A biossíntese do colágeno é mais estudada nos colágenos fibrilares. Estes são sintetizados no retículo endoplasmático granular na forma de moléculas de pró-colágeno, formadas por um N-propeptídeo terminal, seguido por um curto N-telopeptídeo não helicoidal, uma tripla hélice central, um C-telopeptídeo e um C-propeptídeo terminal. Essas moléculas de pró-colágeno são alinhadas no complexo de Golgi e secretadas na MEC. Em geral, após secreção na matriz extracelular, os N-propeptídeos e C-propeptídeos terminais são removidos das cadeias alfa pelas N- e C-procolagenases, resultando em uma molécula nativa de tripla hélice, com dimensões aproximadas de 300nm de comprimento e 1.5nm de diâmetro (Figura 3; Figura 4). No processo de fibrilogênese, as moléculas de colágeno agregam-se segundo uma orientação cabeça-cauda, formando as fibrilas de colágeno ^{(18) (21) (22)}. Essas apresentam um padrão de bandeamento com uma periodicidade (D) que varia de 64nm a 67nm e, quando analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, revelam a presença característica de bandas claras e escuras (Figura 4) ⁽²³⁾.

Tabela 1 - Tipos de colágenos, genes e estrutura molecular.

Tipos de colágeno	Genes	Estrutura molecular	Outros
Tipo I	COL1A1, COL1A2	$\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)$ $\alpha 1(I)_3$	
Tipo II	COL2A1 (A, B)	$\alpha 1(II)_3$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo III	COL3A1	$\alpha 1(III)_3$	
Tipo IV	COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6	$\alpha 1(IV)_2\alpha 2(IV)$ $\alpha 3(IV)\alpha 4(IV)\alpha 5(IV)$ $\alpha 5(IV)_2\alpha 6(IV)$	
Tipo V	COL5A1, COL5A2, COL5A3	$\alpha 1(V)_2\alpha 2(V)^a$ $\alpha 1(V)_3$ $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo VI	COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL6A4, COL6A5, COL6A6	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$ $\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 4(VI)$ $\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 5(VI)$ $\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 6(VI)$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo VII	COL7A1	$\alpha 1(VII)_3$	
Tipo VIII	COL8A1, COL8A2	$\alpha 1(VIII)\alpha 2(VIII)$ $\alpha 1(VIII)_3$ $\alpha 2(VIII)_3$	
Tipo IX	COL9A1, COL9A2, COL9A3	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)_3$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo X	COL10A1	$\alpha 1(X)_3$	
Tipo XI	COL11A1(A,B,C), COL11A2, COL2A1(A) ^b	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo XII	COL12A1	$\alpha 1(XII)_3$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo XIII	COL13A1	$\alpha 1(XIII)_3$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo XIV	COL14A1	$\alpha 1(XIV)_3$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo XV	COL15A1	$\alpha 1(XV)_3$	
Tipo XVI	COL16A1	$\alpha 1(XVI)_3$	
Tipo XVII	COL17A1	$\alpha 1(XVII)_3$	
Tipo XVIII	COL18A1	$\alpha 1(XVIII)_3$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo XIX	COL19A1	$\alpha 1(XIX)_3$	
Tipo XX	COL20A1 ^c	$\alpha 1(XX)_3$	
Tipo XXI	COL21A1	$\alpha 1(XXI)_3$	
Tipo XXII	COL22A1	$\alpha 1(XXII)_3$	
Tipo XXIII	COL23A1	$\alpha 1(XXIII)_3$	
Tipo XXIV	COL24A1	$\alpha 1(XXIV)_3$	
Tipo XXV	COL25A1	$\alpha 1(XXV)_3$	<i>Splicing alternativo</i>
Tipo XXVI	COL26A1	$\alpha 1(XXVI)_3$	
Tipo XXVII	COL27A1	$\alpha 1(XXVII)_3$	
Tipo XXVIII	COL28A1	$\alpha 1(XXVIII)_3$	

Adaptado de Mecham, 2011 ⁽²⁴⁾.^a $\alpha 1(XI)$ e $\alpha 2(V)$ tem sido mostrados como formas heterotrímeras^b A cadeia alfa é conhecida como $\alpha 3(XI)$ quando montado como colágeno tipo XI^c Frango, humano não foi descrito

Tabela 2 – Classificação dos tipos de colágenos e estrutura supramolecular.

Classificação	Tipos de colágeno	Estrutura supramolecular
Colágenos fibrilares	I, II, III	Fibrilas estriadas
Reguladores de diâmetro de colágenos fibrilares	V, XI	Fibrilas estriadas, retem o domínio N-terminal, não colagenoso, regulatório
	XXIV, XXVII	Desconhecida
Colágenos FACIT^a	IX, XII, XIV	Associados à fibrilas, outras interações
Colágenos similares a FACIT	XVI, XIX, XXI, XXII	Região interfacial, zonas de membrana basal
Colágenos de membrana basal	IV	Rede em forma de arame com associação lateral
Colágenos que formam filamentos	VI	Filamentos anelados, rede
Fibrilas de Ancoragem	VII	Dímeros antiparalelos associados lateralmente
Colágenos formadores de rede	VIII, X	Reticulados hexagonais
Colágenos transmembrana	XIII, XVII, XXIII, XXV Gliomedinas, ectodisplasina	Transmembrana e domínios ecto solúveis
Colágenos múltiplos (endostatina-XV e XVIII)	XV, XVIII	Proteoglicanos de membrana basal, domínios C-terminal clivados influenciadores da angiogênese
Outras moléculas com domínios colagenosos	XXVI, XXVIII C1q, colectinas, acetilcolinesterase, adiponectina, proteína surfactante e outros	Domínios colagenosos em moléculas não colagenosas

Adaptado de Mecham, 2011 ⁽²⁴⁾^a Colágenos associados à fibrilas com tripla hélice interrompida

Figura 3 – Esquema ilustrativo da estrutura molecular de colágeno fibrilar.

Estrutura molecular de um colágeno fibrilar, mostrando a região fibrilar em tripla hélice e as porções terminais amina (N)- e carboxi (C)-propeptídeos. Após secreção na matriz extracelular, a maioria dos colágenos fibrilares perde os domínios terminais, devido à ação das enzimas N- e C-procolagenases. Adaptado de Gelse, 2003 ⁽¹⁸⁾.

Figura 4 – Diagrama esquemático da biossíntese dos colágenos fibrilares.

Biossíntese de colágeno fibrilar, como os tipos I, II e III. Esquema (à esquerda) mostrando a síntese do pró-colágeno no retículo endoplasmático granular, o alinhamento no aparelho de Golgi e secreção no espaço extracelular, onde os N- e C-propeptídeos terminais são clivados, formando as moléculas de colágeno. No processo de fibrilogênese, as moléculas de colágeno agregam-se segundo uma orientação cabeça-cauda (à direita), formando fibrilas de colágeno com dimensões aproximadas de 300nm de comprimento e 1.5nm de diâmetro e um padrão de bandeamento com periodicidade que varia de cerca de 67nm. Adaptado de Brückner, 2010 ⁽²³⁾.

1.2.3 *Colágeno na cartilagem articular*

Na matriz cartilaginosa, o colágeno é produzido pelos condrócitos e corresponde a cerca de 60% do peso seco tecidual. O colágeno dos tipos II, IX e XI são os principais constituintes das fibrilas heterotípicas na cartilagem articular; no entanto, outros tipos de colágeno podem ser encontrados, como III, VI, X, XII e XIV ^{(4) (10) (15) (25)}.

O tipo II é um colágeno fibrilar, apresenta-se na forma homotrímera, com três cadeias $\alpha 1(\text{II})$, com cerca de 300nm de comprimento e, é o mais abundante na cartilagem articular, correspondendo a cerca de 75% do colágeno total na cartilagem fetal e 80-95% no adulto (Figura 5). O colágeno do tipo II interage com proteoglicanos presentes na MEC, através das suas cadeias α , que possuem maior quantidade de hidroxilisina (Hyl) e resíduos glucosil-galactose ⁽¹⁸⁾.

O tipo IX é do grupo dos FACIT e heterotrímero, constituído de três cadeias α diferentes: $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$, $\alpha 3(\text{IX})$. Todas as cadeias contêm três domínios colagenosos tripla hélice (COL1, COL2, COL3), separados por domínios não colagenosos (NC1, NC2, NC3 e NC4), que formam uma estrutura retilínea com cerca de 190 nm de comprimento ⁽²⁶⁾ (Figura 5). Este colágeno apresenta-se associado à superfície das moléculas de colágeno II e XI, através de ligações covalentes. Sugere-se que o colágeno IX auxilie na ligação das fibrilas de colágeno II com outros componentes da MEC, particularmente os glicosaminoglicanos que possuem carga negativa, através de seu domínio catiônico NC4 da cadeia $\alpha 1(\text{IX})$. Em alguns tecidos este domínio é ausente e seu domínio NC3 da cadeia $\alpha 2(\text{IX})$ pode ser substituído por sulfato de condroitina, propondo-se desta forma, que o colágeno IX poderia ser considerado um proteoglicano (Figura 5). Na cartilagem embrionária o colágeno IX representa aproximadamente 10% do colágeno total, enquanto que na adulta apenas de 1-5% ^{(4) (15) (19) (27)}.

O colágeno do tipo XI é fibrilar e heterotrímero, com as três cadeias α diferentes [$\alpha 1(\text{XI})$, $\alpha 2(\text{XI})$, $\alpha 3(\text{XI})$]. Na cartilagem embrionária encontra-se numa proporção de cerca de 10% e na cartilagem adulta aproximadamente 3%. Durante a biossíntese, o colágeno XI difere de outros colágenos fibrilares, pois preserva o domínio globular amino-terminal (-NH₂ terminal). Este se localiza no interior das fibrilas de colágeno II e regula o diâmetro da fibrila heterotípica da cartilagem, através do domínio -NH₂ terminal que se encontra voltado para o exterior, impedindo fisicamente a ligação adicional de outras moléculas de colágeno II (Figura 6). Esta característica do colágeno

XI é muito importante, pois assegura a formação de fibrilas de colágeno finas no tecido cartilaginoso ^{(4) (11) (15) (19)}.

Os outros colágenos presentes na cartilagem articular, embora não específicos deste tecido, estão em menor proporção, mas não são menos importantes. O colágeno do tipo VI não é fibrilar, possui três cadeias α distintas [$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$], e é o mais caracterizado. Este encontra-se predominantemente em fibrocartilagem (ex. menisco), na matriz pericelular ao redor dos condrócitos e interage com diversas moléculas, como colágeno dos tipos I, II, IV, XIV, glicoproteínas associadas à microfibrilas (MAGP-1), decorina, heparina, fibronectina, entre outros, além de associar-se à fibrilas formando filamentos ^{(18) (24) (25)}. O colágeno do tipo X, homotrímero, com três cadeias $\alpha 1(X)$, foi identificado em filamentos e associado às fibrilas de colágeno do tipo II na cartilagem embrionária. Ainda, o tipo X é considerado um colágeno cartilagem-específico, devido à sua localização estar restrita a cartilagens hipertróficas adultas; desta forma, apesar de sua função não estar bem estabelecida, ele parece estar relacionado ao processo de calcificação na parte inferior da zona hipertrófica ^{(15) (24)}. Adicionalmente, pouca quantidade de colágeno do tipo III, homotrímero [$\alpha 1(III)_3$], também foi identificado na cartilagem articular em associação às fibrilas de colágeno do tipo II ⁽⁴⁾.

Figura 5 – Ilustração da estrutura molecular do colágeno do tipo IX. Esquema mostrando a estrutura molecular do colágeno tipo IX. Este colágeno apresenta três cadeias alfa diferentes [$\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$, $\alpha 3(\text{IX})$], as quais apresentam domínios colagenosos tripla hélice (COL1, COL2, COL3), separados por domínios não colagenosos (NC1, NC2, NC3 e NC4), que formam uma estrutura retilínea com cerca de 190 nm de comprimento. No domínio NC3 da cadeia $\alpha 2(\text{IX})$ encontra-se um sulfato de condroitina. O colágeno IX liga-se à superfície de moléculas de colágeno tipo II, através de ligações covalentes. Adaptado de Mwale e col, 2001 ⁽²⁸⁾.

Figura 6 – Modelo da fibrila heterotípica de colágeno na cartilagem.

(A) Esquema mostrando o colágeno tipo XI (em azul) no interior das fibrilas de colágeno II. Diferentemente de outros colágenos fibrilares, o tipo XI retém o domínio N-propeptideo terminal, que durante a fibrillogênese encontra-se voltado para o exterior. O colágeno IX, na superfície da fibrila está representado em verde. (B) Esquema tridimensional da fibrila heterotípica de colágeno II/XI/IX. Adaptado de Fang e col., 2012 ⁽²⁹⁾.

1.2.4 *Proteoglicanos na cartilagem articular*

Na cartilagem articular o proteoglicano prevalente é o agrecano. Este, forma os agregados de agrecanos, os quais são complexos de glicosaminoglicanos (GAG) e proteínas, com peso molecular de aproximadamente 2,5 milhões de daltons. O agregado é constituído de um filamento central de ácido hialurônico (AH) no qual, proteínas de baixo peso molecular, denominadas proteínas de ligação, permitem a ligação covalente entre o AH e monômeros de agrecano (Figura 7 A) ^{(11) (15)}. Por sua vez, cada monômero de agrecano é formado por GAG, polímeros lineares de dissacarídeos com resíduos sulfato, altamente aniônicos, os quais se ligam perpendicularmente ao eixo de uma proteína central (Figura 7 A). No tecido cartilaginoso os GAG sulfatados mais frequentes são o sulfato de condroitina (60-90% do volume total de GAG na cartilagem articular) e o sulfato de queratano (5-20%) ^{(4) (11)}.

Os GAG altamente sulfatados são os responsáveis pelas propriedades hidrofílicas dos agregados de agregano. A grande quantidade de grupos carregados negativamente (sulfato e carboxilato) nos GAG tende a repelir um ao outro e expandir o agregado. Ainda, estas cargas aniônicas atraem íons com carga positiva, como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , e consequentemente, o grande número de íons cria uma pressão osmótica, a qual permite a entrada de fluido no tecido (Figura 7 B). O volume distendido dos proteoglicanos exerce uma força de tensão sobre a rede de colágeno, portanto o grau de hidratação da cartilagem é dependente de duas forças opostas: a pressão osmótica total (inchaço) exercida pelos proteoglicanos e a força restritiva à tração da rede de colágeno. Considerando que a cartilagem articular é um tecido avascular, o fluxo de água é importante para carregar nutrientes através da matriz até os condrócitos e eliminar metabólitos celulares.

Na cartilagem articular também estão presentes proteoglicanos de baixo peso molecular, não agregados, como o biglicano, decorina, fibromodulina e lumicano que participam na adesão, estabilização e modulam o metabolismo do tecido ⁽¹⁵⁾.

Figura 7 – Ilustração do agregado de agrecano.

(A) Esquema mostrando a organização de um agregado de agrecano. Os agrecanos são formados por glicosaminoglicanos sulfatados (sulfato de condroitina e sulfato de queratano) ligados a uma proteína central. Os agrecanos ligam-se a uma longa molécula de ácido hialurônico por proteínas de ligação. (B) A grande quantidade de cargas negativas dos agrecanos geram uma força de repulsão entre eles. Ainda, o grande número de cargas negativas atrai cátions, como Na⁺, Ca²⁺ e K⁺, que por sua vez impulsionam a entrada de fluido para o interior da cartilagem.

1.2.5 *Histoarquitetura e homeostase da cartilagem articular*

A organização, distribuição e proporção das macromoléculas e micromoléculas são os responsáveis pelas características e propriedades da cartilagem articular. A matriz que circunda os condrócitos é organizada em regiões definidas pela sua distância da célula. A pericelular, imediatamente ao redor da célula, é a região onde as moléculas interagem imediatamente com os receptores celulares, como por exemplo o ácido hialurônico que se liga ao CD44 da célula. Esta região é constituída principalmente por colágeno XIII, fibrilas heterotípicas de colágeno II e XI, moléculas com função adesiva, como fibronectina, sindecano e condroaderina. Próximo à matriz pericelular, mas ligeiramente mais distante da célula encontra-se a matriz territorial, constituída principalmente por grandes agregados de agrecanos, colágeno tipo VI, pró-colágeno tipo II, e outras moléculas como matrilina tipo 1 e matrilina 3, biglicano, decorina e fibulina. Na região mais distante da célula, encontra-se a região interterritorial, composta basicamente por fibrilas heterotípicas de colágeno II, XI e IX e grandes agregados de agrecanos; e, nesta região as moléculas com função adesiva são basicamente as proteínas oligoméricas da matriz cartilaginosa (COMP), fibromodulina e matrilina tipo 3 (Figura 8). Os tipos de colágeno e as moléculas que se ligam ao colágeno são diferentes em cada região ⁽³⁰⁾.

A organização celular, das fibrilas de colágeno e composição dos constituintes da MEC apresentam distribuição diferentes nas regiões da cartilagem, de modo a garantir a integridade, estabilidade e propriedades do tecido cartilaginoso (Figura 9).

As fibrilas de colágeno são as principais responsáveis pela forma e resistência do tecido cartilaginoso e os agregados de proteoglicanos pela auto-lubrificação. Ainda, as características hidrofílicas dos agregados de proteoglicanos, junto com a resistência exercida pela malha de fibras de colágeno, asseguram as propriedades biomecânicas da cartilagem articular de compressibilidade, elasticidade e resiliência, as quais promovem a resistência tecidual para dispersar e atenuar as forças de impacto sofridas nas articulações móveis ^{(4) (11)}.

A carga mecânica é necessária para a homeostase da cartilagem. O movimento entre a cartilagem e o fluido sinovial, desempenha um papel importante na difusão de moléculas através da cartilagem e facilita sua nutrição ⁽³¹⁾.

A integridade do tecido cartilaginoso depende de uma lenta reposição dos componentes da MEC, que ocorre de modo a garantir adequada homeostase tecidual. O condrócito é dotado de um arsenal enzimático que age sobre o colágeno e os proteoglicanos, de modo a promover uma degradação tecidual localizada e controlada, para dar lugar à síntese de novas moléculas quantitativa e qualitativamente adequadas às necessidades biomecânicas do momento. Trata-se de um mecanismo fisiológico de adaptação e renovação tecidual.

O condrócito sofre a ação reguladora de dois tipos de mediadores: os pró-catabólicos (citocinas) e os pró-anabólicos (fatores de crescimento) que, através de liberação parácrina e/ou autócrina, podem promover junto ao condrócito a ativação de mecanismos para a degradação tecidual, mediada por enzimas e seus inibidores, e para a regeneração da cartilagem, via multiplicação celular e síntese dos elementos da MEC⁽³²⁾.

A estimulação mecânica captada pelos receptores dos condrócitos, que inclui integrinas, sindecans e canais iônicos, tem efeitos sobre o anabolismo e catabolismo, aumentando a quantidade de agrecanos e diminuindo a expressão de enzimas de degradação⁽³³⁾. Além disso, a carga mecânica cíclica de baixa intensidade nos condrócitos inibe as citocinas pró-inflamatórias, a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)⁽³⁴⁾.

Figura 8 – Tipos de matriz e seus componentes.

A matriz cartilaginosa ao redor condrócitos na cartilagem normal está organizada em zonas definidas, de acordo com a distância do condrócito. A matriz pericelular localiza-se imediatamente ao redor da célula. Após a matriz pericelular encontra-se a territorial e depois a interterritorial. Os tipos de colágeno e as proteínas que se ligam ao colágeno formam matrizes diferentes em cada zona. Adaptado de Heinegård D e Saxne T, 2011 (30).

Figura 9 – Cartilagem hialina corada com Hematoxilina-Eosina (H&E) e esquema representativo da morfologia e estrutura nas suas diferentes zonas. Adaptado de Di Bella, 2015 ⁽³⁵⁾.

1.3 CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA

Embora a etiologia da OA não seja conhecida, sabe-se que ocorre uma disparidade do processo de síntese e degradação dos elementos da MEC causando um comprometimento das propriedades físico-químicas do tecido cartilaginoso ⁽¹⁴⁾.

Entende-se que a resposta à injúria tecidual é uma tentativa de reparo ineficiente, em que os condrócitos, responsáveis pelo *turnover* da cartilagem, por meio de mediadores pró-catabólicos (citocinas) e pró-anabólicos (fatores de crescimento), sintetizam e secretam enzimas que degradam componentes da MEC, principalmente colágenos e proteoglicanos ^{(14) (36)}.

Na fase inicial da OA há uma proliferação dos condrócitos assim como uma produção aumentada de componentes da MEC e de citocinas catabólicas, numa tentativa inicial de reparo tecidual. Consequentemente, ocorre a degradação de colágeno do tipo II e proteoglicanos na zona superficial, ocasionando a dissociação de moléculas de água dos proteoglicanos, diminuição da resistência à tração, que caracteriza o aumento do

volume de água tecidual. Apesar de ocorrer um aumento na síntese de colágeno II, o reparo tecidual é limitado e ineficiente, pois os condrócitos não conseguem reestruturar a histoarquitetura da cartilagem articular e alteram o padrão de expressão gênica de constituintes da MEC ⁽¹⁵⁾⁽³⁶⁾.

Posteriormente, na tentativa de restaurar o tecido lesionado, os condrócitos aumentam a síntese de colágeno do tipo II; entretanto, a histoarquitetura das fibrilas de colágeno não é restaurada de modo adequado a manter as características biomecânicas do tecido. Desta forma, a rede de colágeno não resiste ao aumento do volume dos proteoglicanos, contribuindo para a hiper-hidratação da cartilagem articular. Concomitantemente os proteoglicanos, principalmente o agrecano, são degradados por agrecanases e metaloproteinases (MMPs – *matrix metalloproteinases*). Quando isso ocorre, o tecido cartilaginoso sofre com a compressão e, conseqüentemente, os condrócitos sintetizam altos níveis de proteases, agravando o quadro de degeneração. Em consequência destes processos ocorre a perda de água da MEC, alteração da membrana sinovial, remodelação do osso subcondral e formação de osteófitos, pois a degradação do tecido cartilaginoso é constante e, os condrócitos, responsáveis pela síntese, secreção e manutenção da mesma, não conseguem restabelecer as condições normais na mesma proporção ⁽⁴⁾⁽¹⁵⁾.

O processo contínuo de degradação causado por uma desproporção entre síntese e degradação da MEC é reforçado pelo desequilíbrio entre MMPs e seus respectivos inibidores (TIMPs – *tissue inhibitor of metalloproteinases*) já que esses também encontram-se aumentados no líquido sinovial e no tecido cartilaginoso em pacientes com OA ⁽³⁶⁾.

O catabolismo aumentado da MEC, característico do processo degenerativo articular, é mediado por diversos fatores como proteases e fatores inflamatórios (Figura 10). As MMPs são consideradas enzimas importantes envolvidas na evolução da OA e são classificadas de acordo com sua localização celular e especificidade para o substrato. Na OA a MMP-1 e MMP-13 são altamente expressas, sendo a primeira localizada na zona superficial e relacionada à fase inflamatória e, a última na zona profunda, associada à fase de remodelamento degradando colágeno do tipo II e proteoglicanos. Além disso, a MMP-13, considerada importante no *turnover* da cartilagem, age no colágeno do tipo IX e ativa a proMMP-1 ⁽¹⁵⁾⁽¹²⁾⁽³⁶⁾. As agrecanases

são expressas na zona superficial e embora ocorra síntese de mais agreganos, estes são posteriormente encontrados no líquido sinovial com a evolução da OA ⁽¹⁵⁾.

A MMP-9 (gelatinase B) é encontrada somente na cartilagem osteoartrítica e age em colágeno IV e V e *gelatins* (colágenos previamente digeridos por MMPs) ⁽¹⁵⁾.

A IL-1 β , sintetizada pelos condrócitos e fibroblastos da sinóvia, é considerada o mais importante fator inflamatório associado ao processo catabólico da OA, pois possui a propriedade de estimular sua própria produção e de aumentar a síntese de MMPs, assim como bloquear a ação dos inibidores de MMPs, as TIMPs e inibir a síntese de colágeno e proteoglicanos. Em condições normais, a IL-1 β é importante no *turnover* da MEC. Dentre outras citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α , sintetizado pelos condrócitos e membrana sinovial, também é importante no mecanismo da OA e tem seu potencial de degeneração aumentado quando associado a IL-1 ^{(12) (14) (15) (36) (37)}.

Adicionalmente, também estão envolvidos no processo catabólico de degradação tecidual os fatores de crescimento. Embora eles sejam polipeptídeos que atuam na manutenção do tecido cartilaginoso, protegendo-o de danos causados por movimentos repetitivos, lesões e/ou inflamação e estão presentes em baixos níveis na cartilagem articular saudável, eles apresentam um efeito dúbio. Os mais caracterizados e relacionados à manutenção e formação do tecido cartilaginoso são TGF- β (*transforming growth factor beta*), BMPs (*bone morphogenic proteins*), HGF (*hepatocyte growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), CTGF (*connective-tissue growth factor*), IGFs (*insuline-like growth factors*) e CDMPs (*cartilage-derived morphogenic proteins*) ⁽¹⁵⁾.

O TGF- β é um fator de crescimento versátil, com desempenho pró e anti-inflamatório, relacionado à síntese de MEC e proliferação celular, além de aumentar a síntese de proteoglicanos e anular a ação da IL-1 β na supressão da síntese de proteoglicanos. Sabe-se que o TGF- β pode mediar a proteção do tecido cartilaginoso, via inibição de MMP-9 e MMP-1 e atuar no processo de degradação, via condrócitos pela síntese de MMP-13 e ADAMTS-4, sendo considerado um fator importante no desencadeamento da OA. Durante a formação óssea e cartilaginosa o TGF- β , assim como a BMP-2, estimula a diferenciação de células mesenquimais em linhagens condrogênica e osteogênica. Já foi evidenciado *in vitro* que o TGF- β estimula e inibe a produção de colágeno do tipo II e de proteoglicanos, assim como ele pode atuar na inibição de proteases e estimular a produção de TIMPs e, ter uma ação contrária, estimulando a produção de MMP-13. Altos níveis de TGF- β foram constatados no

líquido sinovial de pacientes com OA e com artrite reumatoide e estudos *in vivo* mostraram que injeções intra-articulares de TGF- β promoveram a síntese de proteoglicanos e tiveram ação protetora contra a ação da IL-1 mas levaram à formação de osteófitos e, após muitas aplicações desse polipeptídeo houve diminuição significativa de proteoglicanos na zona profunda da cartilagem ^{(12) (15) (36)}.

As BMPs favorecem a síntese de MEC e crescimento dos condrócitos, atuando no reparo de manutenção tecidual e, também estão presentes em pouca quantidade na cartilagem normal. As BMPs dos tipos 2, 4, 6, 7, 9 e 13 parecem aumentar a síntese de colágeno do tipo II e agrecanos. Com o desenvolvimento da OA, a BMP-2 apresenta-se aumentada e, assim como o TGF- β , a BMP predispõe a formação de osteófitos, mas por vias diferentes ⁽¹⁵⁾.

Embora a OA não seja considerada uma doença inflamatória propriamente dita, sabe-se que existe uma relação entre o processo inflamatório e alterações estruturais da doença. Avaliações imunohistoquímicas mostram que há infiltrado inflamatório na sinóvia, com a presença, principalmente, de TNF α e IL-1 e que, os macrófagos e fibroblastos sinoviais em associação com os condrócitos ativados, medeiam a fisiopatologia da OA ^{(12) (36)}. Sabe-se que os condrócitos sintetizam diversos mediadores inflamatórios e esta ação catabólica parece estar relacionada com a influência de fatores presentes no líquido sinovial ⁽¹²⁾.

Figura 10 – Ilustração da cartilagem articular saudável e afetada pela Osteoartrite. Degradação da cartilagem articular. Desenho esquemático (à esquerda) de uma articulação com cartilagem, sinóvia e osso subcondral normais e com OA. Em maior aumento, observa-se as alterações nas estruturas da cartilagem com OA, como erosão da cartilagem, esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos decorrentes da ativação dos condrócitos por citocinas, produção de MMPs, e outros fatores catabólicos, além da ação de fatores pró-inflamatórios provenientes das células da sinóvia e citocinas e fragmentos da MEC cartilaginosa que liberados no fluido sinovial aumentam a sinovite. Adaptado de Lee e col, 2013 ⁽⁹⁾.

1.4 ASPECTOS GERAIS DA TERAPEUTICA NA OSTEOARTRITE

O tratamento da osteoartrite ainda é consideravelmente limitado. A *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI), uma das principais agências mundiais para o estudo e estabelecimento de recomendações relativas a OA, assinala que existe fraca evidência de que os medicamentos atualmente utilizados tenham atuação efetiva na progressão da doença. O tratamento consiste em aliviar a dor, preservar e melhorar a capacidade funcional da articulação, desacelerar o avanço da OA e possivelmente, regenerar o tecido lesionado, reduzindo a invalidez e aumentando a qualidade de vida. Tais tratamentos envolvem-se desde a simples orientação educacional do paciente até o uso de drogas não-farmacológicas, anti-inflamatórias e analgésicas, modificadoras da doença osteoartítica (DMOAD), viscosuplementação, fisioterapia, exercícios, órteses e cirurgia em casos extremos ⁽⁵⁾.

No tratamento da osteoartrite é fundamental que o paciente compreenda a doença, e aprenda o que deve fazer para evitar danos à articulação. É importante que o indivíduo elimine os fatores de risco, especialmente o excesso de peso, reduzindo a sobrecarga mecânica sobre a articulação, exercite-se e, acima de tudo, reconheça a sua própria responsabilidade no controle do tratamento ^{(8) (14) (37)}.

Como tratamento sintomático são utilizados medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), para alívio da dor e da inflamação articular. Ainda, medicamentos de uso tópico (cremes, pomadas, *spray*, etc.) com propriedades analgésicas e/ou anti-inflamatórias, também são muito utilizados ⁽³⁷⁾.

A infiltração intra-articular com corticóides, ou seja, injeção local dentro da própria articulação como potente agente anti-inflamatório, pode ser prescrita para alívio dos sintomas. A administração de corticoide intra-articular (ex. metilprednisolona) é eficiente quando o paciente apresenta dor aguda, com sinais de derrame intra-articular e inflamação; no entanto, sua utilização é restrita por comprometer o tecido cartilaginoso em longo prazo ^{(8) (14) (37)}.

Fármacos de ação lenta, também são utilizados na terapia medicamentosa, são fármacos sintomáticos que têm efeito residual após a sua suspensão como: sulfato de glicosamina e condroitina, cloroquina, entre outros, e, fármacos modificadores de doença, também conhecidos como condroprotetores, como a diacereína, e ácido hialurônico intra-articular, cujo propósito é evitar, desacelerar ou reverter a progressão da OA. Por outro lado, a viscosuplementação com ácido hialurônico é bastante eficaz no alívio da dor e estimula a produção de ácido hialurônico pela própria articulação, além de perdurar por até seis meses após sua aplicação ^{(8) (14) (37)}.

Adicionalmente pode-se associar terapia física, que consiste na aplicação de calor profundo ou superficial, utilização de gelo/bolsa térmica, estímulo elétrico e/ou acupuntura ou órteses, que são quaisquer dispositivos que facilitem e auxiliem o paciente a realizar suas atividades diárias, como: calçados apropriados, palmilhas, calçadeiras e outros recursos para o realinhamento do eixo mecânico e mudança do padrão de transferência de carga ^{(8) (14)}.

Em casos selecionados, refratários ao tratamento clínico, é possível a realização de procedimentos minimamente invasivos artroscópicos, como a sinovectomia, que apresenta como objetivo a ressecção de fragmentos livres articulares, podendo também ser associado a osteotomias, que são procedimentos corretivos do eixo mecânico.

Finalmente são prescritas as artroplastias com implantes metálicos, que são reservadas somente para os casos mais avançados da doença ^{(8) (14) (37)}.

Devido às dificuldades terapêuticas citadas acima, o baixo potencial de regeneração da cartilagem articular e a progressão das lesões articulares, as células tronco mesenquimais (MSCs – *Mesenchymal stem cells*) estão atualmente sob investigação clínica para indicação como tratamento alternativo da OA ^{(3) (38) (39)}.

1.5 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As células tronco são células indiferenciadas que possuem duas importantes características: a de auto renovação e a de diferenciação celular; sendo esta última, determinante para a sua classificação em células tronco totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes ou onipotentes (Figura 11). As células tronco totipotentes são derivadas do zigoto, capazes de formar todos os tecidos, inclusive extraembrionários (ex. placenta). As células derivadas da massa celular interna do blastocisto são pluripotentes, com potencial de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), exceto placenta e cordão umbilical e são conhecidas como células tronco embrionárias (ESCs – *Embryonic stem cells*). As multipotentes possuem habilidade de se diferenciar em vários tipos celulares do mesmo folheto germinativo. As oligopotentes são células tronco cuja capacidade de diferenciação é reduzida em células de um mesmo folheto embrionário. Por fim, as unipotentes limitam-se a um único tipo celular de um determinado folheto embrionário ^{(40) (41) (42) (43)}.

Figura 11 – Imagem ilustrativa dos tipos de células tronco e suas principais fontes de obtenção.

Classificação das células tronco em tronco totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes ou unipotentes e suas principais fontes de obtenção.

Em 2006, Yamanaka e Takahashi reprogramaram células somáticas (fibroblastos) com a inserção dos genes Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, que passaram a exibir morfologia e propriedades semelhantes às ESCs, além de expressar marcadores genéticos de células tronco e capacidade de formar teratomas quando transplantadas, via subcutânea, em camundongo *nude*. Adicionalmente, estas células também auxiliaram no desenvolvimento de um embrião de camundongo após sua inserção em blastocisto. Por esta razão, essas células são conhecidas como células de pluripotência induzida (iPSCs – *induced pluripotent stem cells*) ⁽⁴⁴⁾.

Quanto à sua origem, as células tronco podem ser de origem embrionária (ESCs) ou adulta (ASCs– *Adult stem cells*) quando derivadas de tecido adulto como medula óssea, gordura, pele e outros. As ASCs, por sua vez, são subdivididas em hematopoiéticas (HSCs – *Hematopoietic stem cells*) que originam células do sistema sanguíneo e, mesenquimais (MSCs) que podem se diferenciar em condrócitos, adipócitos, células musculares entre outros ^{(40) (45)}.

As MSCs podem ser isoladas a partir de diversos tecidos (ex. cordão umbilical, tecido adiposo, medula óssea, placenta, membrana sinovial, pele, etc), no entanto, as principais fontes de obtenção são a medula óssea e o tecido adiposo, sendo este, considerado o mais apropriado por apresentar facilidade de obtenção, pois consiste num procedimento menos invasivo e doloroso ao paciente, além de possuir maior quantidade de células tronco quando comparado à quantidade obtida da medula óssea ($\sim 1 \times 10^6$ células tronco/200mL de gordura, Walenko 2011; $2-6 \times 10^8$ células tronco /300mL de tecido adiposo Okamoto, 2010) ^{(40) (41) (43) (46) (47) (48)}.

O tecido adiposo é derivado do mesênquima e compreende pelo menos 4% da massa corpórea do adulto, com distribuição subcutânea e visceral. Pode ser classificado em tecido adiposo branco (WAT – *White adipose tissue*), caracterizado pelo armazenamento de triglicérides na região central da célula, que resulta no deslocamento das organelas celulares para a periferia e, tecido adiposo marrom (BAT – *Brown adipose tissue*), situado em coração, rins, aorta e gônadas em recém-nascidos, que regula a produção de calor pelos seus adipócitos, cujo citoplasma é abundante, com bastante gotículas de triglicérides e grande quantidade de mitocôndrias. O tecido adiposo secreta polipeptídios, hormônios e citocinas, além de apresentar em sua constituição bastante ASCs. Essas características tornam o tecido adiposo uma fonte atrativa de MSCs para ser utilizado na engenharia de tecidos e medicina regenerativa ^{(40) (47)}.

Desde 2006, as MSCs derivadas do tecido adiposo, nomeadas ADSCs (*Adipose derived stem/stromal cells*), são definidas por três características estabelecidas pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT – *International Society for Cellular Therapy*). Estas características referem-se a capacidade de adesão ao plástico, sob condições de cultura; a diferenciação destas células em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica; além da expressão das seguintes moléculas de superfície (CD – *Cluster of differentiation*): CD105, CD 70, CD90, CD73 e CD44 e, a ausência de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR) ^{(3) (40) (46) (47) (48) (49) (50) (51)}.

Ainda, as ADSCs expressam Oct3/4, Nanog e Sox2, que são fatores de transcrição típicos de ESCs. Estudos mostram que elas são capazes de se diferenciar em linhagens não mesenquimais (ex. célula neuronal, epitelial, endotelial e outros). Ao contrário das ESCs e iPSCs, as ADSCs possuem baixa propensão a induzir resposta imunológica após transplante alogênico, inibindo a ativação de linfócitos T; embora

haja a possibilidade dessas células após sua diferenciação, passarem a expressar moléculas MHC-II, o que mostra a predileção pelo uso autólogo ^{(3) (41) (47) (48) (50)}.

As ADSCs secretam diversas citocinas e fatores de crescimento como VEGF (*vascular endothelial growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), IL-6 (*interleukin-6*), IL-7, TNF α (*tumor necrosis factor-alpha*), M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) e TGF- β (*transforming growth factor*), responsáveis pela angiogênese, diferenciação celular, controle e manutenção de células vizinhas, remodelamento tecidual, efeito anti-apoptótico e imunossupressor ^{(47) (50) (52)}.

Diversas substâncias indutoras são utilizadas para a diferenciação das ADSCs, *in vitro*, em células do tecido conjuntivo. As ADSCs têm um potencial excepcional para se diferenciarem em adipócitos maduros, o que é bastante importante para reconstruções cirúrgicas, como por exemplo, a reconstrução da mama após mastectomia. *In vitro* essa diferenciação ocorre com a presença de insulina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), dexametasona, rosiglitazona e indometacina. Após o estímulo com esses fatores, as ADSCs diferenciadas apresentam vacúolos lipídicos em sua constituição, além de expressar leptina, GLUT4 (*Glucose transporter type 4*) e outros genes e proteínas característicos de adipócitos ^{(40) (46) (47)}. Ainda, com a utilização de meio de cultura suplementado com glicerofosfato- β , ácido ascórbico, ácido valpróico, dexametasona, vitamina D₃, BMP-2 (*Bone morphogenetic protein 2*), as ADSCs expressam genes como o RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) e proteínas como fosfatase alcalina, colágeno do tipo I, osteopontina, osteonectina, associados ao fenótipo de osteoblasto. Após estes estímulos, a associação das ADSCs com *scaffolds* (suportes feitos de materiais inertes) mostra-se efetiva na regeneração óssea ^{(40) (46) (47)}.

Para a indução da condrogênese são utilizados fatores de diferenciação, como TGF- β , FGF-2 (*Basic fibroblast growth factor 2*) e IGF-1. Durante esse processo, observa-se alteração na morfologia das ADSCs, que passam de uma forma semelhante a fibroblastos para um aspecto arredondado, além da identificação de componentes da MEC da cartilagem, como colágeno do tipo II, IX, X, XI, agregano e genes como SOX9 (*SRY-related high mobility group-box gene 9*). O SOX9 é o principal fator de transcrição atuante na diferenciação condrogênica, sendo fundamental no controle da expressão de genes essenciais para esta diferenciação, como o colágeno dos tipos II (COL2A1) e XI (COL11A2), entre outros componentes da MEC. Durante o processo de condrogênese no desenvolvimento embrionário, ocorre o recrutamento, migração e

proliferação de células progenitoras que produzem e secretam componentes da MEC. Interações celulares e com componentes da MEC (microambiente), tais como proteoglicanos, membros da família do fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF), domínio de metaloproteinase e desintegrina A (ADAM) e integrinas, resultam em uma sinalização intracelular, que culmina na diferenciação das células progenitoras em condrócitos, alterando sua morfologia esférica e iniciando a síntese de moléculas específicas da MEC cartilaginosa, como colágeno tipo IIB, IX, XI e agrecano ^{(40) (42) (46) (52)}.

A utilização das ADSCs associadas a diversos fatores de diferenciação tem se tornado frequente em estudos da área de engenharia tecidual e de medicina regenerativa tendo em vista sua capacidade de diferenciação em células especializadas, auto renovação, plasticidade e atividades imunossupressora e anti-inflamatória⁽⁵³⁾. Diferentes estudos mostram que as MSCs são eficazes no reparo ósseo e cartilaginoso, além de possuírem efeito parácrino, secretando moléculas bioativas, importantes na imunomodulação, angiogênese, quimioatração, no crescimento e diferenciação celular, entre outros ⁽⁵⁴⁾.

1.5.1 *Células tronco mesenquimais e osteoartrite*

Filardo e col. (2016) realizaram uma revisão sistemática na base de dados do *PubMed* sobre tratamento de cartilagem e células tronco mesenquimais no período de 2000 até 2015 e, nessa análise, incluíram 60 estudos relacionados a esse tema. Dentre os trabalhos com ADSCs, eles destacaram a utilização dessas células aplicadas em pacientes com OA, em diferentes doses cujo impacto foi positivo após 6 meses de aplicação, evidenciado por exame de ressonância magnética e ausência de efeitos adversos ⁽⁵³⁾.

Foi descrito que a utilização de *scaffolds* de ácido hialurônico auxiliam na diferenciação condrogênica de ADSCs ⁽⁴³⁾, assim como a combinação das ADSCs com hidroxiapatita atua na regeneração do tecido ósseo em coelhos ⁽³⁸⁾.

Trabalhos recentes demonstraram que o tratamento de OA experimental, em ratos, com injeções intra-articulares semanais de MSCs da medula óssea, durante três semanas, têm efeito protetor no desencadeamento da doença, com diminuição de fissuras no tecido e da apoptose de condrócitos ⁽⁵⁵⁾. Complementarmente à ação das

MSCs sabe-se que estas possuem uma ação trófica que atua na redução da inflamação sinovial e, conseqüentemente, na proteção do tecido cartilaginoso ⁽⁵⁶⁾. Toghraie e col. em 2011 demonstraram uma diminuição na degradação do tecido cartilaginoso em coelhos, na formação de osteófitos e esclerose do osso subcondral, após o tratamento com injeção intra-articular de MSCs em modelo animal de OA ⁽⁵⁷⁾.

Centeno e col. em 2008 demonstraram que na OA humana, a avaliação por ressonância magnética, aumento do tecido cartilaginoso e do menisco após seis meses do tratamento de tecido cartilaginoso lesionado do joelho, com injeção intra-articular de MSCs, provenientes da medula óssea ⁽⁵⁸⁾.

Injeções de MSCs com ácido hialurônico em OA experimental, induzida por menisctomia total medial e ressecção do ligamento cruzado anterior, diminuíram a degeneração do tecido cartilaginoso, remodelamento ósseo e esclerose do osso subcondral ⁽⁵⁹⁾.

Em 2007, Yan e Yu, avaliaram o efeito de diferentes tipos celulares (condrócitos, MSCs, fibroblastos de coelhos e, células tronco de cordão umbilical humano), no tratamento de lesão cartilaginosa em coelhos Nova Zelândia, mostrando que, embora os condrócitos também tenham apresentado bons resultados, a utilização de MSCs é a mais apropriada visto que o grupo que recebeu esse tratamento obteve melhor rearranjo celular ⁽⁶⁰⁾.

Masuoka e col em 2006 demonstraram aumento de cartilagem hialina e alta expressão de colágeno do tipo II, após a utilização de ADSCs associadas à solução aquosa de colágeno, em coelhos com alterações osteocondrais ⁽⁶¹⁾. Adicionalmente, Zsachrnack e col. em 2010 tiveram resultados morfológicos positivos, quando associaram fatores de crescimento ao meio de cultura para a pré-diferenciação das MSCs de medula óssea em linhagem condrogênica ⁽⁶²⁾.

Além da aplicação das MSCs em modelos animais, outros autores mostram estudos iniciais em humanos, como Pak em 2011 que trataram dois pacientes que apresentaram OA nos joelhos com injeção de ADSCs, ácido hialurônico, dexametasona e plasma rico em plaquetas (PRP). Após três meses, estes pacientes apresentaram aumento da cartilagem, evidenciados pela ressonância magnética, melhora funcional e redução da dor ⁽⁶³⁾.

Embora o número de estudos com ADSCs esteja aumentando, eles ainda são poucos quando comparados às MSC derivadas da medula óssea. Segundo Dai e col.

(2016) estudos clínicos registrados no site: <http://clinicaltrials.gov/>, com palavra-chave: *adipose derived stem cells* (ADSCs), totalizam 125, sendo 35 estudos clínicos finalizados. Ainda, foi demonstrado que o transplante autólogos de ADSCs associado ao beta fosfato tricálcio (β -TCP – *beta tricalcium phosphate*), um material sintético de cerâmica porosa e, BMP-2 foi eficaz no reparo do tecido ósseo, reforçando a utilização dessa terapêutica na engenharia de tecidos ⁽⁴³⁾. Em 2011, foi realizado um estudo com 4 pacientes com OA moderada a severa que receberam MSC autólogas derivadas da medula óssea, em que houve melhora sintomática e diminuição de crepitações nos pacientes, porém, sem melhora radiográfica ⁽⁶⁴⁾. Outro estudo em 18 pacientes com OA, mostrou que a injeção intra-articular de ADSCs auxiliou na melhora funcional da articulação, acompanhada da redução da dor e da degeneração tecidual ⁽⁴⁸⁾.

Ainda, Koh e col. em 2013, observaram que pacientes com OA de joelho tiveram redução da dor e melhora da função articular, após receberam injeções intra-articulares de MSC autólogas, isoladas do tecido sinovial em combinação com PRP ⁽⁶⁵⁾.

Já foi descrito na literatura que a pré-incubação de ADSCs com PRP para aplicação em camundongo com lesão cartilaginosa, mostrou melhora tecidual e aumento da expressão *in vitro* de agrecano, colágeno II e SOX9 ⁽⁶⁶⁾. A associação de MSCs com outras substâncias a fim de proporcionar a melhora funcional do tecido cartilaginoso é bem aceita. Dentre essas substâncias, destaca-se o colágeno, um componente essencial da MEC cartilaginosa, considerado a proteína mais comumente encontrada no organismo, que atua na organização celular e estimula a síntese e organização da MEC. À vista dessas propriedades do colágeno e, especialmente do colágeno tipo V (ColV), que está presente na cartilagem embrionária e em desenvolvimento, além de apresentar propriedades singulares, considera-se que a associação do ColV às MSCs no transplante autólogo, como estratégia terapêutica no tratamento de lesões cartilaginosas, cujo tecido possui baixo potencial de regeneração, poderia proporcionar resultados promissores ⁽⁵⁴⁾ ⁽⁶⁷⁾.

1.6 COLÁGENO TIPO V

Além dos colágenos típicos do tecido cartilaginoso como os colágenos do tipo IX, II e XI, são encontrados outros tipos de colágeno em pequenas proporções na matriz cartilaginosa adulta, tais como os colágenos III, V, VI, X e XII ⁽⁴⁾. O colágeno tipo V

destaca-se por possuir estrutura molecular e propriedades bioquímicas semelhantes ao tipo XI, que é próprio da cartilagem. Analogamente ao tipo XI, o ColV é fibrilar e encontrado em pequena proporção no interior das fibrilas heterotípicas, associado ao colágeno dos tipos I e III na maioria dos tecidos conjuntivos, como pele, pulmão, placenta, entre outros. Ainda, o ColV, similarmente ao tipo XI, tem a função de regular o diâmetro das fibrilas heterotípicas, uma vez que durante a sua síntese, também, retém um domínio globular amino terminal, que se projeta para a região externa da fibrila, impedindo fisicamente que um grande número de moléculas de outros colágenos (ex. fibrilas heterotípicas I/III/V, na pele, pulmão e outros tecidos, e II/XI na cartilagem) se agreguem à mesma. Visto que os colágenos V e XI apresentam uma importante função no dimensionamento do diâmetro das fibrilas heterotípicas, eles têm sido considerados nucleadores da fibrilogênese ^{(18) (67) (68) (69) (70) (71)}.

Porém, ao contrário do colágeno tipo XI, o tipo V possui 3 isoformas diferentes de acordo com a combinação molecular das suas cadeias α : as heterotrímeras [$\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$], encontrada em placenta, e [$\alpha 1(V)_2$, $\alpha 2(V)$] (Figura 12), ubiquamente distribuída na maioria dos tecidos conjuntivos, e a isoforma homotrímera [$\alpha 1(V)_3$] encontrada em cultura de células de tecidos embrionários e na região da membrana basal do epitélio da pele ^{(18) (72)}. Ademais, o colágeno V é uma proteína preservada entre diferentes espécies de animais, tendo como característica imunogênica a conservação dos telepeptídeos NH2 e COOH terminais ⁽⁶⁷⁾.

Figura 12 – Desenho esquemático da constituição do colágeno tipo V.

(A) Representação esquemática das cadeias pro- $\alpha 1(V)$ e pro- $\alpha 2(V)$ do colágeno V, com os domínios colagenosos (COL1 e COL2) e não colagenosos da cadeia pro- $\alpha 1(V)$ (NC2 e NC3) e da cadeia pro- $\alpha 2(V)$ (NC2). Visão esquemática da isoforma heterotrímera [$\alpha 1(V)_2$, $\alpha 2(V)$]. Os N-propeptídeo da cadeia pro- $\alpha 1(V)$ e C-propeptídeo da pro- $\alpha 2(V)$ são processados pela BMP-1 e o C-propeptídeo da pro- $\alpha 1(V)$ é processado pela furina e/ou BMP-1. Adaptado de Symoens e col, 2011 ⁽⁷³⁾.

O ColV também está presente na cartilagem embrionária e em desenvolvimento, em maiores proporções que na cartilagem adulta, participa do processo funcional do tecido conjuntivo, além de participar na osteogênese e na renovação de células do estroma da córnea ^{(74) (75) (76)}. Ainda, Ruggiero e col. em 1994 já descreviam que o ColV é capaz de promover a adesão celular, tanto na sua forma nativa como na denaturada em diferentes linhagens celulares. Foi descrito por esses autores que grande parte desta importante propriedade está relacionada às suas sequências RGD, presentes em maior quantidade na cadeia $\alpha 2(V)$ da sua molécula e que a sinalização nuclear seria principalmente via integrinas ⁽⁷²⁾. A adesão do Col V pode ocorrer também independente das sequências RGD, através de um fragmento presente na cadeia $\alpha 1(V)$ de 30 Kd que contém um agrupamento de resíduos de aminoácidos básicos com afinidade à heparina e sulfato de heparina, que poderia reforçar a sua interação com as moléculas de heparina aniônica. Deste modo, o sítio do Col V ligante da heparina, interage com os proteoglicanos (PG) de sulfato de heparina na superfície das células, desencadeando sinais de estimulação celular; e, ainda interage com PG de sulfato de heparina na MEC dos tecidos ^{(73) (77)}.

Sendo o colágeno V altamente expresso em ampla variedade de tecidos embrionários, inclusive na cartilagem em desenvolvimento, e considerando as suas propriedades de adesão e proliferação celular, aceita-se que essa proteína tenha um papel importante no reparo do tecido cartilaginoso, através do estímulo da diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais ⁽⁶⁷⁾.

A estratégia de estimulação das ADSCs com o ColV, para utilização na terapêutica em OA baseia-se principalmente em duas características: em primeiro lugar, na capacidade de ADSCs se diferenciarem em condrócitos, bem como de secretar uma grande variedade de fatores biologicamente ativos que auxiliam na proliferação de células de apoio e formação dos tecidos ⁽³⁾. Em segundo, nas propriedades singulares da molécula de ColV e sua capacidade de interação célula-matriz que são de grande relevância na associação e estimulação das ADSCs, para que possamos desenvolver novas estratégias terapêuticas na regeneração do tecido cartilaginoso.

Considerando a fácil obtenção de tecido adiposo e a dificuldade de obter medicamentos que atuem na regeneração da cartilagem osteoartrítica, torna-se imprescindível verificar se ADSCs estimuladas com ColV *in vitro* têm potencial condrogênico. Baseados nos resultados obtidos neste estudo, novas estratégias

terapêuticas podem ser desenvolvidas para auxiliar na regeneração do tecido cartilaginoso.

2 OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

A proposta deste estudo foi analisar se ADSCs seriam capazes de aumentar a síntese dos componentes da MEC cartilaginosa *in vitro*, após o estímulo com ColV e avaliar seu potencial terapêutico no tratamento de coelhos com osteoartrite.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliação da síntese de componentes da MEC pelas ADSCs de coelhos estimuladas com Col V *in vitro*.
2. Análise do efeito das ADSCs, estimuladas Col V, na cartilagem articular de coelhos com OA experimental induzida por menissectomia parcial.

3 MÉTODOS

O presente estudo é uma pesquisa experimental prospectiva, aprovada pela Comissão de Ética para Estudo de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o número 123/14.

3.1 ANIMAIS

Foram incluídos neste estudo 24 coelhos da linhagem Nova Zelândia Branco, machos, com cerca de dois meses e 2.100-2.500g de peso. Os animais foram mantidos no Biotério de Manutenção e Experimentação da Clínica Médica da FMUSP – Laboratório de Investigação Médica (LIM 17), Disciplina de Reumatologia, em gaiolas individuais apropriadas, à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com iluminação controlada claro/escuro (12/12h) e fornecimento de água e ração padronizada *ad libitum*, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os procedimentos cirúrgicos também foram realizados no Biotério de Manutenção e Experimentação da Clínica Médica da FMUSP.

3.2 COLETA DO TECIDO ADIPOSEO

Para coleta do tecido adiposo um grupo de animais (n=16) foi anestesiado com Rompun® (Xilazin, Bayer HealthCare) (5mg/Kg) e Ketamina® (Ketalar, Park-Davis) (50mg/Kg), por via intramuscular (IM). Após tricotomia e antissepsia da linha dorso medial, os animais foram submetidos à lipectomia por uma incisão longitudinal de 2 a 3 cm na região interescapular, seguida de sutura da pele com fio mononylon 4,0, em pontos separados simples.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam, por um período de três dias, antibiótico (enrofloxacina 5mg/kg, uma vez ao dia) e anti-inflamatório (cetoprofeno 10mg/kg, 12/12 horas) por via subcutânea. Aproximadamente 2g de tecido adiposo coletado foi imerso em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Life Technologies; Invitrogen, Paisley, U.K.) (DMEM) para cultivo celular.

Figura 13 – Tricotomia (A) e lipectomia (B) na região interescapular de coelho Nova Zelândia Branco, para a obtenção de células tronco mesenquimais.

3.2.1 Obtenção das células tronco mesenquimais de coelhos

Sob condições estéreis, as amostras de tecido adiposo coletadas foram lavadas com solução fisiológica abundante, para a retirada de sangue. Posteriormente, foram submetidas à digestão enzimática com Liberase 2,5mg/mL (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Germany) em banho-Maria a 37°C, sob agitação em intervalos de 5 minutos, durante 40 minutos.

Após esse período foram realizadas duas centrifugações de 2.000 rpm a 4°C, por 5 minutos cada. O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado transferido para garrafas de cultura de 25cm² contendo DMEM, com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina.

A cultura foi mantida em estufa a 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, sendo o meio de cultura trocado após as primeiras 72h e, posteriormente, a cada 48h até a confluência. Subsequentemente, as células foram dissociadas com a solução de Tripsina-EDTA 0,05% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e expandidas para garrafas de 75cm². Após confluência, parte das células foram utilizadas para os ensaios de imunofluorescência e expressão gênica e, parte foi congelada em tubos criogênicos, contendo 1mL de solução de DMEM suplementado e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO;

Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), em freezer -80°C, por 48h, e após em nitrogênio líquido.

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o corante Azul de Tripán, que identifica as células inviáveis, coradas em azul pela impregnação do corante, através da membrana celular desintegrada, e as células viáveis, sem coloração. Desta forma, as células viáveis foram contadas em Câmara de Neubauer, nos quadrantes laterais. O resultado foi correspondente à média de células por quadrante, multiplicado pelo fator de diluição e pelo fator de correção da câmara de 10.000 ou 10^4 .

3.2.2 Caracterização das células tronco mesenquimais de coelhos

Devido à dificuldade de se encontrar no mercado nacional e internacional anticorpos específicos para células tronco mesenquimais de coelhos, para caracterização por citometria de fluxo, de acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular, a multipotência destas células foi caracterizada pelo potencial de diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.

Para a diferenciação celular, as ADSCs foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina até confluência. Posteriormente, as células foram transferidas para placas de 6 orifícios e cultivadas com os *kits* de diferenciação específicos, conforme descrito abaixo.

- ***Diferenciação adipogênica das células tronco mesenquimais de coelhos***

As ADSCs foram submetidas à diferenciação adipogênica utilizando o Kit de diferenciação *StemPro® Adipogenesis Differentiation* (Gibco®, Life technologies™), contendo Gentamicina (10 mg/mL), durante duas semanas, de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos, lavadas com água destilada, desidratadas em isopropanol 60% por 2 a 5 minutos e coradas com *Oil Red-O* (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 0,5% em isopropanol 100%, seguido de lavagem com água destilada. Por fim, as células foram observadas em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100, Japan).

- ***Diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais de coelhos***

Para a diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas com o Kit de diferenciação *StemPro® Chondrogenesis Differentiation* (Gibco®, Life technologies™), contendo Gentamicina (10 mg/mL), durante duas semanas, de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram fixadas em paraformaldeído 4%, durante 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com *Alcian Blue* 1% em HCl 0,1N, por 30 minutos, seguido de três lavagens com HCl 0,1N e água destilada, para neutralizar a acidez. Por fim, as células foram observadas em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100, Japan).

- ***Diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais de coelhos***

As ADSCs foram submetidas à diferenciação osteogênica utilizando o Kit de diferenciação *StemPro® Osteogenesis Differentiation* (Gibco®, Life technologies™), contendo Gentamicina (10mg/mL), durante três semanas, de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram fixadas em paraformaldeído 4%, durante 30 minutos, lavadas com água destilada, coradas com vermelho de alizarina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 2% em pH 4,2, durante 5 a 10 minutos, cuidadosamente lavadas e observadas em microscópio óptico de contraste de fase (Nikon Phase Contrast-2 ELWS 0.3 – Japan).

Adicionalmente, as ADSCs foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão e por imunomarcagem para CD34 e vimentina.

- ***Microscopia Eletrônica de Transmissão***

A Microscopia Eletrônica de Transmissão foi realizada em precipitado celular para avaliar o fenótipo das ADSCs. Com esse intuito, após confluência, as células foram submetidas à etapa de tripsinização, sendo lavadas com meio DMEM, suplementado com 10% SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina. Logo após, foram centrifugadas a 2.000 rpm, por 5 minutos, em tubo cônico (Falcon) de 50 mL, fixadas em solução de glutaraldeído 2% e embebidas em resina Araldite, para a realização dos cortes ultrafinos, com uma faca de diamante em micrótomo LKB Ultratome (Leica, Deerfield,

IL, EUA). Posteriormente, foram colocadas em grelha de cobre (200-mesh; Ladd Research Industries, Burlington, VT., EUA) e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os espécimes foram observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 100cx 100KW (Philips, Munich, Alemanha) operando a 80 kV.

- ***Imunomarcação para CD34 e vimentina***

No momento da confluência em garrafas de cultura de 75cm², as células foram desprendidas das garrafas por digestão com tripsina 0,2% e Versene 0,02% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina e lavadas com DMEM por centrifugação (1.200rpm), durante 10 minutos a 4°C. Após centrifugação, 2,5x10⁵ células foram transferidas para lamínulas em placas de 24 orifícios, e mantidas em DMEM, suplementado com 10% SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina.

Posteriormente, as lamínulas foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS) pH=7,2 e fixadas com paraformaldeído 4%, por 1h a 4°C. Após esse período, elas foram submetidas novamente à três lavagens com PBS e incubadas com albumina bovina (BSA) 5% por trinta minutos à temperatura ambiente. Foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongo anti-vimentina (1:80) e anti CD34 (1:20) para incubação a 4°C, durante a noite. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubadas com anticorpo anti IgG de camundongo conjugado ALEXA FLUOR 488 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) e DAPI (4,6- diamino-2-fenilindole) (1:200; Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) por 60 minutos. Após sucessivas lavagens em PBS com Tween₂₀ 0,05%, as lamínulas foram montadas em glicerina tamponada e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan) e confocal (ZEISS LSM 510 Meta/UV).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO TIPO V

- ***Eletroforese em gel de poliacrilamida***

A identificação das cadeias do colágeno V comercial (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%.

As frações do colágeno V liofilizadas foram diluídas em ácido acético 0,01N, na proporção de 1mg de proteína para 200 μ l de ácido acético 0,01N. O tampão de amostra (SDS 10%, glicerina 10%, azul de bromofenol 20% e 2-mercaptoetanol) foi adicionado às amostras para posterior aquecimento a 96°C, por cinco minutos. Em cada “poço” do gel de poliacrilamida foi acrescentado 30 μ g das frações do colágeno V. A eletroforese procedeu-se em tampão de corrida tris glicina 0,19 M em pH 8,5 e SDS 0,1%, a 4°C, sob corrente elétrica constante de 100 volts por uma hora e meia.

- ***Imunoblot do colágeno tipo V***

As frações de colágeno foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) em tampão tris 25mM, glicina 192mM e metanol 10%, por uma hora a 100 volts. A eficiência da transferência foi confirmada pela coloração com solução de Ponceau S (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 0,5% em água.

As fitas de nitrocelulose foram incubadas com leite desnatado 5% em PBS pH 7,4, por 90 minutos, sob agitação constante, para bloqueio de sítios inespecíficos. Após este procedimento foi feita uma lavagem de 10 minutos com PBS.

Para verificar a especificidade do colágeno, as fitas de nitrocelulose foram incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com o anticorpo de coelho anti-colágeno V (1:200), diluído em leite desnatado 1% em PBS. Posteriormente, as fitas de nitrocelulose foram lavadas três vezes de 10 minutos com PBS Tween₂₀ e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com o anticorpo de cabra anti IgG de coelho, conjugado com fosfatase alcalina (Nitro-blue tetrazolium chloride; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), diluído 1:1000 em leite desnatado 1% em PBS. Após outro ciclo de lavagens, a reação foi revelada com NBT (Nitro-blue tetrazolium chloride; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 0,0005% e BCIP (5-Bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 0,0005%, diluídos em tampão Tris 0,03M e Cloreto de magnésio 1M, pH=9,5.

A figura 14 mostra as cadeias α 1(V), α 2(V) e α 3(V) do padrão de colágeno tipo V comercial de placenta humana (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA).

Figura 14 – Imunoblot para colágeno V padrão comercial.

Imunoblot mostrando as cadeias $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ e $\alpha 3(V)$ do padrão de colágeno tipo V comercial de placenta humana (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA).

3.3.1 Padronização da concentração de colágeno tipo V em cultura de células tronco mesenquimais de coelhos

Para a avaliação da ação do colágeno tipo V na cultura de ADSCs foi realizado um teste inicial, com diferentes concentrações desta proteína, em diferentes tempos.

No momento da confluência em garrafas de cultura de 75cm², as células foram desprendidas das garrafas por digestão com tripsina 0,2% e Versene 0,02% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e lavadas com DMEM por centrifugação (1.200rpm), durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, 2,5x10⁵ células foram transferidas para lamínulas em placas de 24 orifícios, e mantidas em DMEM, suplementado com 10% SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina. Para estabelecer a concentração ideal de Col V, as ADSCs foram estimuladas com o Col V comercial (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) nas seguintes concentrações: 12,5µg/mL; 25µg/mL; 50µg/mL; 100µg/mL; 200µg/mL e 400µg/mL. As células foram incubadas com o colágeno V, diluído nas diferentes proporções, por períodos de 24h, 48h, 72h, 7dias, 14 dias e 21 dias, sendo o meio de cultura substituído a cada três dias, para os períodos mais longos. Células cultivadas apenas com o meio de cultura, nos mesmos períodos, serviram como controle do experimento.

As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS pH=7,2 e fixadas com paraformaldeído 4%, por 1h a 4°C. Após esse período, elas foram submetidas

novamente à três lavagens com PBS e incubadas com BSA 5% por trinta minutos à temperatura ambiente. Foram utilizados anticorpos policlonais, produzidos em camundongo, anti-colágeno do tipo I e II (1:10 e 1:20, respectivamente), anticorpos monoclonais de camundongo anti-colágeno do tipo III (Oncogene) (1:100), anti-vimentina (1:80) e anti CD34 (1:20), diluídos em PBS e incubados a 4°C, durante a noite. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ALEXA FLUOR 488 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) e DAPI (1:200; Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) por 90 minutos. Após sucessivas lavagens em PBS com Tween₂₀ 0,05%, as lamínulas foram montadas em glicerina tamponada e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51, Olympus Co, Tokyo, Japan). O critério utilizado para a escolha do tempo de estímulo e da concentração de colágeno tipo V a ser utilizado *in vitro* foi a expressão de colágeno do tipo II e vimentina e a ausência/baixa expressão de colágeno dos tipos I e III e CD34.

3.3.2 Avaliação do potencial condrogênico das células tronco mesenquimais de coelhos estimuladas com colágeno V em cultura

O potencial condrogênico das ADSCs foi avaliado através das colorações com *Alcian Blue/PAS* e Picrosirius, para a avaliação de proteoglicanos e colágeno total, respectivamente, e por imunofluorescência para Colágeno II, um dos principais componentes da matriz extracelular da cartilagem. As colorações específicas para proteoglicanos e colágeno total foram realizadas em precipitados celulares e a imunofluorescência para o Colágeno II foi realizada em lamínulas e em precipitados celulares. O potencial condrogênico das ADSCs foi também avaliado pela expressão do gene de pluripotência POU5F1 (Oct4), para o agrecano (ACAN) e para o colágeno tipo II (COL2A1).

Após o terceiro repique, as ADSCs foram cultivadas com ColV (50µg/mL) por 72h (dose de ColV e período de estímulo estabelecidos para a diferenciação das ADSCs, como mostrado no item resultados) em garrafas de 75cm², para o precipitado celular e biologia molecular e em lamínulas de vidro para imunofluorescência. Como controle positivo de diferenciação condrogênica, as ADSCs foram cultivadas com TGF-β1 (10ng/mL) (R&D Systems, Tools for Cell Biology Research TM).

Complementarmente, também utilizamos os seguintes estímulos: colágeno do tipo I (Col I), Col I associado ao TGF- β 1 e ColIV com TGF- β 1, para compararmos a síntese de Col II entre as ADSCs cultivadas com diferentes estímulos.

Para o precipitado celular, as ADSCs confluídas foram submetidas à etapa de tripsinização, sendo lavadas com meio DMEM, suplementado com 10% SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina. As células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos em tubo cônico (Falcon) de 50 mL e fixadas em paraformaldeído 4% e, posteriormente, em álcool 70%. Após uma semana o precipitado foi embebido em parafina, e cortes de 5 μ m foram aderidos a lâminas de microscopia e corados com *Alcian Blue/PAS* e Picrosirius.

- ***Imunofluorescência para colágeno tipo II***

Após 72h de estímulo com ColIV (50 μ g/mL) as ADSCs em lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4%, como descrito anteriormente. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno tipo II (1:20) e, em seguida, com anti-IgG de camundongo conjugado ALEXA FLUOR 488 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL).

Para a imunomarcação do Col II em precipitados de ADSCs, previamente estimulados com ColIV (50 μ g/mL) por 72h, cortes de 5 μ m, aderidos a lâminas tratadas com 3-dimetilaminosilane, foram desparafinizados em xilol e reidratados com banhos de álcool, com concentrações decrescentes, água corrente e destilada e PBS. Após bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 5%, os cortes foram submetidos a digestão com pepsina (Sigma Aldrich Co.) 4mg/mL em ácido acético 0,5N, por 30 min a 37°C. Em seguida, foram lavados com PBS e incubados com anticorpo policlonal de camundongo anti-colágeno II (1:50) durante a noite, a 4°C. Posteriormente, as lâminas de precipitados de ADSCs foram lavadas em PBS com Tween₂₀ 0,05% e incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ALEXA FLUOR 488 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). O DAPI (1:200) foi adicionado à reação para corar o núcleo das células. Após sucessivas lavagens em PBS com Tween₂₀, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-51 Center Valley, Pennsylvania) e quantificada por análise de imagem, com o *Software Image Pro Plus 6.0®*. O sistema de análise de imagem

consiste em uma câmera CCD Sony, acoplada ao microscópio Olympus BX-51, a qual captura as imagens e as envia para o monitor por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada). As imagens foram digitalizadas em aumento de 400X e processadas pelo *Software Image-Pro Plus 6.0*[®]. A área de cada campo analisado foi medida em μm^2 e utilizando-se os recursos do *software Image ProPlus 6.0* de seleção de cores; a tonalidade verde fluorescente, que identifica o colágeno II (Figura 15, verde fluorescente) nos precipitados de ADSCs foi demarcada (Figura 15, em vermelho) e quantificada. A média da área imunomarcada, correspondente ao colágeno II, foi dividida pela média da área total analisada e o resultado final expresso em porcentagem.

Figura 15 – Imagem representativa da análise de imagens pelo *software Image-Pro Plus 6.0*, mostrando a imunomarcção do colágeno do tipo II no precipitado celular (verde fluorescente) e delimitação da área imunomarcada (vermelho) para quantificação.

- ***Análise da expressão gênica de POU5F1, ACAN e COL2A1 em células tronco mesenquimais por qRT-PCR***

Extração de RNAm de células tronco mesenquimais

Para a análise da expressão do gene de agrecano (ACAN), do colágeno do tipo II (COL2A1) e de um dos fatores de transcrição essencial na manutenção da pluripotência característico de ESC, mas também presente em ADSCs, (POU5F1), as ADSCs foram cultivadas em garrafas de cultura de 75cm² e divididas em três grupos. Um grupo foi estimulado com Col V (50µg/mL por 72h), outro foi estimulado com TGF-β1 (10ng/mL por 72h) servindo como controle positivo ou indicador de potencial estímulo condrogênico, enquanto o terceiro grupo não recebeu estímulo, sendo cultivado somente com DMEM suplementado com 10%SFB e 1% de antibiótico. Após confluência de 100%, o RNA total foi extraído pelo método de Chomczynski e Sacchi, 1987, utilizando-se o reagente Trizol® (uma solução monofásica de fenol e isoticianato de guanidina; Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante ⁽⁷⁸⁾.

Para a separação do RNA, após adição de 200µl de clorofórmio, as amostras foram rapidamente agitadas, mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos e submetidas à centrifugação (12.000g), por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um tubo novo. Para a precipitação do RNA foram adicionados 500µl de álcool isopropílico às amostras, as quais foram homogeneizadas por inversão e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas (12.000 g) por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA lavado em 1mL de etanol (75% em água deionizada tratada com dietilpirocarbonato - DEPC) e centrifugado por 10 minutos, 12.000g a 4°C. Por fim, o RNA foi dissolvido em 25µl de água DEPC (Merck, Alemanha), que constitui um forte inibidor de ribonuclease.

Tratamento das amostras de RNA com DNase

A fim de diminuir a contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com DNase, Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega®, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), de acordo com as instruções do fabricante.

A avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA foi feita em espectrofotômetro (Nano Vueplus; GE), a partir de 2µl das amostras de RNA dissolvidas em água DEPC. Para obtenção de RNA com alto grau de pureza, a relação entre as leituras obtidas nos comprimentos de onda 260nm e 280nm deve estar entre 1,7 e 2,0.

Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Para a reação de qRT-PCR foram selecionados os genes de interesse POU5F1, ACAN e COL2A1 e o gene endógeno GAPDH, específicos para coelho (Tabela 3). As sequências dos genes foram adquiridas pelo site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. Para a montagem do mapa gênico da sequência escolhida foi utilizado o *software* localizado no endereço eletrônico:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.

Tabela 3 - Sequência de oligonucleotídeos.

Gene	Sense	Reverse	Pares de base (pb)
GAPDH	AGGTCATCCACGACCACTTC	GTGAGTTTCCCGTTCAGCTC	202
POU5F1	GCCGACAACAATGAGAACCT	ACACGGACCACGTCTTTCTC	197
ACAN	GTGACCGAGGTCAGTGGATT	CCAGGTCAGGGATTCTGTGT	175
COL2A1	GAGACCTGAACTGGGCAGAC	GACACGGAGTAGCACCATCG	192

A expressão dos genes foi avaliada por PCR em tempo real utilizando o equipamento Step One (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com o kit Super Script III Platinum SYBR® Green One-Step qRT-PCR (Life Technologies). Cada reação foi realizada com 15 µl de solução, contendo 1,75 µl de água deionizada estéril; 7,5 µl da mistura de reação 2XSYBER® Green; 0,15 µl de cada primer a 10nM; 0,3 µl de Super Script III RT/Platinum Taq Mix; 0,15 µl de ROX Reference Dye e 5 µl de RNA total a 20ng/µl. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra). A análise da expressão gênica foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, usando o gene da GAPDH como controle interno.

As reações de qRT-PCR foram padronizadas com a finalidade de encontrar a melhor temperatura de anelamento para cada gene em estudo. Desta forma um único pico de fluorescência foi detectado para cada gene. Os tamanhos dos fragmentos gerados pelo qRT-PCR foram conferidos em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo. As condições de ciclagem para os genes foram as seguintes: 50°C por 10 minutos (para síntese de cDNA), seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C para GAPDH e COL2A1, 59°C para ACAN e 57°C para o gene POU5F1 por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Foi realizada curva de *melting* (fusão) para cada gene para verificação e certificação de um único pico de fluorescência para cada amostra analisada.

3.4 INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE

Os animais (n=24) foram submetidos à indução de OA através de meniscectomia parcial no joelho direito, modelo estabelecido por Moskowitz (1972) ⁽⁷⁹⁾ e modificado por Velosa e colaboradores em 2001 ⁽¹¹⁾. A anestesia foi ministrada via intramuscular (Xilazina 5mg/Kg e Ketamina 50mg/Kg) e os procedimentos realizados em condições assépticas.

A indução de OA experimental foi realizada através de uma incisão parapatelar lateral no joelho direito, seguido da remoção de um quarto anterior do menisco lateral, preservando os ligamentos (Figura 16). Para a sutura foi utilizado fio mononylon 4,0 em pontos separados simples.

Todos os animais receberam por um período de três dias, antibiótico (Enrofloxacina 5mg/kg, uma vez ao dia) e anti-inflamatório (Cetoprofeno 10mg/kg, 12/12 horas), por via subcutânea.

Os animais submetidos anteriormente à lipectomia, para isolamento das ADSCs, foram divididos randomicamente em dois grupos:

- **OA/ADSCs (n=8):** Grupo com indução de OA, por meniscectomia parcial e com tratamento mensal de injeção intra-articular de ADSCs autólogas na concentração de 1×10^6 células em 0,3mL de solução fisiológica.
- **OA/ADSCs/V (n=8):** Grupo com indução de OA, por meniscectomia parcial e com tratamento mensal de ADSCs autólogas, previamente estimuladas com Col

V (50 μ g/mL) em cultura por 72 horas, na concentração de 1×10^6 células em 0,3mL de solução fisiológica.

Os animais não submetidos à lipectomia, para isolamento de ADSCs, e com osteoartrite induzida por meniscectomia parcial serviram como grupo controle de OA.

- **OA (n=8):** Grupo com indução da OA, por meniscectomia parcial, sem tratamento.

Figura 16 – Indução de osteoartrite em coelho por meniscectomia parcial na região lateral do joelho direito.

3.4.1 *Protocolo terapêutico*

Após o procedimento de indução de OA e antissepsia do joelho direito com álcool iodado, o grupo **OA/ADSCs** foi tratado com uma injeção intra-articular (Figura 17) de 0,3mL de 1×10^6 de ADSCs e o grupo **OA/ADSCs/V** foi tratado com uma injeção intra-articular de 0,3mL de 1×10^6 de ADSCs, cultivadas previamente com Col V (50 μ g/mL), em cultura, por 72 horas. Este tratamento foi realizado mensalmente, por um período de 22 semanas (Figura 18), de acordo com cada grupo e, após cada aplicação intra-articular, foram feitos movimentos de extensão e flexão na articulação do joelho a fim de dispersar a suspensão no espaço intra-articular. Depois deste período, os animais foram anestesiados com xilazina (5mg/Kg) e ketamina (50 mg/Kg) via intramuscular e submetidos a eutanásia, através de uma dose extra de 50 mg/Kg de ketamina e propofol, aplicada na veia marginal da orelha. As articulações dos joelhos direito e esquerdo foram coletadas para o estudo e, o restante das carcaças dos animais foram armazenadas em sacos plásticos (branco leitoso), padrão para materiais biológicos, devidamente

identificados e mantidos em freezer a -20°C , até o momento do descarte, conforme as normas de biossegurança estabelecidas pela FMUSP.

Figura 17 – Injeção intra-articular administrada nos grupos tratados com ADSCs e ADSCs/ColV, após a cirurgia de indução de osteoartrite com reforços mensais por 22 semanas.

Figura 18 – Esquema do delineamento do estudo.

Lipectomia nos grupos **OA/ADSCs** e **OA/ADSCs/V** (n=16) para obtenção das células tronco mesenquimais e sua utilização no tratamento autólogo. Indução de OA por menisectomia parcial do joelho direito nos grupos **OA**, **OA/ADSCs** e **OA/ADSCs/V** (n=24), seguido de seus respectivos tratamentos e eutanásia após um período de 22 semanas.

3.4.2 Coleta das articulações

As articulações dos joelhos direito (JD) e esquerdo (JE) de todos os animais foram coletadas e, parte do tecido cartilaginoso foi mantido em tubos criogênicos livres de RNase em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenado em freezer -80°C para biologia molecular (Figura 19). A porção restante das articulações foi fixada em formol tamponado 10%, por cerca de 24 horas, seguido de descalcificação com ácido nítrico 7% em meio aquoso. A seguir foram submetidas aos procedimentos histológicos de rotina, para a avaliação morfológica.

Com este intuito, foram realizados cortes histológicos de 4 a 5µm de espessura com um espaço de 50µm entre eles e, corados com hematoxilina-eosina (H&E) e Safranina-O/*Fast-green*.

Figura 19 – Esquema da coleta de material.

3.4.3 Avaliação da espessura da cartilagem

Foram utilizados cortes histológicos transversais (4-5µm) dos côndilos femoral lateral e medial e platôs lateral e medial da tíbia, corados com H&E, para a avaliação da espessura da cartilagem através de análise de imagem. O sistema de análise de imagem

consiste em uma câmera CCD Sony, acoplada ao microscópio Olympus BX-51, a qual captura as imagens e as envia para o monitor por um sistema de digitalização (Oculus TCX, Coreco, Inc, St. Laurent, Quebec, Canada). As imagens foram digitalizadas em aumento de 200X e processadas pelo software *Image-Pro Plus 6.0*[®]. Seis linhas verticais foram traçadas entre a superfície da cartilagem até a linha de crescimento, partindo de um ponto central do tecido e 250µm e 500µm à direita e à esquerda. A partir da média aritmética das linhas traçadas foi calculada a espessura da cartilagem em µm².

Figura 20 – Ilustração da análise da espessura da cartilagem pelo *Software Image-Pro Plus 6.0*.

3.4.4 Avaliação da densidade de condrócitos

Para a avaliação dos condrócitos na cartilagem corada por H&E foi utilizado o método estereológico de contagem de pontos, de acordo com Gundersen e col. 1988, com modificações⁽⁸⁰⁾. Novamente, foi utilizado o sistema de análise de imagem *Image-Pro Plus 6.0*, no qual a captura das imagens foi realizada como descrito anteriormente. Utilizando-se os recursos de medidas do *Image-Pro Plus 6.0* foi construído um retículo com 100 pontos, distribuídos ortogonalmente sobre a imagem adquirida (Figura 21). A avaliação foi realizada por observador, às cegas, em 10 campos randomizados da

cartilagem em aumento de 400X. A porcentagem de células ($C\%$), corresponde à relação do número de pontos que incidem sobre as células coradas em H&E, pelo número total de pontos que incidem na região da superfície da cartilagem até a linha de crescimento do tecido cartilagenoso, multiplicado por 100:

$$C\% = (P_i / P_{tc}) \times 100$$

Sendo P_i , o número de pontos que incidem sobre as células coradas em H&E e P_{tc} , o número total de pontos na área delimitada do tecido cartilagenoso. A porcentagem total de células por amostra foi calculada a partir da média de todos os 10 campos analisados. O resultado foi dado em porcentagem de condrócitos por μm^2 .

Figura 21 – Ilustração da contagem de condrócitos pelo *Software Image-Pro Plus 6.0*, pelo método estereológico de contagem de pontos (*point-counting method*).

3.4.5 Avaliação dos proteoglicanos

A análise histomorfométrica foi realizada para avaliação dos proteoglicanos, na cartilagem corada com Safranina-O/*fast-green*, por meio de análise de imagem. A captura das imagens foi realizada como descrito anteriormente, e, o *software Image-Pro Plus 6.0*, permitiu quantificar a perda dos proteoglicanos, através da densidade de

impregnação do corante no tecido cartilaginoso. Todos os campos microscópicos foram analisados, por observador, às cegas, sendo adquiridas aleatoriamente 10 imagens de cada caso, em aumento de 400X. A área correspondente à superfície da cartilagem até a linha de crescimento, de cada imagem adquirida, foi medida em μm^2 e utilizando-se os recursos do *software Image-Pro Plus 6.0*, de seleção de cores, a tonalidade azul, que sinaliza a perda de proteoglicanos, foi quantificada (Figura 22). A média da área corada em azul foi dividida pela média da área total analisada e o resultado final expresso em porcentagem.

3.4.6 Avaliação do processo de apoptose celular na cartilagem

Para avaliação da apoptose de condrócitos na cartilagem foi realizada reação de imunohistoquímica, para a imunomarcação de FasL (Fas ligante) com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-FasL (1:20) (Neomarkers, Fremont, CA) e o kit de revelação Novolink (Leica Biosystems. New Castle Ltd, UK), de acordo com as especificações do fabricante. As células positivas para FasL foram quantificadas utilizando-se o método estereológico de contagem de pontos, de acordo com Gundersen e col., 1988, com modificações⁽⁸⁰⁾. Novamente, foi utilizado o sistema de análise de imagem *Image-Pro Plus 6.0*, no qual a captura das imagens foi realizada como descrito anteriormente. Utilizando-se os recursos de medidas do *Image-Pro Plus 6.0* foi construído um retículo com 100 pontos, distribuídos ortogonalmente sobre a imagem adquirida (Figura 23). A avaliação foi realizada por observador, às cegas, em 10 campos randomizados da cartilagem em aumento de 400X. A porcentagem de pontos que incidem nas células marcadas com FasL (FL%) (apoptose), na região compreendendo a superfície da cartilagem até a linha de crescimento do tecido cartilaginoso, foi expressa conforme a fórmula:

$$FL\% = (P_i / P_{tc}) \times 100$$

Sendo P_i , o número de pontos que incidem sobre as células marcadas para FasL e P_{tc} , o número total de pontos na região da superfície até a linha de crescimento do tecido cartilaginoso. A porcentagem (FL%) de células marcadas por amostra foi calculada a partir da média de todos os 10 campos analisados. O resultado foi dado em número de condrócitos marcados com FasL por μm^2 .

Figura 23 – Ilustração da contagem de condrócitos em apoptose, marcados pelo FasL, através do *Software Image-Pro Plus 6.0*, pelo método estereológico de contagem de pontos (*point-counting method*).

3.4.7 Avaliação do colágeno tipo II na cartilagem

- **Imunofluorescência do colágeno tipo II na cartilagem**

Para imunomarcção do colágeno tipo II, os cortes de 4 μ m de espessura do cndilo do joelho direito (meniscectomizado) foram aderidos em lâminas, previamente tratadas com *3-aminopropiltriethoxy Silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A reação foi iniciada pela desparafinização dos cortes, através da imersão das lâminas em xilol aquecido a 60°C, por 30 minutos, seguida de dois banhos de 10 minutos em xilol, à temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), seguida de lavagem com água corrente por 10 minutos, água destilada e PBS por 15 minutos.

Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos, os cortes foram submetidos à digestão enzimática com condroitinase ABC 2UN (Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO, USA), em tampão contendo Tris 50mM, pH=8,0, acetato de sódio 60mM e BSA 0,02%, por três horas a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes por 5 minutos e, submetidas à digestão enzimática com pepsina gástrica de porco (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, 10000 UTI/mL) 8mg/mL, diluída em ácido acético 0,5N, por 30 minutos, a 37°C. Após a recuperação antigênica, os cortes foram submetidos a um ciclo de três lavagens com PBS, por 10 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos, os cortes foram incubados com BSA 5% diluído em PBS, durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas, por uma noite, a 4°C, com o anticorpo policlonal de camundongo anti colágeno II, numa diluição de 1:20 em PBS. Após esse período, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS Tween₂₀ 0,05%, por três vezes de 10 minutos, e incubados por 60 minutos, a temperatura ambiente, com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (ALEXA FLUOR 488, Invitrogen, Life Technology), diluído 1:150 em PBS, contendo azul de Evans 0,006%. Os cortes foram novamente lavados com PBS Tween₂₀ 0,05% e as lâminas montadas com glicerina em PBS (v/v), para a análise no microscópio de fluorescência *Olympus BX51* (Olympus Co, Tokyo, Japan).

- ***Análise da expressão de colágeno tipo II na cartilagem***

A expressão de colágeno tipo II no côndilo do joelho direito foi avaliada através de análise de imagem, pelo software *Image Pro-Plus 6.0*, onde a captura das imagens foi realizada como descrito anteriormente. A análise foi realizada por observador, às cegas, sendo adquiridas imagens de cada caso num aumento de 400 vezes. A área de cada campo analisado foi medida em μm^2 (Figura 24A). Ainda, utilizando-se os recursos do *software Image ProPlus 6.0* de seleção de cores; a tonalidade verde fluorescente, que identifica o colágeno II foi quantificada (Figura 24B, delimitado em vermelho). A média da área imunomarcada, correspondente ao colágeno II foi dividida pela média da área total analisada e o resultado final expresso em porcentagem.

Figura 24 – Ilustração da imunomarcagem do Colágeno II e quantificação através do *Software Image-Pro Plus 6.0*.

(A) Área total avaliada em μm^2 (vermelho). (B) Identificação da imunoposição de Colágeno II, utilizando os recursos de seleção de cores (vermelho).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram analisados mediante testes estatísticos para comparação, baseados nos tipos de distribuição das variáveis (paramétricas ou não paramétricas) utilizando o programa estatístico *Graphpad prism 4.1* (CA 92037 USA).

Os valores obtidos pelos estudos de cada variável contínua foram organizados e descritos pela média e desvio padrão. Para a comparação entre as médias dos grupos

amostrais foi utilizado o teste *One-way ANOVA*, utilizando como pós- teste o método de *Tukey*. Para que fosse considerada diferença entre médias e frequências ou a presença de correlação entre variáveis, foi utilizado o valor de significância estatística menor a 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ADSCs DE COELHOS

4.1.1 *Análise do Potencial de Diferenciação*

A avaliação do potencial de diferenciação das ADSCs de coelhos em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, através das colorações histológicas de *Oil Red-O*, *Alcian Blue* e vermelho de Alizarina, mostrou que as ADSCs, dos grupos de coelhos analisados neste estudo, obedeceram aos critérios para a caracterização de células tronco mesenquimais, de acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular. Assim sendo, foi observado na Figura 25 (painéis, A-C) que as ADSCs, cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% Penicilina/Estreptomicina estavam indiferenciadas, pois apresentaram coloração negativa para lipídeos (A), proteoglicanos (B) e sais de cálcio (C), indicando que as ADSCs que não foram cultivadas com meios específicos de diferenciação não produziram proteínas específicas de células somáticas.

Por outro lado, as ADSCs que foram cultivadas com meio adipogênico, apresentaram diferenciação para adipócitos, caracterizadas pela coloração positiva para gotículas lipídicas citoplasmáticas, coradas com *Oil Red-O* 0,5% em isopropanol (Figura 25D). Ainda nas ADSCs cultivadas em meio condrogênico, também foi obtido positividade para a síntese de proteoglicanos, identificados através da coloração de *Alcian Blue* 1% em HCl 0,1N, mostrando que estas células apresentaram diferenciação condrocitária (Figura 25 E). Do mesmo modo, quando cultivamos as ADSCs em meio osteogênico, pôde-se observar sinais de diferenciação pela presença de agregados de sais de cálcio que foram caracterizados pela intensa coloração do vermelho de alizarina.

Figura 25 – Caracterização de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo através da diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.

Células tronco mesenquimais do tecido adiposo de coelhos observadas em contraste de fase cultivadas em placa de cultura com DMEM, suplementado com 10% SFB e 1% Penicilina/Estreptomicina e coradas com *Oil Red-O* 0,5% em isopropanol (A), *Alcian Blue* 1% em HCl 0,1N (B) e em vermelho de alizarina 2% (C). As ADSCs cultivadas com meio adipogênico, por 14 dias, e coradas com *Oil Red* 0,5% em isopropanol, mostraram diferenciação adipogênica, pela identificação das gotículas lipídicas no citoplasma (D, seta); as ADSCs cultivadas em meio condrogênico, por 14 dias, e coradas com *Alcian Blue* 1% em HCl 0,1N, mostram a síntese de proteoglicanos em azul (E, seta) e as cultivadas com meio osteogênico, por 21 dias, mostram a síntese de sais de cálcio, corada com o vermelho de Alizarina 2% (F, seta).

4.1.2 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Imunofluorescência

Na Figura 26 A-L observa-se o resultado da caracterização da cultura de ADSCs analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, imunofluorescência e microscopia confocal. Pode-se evidenciar nas micrografias eletrônicas da cultura de ADSCs (Figura 26, A-H), em menor aumento, as células cultivadas viáveis, dispostas em blocos levemente coesos, com vesículas eletrondensas, resultantes da adaptação das células em cultura (Figura 26A). Em grande aumento, observa-se as células tronco mesenquimais frequentemente binucleadas, exibindo núcleos chanfrados com membrana nuclear eletrondensa, nucleoplasma e cromatina uniforme, com discreta eletrondensidade (Figura 26B), mas com nucléolo evidente (Figura 26C). No citoplasma, as células mesenquimais apresentam vesículas pinocíticas com localização perinuclear ou junto à membrana citoplasmática (Figura 26, D-G). As ADSCs também apresentam grande quantidade de retículo endoplasmático granular (Figura 26F), mitocôndrias esparsas (Figura 26F) e é evidente a presença de uma rede rica de filamentos intracitoplasmáticos (Figura 26, G-H). Por outro lado, a análise da imunofluorescência para vimentina da cultura de ADSCs apresentou intensa expressão desta proteína, assinalada pela forte fluorescência no citoplasma dessas células (Figura 26I). As ADSCs apresentaram uma expressão negativa para CD34, indicando que a linhagem não estava diferenciada em células endoteliais ou hematopoiéticas (Figura 26L). Ainda, a análise em 3D em microscópio confocal foi tênue para colágeno II (Figura 26J), assim como a co-localização de vimentina (Figura 26K, asterisco) e colágeno II (Figura 26K, seta), confirmando a linhagem mesenquimal.

Figura 26 – Micrografias eletrônicas (A-H) e imunomarcação (I-L) de cultura de células tronco mesenquimais.

Pode-se notar em visão panorâmica das células tronco mesenquimais exibindo coesividade (A). Em grande aumento, as ADSCs são frequentemente binucleadas e exibem núcleos (N) chanfrados com membrana nuclear eletrondensa, nucleoplasma e cromatina uniforme com discreta eletrondensidade (B) e nucléolo evidente (Nu) (C). No citoplasma, notamos vesículas pinocíticas (VP) localizadas na região perinuclear ou junto à membrana citoplasmática (D-G). Retículo endoplasmático granular (RE) ativo (F) e mitocôndrias (Mi) esparsas (F). Notar rede rica de filamentos intracitoplasmáticos (G-H). Imunofluorescência da cultura de ADSCs (I-L). No painel I, nota-se forte expressão de vimentina na região citoplasmática em verde. Em J, observa-se a expressão positiva para colágeno II (verde), que é confirmada pela microscopia confocal com co-localização de vimentina (asterisco, verde) / colágeno II (seta, alaranjado) (K). No painel L, não se observa imunomarcação para CD34 nestas células.

4.2 ANÁLISE DA DOSE/RESPOSTA PARA COLÁGENO V EM CULTURA DE ADSCs

A análise da resposta para os estímulos das ADSCs *in vitro* com Col V, nas concentrações 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL e 400µg/mL em 24h, 48h, 72h, 7 dias, 14 dias e 21 dias, mostrou que o colágeno do tipo II, produzido por estas células, esteve mais expresso na concentração de 50µg/mL de Col V por 72h (*dados não mostrados*). A Figura 27, A-J demonstra os resultados da imunofluorescência após o estímulo com Col V (50µg/mL por 72h), onde observa-se que tanto as ADSCs, cultivadas somente com DMEM suplementado (cultura controle), como as ADSCs cultivadas previamente com Col V, exibiram marcação positiva para vimentina (Figura 27, A-B) e negativa para CD34 (Figura 27, C-D), caracterizando a linhagem de células tronco e mostrando que essas células, mesmo após estímulo, mantiveram o padrão de expressão característico da linhagem mesenquimal. Tanto a cultura controle como a estimulada com colágeno V mostrou uma expressão tênue para os colágenos fibrilares dos tipos I e III (Figura 27, E-H). Por outro lado, a imunomarcação para colágeno do tipo II (diferenciação condrocitária) mostrou-se muito intensa na cultura estimulada com Col V, em relação às células sem estímulo (Figura 27, I-J).

Figura 27 – Imunofluorescência para vimentina, CD34, colágenos I, II e III em ADSCs controle e após estímulo com colágeno V.

Precipitado de ADSCs (E-F e I-J) e lamínulas com ADSCs (A-D e G-H), cultivadas em DMEM suplementado (controle) e cultivadas com estímulo com Col V. As ADSCs controle (A) e estimuladas com Col V (B), mostraram imunomarcagem positiva para vimentina e negativa para CD34 (C e D). Notar uma tênue expressão na imunofluorescência para os colágenos I (E-F) e III (G-H), nas células controle e nas estimuladas com Col V. As ADSCs sem estímulo, mostraram imunoexpressão negativa para o colágeno II (I) e, ao contrário, as ADSCs estimuladas com Col V, mostram intensamente expressão do colágeno II (J).

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CONDRÓGÊNICO DAS ADSCS DE COELHOS ESTIMULADAS COM COLÁGENO V

A figura 28 (painéis A-F) ilustra os resultados das características condrogênicas das ADSCs, cultivadas com DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina e estimuladas com Col V. No que se refere à avaliação da síntese de proteoglicanos, nos precipitados celulares da cultura das ADSCs coradas pelo *Alcian Blue*/PAS (Figura 28, A-B), nota-se um aumento na expressão de proteoglicanos após o estímulo com Col V, indicado pela impregnação azul do corante (Figura 28B), quando comparado ao precipitado celular sem estímulo (Figura 28A). A avaliação da síntese de colágeno total pela coloração do Picrosírius, por microscopia de polarização (Figura 28, C-D), também foi mais intensa após o estímulo com Col V, indicada pelo aumento de pontos birrefringentes róseo-avermelhados no precipitado celular da cultura (Figura 28D), quando comparada com as ADSCs sem estímulo (Figura 28C). Ainda foi demonstrado na Figura 28 (E-F), que a expressão para osteocalcina apresentou-se negativa no precipitado celular da cultura das ADSCs estimuladas com Col V, quando comparado às ADSCs sem estímulo.

Figura 28 – Coloração para proteoglicanos e colágeno e, imunofluorescência para proteína de formação óssea em ADSCs controle e após estímulo com colágeno V. Os painéis A e B representam os precipitados celulares das culturas de ADSCs corados pelo *Alcian Blue*/PAS. Nota-se um aumento expressivo dos proteoglicanos após o estímulo com Col V, indicado pela impregnação azul do corante (B) quando comparado ao precipitado celular sem estímulo (A). Nos painéis (C) e (D) observamos os precipitados celulares corados pelo Picrosírius analisados em microscópio de polarização. Nota-se o aumento da síntese de colágeno, caracterizada pela birrefringência rosa-avermelhada de padrão estrelado no precipitado celular que foi estimulado com Col V (D), quando comparado com o controle sem estímulo (C). A imunomarcação para osteocalcina foi negativa no precipitado de ADSCs estimuladas com Col V (F) em relação às ADSCs controle (E).

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COLÁGENO DO TIPO II PELAS ADSCs DE COELHOS ESTIMULADAS COM COLÁGENO V, COMPARADA A OUTROS ESTÍMULOS

Nossos resultados mostram que a expressão para o colágeno do tipo II através da microscopia confocal, corroborou com os dados observados em microscópio de fluorescência, afirmando a intensa expressão deste marcador condrogênico após o estímulo com colágeno do tipo V (Figura 29B), em relação às cultivadas com DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Figura 29A) e também nas ADSCs estimuladas com TGF- β 1 (Figura 29C).

Ainda a associação com TGF β -1 ao estímulo com colágeno do tipo V, mostrou diminuição na expressão de colágeno II (Figura 29D) em relação ao estímulo com colágeno V (Figura 29B) e, uma maior expressão em relação às ADSCs cultivadas sem estímulo (Figura 29A). Adicionalmente, observamos que as ADSCs quando estimuladas com colágeno do tipo I (Figura 29E), a expressão colágeno do tipo II é semelhante às ADSCs cultivadas sem estímulo (Figura 29A). Quando associamos o estímulo com colágeno do tipo I e TGF β -1 (Figura 29F), a expressão foi semelhante ao estímulo do colágeno V mais TGF β -1 (Figura 29D) e, maior em relação às ADSCs cultivadas sem estímulo (Figura 29A).

Anti col-II/DAPI

Figura 29 – Imunofluorescência para colágeno do tipo II em ADSCs controle e estimuladas com ColV, ColV+TGF- β 1, TGF- β 1, ColI e ColI+ TGF- β 1.

Notar a intensa fluorescência (verde) da expressão de colágeno do tipo II na cultura de células estimuladas com colágeno V (B) comparadas com as sem estímulo (A) e comparadas ao controle positivo TGF- β 1 (C). Em contraste após o estímulo com colágeno do tipo I (E) as ADSCs não apresentaram alteração no padrão de síntese do colágeno do tipo II em relação ao controle sem estímulo (A). Observar em (F) um pequeno aumento na expressão do colágeno do tipo I, quando o colágeno I foi associado ao TGF- β 1. Em (D) observamos uma menor expressão de colágeno II quando TGF- β 1 é associado ao colágeno V, quando comparamos com as ADSCs estimulada somente com colágeno V (B).

4.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO COLÁGENO DO TIPO II NAS ADSCS DE COELHOS

A análise quantitativa da imunomarcação para colágeno do tipo II em *pellet* das ADSCs cultivadas com e sem estímulo com colágeno do tipo V, confirma a avaliação morfológica e ultraestrutural desta proteína, onde foi observado um aumento significativo do colágeno do tipo II nas células estimuladas com colágeno do tipo V em relação à cultura controle, respectivamente ($73,7 \pm 2,9\%$ vs $8,7 \pm 1,1\%$, $p < 0,0001$) demonstrado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Análise gráfica da quantificação do colágeno do tipo II por imunofluorescência das ADSCs cultivadas com DMEM suplementado e estimuladas com Col V

Valor expresso por fração de área (%). Análise pelo *GraphPad Prism*-versão 5.0 ($*p < 0,0001$)

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES COL2A1, ACAN E POU5F1 NAS ADSCS ESTIMULADAS COM COLÁGENO DO TIPO V

A avaliação da expressão do gene COL2A1 a partir do RNAm das ADSCs estimuladas com colágeno V e controles, corroboram com os nossos resultados morfológicos e histomorfométricos da expressão proteica do colágeno do tipo II. Foi observado que a expressão do gene COL2A1 apresentou-se significativamente aumentada nas ADSCs estimuladas com colágeno V, quando comparado com a cultura

controle e no controle positivo com TGF- β 1 ($p<0,05$) como mostra a Figura 30 e Tabela 4. Estes resultados demonstram mais uma vez que o estímulo com colágeno V induz a síntese do colágeno do tipo II nas ADSCs, justificando a expressão proteica aumentada.

Adicionalmente, os resultados para a expressão do gene ACAN também demonstraram um aumento significativo para a síntese deste gene nas ADSCs estimuladas com colágeno V, quando comparamos com a cultura controle ($p<0,05$) (Figura 30 e Tabela 4), o que confirma nossos resultados morfológicos através da coloração com *Alcian-Blue/PAS* (Figura 28 A-B). Em contraste à expressão do POU5F1 não apresentou diferença estatística, mas esteve expresso em todos os estímulos celulares estudados (Figura 30 e Tabela 4). Este resultado confirma que as ADSCs mesmo depois de serem submetidas ao estímulo com colágeno do tipo V e TGF- β 1 não perderam seu fenótipo celular, apesar de haver uma diferença numérica para a diminuição deste marcador após os estímulos.

Figura 30 – Representação gráfica da quantidade relativa da expressão dos genes COL2A1, POU5F1 e ACAN de ADSCs sem estímulo e cultivadas com TGF- β 1 e ColIV por qRT-PCR.

Significância estatística com teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 4 - Quantificação relativa da expressão dos genes COL2A1, POU5F1 e ACAN e em ADSCs cultivadas sem estímulo (controle), estimuladas com TGF- β 1 e com colágeno V.

Gene	ADSCs/Controle	ADSCs/TGF- β 1	ADSCs/ColV
COL2A1	1,0 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,1*	2,5 $\pm$ 0,2*
POU5F1	1,0 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,4
ACAN	1,0 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,7*

Valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. Significância estatística com teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$)

4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO EFEITO DA TERAPÊUTICA CELULAR NA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA

A figura 31, painéis A D, G, mostra a análise morfológica do côndilo direito no grupo OA. Neste grupo de animais observa-se a solução de continuidade na forma de fissuras lineares sobre a superfície da cartilagem articular, redução na espessura das trabéculas ósseas como mostra a Figura 31 A. Ainda no grupo OA, na junção osteocartilaginosa, em maior aumento são observadas linhas de aposição azuis, mostrando o intenso remodelamento do tecido ósseo (Figura 31 D) e desorganização dos condrócitos com formação de “clusters” celulares sólidos característicos de uma cartilagem osteoartrítica (Figura 31 G).

Após o tratamento, a continuidade da superfície articular foi restabelecida, principalmente no grupo OA/ADSCs/V que apresentou menos fibrilações (Figura 31 C, F, I) e, a espessura das traves ósseas (Figura 31 B, E, H) foi similar entre os grupos tratados. Em grande aumento, o desarranjo espacial dos condrócitos dispostos em “clusters” celulares coesos na osteoartrite (Figura 31 G) apresenta-se de forma ordenada no grupo após o tratamento OA/ADSCs/V (Figura 31 I) quando comparamos com os grupos OA (Figura 31 C) e OA/ADSCs (Figura 31 H).

Figura 31 – Fotos representativas do côndilo do joelho direito dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V, corados em H&E e avaliados por microscopia óptica. Microscopia óptica da articulação do joelho côndilo direito após indução de osteoartrite (A, D, G), diminuição do processo osteoartítico após tratamento com células tronco mesenquimais de tecido adiposo (B, E, H) e após o tratamento com células tronco mesenquimais estimuladas com colágeno V (C, F, I). O côndilo direito apresenta fissuras lineares sobre a superfície da cartilagem articular e redução na espessura das trabéculas ósseas (D, G); há desorganização dos condrócitos com formação de “clusters” (G, seta). Em contraste, o tratamento reestabeleceu grande extensão da continuidade da superfície articular e a espessura da cartilagem (E, H) similar ao tratado com células tronco mesenquimais estimuladas com colágeno V (F, I). Em grande aumento, nota-se que os condrócitos dispostos em “clusters” (G) estão mais orientados na superfície cartilaginosa, após os tratamentos (H) (I), embora o último grupo tenha apresentado menor quantidade de fibrilações (I).

4.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PARAMETROS MORFOLÓGICOS APÓS A TERAPÊUTICA CELULAR NA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA

4.8.1 Aumento da Espessura Cartilaginosa Após a Terapia Celular

Na tabela 5 observa-se os resultados obtidos da análise histomorfométrica da espessura na cartilagem articular após a terapia com ADSCs e ADSCs estimuladas com colágeno do tipo V. Nota-se um efeito positivo no que se refere ao ganho tecidual nos animais dos grupos tratados. O côndilo direito e o platô da tíbia do grupo OA/ADSCs/V apresentaram aumento significativo da espessura cartilaginosa quando comparado aos grupos OA e OA/ADSCs ($p < 0,05$). No platô do joelho direito nos animais do grupo OA/ADSCs foi obtido uma resposta intensa e estatisticamente significativa para terapia celular, quando relacionamos com o côndilo do joelho direito (Côndilo JD) (Tabela 5 e Gráfico 2A). No joelho contralateral (Côndilo JE e Platô JE) a terapia celular também foi positiva nos grupos OA/ADSCs e OA/ADSCs/V, quando comparado com o grupo OA (Tabela 5 e Gráfico 2B). Estes dados mais uma vez corroboram com os resultados obtidos através avaliação morfológica em H&E e comprovam um ganho significativo de tecido após a terapêutica celular (Figura 31-A-I).

Tabela 5 - Medida da espessura da cartilagem expressa em % de células/ μm^2 no côndilo e platô dos joelhos direito (JD) e esquerdo (JE) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V avaliados através da coloração de H&E.

Espessura da cartilagem	JD Côndilo	JD Platô	JE Côndilo	JE Platô
OA	25,5 $\pm$ 6,4	25,1 $\pm$ 7,1	24,2 $\pm$ 7,0	29,6 $\pm$ 12,1
OA/ADSCs	29,7 $\pm$ 7,0	31,0 $\pm$ 7,5	35,7 $\pm$ 10,8*	43,0 $\pm$ 13,4*
OA/ADSCs/V	38,8 $\pm$ 7,0*	56,6 $\pm$ 8,0*	39,0 $\pm$ 6,4*	43,7 $\pm$ 10,6*

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni: * $p < 0,05$

Gráfico 2 - Representação gráfica da espessura da cartilagem articular dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V.

4.8.2 Aumento da Celularidade Após a Terapia Celular

A tabela 6 evidencia os resultados provenientes da análise histomorfométrica dos condrócitos após a terapia com ADSCs e ADSCs estimuladas com colágeno do tipo V. Observa-se que a terapia celular conseguiu auxiliar o aumento no número de condrócitos em todos os animais tratados (Tabela 6 e Gráfico 3). Entretanto somente foram significativos os dados obtidos do côndilo do JD do grupo OA/ADSCs/V, quando comparado com o grupo OA ($p < 0,05$) (Tabela 6 Gráfico 3A). Os resultados referentes à celularidade, mostram que apesar das ADSCs estimularem o aumento de condrócitos na cartilagem osteoartrítica, somente as ADSCs/ColV conseguiram interferir positivamente no processo degenerativo. Estes resultados complementam e corroboram com os achados da análise morfológica da distribuição dos condrócitos nos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V que observamos através da coloração de H&E (Figura 31 A-I).

Tabela 6 - Contagem de condrócitos na cartilagem expressos em % de células/ μm^2 no côndilo e platô dos joelhos direito (JD) e esquerdo (JE) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V avaliados através da coloração de H&E.

Celularidade	JD Côndilo	JD Platô	JE Côndilo	JE Platô
AO	28,3 $\pm$ 4,9	22,7 $\pm$ 4,9	40,0 $\pm$ 8,1	32,2 $\pm$ 9,7
OA/ADSCs	31,5 $\pm$ 6,8	26,3 $\pm$ 5,5	37 $\pm$ 5,3	28,2 $\pm$ 7,5
OA/ADSCs/V	43,0 $\pm$ 5,3*	30,3 $\pm$ 5,6	39,0 $\pm$ 13,9	37,0 $\pm$ 5,2

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni: * $p < 0,05$

Gráfico 3 - Representação gráfica da porcentagem de condrócitos da cartilagem articular dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V.

4.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA TERAPIA CELULAR NOS PROTEOGLICANOS DA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA

4.9.1 *Terapia com ADSCs estimuladas com colágeno V induz o aumento de proteoglicanos na cartilagem osteoartrítica*

Na figura 32 pode-se observar o resultado da análise morfológica e histomorfométrica do conteúdo de proteoglicanos na articulação do joelho dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V corados com Safranina-O/*fast green*. Na figura 32 A, representativa do grupo OA é possível observar a perda expressiva de proteoglicanos no côndilo do JD, caracterizada pela diminuição da coloração avermelhada resultante da coloração metacromática, principalmente perto das fissuras lineares da superfície da cartilagem articular. Ainda neste mesmo grupo nota-se a presença de proteoglicanos principalmente ao redor dos condrócitos com perda significativa na matriz cartilaginosa. A diminuição do conteúdo de proteoglicanos nesse grupo é presente tanto no côndilo do JD como no côndilo do JE, como mostra as figuras 32 D e E ($p < 0,05$). Em contraste, nos grupos OA/ADSCs e OA/ADSCs/V observa-se aumento da coloração avermelhada de padrão homogêneo da matriz cartilaginosa, que é identificada principalmente na zona mais profunda da cartilagem, rodeando a matriz pericondrocitária como observamos na Figura 32 B e C, respectivamente e comparadas ao padrão da coloração do grupo OA (Figura 32 A).

No grupo OA/ADSCs observa-se a coloração avermelhada de forma mais tênue, com padrão heterogêneo da matriz cartilaginosa (Figura 32 B) em relação ao grupo OA como mostra a Tabela 7 e Figura 32 D e E. Por outro lado no grupo OA/ADSCs/V (Figura 32 C) a perda de proteoglicanos foi menor e homogêneo, identificada pela coloração avermelhada resultante do corante Safranina-O/*fast green*. Estes dados foram confirmados pela análise histomorfométrica, que demonstrou diminuição da perda de proteoglicanos no côndilo do JD em relação ao grupo OA/ADSCs ($p < 0,05$), indicando que o estímulo com colágeno V foi mais eficaz do que o tratamento com ADSCs. Ainda, o grupo OA/ADSCs/V revelou uma importante diminuição da perda de proteoglicanos no côndilo do JD e do JE ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo OA (Figura 32 D). A análise histomorfométrica da expressão de proteoglicanos confirmam

os resultados obtidos através do H&E (Figura 31) e da Safranina-O/*fast green*, mostrando mais uma vez o ganho dos componentes da matriz da cartilagem.

Tabela 7 - Quantificação da perda de proteoglicanos na cartilagem articular no côndilo e platô dos joelhos direito (JD) e esquerdo (JE) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V, avaliados através da coloração de Safranina O/*fast green* e expressos em fração de área (%)

Perda de Proteoglicanos	JD Côndilo	JD Platô	JE Côndilo	JE Platô
OA	41,6±11,4	20,2±8,8	22,8±2,4	14,4±3,4
OA/ADSCs	31,8±8,3*	21,4±8,3	17,0±5,0	14,1±3,7
OA/ADSCs/V	17,7±6,1*	11,0±5,1	9,0±1,9*	4,4±1,2

Valores representam a média ± desvio padrão. Teste de Comparação Múltipla de Tukey

**p<0,05*

Figura 32 – Fotos representativas da cartilagem articular do côndilo direito dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V corados com Safranina-O/fast green.

Notar em (A) a região lesionada do côndilo direito com perda expressiva de proteoglicanos (diminuição da coloração avermelhada) principalmente perto das fissuras lineares da superfície da cartilagem articular. Notar a presença de proteoglicanos somente ao redor dos condrócitos e com perda significativa na matriz cartilaginosa. Em (B) aumento da coloração avermelhada no grupo OA/ADSCs, porém heterogênea na matriz cartilaginosa e na superfície da cartilagem caracterizando aumento da perda de proteoglicanos (diminuição do vermelho). Nota-se no grupo OA/ADSCs/V o aumento dos proteoglicanos, de padrão homogêneo na matriz cartilaginosa, indicada pela intensa coloração avermelhada (C). Gráficos representam a porcentagem de perda de proteoglicanos no joelho direito (D) e joelho esquerdo (E).

4.10 ANÁLISE DA TERAPIA CELULAR NA SÍNTESE DO COLÁGENO DO TIPO II NA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

4.10.1 Terapia com ADSCs estimuladas com colágeno V induz a síntese de colágeno II na cartilagem osteoartrítica

Na Figura 33 A-D e Tabela 8 observa-se os resultados da análise morfológica e histomorfométrica da imunofluorescência para colágeno do tipo II, na articulação do joelho dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V. No grupo OA (Figura 33 A) nota-se a intensa diminuição de colágeno II no côndilo do JD ($p < 0,05$) (Figura 33 A e Tabela 8), caracterizada pela diminuição da intensidade da imunofluorescência resultante da imunomarcagem para colágeno do tipo II na superfície da cartilagem articular e expressão aumentada na região pericondrocitária. Em contraste, no grupo OA/ADSCs foi identificado aumento na síntese de colágeno II, principalmente ao redor da região pericondrocitária, mas com uma tênue expressão desta proteína na matriz cartilaginosa, quando comparadas ao grupo OA/ADSCs/V (Figura 33 B). No entanto, no grupo OA/ADSCs/V a síntese do colágeno do tipo II apresenta-se intensamente aumentada, tanto na região pericondrocitária como na matriz cartilaginosa, indicando um aumento intenso da síntese desta proteína pelos condrócitos da cartilagem osteoartrítica ($p < 0,05$), (Figura 33 C e Tabela 8).

Tabela 8 - Análise quantitativa da síntese colágeno do tipo II no côndilo do joelho direito (JD) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V por imunofluorescência. Resultados expressos em porcentagem (%).

Colágeno II	JD Côndilo
OA	3,3±1,9
OA/ADSCs	4,5±1,0
OA/ADSCs/V	9,4±2,1*

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Teste de Comparação Múltipla de Tukey
* $p < 0,05$

Figura 33 – Imunofluorescência para colágeno do tipo II da cartilagem articular do côndilo direito dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V.

Notar em (A) na região lesionada do côndilo direito perda da expressão de colágeno II e ausência da imunomarcagem na matriz cartilaginosa. Notar a síntese de colágeno II somente ao redor dos condrócitos e com perda significativa na matriz cartilaginosa. Em (B) no grupo OA/ADSCs, observamos aumento da expressão de colágeno II na região pericondrocitária, mas ausente na matriz cartilaginosa. No grupo OA/ADSCs/V é observado intensa fluorescência na região pericondrocitária e na matriz cartilaginosa (C). Em (D) observamos a representação gráfica da fração de área imunomarcada para colágeno II nos grupos estudados.

4.11 ANÁLISE DA TERAPIA CELULAR NO MECANISMO DE APOPTOSE DA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA POR IMUNOHISTOQUÍMICA

4.11.1 Terapia com ADSCs estimuladas com colágeno V diminui a expressão de Fas-L na cartilagem osteoartrítica

Na Figura 34 A-D observa-se fotos representativas dos resultados da análise morfológica e histomorfométrica da imunohistoquímica para Fas-L, na articulação do joelho dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V. A Figura 34 A ilustra a intensa expressão do Fas-L no côndilo do JD no grupo OA ($p<0,05$), caracterizada pelo aumento da imunomarcagem para Fas-L na superfície da cartilagem articular e na região pericondrocitária. Em contraste, no grupo OA/ADSCs foi observado uma tênue diminuição da expressão deste marcador na região pericondrocitária, quando comparadas ao grupo OA (Figura 34 B). No entanto, no grupo OA/ADSCs/V a expressão do Fas-L apresenta-se diminuída na região pericondrocitária ($p<0,05$), indicando diminuição da apoptose dos condrócitos e recuperação da celularidade na cartilagem osteoartrítica, corroborando com nossos dados morfológicos e histomorfométricos em H&E (Figura 31 e Tabela 9).

Tabela 9 - Quantificação da expressão de Fas-L no côndilo do joelho direito (JD) dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V por imunohistoquímica. Resultados expressos em porcentagem (%) de células positivas/ μm^2

Fas-L	JD Côndilo
OA	19,1 $\pm$ 3,6
OA/ADSCs	14,7 $\pm$ 4,0
OA/ADSCs/V	11,0 $\pm$ 3,1*

Valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Teste de Comparação Múltipla de Tukey * $p<0,05$

Figura 34 – Imunohistoquímica da cartilagem articular do côndilo direito dos grupos OA, OA/ADSCs e OA/ADSCs/V imunomarcados com Fas-L.

Notar em (A) na região lesionada do côndilo direito a intensa expressão desta proteína nos condrócitos perto das fissuras da superfície da cartilagem articular. Em (B) nota-se uma pequena diminuição da imunomarcagem do Fas-L nos condrócitos da região superficial no grupo OA/ADSCs. No grupo OA/ADSCs/V foi observado grande diminuição da expressão deste marcador nas regiões superficial e profunda da cartilagem (C). Em D, gráfico expressando a marcação positiva para Fas-L por μm^2 .

5 DISCUSSÃO

As ADSCs estimuladas com colágeno V aumentam a expressão de componentes da matriz cartilaginosa como proteoglicanos e colágeno tipo II *in vitro* e a administração mensal intra-articular destas células após estímulo foi capaz de atenuar o processo osteoartrítico, com diminuição das alterações teciduais, sugerindo uma possível ação condrogênica desta proteína nas ADSCs.

É consenso na literatura que as ADSCs possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação celular, além de secretarem fatores importantes para a homeostase ⁽⁴⁰⁾ ⁽⁴⁷⁾. Dentre outras fontes de obtenção, o tecido adiposo torna-se mais viável devido à maior facilidade e quantidade de MSCs isoladas. Ainda, a associação de substâncias como PRP, ácido hialurônico, e outros, às ADSCs para posterior avaliação *in vitro* e *in vivo* tem se tornado frequente em pesquisas básicas e clínicas para o tratamento da OA ⁽⁵²⁾.

Embora o colágeno V seja encontrado na cartilagem em desenvolvimento não há relatos na literatura científica sobre sua importância na cartilagem adulta, bem como sua utilização no estímulo de ADSCs para tratamento da OA.

No presente estudo optamos pelo transplante autólogo de ADSCs no modelo experimental de OA em coelhos Nova Zelândia, submetidos a menissectomia parcial. É importante salientar que a identificação da expressão dos marcadores para ADSCs, como CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD14-, CD 19-, CD79, CD11b e HLA-DR ⁽⁴³⁾ torna-se difícil em células provenientes de coelhos, devido à falta de anticorpos específicos disponíveis para esta espécie. Deste modo, realizamos a caracterização morfológica das células por microscopia eletrônica de transmissão, a qual demonstrou pela disposição e a forma das organelas, grande quantidade de retículo endoplasmático granular, que estas células apresentam fenótipo mesenquimal. Ainda, demonstramos que as células obtidas da lipectomia da região interescapular de coelhos foram positivas para vimentina e negativas para CD34, além da capacidade de diferenciação em linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica, conforme estabelecido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular ⁽⁴⁹⁾.

Após estabelecimento da cultura de ADSCs, foi realizado estímulo com Col V para avaliação da expressão de vimentina, CD34, colágenos I, II e III, osteocalcina, síntese de proteoglicanos e colágeno total. Foi observado que após o estímulo com Col V, as ADSCs mantiveram a positividade para vimentina e CD34 manteve-se negativo e,

que, embora as ADSCs tenham uma expressão basal de colágenos fibrilares I e III, essa expressão se manteve após o estímulo com Col V. Por outro lado, o colágeno II, um importante constituinte do tecido cartilaginoso, foi altamente expresso pelas ADSCs com Col V, sugerindo que esse estímulo foi eficaz podendo tornar-se um potencial fator condrogênico.

Outro fator consagrado na comunidade científica para diferenciação condrogênica *in vitro* em ADSCs é o TGF- β 1⁽⁴⁰⁾. Este é considerado um importante fator anabólico para o crescimento e manutenção do tecido cartilaginoso, estimulando a proliferação celular e síntese de componentes da MEC, como os glicosaminoglicanos, além da expressão de genes específicos, como o do agregano e do colágeno II e, do fator de transcrição SOX-9 (regulador da condrogênese e da formação da cartilagem)⁽³⁶⁾. Além da utilização desse fator de crescimento nas ADSCs, foi descrito na literatura a sua associação em cultura de condrócitos humanos, cuja resposta foi o aumento de colágeno do tipo II, quando comparado à cultura sem TGF- β ^{(81) (82) (83) (84) (85)}. Por essa razão, utilizamos esse fator condrogênico como um controle positivo, para avaliar a expressão dos genes COL2A1 e ACAN e comparar com a resposta das ADSCs, promovida pelo estímulo com o Col V. Demonstramos que o Col V na cultura de ADSCs gerou uma resposta similar à do TGF- β 1 na expressão do gene COL2A1 em relação à cultura controle, não havendo diferença estatística entre os dois estímulos e, apresentou uma expressão significativa do gene ACAN em relação às ADSCs controle, sugerindo mais uma vez que ele possa atuar como mediador condrogênico.

Ademais, a comparação da imunomarcação para colágeno do tipo II, um típico marcador condrogênico, nas ADSCs com diferentes estímulos permitiu concluir que o colágeno V foi eficiente no aumento da expressão do colágeno II *in vitro*, mesmo quando comparado ao estímulo com TGF- β 1 e, surpreendentemente, ao associarmos o Col V com o TGF- β 1, a expressão de colágeno II diminuiu. Embora não tenhamos estudado os mecanismos envolvidos na diferenciação destas células, fica evidente que Col V tenha um efeito similar ao TGF- β 1. Além disso, considera-se que quando Col V e TGF- β 1 são acrescidos simultaneamente à cultura de ADSCs ocorra um *feedback* negativo, um inibindo a ação do outro, mesmo não disputando pelos mesmos receptores nas ADSCs.

Embora o TGF- β seja amplamente utilizado para a diferenciação de ADSCs na linhagem condrogênica *in vitro*, foi demonstrado que a utilização prolongada deste fator

de crescimento, pode ocasionar diminuição no conteúdo de proteoglicanos e propiciar a formação de osteófitos ⁽³⁶⁾.

Por outro lado, neste modelo celular ficou demonstrado que o estímulo das ADSCs, provenientes do tecido adiposo de coelhos, estimuladas com o Col V, produzem uma quantidade expressiva de colágeno do tipo II e proteoglicanos; tais resultados estão de acordo com a expressão de RNAm para colágeno tipo II, obtida em análise molecular, que foi maior em ADSCs estimuladas com Col V, em relação às não estimuladas com esta proteína. Ainda, demonstramos que as ADSCs quando estimuladas por TGF- β 1, um dos principais fatores de crescimento, apresentaram expressão similar das proteínas estudadas, em relação ao estímulo com Col V.

Outro resultado de grande importância em nosso estudo foi que o colágeno V não apresentou expressão de proteínas de formação óssea pelas ADSCs indicado pela expressão negativa para osteocalcina. Nosso resultado vai de encontro com o trabalho de Longo e col (2014) que demonstraram que o colágeno tipo V não atuou na diferenciação osteogênica de MSCs humanas ⁽⁸⁶⁾. Porém, baseados em nossos dados consideramos que ele tenha um potencial de diferenciação condrogênica *in vitro* e um potencial de reparo tecidual *in vivo* ⁽⁶⁷⁾.

Na primeira etapa do nosso estudo, mostramos que o estímulo com colágeno V é importante, nunca foi descrito na literatura para diferenciação condrogênica e que, eventualmente, pode ser mais seguro que outros fatores lábeis ou de função antagônica. Tivemos então, o interesse de avaliar como seria a ação terapêutica das ADSCs, estimuladas previamente com Col V, em coelhos com OA induzida por menisctomia parcial.

Apesar de existirem diferentes modelos experimentais de osteoartrite, inclusive com secção de ligamento cruzado anterior, nós utilizamos o modelo experimental de OA por menisctomia parcial, estabelecido por Moskowitz e cols. (1972) e modificado por Velosa e col. ⁽⁷⁹⁾ que reproduz de forma gradativa as alterações morfológicas encontradas na OA humana, considerado equivalente a um período avançado de doença, com lesões macroscópicas da cartilagem e histologia apresentando desorganização celular, presença de clones celulares, fibrilações e fissuras, além de perda de colágeno e proteoglicanos. Ainda, na divisão dos grupos experimentais, a fim de diminuir o número de animais utilizados na pesquisa, não foi constituído o grupo *Sham*, pois em um

trabalho anterior do nosso grupo foi verificado que não houve alteração articular nesses animais.

Nossos resultados do grupo de animais com OA, tratados com injeções intra-articulares de ADSCs demonstraram que a terapia celular com estímulo com ColV foi eficaz, aumentou a espessura da cartilagem, principalmente na região visivelmente fibrilada, além de aumentar o número de condrócitos e proteínas da matriz extracelular, em relação ao grupo de animais com OA não submetidos a terapia.

Embora não haja um consenso na literatura em relação ao tempo de tratamento, quantidade de células administradas e via de administração, nós trabalhamos com uma administração mensal de ADSCs (1×10^6) durante o período de 22 semanas com o objetivo de avaliar o efeito protetor da terapia, assim como a administração via intra-articular, tendo em vista que desta forma há uma garantia da viabilidade das células aplicadas no local da lesão, não ocasionando a perda de um determinado número de células, além de se aproximar do que seria viável na prática clínica. Ainda, não foi realizado estudo com menor intervalo de tratamento pois isso implicaria em maior manipulação do animal e consequentemente, maior estresse, além de parecer inviável ao transportar esse tratamento aos humanos.

Era de nosso interesse avaliar a expressão dos genes POU5F1, NANOG, MMP1, MMP9, MMP13, TNFA, IL1A, ACAN, SOX9 e COL2A1 após o tratamento com ADSCs estimuladas previamente com colágeno V, no entanto o material foi bastante limitado e não obtivemos concentração e pureza de RNA adequados para a análise. Desta forma, foi realizada a avaliação pelos parâmetros histomorfométricos da cartilagem após os respectivos tratamentos.

Grande parte dos estudos feitos em animais, avaliam o tratamento mediante Score, no entanto, essa forma de avaliação não informa quantitativamente o conteúdo das proteínas constituintes da MEC, sendo assim, decidimos avaliar o efeito do tratamento através de parâmetros histomorfométricos.

Outros autores têm estudado a ação das MSCs na regeneração articular e, também, utilizando estímulos diversos. Centeno e col. em 2008 trataram com injeção intra-articular de MSCs autólogas, provenientes da medula óssea, um tecido cartilaginoso lesionado do joelho e após seis meses, a ressonância magnética indicou aumento da cartilagem e do menisco ⁽⁵⁸⁾. Adicionalmente, Zscharnack e col. em 2010 obtiveram resultados morfológicos positivos, quando associaram fatores de crescimento

ao meio de cultura para a pré-diferenciação das MSCs de medula óssea em linhagem condrogênica ⁽⁶²⁾. Toghraie e col. em 2011 também demonstraram uma diminuição na degeneração do tecido cartilaginoso em coelhos, na formação de osteófitos e esclerose do osso subcondral, após o tratamento com injeção intra-articular de MSCs em modelo animal de OA ⁽⁵⁷⁾.

Além da aplicação das MSCs em modelos animais, outros autores mostram estudos iniciais em humanos, como Pak e col. em 2011 que trataram dois pacientes que apresentaram OA nos joelhos com injeção de MSCs de tecido adiposo, ácido hialurônico, dexametasona e PRP. Após três meses, estes pacientes apresentaram aumento da cartilagem, evidenciado pela ressonância magnética, melhora funcional e redução da dor ⁽⁶³⁾.

Koh e col. em 2013 avaliaram pacientes com OA de joelho que receberam injeções intra-articulares de MSCs autólogas, isoladas do tecido sinovial em combinação com PRP. Após o tratamento, verificou-se uma redução da dor e melhora da função articular ⁽⁶⁵⁾.

Ainda não sabemos o possível mecanismo da ação do Col V no estímulo condrogênico, porém os resultados encontrados poderiam ser explicados pela biologia e função do Col V, uma vez que foi demonstrado que uma das suas principais funções é a de induzir proliferação e diferenciação celular ⁽⁶⁷⁾. Este processo poderia ser explicado por sua capacidade de ligação com as integrinas, que são glicoproteínas heterodiméricas localizadas na superfície das células que medeiam diversos eventos biológicos envolvendo interações célula-célula e célula-matriz. As integrinas consistem numa subunidade α e uma β que são importantes para a adesão celular e na transdução de sinais. Estas glicoproteínas apresentam uma sequência tripeptídica que consiste em Arg-Gly-Asp (RGD), que tem sido identificada como um sítio de reconhecimento usado como ligante pelas proteínas da MEC como a vitronectina, fibrinogênio, laminina e colágeno ^{(67) (72)}.

Outra característica importante que ficou evidenciada no presente estudo foi que as ADSCs, também, favorecem o aumento da síntese de colágeno II e diminuição de condrócitos apoptóticos quando administramos uma dose mensal destas células previamente cultivadas com Col V intra-articular. Estes achados podem resultar no estabelecimento de novos modelos terapêuticos de intervenção em processos degenerativos, como a osteoartrite.

É sabido que o remodelamento do colágeno na cartilagem osteoartrítica se processa a custa da substituição inadequada dos tipos de colágeno, dificultando a recuperação da função biomecânica da cartilagem articular. Desta forma, devido às propriedades singulares da molécula de Col V, além da maior expressão em tecidos embrionários e capacidade de interação célula-matriz, e, pela similaridade ao colágeno XI (colágeno constituinte da cartilagem articular), é de grande relevância sua associação com as ADSCs autólogas, para que possamos desenvolver novas estratégias terapêuticas na regeneração do tecido cartilaginoso osteoartrítico.

6 CONCLUSÃO

- *In vitro*, o Col V estimulou a síntese de colágeno total, colágeno do tipo II, proteoglicanos, além da expressão dos genes COL2A1 e ACAN, sugerindo que possa atuar como um mediador da condrogênese.
- A avaliação estrutural e bioquímica da cartilagem articular de coelhos com OA, submetidos ao tratamento autólogo com ADSCs, estimuladas com Col V, demonstrou aumento da espessura, manutenção da celularidade, dos proteoglicanos e de colágeno tipo II na cartilagem articular, sugerindo uma perspectiva da utilização desta terapêutica no tratamento da doença.

7 ANEXO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/09/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **123/14** intitulado: **“Efeito terapêutico da administração de células tronco mesenquimais estimuladas com colágeno V na cartilagem articular de coelhos com osteoartrite”** que utilizará **27** animais da espécie **coelho**, apresentado pelo **Departamento de Reumatologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Walcy Paganelli Rosolia Teodoro

Pesquisador (a) Executante: Isabele Camargo Brindo da Cruz

CEUA-FMUSP, 04 de Setembro de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

1. Burgos-Vargas R, Cardiel MH, Loyola-Sánchez A, De Abreu MM, Pons-Estel Ba, Rossignol M, et al. Characterization of knee osteoarthritis in Latin America. A comparative analysis of clinical and health care utilization in Argentina, Brazil, and Mexico. *Reumatol Clin. SEGO*; 2014;10(3):152–9.
2. Malfait AM. Osteoarthritis year in review 2015: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. Elsevier Ltd; 2016 Jan;24(1):21–6.
3. Van Der Kraan PM. Stem cell therapy in osteoarthritis: A step too far? *BioDrugs*. 2013;27(3):175–80.
4. Espanha MM. Articular cartilage: structure and histochemical composition [in Portuguese]. *Acta Reumatol Port*. 2010;35(5):424–33.
5. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. Elsevier Ltd; 2014;22(3):363–88.
6. Khan WS, Johnson DS, Hardingham TE. The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *Knee*. 2010 Dec;17(6):369–74.
7. Palmer KT, Goodson N. Ageing, musculoskeletal health and work. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. Elsevier Ltd; 2015;29(3):391–404.
8. Shinjo SK. *MEDICINANET - REUMATOLOGIA*. Atheneu. São Paulo; 2010.
9. Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*. Elsevier B.V.; 2013;527(2):440–7.
10. Brody LT. Knee osteoarthritis: Clinical connections to articular cartilage structure and function. *Phys Ther Sport*. Elsevier Ltd; 2015;16(4):301–16.
11. Velosa APP. Importância dos colágenos IX e XI na progressão da osteoartrose experimental em coelhos [tese]. São Paulo; 2001
12. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone*. Elsevier B.V.; 2016 Apr;85:81–90.
13. Busija L, Bridgett L, Williams SRM, Osborne RH, Buchbinder R, March L, et al. Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(6):757–68.
14. Fuller R. *Clínica médica, volume 5:doenças endócrinas e metabólicas, doenças*

- ósseas,doenças reumatológicas. Manole. Barueri,SP; 2009.
15. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J-P, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008 Apr [cited 2015 Dec 14];22(2):351–84.
 16. Hardin J a., Cobelli N, Santambrogio L. Consequences of metabolic and oxidative modifications of cartilage tissue. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2015;11(9):1–9.
 17. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):1–19.
 18. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(12):1531–46.
 19. Teodoro WPR, Fuller R. Estrutura e Função do Tecido Conjuntivo. :1–9.
 20. Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: From the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol*. 2005;53(7):430–42.
 21. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N Engl J Med*. 1979 Jul 5;301(1):13–23.
 22. Smith LT, Holbrook KA, Madri JA. Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *Am J Anat*. 1986 Apr;175(4):507–21.
 23. Bruckner P. Suprastructures of extracellular matrices: Paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):7–18.
 24. Mecham RP. The Extracellular Matrix: an Overview. Parks WC, Mecham RP, editors. Springer. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. 321-398 p.
 25. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*. 2002;4(1):30–5.
 26. Olsen R. Molecules. *Science* (80-). 1997;29(4):555–8.
 27. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 Apr;12(2):69–78.
 28. Mwale F, Billingham C, Wu W, Alini M, Webber C, Reiner MI, et al. Erratum: Selective assembly and remodeling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype (*Dev. Dyn.* (2000) 218 (648-662). *Dev Dyn*. 2001;220(2):187.

29. Fang M, Jacob R, McDougal O, Oxford JT. Minor fibrillar collagens, variable regions alternative splicing, intrinsic disorder, and tyrosine sulfation. *Protein Cell*. 2012;3(6):419–33.
30. Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jan [cited 2016 Apr 15];7(1):50–6.
31. Hara BPO, Urban JPG, Maroudas A. Influence of cyclic loading articular cartilage. *Ann Rheum Dis*. 1990;49:536–9.
32. Dijkgraaf LC, de Bont LGM, Boering G, Liem RSB. The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage: A review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(10):1182–92.
33. Millward-Sadler SJ, Wright MO, Davies LW, Nuki G, Salter DM. Mechanotransduction via integrins and interleukin-4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2000;43(9):2091–9.
34. Leong DJ, Hardin JA, Cobelli NJ, Sun HB. Mechanotransduction and cartilage integrity. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1240(1):32–7.
35. Di Bella C, Fosang A, Donati DM, Wallace GG, Choong PFM. 3D Bioprinting of Cartilage for Orthopedic Surgeons: Reading between the Lines. *Front Surg*. 2015;2(August):1–7.
36. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(9):1916–26.
37. Ge Z, Hu Y, Heng BC, Yang Z, Ouyang H, Lee EH, et al. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum*. 2006 Jun 15;55(3):493–500.
38. Arrigoni E, de Girolamo L, Di Giancamillo A, Stanco D, Dellavia C, Carnelli D, et al. Adipose-derived stem cells and rabbit bone regeneration: histomorphometric, immunohistochemical and mechanical characterization. *J Orthop Sci*. 2013 Mar;18(2):331–9.
39. Yasen M, Fei Q, Hutton WC, Zhang J, Dong J, Jiang X, et al. Changes of number of cells expressing proliferation and progenitor cell markers with age in rabbit intervertebral discs. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013 May;45(5):368–76.
40. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: Desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol*. 2010;85(5):647–56.

41. Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose Tissue - Adequate, Accessible Regenerative Material. *Int J stem cells*. 2015;8(2):121–7.
42. Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, Matta C, Memic A, Khademhosseini A, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods*. Elsevier Inc.; 2015;99:69–80.
43. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo K, Kim K. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016:1–19.
44. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
45. Lee JW, Kim YH, Kim S-H, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J*. 2004 Jun 30;45 Suppl:41–7.
46. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*. Elsevier; 2016;1–11.
47. Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett*. 2011;16(2):236–57.
48. de Girolamo L, Kon E, Filardo G, Marmotti AG, Soler F, Peretti GM, et al. Regenerative approaches for the treatment of early OA. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc*. Springer Berlin Heidelberg; 2016 Apr 27.
49. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. Elsevier Inc.; 2015;99:62–8.
50. Pers Y-M, Jorgensen C. Adipose derived stem cells for regenerative therapy in osteoarticular diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016;0(0):1–8.
51. Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiaroni M, Kon E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013 Aug;21(8):1717–29.
52. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for

- cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther.* Elsevier Ltd; 2012;3(4):25.
53. Filardo G, Perdisa F, Roffi A, Marcacci M, Kon E. Stem cells in articular cartilage regeneration. *J Orthop Surg Res. Journal of Orthopaedic Surgery and Research*; 2016 Dec 12;11(1):42.
 54. Bernhard JC, Vunjak-Novakovic G. Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration? *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2016;7(1):56.
 55. Yang X, Zhu TY, Wen LC, Cao YP, Liu C, Cui YP, et al. Intraarticular injection of allogenic mesenchymal stem cells has a protective role for the osteoarthritis. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(18):2516–23.
 56. Pers YM, Ruiz M, No??l D, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: State of the art and perspectives. *Osteoarthr Cartil*. 2015;23(11):2027–35.
 57. Toghraie FS, Chenari N, Gholipour MA, Faghih Z, Torabinejad S, Dehghani S, et al. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. *Knee. Elsevier B.V.*; 2011;18(2):71–5.
 58. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells, platelet lysate and dexamethasone. *Am J Case Rep*. 2008;9:246–51.
 59. Nöth U, Steinert AF, Tuan RS. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(7):371–80.
 60. Yan H, Yu C. Repair of Full-Thickness Cartilage Defects With Cells of Different Origin in a Rabbit Model. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg*. 2007;23(2):178–87.
 61. Masuoka K, Asazuma T, Hattori H, Yoshihara Y, Sato M, Matsumura K, et al. Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane sealing in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006 Oct;79(1):25–34.
 62. Zscharnack M, Hepp P, Richter R, Aigner T, Schulz R, Somerson J, et al. Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *Am J Sports Med*. 2010 Sep;38(9):1857–69.
 63. Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in

- knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *J Med Case Rep. BioMed Central Ltd*; 2011;5(1):296.
64. Davatchi et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis.* 2011;14(2):211–5.
 65. Koh YG, Jo SB, Kwon OR, Suh DS, Lee SW, Park SH, et al. Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg. Arthroscopy Association of North America*; 2013;29(4):748–55.
 66. Jeon OH, Elisseeff J. Orthopedic tissue regeneration: cells, scaffolds, and small molecules. *Drug Deliv Transl Res.* 2015;105–20.
 67. Mak KM, Png CYM, Lee DJ. Type V Collagen in Health , Disease and Fibrosis. 2016;629(February):1–57.
 68. Adachi E, Hayashi T. In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect Tissue Res.* 1986 Jan;14(4):257–66.
 69. Andrikopoulos K, Liu X, Keene DR, Jaenisch R, Ramirez F. Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. *Nat Genet.* 1995 Jan;9(1):31–6.
 70. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(5):495–501.
 71. Chanut-Delalande H, Bonod-Bidaud C, Cogne S, Malbouyres M, Ramirez F, Fichard A, et al. Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. *Mol Cell Biol.* 2004;24(13):6049–57.
 72. Ruggiero F, Champliand M-F, Garrone R, Aumailley M. Interactions between Cells and Collagen V Molecules or Single Chains Involve Distinct Mechanisms. *Exp Cell Res.* 1994 Feb;210(2):215–23.
 73. Symoens S, Renard M, Bonod-Bidaud C, Syx D, Vaganay E, Malfait F, et al. Identification of binding partners interacting with the $\alpha 1$ -N-propeptide of type V collagen. *Biochem J.* 2011;433(2):371–81.
 74. Wu JJ, Weis MA, Kim LS, Carter BG, Eyre DR. Differences in chain usage and cross-linking specificities of cartilage type V/XI collagen isoforms with age and tissue. *J Biol Chem.* 2009;284(9):5539–45.
 75. Breuls RGM, Klumpers DD, Everts V, Smit TH. Collagen type V modulates

- fibroblast behavior dependent on substrate stiffness. *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc.; 2009;380(2):425–9.
76. Fichard A, Kleman JP, Ruggiero F. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol*. 1995 Jul;14(7):515–31.
 77. Ricard-Blum S, Beraud M, Raynal N, Farndale RW, Ruggiero F. Structural requirements for heparin/heparan sulfate binding to type V collagen. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25195–204.
 78. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156–9.
 79. Moskowitz RW. Experimental models of degenerative joint disease. *Semin Arthritis Rheum*. 1972 Jun;2(1):95–116.
 80. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The New Stereological Tools - Disector, Fractionator, Nucleator and Point Sampled Intercepts and Their Use in Pathological Research and Diagnosis. *Apmis*. 1988;96(10):857–81.
 81. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(3):914–9.
 82. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: Optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem*. 2006;97(1):84–97.
 83. Kraus VB. Osteoarthritis year 2010 in review: Biochemical markers. *Osteoarthr Cartil*. Elsevier Ltd; 2011;19(4):346–53.
 84. Kwon H, Paschos NK, Hu JC, Athanasiou K. Articular cartilage tissue engineering: the role of signaling molecules. *Cell Mol Life Sci*. Springer International Publishing; 2016;
 85. Das R, Timur UT, Edip S, Haak E, Wruck C, Weinans H, et al. TGF- β 2 is involved in the preservation of the chondrocyte phenotype under hypoxic conditions. *Ann Anat*. Elsevier GmbH.; 2015;198:1–10.
 86. Longo A, Tobiasch E, Luparello C. Type V collagen counteracts osteo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biologicals*. Elsevier Ltd;

2014;42(5):294–7.