

PEDRO NOGUEIRA GIGLIO

Comparação de culturas de células da cartilagem articular humana obtidas por digestão enzimática ou por migração de explante

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Marco Kawamura Demange

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2023**

PEDRO NOGUEIRA GIGLIO

Comparação de culturas de células da cartilagem articular humana obtidas por digestão enzimática ou por migração de explante

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Marco Kawamura Demange

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Giglio, Pedro Nogueira
Comparação de culturas de células da cartilagem
articular humana obtidas por digestão enzimática ou
por migração de explante / Pedro Nogueira Giglio. --
São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientador: Marco Kawamura Demange.

Descritores: 1.Cartilagem 2.Cartilagem articular
3.Técnicas de cultura de células 4.Condrócitos
5.Terapia baseada em transplante de células e
tecidos 6.Doenças das cartilagens

USP/FM/DBD-218/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Aymar Giglio Junior e Sandra Nogueira Giglio, pelo amor incondicional, dedicação e apoio ao longo de toda vida. Vocês são os alicerces de tudo.

À minha irmã Luísa Nogueira Giglio, com quem dividi uma infância muito feliz, que sempre possamos nos apoiar um ao outro.

À minha esposa Verônica Bresciani Giglio, minha melhor amiga e companheira há 18 anos, pela vida maravilhosa que construímos juntos.

Ao meu filho Victor Bresciani Giglio, pela alegria sem fim de te ver se desenvolvendo, cada dia mais bonito, grande e esperto.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marco Kawamura Demange**, orientador desta tese, pela confiança, incentivo constante e tantas oportunidades proporcionadas.

À **Dra. Débora Levy**, pela generosidade incrível, apoio e aconselhamento contínuos. Sem sua dedicação e expertise, esse trabalho não existiria.

Ao **Prof. Dr. Riccardo Gomes Gobbi**, meu mentor na Cirurgia do Joelho e grande amigo, pela convivência e parceria próxima de muitos anos. Seu papel como líder, generosidade e trabalho incansável em tantos contextos é uma inspiração.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Luis Camanho**, pela liderança, experiência, ensinamentos, oportunidades e privilégio do convívio próximo.

Aos **Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo e Prof. Dr. Tarcísio E. P. de Barros**, Professores Titulares do Departamento de Ortopedia e Traumatologia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aprimorar minha formação acadêmica, e pela liderança do Instituto de Ortopedia e Traumatologia, uma segunda casa para mim há mais de uma década.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, minha *alma mater*, onde me formei Médico, Ortopedista, Cirurgião do Joelho, e agora curso Doutorado.

Ao Grupo de Cirurgia do Joelho do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: **Prof. Dr. José Ricardo Pécora, Prof. Dr. Riccardo Gomes Gobbi, Dr. Roberto Freire da Mota e Albuquerque, Profa. Dra. Márcia Uchôa de Rezende, Dr. Fábio Janson Angelini, Prof.**

Dr. Marco Kawamura Demange, Dr. Luis Eduardo Passarelli Tírico, Prof. Dr. Camilo Partezani Helito e Dr. Marcelo Batista Bonadio. Como mais jovem membro deste grupo, tive o privilégio de ter sido formado por todos estes grandes cirurgiões. Obrigado pela amizade, ensinamentos e convivência.

Aos colegas ortopedistas, residentes, ex-residentes do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por manter viva essa instituição tão importante.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski**, pelo incentivo, apoio contínuo e amizade. Sem sua parceria, nenhuma parte deste trabalho seria possível.

Ao **Dr. Phelipe Oliveira Favaron**, cujo trabalho com cultivo de células da cartilagem em nossa instituição foi o início de uma linha de pesquisa e o alicerce deste trabalho.

Aos estagiários e ex-estagiários do Grupo de Cirurgia do Joelho, que contribuíram sempre que necessário com a realização deste trabalho: **Diego Ubrig Munhoz, Marcelo Faraco Sobrado, Chilan Bou Ghosson Leite, Tarsis Padula dos Santos, Marco Aurelio Cotegipe Negrelli, Camila Maftoum Cavalheiro, Bruno Bonganha Zanon, Danilo Bordini Camargo e Guilherme Venturi Abreu.**

À Banca de Qualificação desta Tese, **Prof. Dr. Riccardo Gomes Gobbi, Dr. Luis Eduardo Passarelli Tírico e Dra. Débora Levy**, pelas sugestões e engrandecimento geral do trabalho.

Ao amigo e colega **Dr. Lucas da Ponte Melo**, por juntos termos trilhado o caminho difícil, mas recompensador, de desenvolver trabalho de biologia celular, sendo Ortopedistas. Certamente essa empreitada foi mais fácil tendo sido compartilhada.

À **Dra. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro**, pela ajuda fundamental na minha trajetória na Pós-Graduação, mesmo antes deste projeto estar amadurecido.

Aos colegas que tanto contribuíram com os trabalhos técnicos desta tese, profundo conhecimento de ciência básica e convivência sempre agradável, **Dra. Cadiele Oliana Reichert, Dr. Fábio Alessandro de Freitas, Juliana Sampaio Silva, Linah Akemi Fukuya, Lisandre Keren da Silveira.**

À **Tânia Fernanda Cardoso**, que prestou auxílio inestimável com a documentação deste e outros tantos trabalhos.

À **Priscila Vargas**, pelo apoio com formatação e revisão desta tese.

Às **Tânia Borges e Rosana Moreno Costa**, que sempre me auxiliaram com paciência e prestatividade na Secretaria da Pós-Graduação.

Aos doadores de material biológico, sem os quais este trabalho seria impossível.

"Nós pensamos, cada um de nós, que somos muito mais racionais do que realmente somos. E acreditamos que tomamos nossas decisões porque temos boas razões para tomá-las. Mesmo quando é o contrário. Acreditamos nas razões, porque já tomamos a decisão."

Daniel Kahneman

"O método científico, em sua essência, é um conjunto de ferramentas projetadas explicitamente para romper com vieses e lançar luz sobre as informações empíricas subjacentes. Reconhecendo nossas preconceções, podemos superá-las."

Peter Watts

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana,
Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão
de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
3 REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1 Métodos de isolamento de células para cultura a partir da cartilagem articular	11
3.1.1 Isolamento e caracterização de células da cartilagem articular a partir de digestão enzimática	11
3.1.2 Isolamento de progenitores da cartilagem articular	30
3.1.3 Isolamento e caracterização de células migratórias da cartilagem articular	31
3.2 Comparação de células condrais migratórias obtidas por explante de cartilagem e células condrais obtidas por digestão enzimática da cartilagem articular	40
4 MÉTODOS	48
4.1 Critérios de inclusão	50
4.2 Obtenção de material biológico	51
4.3 Obtenção das células por método enzimático (tripsina/colagenase) (grupo colagenase)	52
4.4 Obtenção de condroprogenitores migratórios por explante (grupo explante)	53
4.5 Congelamento e descongelamento das células	54
4.6 Imunofenotipagem	55
4.7 Plasticidade das células provenientes de cartilagem articular	56
4.7.1 Diferenciação osteogênica	56
4.7.2 Diferenciação adipogênica	57
4.7.3 Diferenciação condrogênica	58
4.8 Detecção das proteínas, colágeno I, colágeno II, Nanog, PPAR γ , RUNX2, SOX2, SOX9 por imunofluorescência indireta quantitativa <i>high-content screening</i>	59
4.9 Análise de expressão gênica dos marcadores de diferenciação celular	60
4.9.1 Extração do RNA total	60
4.9.2 Tratamento com DNase	61
4.9.3 Síntese do cDNA	61

4.9.4	Avaliação dos genes envolvidos na diferenciação celular.....	62
4.10	Análise de dados	63
5	RESULTADOS.....	64
5.1	Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	67
5.2	Plasticidade das células provenientes de cartilagem articular.....	68
5.3	Imunofluorescência indireta quantitativa <i>high-content screening</i>	70
5.3.1	Análise das proteínas de indiferenciação NANOG e SOX2	70
5.3.2	Análise das proteínas RUNX2, SOX9 e PPAR γ	72
5.3.3	Colágeno I e colágeno II	76
5.4	Análise de expressão gênica dos marcadores de diferenciação celular.....	80
6	DISCUSSÃO	86
6.1	Isolamento e cultivo células derivadas da cartilagem saudável	88
6.2	Técnica para obtenção de células da cartilagem por migração de explante.....	90
6.3	Cultivo celular.....	91
6.4	Imunofenotipagem.....	91
6.5	Genes indiferenciação.....	92
6.6	Fatores de transcrição e genes relacionados à diferenciação em linhagens mesenquimais.....	93
6.7	Produção de proteínas de matriz condral.....	97
6.8	Diferenciação tri-linhagem (osteogênica, adipogênica e condrogênica).....	98
6.9	Características de célula tronco mesenquimal	99
6.10	Nomenclatura de células derivadas da cartilagem cultivadas	100
6.11	Principais diferenças entre os grupos e inferências sobre o potencial para uso <i>in vivo</i>	103
6.12	Pontos fortes e limitações do estudo.....	106
7	CONCLUSÕES	112
8	ANEXOS	114
9	REFERÊNCIAS.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCG2	- Membro 2 da subfamília G de transportadores de cassetes de ligação de ATP
ALK-1	- Quinase do tipo receptor de ativina 1
ATP	- Trifosfato de adenosina
ATV	- Tripsina versene
BMP	- Proteína morfogenética óssea
CCL2	- Quimiocina ligante de motivo C-C 2
CD	- Conjunto de diferenciação
CO ₂	- Dióxido de carbono
CT	- Limiar de ciclo
CTM	- Células-tronco mesenquimais
DMEM	- Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPBS	- <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EGF	- Fator de crescimento epidermal
EGFR	- Receptor do fator de crescimento epidermal
FGFR-3	- Receptor 3 do fator de crescimento fibroblástico
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
G	- Aceleração da gravidade
HCFMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEMA	- Hidroximetilmetacrilato
HIF-1 α	- Fator α -1 induzível por hipóxia
HLA	- Sistema de antígeno leucocitário humano
HMGB1	- Proteína nuclear B1 do grupo de alta mobilidade
ICRS	- <i>International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society</i>
IGF-1	- Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IL	- Interleucina
IOT	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia
ISCT	- Sociedade Internacional de Terapia Celular
LIM	- Laboratório de investigação médica
LP	- Lisado de plaquetas
MSCA-1	- Antígeno de células mesenquimal estromal 1
NaCl	- Cloreto de sódio
p	- Passagem
p/v	- Por volume
PBS	- Tampão fosfato-salino
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PDGF-BB	- FATOR de crescimento derivado de plaqueta BB
PE	- Ficoeritina
pH	- Potencial de hidrogênio
PPAR γ	- <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPAR- γ	- Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PRG4	- Proteoglicano 4 (lubricina)
PRP	- Plasma rico em plaquetas
RAGE	- Receptor para produtos finais de glicação avançada
RNA _m	- Ácido ribonucleico mensageiro
RUNX2	- Fator de transcrição relacionado a <i>runt</i>
SDF	- Fator estromal derivado de célula
SFB	- Soro fetal bovino
SOX	- <i>SRY-Box Transcription Factor</i>
TAC	- Transplante autólogo de condrócitos
TFG- β 3	- Fator de crescimento transformante beta 3
TGFBR1	- Receptor para TFG- β 3 tipo 1
TLR	- Receptor semelhante a toll
UI	- Unidade internacional
VEGF	- Fator de crescimento de endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visualização por artroscopia de biópsia da cartilagem articular do joelho, sendo elevada por uma goiva artroscópica	51
Figura 2 - Amostra de cartilagem retirada por biópsia artroscópica	51
Figura 3 - Fotomicrografia de células migratórias a partir de explante de cartilagem.....	66
Figura 4 - Fotomicrografia de culturas celulares	67
Figura 5 - Imagens representativas da diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos	69
Figura 6 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da proteína Runx2	73
Figura 7 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da proteína SOX9	74
Figura 6 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta do receptor PPAR γ	75
Figura 9 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta do colágeno tipo I.....	77
Figura 10 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta do colágeno tipo II.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de citometria de fluxo para marcadores de células-tronco mesenquimais.....	67
Tabela 2 - Resultados de citometria de fluxo para marcadores de células hematopoiéticas e endoteliais.....	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise do fator de transcrição de indiferenciação Nanog	70
Gráfico 2 - Análise do fator de transcrição de indiferenciação SOX2	71
Gráfico 3 - Análise do fator de transcrição Runx2	72
Gráfico 4 - Análise do fator de transcrição SOX9	74
Gráfico 5 - Análise do fator do receptor PPAR γ	75
Gráfico 6 - Análise do fator do colágeno tipo I.....	76
Gráfico 7 - Análise do fator colágeno tipo II.....	78
Gráfico 8 - Análise da razão entre o colágeno tipo II e colágeno tipo I.....	79
Gráfico 9 - Expressão do gene ALPL (fosfatase alcalina) para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase	80
Gráfico 10 - Expressão do gene RUNX2 para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase	81
Gráfico 11 - Expressão do gene osteocalcina para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase	81
Gráfico 12 - Expressão do gene osteopontina para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase	82
Gráfico 13 - Expressão do gene PPAR γ para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase	83
Gráfico 14 - Expressão do gene CEBP α para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase	83
Gráfico 15 - Expressão do gene Sindecan para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase	84

Gráfico 16 - Expressão do gene Perlecan para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por colagenase	85
--	----

RESUMO

Giglio PN. *Comparação de culturas de células da cartilagem articular humana obtidas por digestão enzimática ou por migração de explante* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: a terapia celular já é utilizada como opção de primeira linha para tratamento de lesões condrais focais, através do uso de células da cartilagem obtidas por biópsias artroscópicas, expandidas em cultura e implantadas, na técnica conhecida como transplante autólogo de condrócitos. O método mais utilizado para obtenção de células da cartilagem é a digestão enzimática do tecido com colagenase. Recentemente, foi descrito o método de isolamento de células da cartilagem por migração celular de explante condral, descrito como uma forma de selecionar células com maior potencial para uso em terapias regenerativas de cartilagem. Porém, nenhum trabalho prévio descreveu a obtenção destas células a partir de biópsias de cartilagem artroscópicas em pacientes sem osteoartrite, que são a população de interesse para tratamentos regenerativos de lesões focais. Além disso, existem poucos estudos comparativos da obtenção de células por migração e por digestão enzimática. **Objetivo:** o objetivo deste estudo foi estabelecer linhagens de células derivadas da cartilagem isoladas por migração de explante ou digestão enzimática, a partir de biópsias artroscópicas condrais de voluntários sem osteoartrite, e realizar a caracterização celular comparativa das células obtidas quanto a marcadores de superfície, indiferenciação, plasticidade e características fenotípicas condrogênicas. **Métodos:** biópsias de cartilagem fora da área de carga foram colhidas de oito voluntários sem osteoartrite submetidos a cirurgia do joelho. A partir dos fragmentos de cartilagem, foram isoladas células através de digestão enzimática ou por migração de explante condral, estabelecendo-se linhagens celulares distintas. Foi realizada caracterização e comparação das linhagens quanto a expressão de marcadores de indiferenciação (SOX2, Nanog), imunofenotipagem, fatores de transcrição e genes relacionados à diferenciação em linhagens mesenquimais (RUNX2, SOX9, ALP, osteocalcina, osteopontina, sidecan, perlecan, PPAR γ e CEBP α), proteínas de matriz (colágeno II, colágeno I, relação colágeno II/colágeno I), diferenciação em linhagens mesenquimais osteogênica, adipogênica e condrogênica. **Resultados:** foram estabelecidas linhagens celulares a partir de oito amostras de cartilagem (cinco homens e três mulheres, com idade

entre 19 e 54 anos), sendo quatro com extração por migração de explante e quatro por digestão enzimática por collagenase. Os dois tipos de linhagem não apresentaram diferenças nos marcadores de indiferenciação e plasticidade de diferenciação em linhagens mesenquimais. Células separadas por digestão enzimática apresentaram maior produção de colágeno II, maior relação colágeno II/colágeno I, fatores positivamente relacionados à produção de matriz condral, porém maior expressão de colágeno I, relacionado à fibrose, e RUNX2, fator chave de diferenciação osteogênica. Já as células separadas por migração de explante tiveram maior expressão de PPAR γ . SOX9, o fator chave de diferenciação condrogênica, não apresentou diferença entre os grupos. **Conclusão:** é possível obter células por migração de explante condral de biópsia artroscópica de indivíduos sem osteoartrite. Estas células apresentam perfil de indiferenciação e plasticidade semelhante às células obtidas por digestão enzimática. Estas últimas apresentaram maior expressão de proteínas da matriz condral, mas também marcadores de produção de fibrose e osso. Estudos subsequentes *in vivo* devem comparar o potencial de regeneração destas duas linhagens de células.

Descritores: Cartilagem; Cartilagem articular; Técnicas de cultura de células; Condrócitos; Terapia baseada em transplante de células e tecidos; Doenças das cartilagens.

ABSTRACT

Giglio PN. *Comparison of human articular cartilage cell cultures obtained by enzymatic digestion or by chondral explant migration* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Introduction: cell therapy is one of the first-line options for the treatment of large focal cartilage defects, with the technique known as autologous chondrocyte transplantation, in which cartilage cells obtained from arthroscopic biopsies are expanded in culture and implanted. The most commonly used method for isolating cartilage cells is enzymatic digestion of the tissue by collagenase. Recently, the method of isolating cells by migration from cartilage explants was described, and these cells could have a greater potential for use in cartilage regenerative therapies. However, no previous study described obtaining migratory cells from arthroscopic cartilage biopsies of patients without osteoarthritis, who are the population of greater interest for regenerative treatments of focal cartilage defects. Moreover, there are few comparative studies of cell procurement by migration and enzymatic digestion. **Objective:** the aim of this study was to establish cell lines derived from cartilage isolated by explant migration or enzymatic digestion, from chondral arthroscopic biopsies of volunteers without osteoarthritis, and to perform comparative cellular characterization of the cells in terms of surface markers, undifferentiation, plasticity, and chondrogenic phenotypic characteristics. **Methods:** cartilage biopsies outside the weight-bearing area were collected from eight volunteers without osteoarthritis undergoing knee surgery. From the cartilage fragments, cells were isolated by enzymatic digestion or explant migration, establishing distinct cell lines. Characterization and comparison of the lines was performed in terms of the expression of undifferentiation markers (SOX2, Nanog), immunophenotyping, transcription factors, and genes related to differentiation in mesenchymal lineages (RUNX2, SOX9, ALP, osteocalcin, osteopontin, syndecan, perlecan, PPAR γ , and CEBP α), matrix proteins (collagen II, collagen I, collagen II/collagen I ratio), differentiation in osteogenic, adipogenic, and chondrogenic mesenchymal lineages. **Results:** cell lines were established from eight cartilage samples (five men and three women, aged between 19 and 54 years), four with extraction by explant migration and four by collagenase enzymatic digestion. The two types of line did not show differences in undifferentiation markers and plasticity of differentiation in mesenchymal

lineages. Cells separated by enzymatic digestion presented higher production of collagen II, higher collagen II/collagen I ratio, factors positively related to chondral matrix production, but also higher expression of collagen I, related to fibrosis, and RUNX2, a key factor of osteogenic differentiation. On the other hand, cells separated by explant migration had higher expression of PPAR γ . SOX9, the key factor of chondrogenic differentiation, showed no difference between the groups. **Conclusion:** it is possible to obtain cells by chondral explant migration from arthroscopic biopsy of individuals without osteoarthritis. These cells present a profile of undifferentiation and plasticity similar to the cells obtained by enzymatic digestion. The latter showed higher expression of chondral matrix proteins, but also markers of fibrosis and bone production. Subsequent *in vivo* studies should compare the regeneration potential of these two cell lines.

Descriptors: Cartilage; Cartilage articular; Cell culture techniques; Chondrocytes; Cell- and tissue-based therapy; Cartilage diseases.

1 INTRODUÇÃO

Lesões focais da cartilagem representam um desafio significativo para a ortopedia e cirurgia do joelho, pois são muito comuns, limitantes clinicamente, possuem baixo potencial de reparo natural e tendem a progredir para osteoartrite. Embora a incidência de lesões na cartilagem na população em geral seja desconhecida, diversos estudos mostram que entre 34% e 63% dos joelhos submetidos a artroscopia por dor apresentam algum tipo de lesão condral¹⁻⁴. Nos estudos que diferenciam lesões condrais focais das relacionadas à osteoartrite avançada, as lesões focais estão presentes em 19% a 42% dos joelhos^{1,3,4}. Quanto às lesões com indicação potencial para tratamento cirúrgico, ou seja, focais, únicas, bem delimitadas, profundas e em pacientes com menos de 50 anos, Hjelle *et al.*¹ relatam uma prevalência de 9,2%.

Os sintomas das lesões de cartilagem incluem dor, inchaço, rigidez e travamento⁵, podendo ser limitantes. Heir *et al.*⁶ demonstram que pacientes jovens com lesões condrais focais apresentam prejuízo na qualidade de vida tão intenso quanto pacientes mais velhos com osteoartrite em estágio avançado (que necessitam de artroplastia).

A resposta reparativa *in vivo* às lesões condrais é insatisfatória⁷. Diversos fatores contribuem para isso: a cartilagem é um tecido avascular, o que impede mecanismos de reparo baseados no recrutamento de células

pela via vascular^{8,9}. Ademais, a baixa densidade celular do tecido limita a resposta à lesão por migração e proliferação de células locais^{10,11}, e os condrócitos locais apresentam limitações intrínsecas no reparo de danos teciduais¹². Por fim, para um reparo ideal, seria necessário reproduzir a complexa arquitetura formada por matriz extracelular e células, essencial para sua função ao longo prazo sem degeneração^{13,14}.

Como consequência destas limitações, a resposta natural ao dano condral varia da ausência de resposta de reparo eficaz (para lesões parciais) à formação de fibrocartilagem (para lesões que atingem o osso subcondral)^{15,16}. Apesar da fibrocartilagem ser capaz de preencher defeitos^{17,18}, suas propriedades morfológicas e mecânicas são inferiores, com maior risco de degeneração secundária¹⁴, já que o tecido saudável nas bordas do defeito e na cartilagem adjacente fica submetido a estresse mecânico aumentado, o que facilita a progressão da degeneração condral no compartimento e evolução para osteoartrite¹⁹⁻²¹. Clinicamente, a história natural das lesões focais de cartilagem ocorre com progressão de alterações degenerativas, aumento das lesões e novas lesões condrais²²⁻²⁴.

O tratamento ideal para lesões condrais focais deve ser capaz de preencher o defeito com cartilagem hialina organizada, ter mínima morbidade, proporcionar longa sobrevida sem dor e evitar a progressão para osteoartrite^{13,25}.

O primeiro uso da terapia celular para tratamento de lesões da cartilagem foi em 1987, e descrito em 1994, por Brittberg *et al.*²⁶, com o transplante autólogo de condrócitos (TAC). Nele, células autólogas da

cartilagem articular do paciente, obtidas por biópsia por artroscopia, são extraídas por digestão enzimática da matriz por collagenase e expandidas em cultura. Em um segundo procedimento cirúrgico, elas são implantadas no defeito condral, com objetivo de promover a formação de reparo com cartilagem hialina²⁷. Esta técnica já foi utilizada com sucesso no Brasil, com experiências do grupo do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) publicadas em 2010²⁸ (de forma eletrônica) e 2020²⁹.

Ao contrário de técnicas prévias de estímulo medular local^{30,31}, que resultam exclusivamente na formação de fibrocartilagem, o TAC permite a formação de cartilagem hialina³²⁻³⁴. Ou seja, este tipo de terapia celular permite a regeneração de lesão condral, superando as limitações do reparo natural do tecido. Atualmente, o TAC é considerado no mundo um dos tratamentos de primeira linha para lesões condrais focais^{27,35,36}, com bons resultados em longo tempo de seguimento^{37,38}. Porém, a regeneração da cartilagem hialina com o tratamento não é perfeita: a histologia é heterogênea, com áreas de cartilagem hialina misturadas com fibrocartilagem³³, com propriedades biomecânicas inferiores a da cartilagem normal³⁹ com falha no longo prazo de 18%⁴⁰.

Apesar da ampla experiência mundial com o transplante autólogo de condrócitos, há pontos controversos quanto à biologia das células utilizadas nesta técnica. O próprio uso do termo “condrócitos” está mais relacionado a uma suposição histórica da cartilagem adulta ser composta por um único tipo de célula em diferenciação terminal, do que às propriedades biológicas

observadas em cultura. Estas células derivadas da cartilagem, extraídas por digestão enzimática, mesmo sem um processo de seleção específico, possuem capacidade para diferenciação *in vitro* em múltiplos tecidos, incluindo cartilagem, tecido fibroso, músculo esquelético, osso e gordura⁴¹⁻⁴³. Ou seja, provavelmente não é acurado considerar que as células derivadas da cartilagem utilizadas clinicamente em TAC sejam uma população homogênea de condrócitos adultos unipotentes.

Algumas hipóteses são possíveis para explicar a multipotência em células da cartilagem adulta: é possível que o condrócito diferenciado seja capaz de reprogramação ou desdiferenciação para um fenótipo menos maduro, que a cartilagem seja composta por células de perfil heterogêneo em diversos estágios de diferenciação, ou que subpopulações de células na cartilagem sejam isoladas ou expandidas seletivamente em cultura⁴¹.

Desde a descrição de células-tronco mesenquimais (CTM) por Caplan⁴⁴, tornou-se um paradigma para terapias regenerativas a identificação de populações de células imaturas, com plasticidade, capacidade de diferenciação e papel na regulação de processos reparativos. Células progenitoras já foram identificadas em tecidos adultos diversos⁴⁵, inclusive na cartilagem. Em 2004, descreveu-se uma técnica de isolamento de células da cartilagem por meio do uso de ensaio de adesão à fibronectina, que os autores batizaram de progenitores condrais⁴⁶. Estas células têm alta eficiência para formação de colônias e capacidade de enxertia em tecidos embrionários animais, manutenção de atividade de telomerase, expressão de genes relacionados à expressão de matriz de

cartilagem e potencial condrogênico em culturas prolongadas⁴⁷. A identificação destas supostas linhagens de células progenitoras da linhagem cartilaginosa, também denominadas células condroprogenitores, reforçou a hipótese de subpopulações celulares heterogêneas na cartilagem. Posteriormente, outros métodos foram descritos para isolamento de células supostamente progenitoras da cartilagem, incluindo a seleção por capacidade de migração celular de explante condral⁴⁸, em que células migram de fragmentos condrais para uma placa de cultura⁴⁸.

As células conhecidas como condroprogenitoras são supostamente menos diferenciadas que condrócitos maduros, portanto, especula-se que desempenhem um papel na regeneração do tecido condral⁴⁹. São células que apresentam uma tendência fenotípica para condrogênese, pouca hipertrofia⁵⁰, grande capacidade de expansão e de manutenção do potencial condrogênico em culturas por períodos longos^{47,51-53}. Estas são características potencialmente desejáveis para células usadas em terapia celular para defeitos condrais.

No contexto de terapia regenerativa para cartilagem, a capacidade de migração de células derivadas da cartilagem é de grande interesse, por ser potencialmente importante no processo de reparo de defeitos condrais⁴⁸. Apesar disso, a maioria das publicações sobre isolamento de supostas células progenitoras da cartilagem usa ensaio de fibronectina⁴⁹, havendo uma relativa escassez de caracterização de supostas células progenitoras por migração de explante^{48,49}. Na literatura atual, existe considerável heterogeneidade na caracterização de supostos condroprogenitores isolados

da cartilagem, como marcadores de superfície, genes de indiferenciação, capacidade de diferenciação e características fenotípicas condrogênicas. Adicionalmente, a quase totalidade dos estudos de células obtidas por migração em cartilagem humana utiliza material de pacientes com osteoartrite⁴⁹, que podem ter diferenças importantes com células obtidas de articulações sem osteoartrite. Há autores, inclusive, que descrevem que a obtenção destas células de cartilagem saudável não é possível⁴⁸. Esta é uma limitação importante, já que pacientes com lesões condrais focais, porém sem osteoartrite estabelecida, são os melhores candidatos a terapias regenerativas.

Portanto, dentro de uma lógica de medicina translacional, as células obtidas por migração de explante de cartilagem, os potenciais condroprogenitores migratórios, são promissoras para uso em terapia celular em defeitos de cartilagem. Porém, há lacunas importantes do conhecimento básico a serem avaliadas: a viabilidade de obtenção destas células de cartilagem sem osteoartrite; sua caracterização quanto a marcadores de superfície, indiferenciação, plasticidade e marcadores de potencial de produção de matriz condral; e a comparação destas características com a técnica padrão de obtenção de células da cartilagem cultura, a digestão enzimática da cartilagem^{48,54-57}.

2 OBJETIVOS

Estabelecer linhagens de células derivadas da cartilagem isoladas por migração de explante (grupo explante) e células derivadas da cartilagem isoladas por meio de digestão enzimática (grupo colagenase), a partir de biópsia artroscópica da cartilagem do joelho adulto, humano, sem osteoartrite.

Caracterização celular e comparação dos dois grupos de linhagem por marcadores de superfície, marcadores de indiferenciação, plasticidade e características fenotípicas condrogênicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para facilitar a leitura desta tese, foi elaborado um glossário com alguns termos relacionados a biologia e cultura celular (Anexo A).

3.1 Métodos de isolamento de células para cultura a partir da cartilagem articular

3.1.1 Isolamento e caracterização de células da cartilagem articular a partir de digestão enzimática

Os trabalhos a seguir descrevem o isolamento de células da cartilagem por digestão da matriz extracelular, sem nenhum processo de seleção específico. Tradicionalmente, essas células são conhecidas como condrócitos cultivados, e, portanto, esta nomenclatura foi respeitada nesta revisão de literatura. Na seção de discussão desta tese, uma discussão crítica da nomenclatura utilizada na literatura será apresentada.

Holtzer *et al.*⁵⁸, em 1960, reportam pioneiramente o isolamento de condrócitos da cartilagem vertebral de embriões de galinha, através de digestão por tripsina, seguida de cultivo em monocamada. A atividade condrogênica é demonstrada pela capacidade de sintetizar sulfato de condroitina e de incorporar enxofre-35 inorgânico. Na cultura em monocamada, há perda de morfologia condrocítica e incapacidade de incorporar enxofre-35. Os autores denominam esse fenômeno de desdiferenciação.

Smith⁵⁹, em 1965, reporta pioneiramente a criopreservação de condrócitos extraídos de cartilagem animal (coelho, cão e macaco), usando dimetilsulfóxido (DMSO), com recuperação de células viáveis após o descongelamento. Os autores implantam com sucesso condrócitos em defeitos ósseos extra-articulares de coelhos (ílio e úmero), havendo incorporação das células e formação de matriz condral. Este é o primeiro trabalho que descreve o isolamento de condrócitos de mamíferos adultos, demonstra a possibilidade de criopreservação (essencial para uso futuro em terapia celular), e a capacidade de incorporação dessas células em tecidos musculoesqueléticos adultos.

Manning e Bonner⁶⁰, em 1967, são pioneiros no isolamento de condrócitos da cartilagem articular humana, usando digestão enzimática com colagenase. As células têm alta capacidade de adesão ao plástico, estabelecem culturas viáveis em monocamada, e são capazes de concentrar enxofre-35. A morfologia das células em cultura é alongada, semelhante a fibroblasto, confirmando a alteração morfológica de condrócitos adultos humanos em cultura descrita por Holtzer *et al.*⁵⁸ em condrócitos embrionários de galinha. As células são capazes de formação de matriz quando cultivadas em botão celular ("pellet"), mas não se multiplicam nessa condição. Primeira descrição de isolamento e cultura de condrócitos articulares humanos, confirmando sua desdiferenciação, mas também reportando que as células cultivadas podem produzir matriz quando condensadas em um botão celular. É a primeira evidência de retorno a uma morfologia condrocítica após desdiferenciação.

Chesterman e Smith⁶¹, em 1968, descrevem tentativa de uso de condrócitos, isolados de cartilagem articular de coelhos por digestão enzimática e cultivados em monocamada, para tratamento de defeito articular osteocondral, também em coelhos. Não há rejeição das células homólogas, havendo formação de matriz condral nos defeitos, que, porém, é envolta de tecido fibroso. Não houve preenchimento adequado do defeito. Os autores inferem que o insucesso na regeneração da cartilagem pode ser por conta da profundidade do defeito, com exposição do osso esponjoso e medula óssea. Posteriormente, em 1978, os autores⁶² especulam um motivo adicional para a falha: a incapacidade de manutenção de número suficiente de condrócitos no defeito, por conta da movimentação e carga articular. Esta é a primeira descrição de modelo experimental de transplante de condrócitos cultivados em defeito articular, vislumbrando seu uso futuro para terapia celular.

Layman *et al.*⁶³, em 1972, demonstraram de forma pioneira a alteração na produção de colágeno por condrócitos articulares de coelho em cultura monocamada. Diferentemente do que ocorre na cartilagem nativa, onde há síntese predominante de colágeno II, condrócitos cultivados em monocamada produziram colágeno I. Este é o primeiro trabalho que descreve a alteração da produção de colágeno em condrócitos em cultura, e no uso da razão colágeno II/colágeno I como marcador de diferenciação condrocítica.

von der Mark *et al.*⁶⁴, em 1977, investigam se a expressão de colágeno I ou II por condrócitos cultivados em monocamada está relacionada com a morfologia individual de cada célula. Os autores confirmam a transição da expressão de colágeno II para colágeno I com a progressão da cultura. Diferentemente da hipótese levantada pelos autores, a morfologia plana ou esferoide de células individuais não está relacionada com o tipo de colágeno produzido. Esta é a primeira descrição da transição da produção de colágeno II para I com o tempo em cultura monocamada.

Benya e Shaffer⁶⁵, em 1982, são pioneiros ao demonstrar a reversibilidade da desdiferenciação de condrócitos isolados de cartilagem articular de coelhos cultivados em monocamada. Condrócitos cultivados em monocamada, em terceira, quarta, quinta e sexta passagens, apresentam fenótipo desdiferenciado. Estas células, independente de qual passagem, quando transferidas para cultura tridimensional em suspensão na agarose, apresentam interrupção quase completa de multiplicação e aumento de síntese de colágeno e proteoglicanos. Porém, quanto maior a passagem, mais tempo é necessário para retorno da síntese. Os autores inferem que a reversão do fenótipo não ocorre por proliferação de um subtipo de células, mas pela transição de cada célula sobrevivente, já que 80% das células sobrevivem à transferência de cultura e há mínima proliferação celular na agarose. Os autores também especulam que a morfologia das células é o principal determinante do fenótipo: plana em monocamada e esférica em agarose. Este trabalho demonstra a capacidade de reversão da desdiferenciação, que é crucial para uso clínico de condrócitos cultivados,

que precisam adquirir fenótipo condrocítico *in vivo*. Descartam a hipótese de que a transição de fenótipo seria por multiplicação diferencial de células, mas sim por transição fenotípica. A cultura em suspensão de agarose descrita será frequentemente usada como forma de manter, ou retornar, condrócitos para fenótipo diferenciado.

Aulthouse *et al.*⁶⁶, em 1989, demonstram a capacidade de transição da produção de colágeno de condrócitos cultivados em monocamada, quando passados para cultivo em suspensão. Condrócitos extraídos da cartilagem costocondral humana perdem o fenótipo diferenciado em cultura monocamada, assumindo morfologia estrelada (semelhante a célula mesenquimal) ou alongada com espículas (semelhante a fibroblasto). Na cultura em monocamada, não há identificação de proteoglicanos por coloração azul de Alcian. Há forte marcação imuno-histoquímica para pró-colágeno tipo I e fibronectina, mas apenas em poucas células para colágeno tipo II. Quando transferidas para culturas de suspensão em agarose, as células assumem morfologia arredondada, há identificação de proteoglicanos, e quase todas as células são positivas para colágeno tipo II. Este trabalho demonstra a transição do tipo de colágeno com a reversão do fenótipo desdiferenciado para diferenciado.

Grande *et al.*⁶⁷, em 1989, demonstram pela primeira vez sucesso em modelo animal em coelhos de transplante autólogo de condrócitos, com um primeiro tempo cirúrgico para criação de defeitos condrais e obtenção de cartilagem para isolamento e cultura de células, seguido de segundo tempo, com implantação de condrócitos em suspensão sob enxerto periosteal

suturado no defeito. Vários aspectos inovadores importantes são reportados no trabalho: criação de lesões focais da cartilagem articular sem violar o osso subcondral (diferentemente de estudos anteriores), portanto sem induzir resposta de reparo nativa com fibrocartilagem; uso de condrócitos autólogos; uso de enxerto periosteal para cobertura do defeito, isolamento das células e proteção do regenerado; demonstração de menor sinovite em articulações tratadas; e, o mais importante: formação de tecido de reparo condral com predominância de colágeno II em todas articulações tratadas, havendo preenchimento médio de 82% da área dos defeitos. Em dois animais (20%), houve regeneração completa da lesão. Nas articulações controle, com sutura de enxerto de periósteo, mas sem implante celular, houve ausência de regeneração da lesão (18% da área preenchida). Para confirmar que os condrócitos implantados foram a origem do tecido de reparo, o experimento foi repetido em três animais com células tratadas com nucleodídeo radiomarcado. Assim, as células originárias do implante puderam ser rastreadas no tecido pela emissão de radiação, e de fato se incorporam na lesão condral, fortalecendo a hipótese de que o reparo ocorre por proliferação das células implantadas, e não por indução de resposta local. Trata-se de trabalho experimental seminal, demonstrando *in vivo* o conceito de transplante autólogo de condrócitos.

Brittberg *et al.*²⁶, em 1994, reportam o resultado da primeira série de pacientes tratados com transplante autólogo de condrócitos, em 23 pacientes sintomáticos, com lesões focais de cartilagem de espessura completa, mas sem lesão do osso subcondral. Os condrócitos são isolados

por digestão enzimática de biópsias de cartilagem realizadas por artroscopia, em primeiro tempo cirúrgico e cultivados em monocamada, com soro autólogo, até a obtenção de 2,6 a 5×10^6 células. O número de passagens necessário não é reportado. Em segundo procedimento cirúrgico, as células, ressuspendidas em solução, são injetadas sob enxerto de periósteo suturado no defeito condral do paciente. Os autores reportam resultados subjetivos excelentes ou bons em 87% dos casos de lesão femoral, porém apenas em 28% das lesões patelares e preenchimento do defeito em artroscopias diagnósticas com 3 meses. Os autores descrevem pioneiramente o uso de terapia celular para tratamento de cartilagem e confirmam a capacidade de produção de cartilagem hialina em humanos por condrócitos cultivados. Porém, a caracterização biológica das células reportadas é pobre.

Kolettas *et al.*⁶⁸, em 1995, identificam o tempo de vida de condrócitos cultivados entre 34 e 37 duplicações da população. Tanto em cultura de monocamada quanto em suspensão na agarose, há expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relacionadas ao perfil condrocítico, incluindo colágeno tipo II, colágeno IX, aggrecan, versican, mas não há expressão de sindecan. Os autores concluem que condrócitos cultivados, apesar de sua morfologia, não passam por desdiferenciação verdadeiramente, mesmo em culturas prolongadas, uma vez que a expressão de genes relacionados à cartilagem permanece. Adicionalmente, eles inferem que a transição para formato plano das células está relacionada a mecanismos de proliferação e reparo, e é parte da fisiologia do condrócito,

e não caracteriza uma verdadeira perda de fenótipo. Este estudo é pioneiro no uso de técnicas de biologia molecular para caracterizar condrócitos expandidos em monocamada.

Brittberg *et al.*⁶⁹, em 1996, descrevem resultados de modelo experimental de transplante autólogo de condrócitos em coelho, com algumas inovações relevantes: biópsia de cartilagem fora da área de carga no primeiro procedimento; comparação entre dissociação de células da cultura em monocamada por de forma enzimática, com tripsina, ou mecanicamente, com um raspador de células; avaliação da capacidade condrogênica das células cultivadas por implantação intramuscular em camundongo *nude* (animais imunodeprimidos por mutação genética); avaliações sequenciais com 8, 12 e 52 semanas, para avaliação do amadurecimento do tecido regenerado; comparação de implante de células injetadas sobre enxerto perióstio ou formado por células cultivadas "scaffold" de fibra de carbono. Células dissociadas da cultura mecanicamente ficam agrupadas, enquanto as suspendidas com tripsina ficam quase completamente separadas individualmente. Não houve diferença na qualidade do tecido de reparo com os dois métodos, e os agrupamentos de células extraídos mecanicamente são mais difíceis de transportar para a área do defeito. A injeção intramuscular de condrócitos cultivados em camundongo "nude" resulta na formação de cartilagem hialina após duas semanas. Condrócitos cultivados em "scaffold" de fibra de carbono não apresentam reação adversa ao material, e crescem aderidos aos filamentos de carbono, com deposição de matriz com aparência

histológica de cartilagem hialina. Os autores mostram pioneiramente que no tratamento de lesões da cartilagem com transplante autólogo de condrócitos (coberta com perióstio), há maturação prolongada do tecido de reparo: nas avaliações de 8, 12 e 52 semanas, há aumento da área do defeito preenchida, e há progressão histológica de tecido com agrupamentos celulares, com baixa integração ao osso e cartilagem adjacentes, para um aspecto colunar organizado (semelhante à cartilagem articular saudável), e sinais de integração com as bordas e leito do defeito. O regenerado resultante do uso "scaffolds" de carbono com condrócitos, apesar de apresentar mais cartilagem hialina em 12 semanas, sofreu degeneração na avaliação de 52 semanas, possivelmente pela natureza não biodegradável do material. Esse fato mostra a importância do tempo de avaliação de defeitos para reparo de cartilagem ser adequado para refletir a maturação do tecido, e que uma melhor resposta regenerativa inicial pode não ser persistente no resultado final. Além do avanço no entendimento da evolução do tecido regenerado em implante de condrócitos, é notório o uso do ensaio *in vivo* em camundongo nude para avaliação da capacidade condrogênica das células cultivadas.

Stokes *et al.*⁷⁰, em 2001, demonstram a relação do fator de transcrição SOX9 com a recuperação em cultura do fenótipo condrocítico. Condrócitos humanos fetais, desdiferenciados após cultivo em monocamada, são transferidos para cultura tridimensional em hidrogel (poli-HEMA), onde retomam a produção de colágeno II. Os autores demonstram que a ativação do gene para colágeno II (COL2A1) é mediada pelos fatores

SOX (SOX6, SOX9, SOX5). Os autores concluem que os fatores SOX são genes regulatórios mestres na expressão do fenótipo condrocítico, e sua modulação e expressão podem ser chaves para a aplicação em terapia celular para cartilagem. Este trabalho demonstra a importância dos fatores de transcrição SOX, ainda hoje um dos marcadores mais importantes de condrogenicidade.

Dell'Accio *et al.*⁷¹, em 2001, cultivam condrócitos isolados de cêndilos femorais humanos por digestão com colagenase, com o propósito de identificar marcadores moleculares relacionados a uma maior capacidade de formação de cartilagem *in vivo*, em ensaio experimental em camundongos "nude". A capacidade de formação de cartilagem diminuiu após 2-3 passagens em cultura em monocamada. A condrogênese *in vivo* estava positivamente relacionada à expressão do receptor 3 do fator de crescimento fibroblástico (FGFR-3), proteína morfogenética óssea 2 (BMP 2) e colágeno II, e negativamente relacionada à expressão da quinase do tipo receptor de ativina 1 (ALK-1). Este estudo demonstra a possibilidade de buscar marcadores moleculares de capacidade condrogênica em condrócitos expandidos. Uma vez que suas propriedades biológicas não são uniformes, seria possível selecionar células de interesse a partir de culturas

Barbero *et al.*⁷², em 2003, demonstram que condrócitos articulares humanos desdiferenciados são capazes de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica. O uso de fatores de crescimento aumenta o potencial condrogênico e osteogênico, enquanto diminui o potencial adipogênico. A análise de populações derivadas de clones únicos demonstra

que há heterogeneidade nos clones, com nulipotentes, capazes de se diferenciar em apenas uma linhagem (a maioria condrogênica), em duas linhagens (condrogênico e osteogênico ou adipogênico) ou nas três linhagens. Os autores não conseguem afirmar se células com capacidade de diferenciação multilinhagem são uma subpopulação das células inicialmente isoladas, ou se são resultado de expansão e de desdiferenciação de condrócitos. Este é um trabalho seminal, demonstrando que condrócitos expandidos desdiferenciados têm multipotência. Esse fato potencialmente muda o entendimento da biologia destas células, colocando em xeque o entendimento delas como células adultas terminalmente diferenciadas e comprometidas com linhagem condrogênica.

Dell'Accio *et al.*⁴¹, em 2003, usam culturas de células extraídas de cartilagem articular humana com colagenase, em ensaios *in vivo* de diferenciação celular, usando camundongos "nude". As células são capazes de gerar cartilagem, fibrose, músculo esquelético, osso e adipócitos, dependendo do equilíbrio entre a estabilidade fenotípica e os sinais ambientais. Os autores questionam se esse comportamento está relacionado a uma reprogramação de condrócitos diferenciados, ou à existência de uma população separada de células multipotentes na cartilagem articular. Essas células multipotentes podem suplantar condrócitos diferenciados por crescimento mais eficiente em cultura, ou então as suas populações podem coexistir nas linhagens cultivadas. Os autores afirmam não ser possível, naquele momento, identificar uma subpopulação de células multipotentes, pela ausência de marcadores moleculares inequívocos de células-tronco

mesenquimais. Este trabalho apresenta a confirmação e descrição mais detalhada da multipotência de condrócitos cultivados. Porém, não é possível afirmar se essa é uma característica universal dos condrócitos, ou de subpopulações presentes na cartilagem.

Tallheden *et al.*⁷³, em 2003, demonstram a capacidade *in vitro* de condrócitos articulares humanos de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica. Porém, diferentemente de células-tronco mesenquimais, condrócitos submetidos a ensaio osteo-condrogênico *in vivo* produzem apenas cartilagem. Este é mais um estudo sobre diferenciação de condrócitos cultivados, porém, demonstra diferenças dessas características com relação àquela esperada para células-tronco mesenquimais.

De la Fuente *et al.*⁷⁴, em 2004, propõem demonstrar a multipotência de condrócitos desdiferenciados cultivados a partir da cartilagem articular humana. Na citometria de fluxo, as células são positivas para CD9, CD12, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90, CD95, CD105, CD106, CD166, beta 2 microglobulina, HLA-1. Este perfil é quase idêntico ao de células-tronco mesenquimais de medula óssea testadas pelos autores. Os condrócitos são capazes de diferenciação *in vitro* osteogênica, adipogênica, condrogênica, miogênica e neurogênica. Por isso, os autores especulam que condrócitos desdiferenciados são na verdade uma população de célula tronco mesenquimal. Além de novamente demonstrar a multipotência de condrócitos em cultura, os autores caracterizam marcadores de superfície, havendo grande similaridade com relação a células-tronco mesenquimais.

Marlovits *et al.*⁷⁵, em 2004, demonstram as mudanças na razão de colágeno tipo I e tipo II em culturas monocamada de condrócitos articulares humanos por até 46 dias. A transição de morfologia esférica para achatada é acompanhada por uma rápida mudança no fenótipo de colágeno, substituindo o tipo II pelo tipo I. A expressão dos genes que codificam o colágeno tipo I e II é dependente do tempo, e a proporção de colágeno tipo II para tipo I diminui ao longo do tempo, com queda abrupta a partir do sexto dia, chegando nos níveis mínimos em 30 dias.

Brittberg *et al.*⁷⁶, em 2005, reportam que condrócitos humanos isolados por digestão com colagenase formam agrupamentos celulares heterogêneos em cultura de suspensão em agarose. Os agrupamentos são classificados pela morfologia das células e formação de matriz, sendo possível observar grupos mais diferenciados, com formação de matriz, e menos diferenciados, com células homogêneas. Clones resultantes destes grupos apresentam potencial de crescimento diferentes, tanto em cultura de suspensão com agarose quanto em cultura monocamada. Os autores concluem que células obtidas da cartilagem articular têm características heterogêneas. Este trabalho demonstra a heterogeneidade de condrócitos expandidos em cultura, por meio de caracterização morfológica após transferência em cultura tridimensional.

Thornemo *et al.*⁴², em 2005, demonstram propriedades progenitoras de subpopulações de condrócitos articulares humanos selecionados em cultura de suspensão em agarose. Após isolamento das células por digestão enzimática com colagenase e cultivo em monocamada na primeira

passagem, os condrócitos são transferidos para as culturas em agarose, de forma a excluir a contaminação por células-tronco mesenquimais de medula óssea, periosteais ou fibroblastos, incapazes de crescer nesse tipo de cultura. Após 6 semanas, agrupamentos celulares com morfologias diferentes são observados a partir de 4% das células semeadas. Os autores classificam morfologicamente os agrupamentos, em quatro grupos, com características maiores ou menores de diferenciação. As células de agrupamentos homogêneos, morfologicamente menos diferenciadas, têm capacidade maior de gerar subculturas em novas placas, enquanto os agrupamentos com células morfologicamente diferenciadas têm pequena capacidade de formar subculturas. Todos os tipos de agrupamento expressam genes para receptores de FGF e colágeno II, característicos de linhagens condrocíticas. Há variação da distribuição da morfologia dos agrupamentos formados entre os indivíduos doadores da cartilagem, mas sem correlação com sexo ou idade. Células de agrupamentos menos diferenciados são capazes de diferenciação *in vitro* condrogênica, adipogênica e osteogênica. Células de agrupamentos mais diferenciados não são capazes de expansão em culturas secundárias, impedindo ensaio de diferenciação. Os autores concluem que as propriedades multipotentes observadas na literatura são devidas a subpopulações de células condrocíticas, e não de células-tronco mesenquimais contaminantes, e que a cartilagem não é um tecido pós-mitótico terminalmente diferenciado, e possui células com características de células-tronco. Este trabalho elucida pontos importantes: primeiramente, os autores afastam a contaminação da

população por células-tronco mesenquimais de medula óssea, periosteais ou fibroblastos; em seguida, demonstram a heterogeneidade de células expandidas, inclusive com relação a multipotencialidade, reforçando a hipótese de subpopulações com características de células-tronco.

Diaz-Romero *et al.*⁷⁷, em 2005, exploram a caracterização por marcadores de superfície de condrócitos articulares humanos expandidos em monocamada. Diferentes categorias de marcadores são positivos nos condrócitos: integrinas e moléculas de adesão (CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD49f, CD51/61, CD54, CD106, CD166, CD58, CD44), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82, CD151), receptores (CD105, CD119, CD130, CD140a, CD221, CD95, CD120a, CD71, CD14), ectoenzimas (CD10, CD26), e outras moléculas de superfície (CD90, CD99). Há expressão de marcadores típicos de células-tronco mesenquimais (CD10, CD90, CD105, CD166). Os autores identificaram marcadores que são afetados pelo processo de digestão enzimática por colagenase (CD 105 e CD14), inferindo que o estudo de condrócitos frescos isolados por digestão não reflete o imunofenótipo na cartilagem nativa. Em comparação com condrócitos cultivados por 24 horas, o cultivo em monocamada por duas semanas resulta no aumento da expressão de diversos marcadores, em ordem de aumento: CD90, CD166, CD49c, CD44, CD49e, CD151, CD81, CD49f, CD51/61. CD105, CD10 e CD99. Há diminuição de expressão de CD14, CD49a, CD106 e CD54. O perfil de marcadores na citometria permanece unimodal, indicando alteração uniforme de toda a população, e não crescimento ou sobrevida diferencial de uma subpopulação. Este é o

estudo mais completo de marcadores de superfície de condrócitos cultivados. É relevante que os autores demonstram marcadores de células-tronco, com a interferência de que a digestão por colagenase causaria alteração no fenótipo. Também é importante a descrição da característica unimodal na citometria, mostrando que as alterações que ocorrem em cultura são uniformes na população.

Grogan *et al.*⁷⁸, em 2007, a partir de condrócitos expandidos de cartilagem articular humana saudável obtida em autópsias, identificam marcadores que se correlacionam com a capacidade condrogênica avaliada pela produção de glicosaminoglicanos em culturas de botão celular. Condrócitos com alta capacidade condrogênica apresentam expressão aumentada de genes envolvidos em interação célula-célula e célula-matriz (CD49c e CD49f), e têm os marcadores de superfície CD44 (receptor de hialuronato), CD151 (relacionado a adesão célula-célula) e CD29c (integrina). Já condrócitos com menor capacidade condrogênica expressam fator de crescimento tipo insulina 1, metaloproteinase de matriz 1 e agrecanase 2. A separação de condrócitos com base em CD49e ou CD44 resultou em maiores níveis de glicosaminoglicanos e colágeno tipo II. Os autores concluem que a avaliação de marcadores de superfície específicos pode ser útil na separação de células com maior potencial clínico para terapia celular de cartilagem. Este estudo demonstra a potencial importância de marcadores de superfície na identificação de potencial condrogênico, propriedade que pode ser aplicada em terapia celular.

Diaz-Romero *et al.*⁴³, em 2008, contrastam marcadores de superfície de condrócitos articulares expandidos e células-tronco mesenquimais de medula óssea. Condrócitos são positivos para CD14, fortemente para CD90, fracamente para CD105, enquanto células-tronco mesenquimais são negativas para CD14, e positivas fracamente para CD90 e fortemente para CD105. Células-tronco tiveram pouca variação dos marcadores em cultura, enquanto condrócitos tiveram aumento de CD90, CD166, CD49c, CD44, CD10, CD26, CD49e, CD151, CD51/61, e CD81, e diminuição de CD49a, CD54 e CD14. Os autores relacionam a proporção CD14/CD90 com a razão agrecano/versicano e colágeno II/colágeno I, mostrando que a evolução de marcadores de superfície em cultura está relacionada a um fenótipo menos diferenciado. Os autores inferem que a desdiferenciação de condrócitos ocorre no nível da população, não por uma amplificação de uma pequena população de células-tronco mesenquimais. As células são capazes de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. Este estudo compara diretamente condrócitos cultivados com células-tronco mesenquimais de medula óssea, demonstrando similaridades e diferenças importantes. Mais uma vez, fica demonstrado que essas células estão relacionadas, mas não são idênticas. Pela característica da evolução de marcadores em cultura para condrócitos, em contraste com a relativa estabilidade em células-tronco, é fortalecida a hipótese de que as células passam por transição do fenótipo ou reprogramação, e não uma expansão seletiva de células progenitoras.

Giovannini *et al.*⁷⁹, em 2010, estudam a presença de colágeno I e II intracelular em condrócitos articulares bovinos expandidos em monocamada através de marcação dupla em citometria de fluxo. De forma inovadora, os autores avaliam se a transição de fenótipo da produção de colágeno II para colágeno I ocorre abruptamente no nível celular, com células produzindo apenas uma das proteínas, ou gradual, com células individuais com expressão simultânea de ambos. Ao longo das passagens, há uma transição entre a maioria das células produzindo apenas colágeno II, para a coexpressão dos dois tipos de colágeno por células individuais, para apenas células produzindo colágeno I. Adicionalmente, usando marcação dupla para colágeno II e BrdU (um marcador de proliferação), é demonstrada a capacidade de proliferação tanto de células positivas ou negativas para colágeno II, o que mostra que a capacidade de proliferação não está obrigatoriamente ligada à perda de produção de colágeno II. Este é mais um trabalho que fortalece a hipótese de uma transição de fenótipo gradual, no lugar de uma mudança abrupta ou de uma expansão seletiva.

Hamada *et al.*⁸⁰, em 2013, descrevem a expressão gênica e marcadores de superfície de condrócitos articulares humanos de três joelhos sem osteoartrite extraídos por colagenase e expandidos em monocamada da primeira até a quarta passagem. A razão de RNAm para colágeno II para colágeno I diminui a cada passagem, sendo o melhor marcador de diferenciação das células. A expressão dos marcadores CD44, CD49c e CD151 aumenta com cada passagem, enquanto CD14, CD49ae CD54 diminuem. Entre os marcadores de superfície, a razão CD54/CD44 têm

melhor relação com a razão de colágeno II/I. A maior mudança na expressão gênica e de marcadores ocorreu no início da cultura, entre as passagens 0 e 1. Seleção celular de condrócitos CD54⁺CD44⁺ resulta em uma subpopulação de células com maior expressão de colágeno II e agrecano, mas sem significância. Os autores especulam que, havendo uma maior amostra, os resultados poderiam ser significativos.

Benz *et al.*⁸¹, em 2013, avaliam células da cartilagem obtidas por digestão enzimática para características de células-tronco. As células expressam antígenos tipicamente relacionados com células-tronco mesenquimais (CD49e, CD73, CD90, CD105, CD140b e CD166), porém com capacidade para retorno a um fenótipo condrocítico (mesmo com tempos prolongados de cultura), mas apenas uma capacidade limitada para diferenciação adipogênica e osteogênica.

Karlsen *et al.*⁸², em 2021, avaliam células da cartilagem obtidas por digestão enzimática expandidas para a expressão individual, célula a célula, de RNAm. Existe variação considerável entre as células, mas há evidência de subpopulações identificáveis. As células expressavam marcadores para CTM e foram capazes de diferenciação adipogênica e osteogênica, levando à afirmação pelo autor que essas células devem ser consideradas formalmente como CTM.

3.1.2 Isolamento de progenitores da cartilagem articular

A partir dos anos 2000, outras técnicas de isolamento ou separação de células da cartilagem articular são utilizadas com intuito de obtenção de células envolvidas em reparo e regeneração da cartilagem. Em 2004, Douthwaite *et al.*⁴⁶ utilizam ensaio de adesão de fibronectina para isolar uma população que denominou como "células progenitoras da cartilagem". Estas células são caracterizadas por alta expressão de SOX9 e NOTCH1, afinidade para CD49e e maior atividade da telomerase quando comparada a células isoladas por digestão enzimática sem seleção.

Em 2009, Koelling *et al.*⁴⁸ propõem a identificação de células da cartilagem que possuam capacidade migratória, uma vez que essas duas características seriam desejáveis para terapias regenerativas. Estes autores nomeiam estas células de "condroprogenitores migratórios".

Novamente, respeitou-se, nesta revisão de literatura, a terminologia utilizada pelos autores citados, com o uso de termos como "células progenitoras da cartilagem" ou "condroprogenitores migratórios", para se referir a células derivadas da cartilagem selecionadas migração de explante condral. Conforme já apontado, na seção de discussão desta tese, uma discussão crítica destes termos será apresentada.

3.1.3 Isolamento e caracterização de células migratórias da cartilagem articular

Koelling *et al.*⁴⁸, em 2009, propõem a identificação de células com características progenitoras que possuam capacidade migratória. Para isso, os autores não utilizam digestão enzimática por colagenase, mas sim a migração de células de explante de tecido. Pequenos fragmentos de tecido de reparo em lesões condrais de osteoartrite em joelhos humanos são colocados em placas de cultura, e ocorre a migração de células do fragmento para a placa, entre 5 e 10 dias, com 93,83% de sucesso. Os autores reportam fracasso ao tentar o processo com cartilagem de joelho sadio. As células migratórias expandidas apresentam níveis de transcrição intermediários de RUNX2 e altos de colágeno I, e na imunocitoquímica são positivas para RUNX2, SOX9 e colágeno I. Na análise de citometria intracelular, condroprogenitores são positivos para CD29 (beta 1 integrina), CD49c (alfa 3 integrina) e CD49e (alfa 5 integrina). As células têm capacidade de produzir tecido semelhante à cartilagem em culturas tridimensionais de agarose, mesmo sem indução. Também são capazes de diferenciação osteo e adipogênica em meios específicos. Os autores cunham o termo progenitores condrogênicos para essas células. É notável que a origem das células é o tecido desorganizado de reparo em lesões condrais da osteoartrite, e os autores reportam insucesso em isolar as células de cartilagem saudável, algo que se mantém controverso posteriormente na literatura.

Joos *et al.*⁸³, em 2013, demonstram isolamento de condroprogenitores migratórios pela técnica de explante de cartilagem não fibrilada (macroscopicamente intacta) em joelho com osteoartrite, e não de áreas ulceradas com perda estrutural. As células são positivas para CD73, CD90, CD166 e CD54 na imunocitoquímica. Na citometria de fluxo, de forma semelhante a células-tronco mesenquimais, elas apresentam positividade para CD29, CD44, CD73, CD90 (todos > 90%), CD105 e CD166 (> 75%), CD54 e MSCA-1 (44% a 66%), Stro-1 (16% a 23%) e CD88 (9% a 10%). Apresentam maior positividade de CD9 (80% contra 47%) e menor de CD164 (12% contra 44%). Quanto a receptores de adesão, condroprogenitores são fortemente positivos para CD49a, CD49e e CD29. Os condroprogenitores são capazes de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica. A migração das células foi estimulada por PDGF-BB e IGF-1 e inibida por IL-1 beta e TNF alfa. Sobrenadante de cartilagem com osteoartrite, submetida ou não a trauma contuso, também estimulam a migração dos condroprogenitores. Os autores inferem que o balanço citocinas de atração e inibição de condroprogenitores pode restringir o potencial regenerativo de cartilagem *in vivo*. Neste trabalho, os autores demonstram ser factível a obtenção de condroprogenitores migratórios de cartilagem macroscopicamente intacta, porém ainda em articulação com osteoartrite. Além de reportarem marcadores de superfície, demonstram a capacidade de diferenciação multilinhagem e características de sua resposta quimiotática.

Zingler *et al.*⁸⁴, em 2016, demonstram que a extração de células progenitoras por explante não é possível após lavagem vigorosa de fragmentos condrais intactos de joelhos com osteoartrite submetidos a artroplastia, em comparação com apenas uma lavagem breve. Os autores ressaltam que o comportamento na cartilagem de articulação sem osteoartrite poderia ser diferente. Baseados nos resultados, os autores especulam se as células migratórias obtidas por explante podem ter outra fonte, e estar somente aderidas ao tecido condral durante a retirada cirúrgica. A obtenção de material pós artroplastia pode expor a cartilagem a contaminação por tecido medular ósseo, ou outro tecido pericondral, como sinóvia. Os autores colocam em dúvida a origem de células condroprogenitoras migratórias. Uma vez que têm características de células-tronco mesenquimais, elas poderiam ser células de outro sítio, atraídas e aderidas na cartilagem por estimulação na osteoartrite.

Wang *et al.*⁸⁵, em 2017, avaliam condroprogenitores obtidos por explante de cartilagem articular bovina saudável, após trauma por arranhadura da superfície condral, para a produção de fator de crescimento vascular endotelial 1 (VEGF) e fator estromal derivado de célula 1 α (SDF-1 α), relacionados com a patogênese da osteoartrite e catabolismo de cartilagem. Em comparação com condrócitos obtidos por digestão enzimática, condroprogenitores superexpressam VEGF e SDF-1 α . Condroprogenitores respondem à estimulação com SDF-1 α com síntese de VEGF. Os autores concluem que condroprogenitores contribuem para a superabundância de VEGF em líquido sinovial de osteoartrite, com

implicações na fisiopatologia da doença. Este artigo demonstra que cartilagem articular saudável, de origem animal, é fonte adequada para condroprogenitores migratórios, após trauma local com arranhadura por agulha. Este fato corrobora a origem condral das células, já que na articulação saudável não há violação da interface osso subcondral e cartilagem, que ocorre em nível microscópico na osteoartrite. A factibilidade do uso de cartilagem saudável traumatizada (por fragmentação, por exemplo) é essencial para a obtenção de condroprogenitores de joelhos sem osteoartrite, para fins de terapia celular autóloga.

Batschkus *et al.*⁸⁶, em 2017, avaliam o secretoma de condroprogenitores obtidos por explante de cartilagem de joelhos com osteoartrite, tanto em cultura em monocamada quanto em cultura em suspensão de agarose. O secretoma revela componentes de matriz extracelular, proteínas de sinalização e fatores de crescimento, também encontrados em cartilagem saudável. Há aumento de proteínas relacionadas com resposta regenerativa em cultura de suspensão, e diminuição de proteínas envolvidas no catabolismo. Os autores concluem que a cultura de condroprogenitores em suspensão de agarose, além de produzir tecido semelhante a cartilagem, aumenta seu potencial condrogênico observado pela secreção de proteínas. Este estudo contribui para o entendimento da biologia de condroprogenitores migratórios, descrevendo seu perfil de secreção proteica para matriz extracelular.

Nguyen *et al.*⁸⁷, em 2018, reportam que lisado de plaquetas (LP) na cultura de condroprogenitores extraídos por explante de fragmentos condrais articulares humanos de quadris ou joelhos com osteoartrite. Em controles sem LP, uma pequena quantidade de células é obtida de 50% das amostras, em comparação com grande quantidade de células em 100% das amostras suplementadas. Há expressão aumentada de colágeno tipo II com o uso de LP, mas também de colágeno tipo I em lacunas intercelulares. Após um ano de cultura dos fragmentos de cartilagem, as amostras tratadas continuam liberando células. Quando as células são suspensas e transferidas para culturas secundárias, há incapacidade de formação de culturas nas amostras controle, enquanto as suplementadas com LP proliferam e expressam colágeno tipo I. Quando transferidas para culturas em suspensão de agarose, estas células retomam o fenótipo de síntese de colágeno II e agregano. A suplementação de LP nessas culturas induz a produção de fator α -1 induzível por hipóxia (HIF-1 α), relacionada à proliferação de condrocitos. Os autores concluem que o LP induz a ativação de fenótipo de proliferação desdiferenciada, mas que mantém a habilidade de assumir fenótipo condrocítico com produção de matriz em condições em ambiente propício. Os autores inferem que este pode ser um mecanismo possível *in vivo* para reparo condral. Este estudo demonstra que suplementação de condroprogenitores com lisado de plaquetas (que pode ser obtido de forma autóloga), pode ter aplicações no uso em terapia celular.

Janssen *et al.*⁵⁴, em 2019, estudam o efeito de TGF- β 3 em condroprogenitores isolados por explante de cartilagem articular de joelhos com osteoartrite. As células expressavam receptor para TGF- β 3 tipo 1 (TGFBR1), e pouca expressão de receptor para fator de crescimento epidermal (EGFR). Tanto TGF- β 3 quanto EGF aumentaram a expressão de SOX9, enquanto EGF isolado estimulou também a expressão de RUNX2. Estimulação com TGF- β 3 tanto isolado quanto em combinação com EGF aumentaram RNAm para agregcano e colágeno II, enquanto EGF isolado diminuiu a expressão de ambos. Os autores identificaram TGFBR1 e EGFR expressados em amostras histológicas tanto de cartilagem normal quanto de osteoartrite. Este estudo demonstra o estímulo condrogênico de TGF- β 3 em células migratórias da cartilagem.

Matta *et al.*⁵⁶, em 2019, descrevem o proteoma de superfície de condroprogenitores migratórios extraídos por explante de joelhos com osteoartrite, após cultura em monocamada. São identificadas 1256 proteínas na superfície dos condroprogenitores. Como achados dignos de nota, condroprogenitores são positivos para integrinas beta 1 (CD29), alfa 3 (CD49c), alfa 5 (CD49e), e para CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105, e negativos para CD34, CD31, CD117 e CD45. Porém, os marcadores tipicamente positivos para células-tronco mesenquimais CD18, CD31 e CD271 são negativos em condroprogenitores. Os autores concluem que condroprogenitores estão intimamente relacionados com células-tronco mesenquimais, mas apresentam uma interface celular distinta. Este estudo contribui no entendimento dos marcadores de superfície de condroprogenitores, e para o entendimento de que, apesar de semelhanças, são células diferentes das células-tronco mesenquimais de medula óssea.

Wang *et al.*⁵⁷, em 2020, comparam condroprogenitores migratórios de cartilagem articular humana de joelhos com osteoartrite em áreas de lesões profundas ou superficiais (graus 1-2 de Outerbridge contra graus 3-4). Há maior migração de células em áreas de lesões mais graves. Características morfológicas, proliferativas e de formação de colônia são semelhantes nas populações obtidas de lesões mais ou menos graves. Por outro lado, células de lesões mais graves expressam mais CD271 (32,5% contra 22,5%), relacionado ao catabolismo da matriz extracelular. Além disso, condroprogenitores de lesão mais graves têm maior capacidade osteogênica e adipogênica e menor condrogênica, além de maior resposta quimiotática a líquido sinovial de osteoartrite. Os autores inferem que as alterações de condroprogenitores em lesões mais graves, em comparação com lesões iniciais, está relacionada à fisiopatologia da progressão da osteoartrite. Os autores demonstram diferenças biológicas entre condroprogenitores migratórios extraídos de lesões graves ou iniciais na osteoartrite. Fica claro que estas células têm papel na resposta de reparo natural (mas ineficaz) na osteoartrite, e que o meio em que se encontram têm interferência nas suas propriedades biológicas.

Carluccio *et al.*⁸⁸, em 2020, reportam sucesso na obtenção de condroprogenitores migratórios obtidos de cartilagem osteoartrítica humana quando o explante é realizado em meio de cultura enriquecido com lisado de plaquetas, em comparação ao insucesso na maioria das amostras utilizando soro fetal bovino. Além disso, a proliferação foi maior com uso de LP. De forma inovadora, os autores mostram que condroprogenitores não têm potencial tumorigênico, usando ensaio *in vitro* crescimento independente de

ancoragem em metilcelulose e ensaio *in vivo* com camundongos imunodeficientes. Desta forma, este é o primeiro estudo demonstrando a segurança do uso de condroprogenitores autólogos com relação à tumorigênese. É interessante notar que, diferente de estudos prévios, os autores não são bem-sucedidos em extrair condroprogenitores com uso de meio suplementado com soro fetal bovino. Pode-se inferir que diferenças no meio de cultura e técnica de cultivo são importantes para o sucesso ou insucesso na obtenção das células.

Janssen *et al.*⁸⁹, em 2021, avaliam mecanismos de regulação de condrogênese em condroprogenitores. O nocaute do gene RUNX2 provocou a diminuição de deposição de colágeno I, e mais acentuadamente de colágeno II, em contraste com estudo prévio⁴⁸ (revisado anteriormente neste texto), que mostrou que o "knockdown" de RUNX2 aumenta o potencial condrogênico. Os autores inferem que é importante uma função mínima de RUNX2 para diferenciação condrogênica de condroprogenitores. Já a inativação de RAB5C, proteína envolvida em tráfego endossomal, aumenta o potencial condrogênico, avaliado pela expressão de marcadores como o trio SOX (SOX5, SOX6 e SOX9) e aumento da deposição de colágeno tipo II, sem mudança na deposição de colágeno tipo I, e não impede a proliferação e deposição de matriz extracelular em modelo animal com camundongos "nude". Este estudo é relevante ao demonstrar a interrelação de SOX e RUNX2 na resposta condrogênica e osteogênica, apesar de RUNX2 estimular osteogênese em detrimento de condrogênese, sua inativação completa não é desejada.

Vinod *et al.*⁹⁰, em 2021, obtiveram culturas de células obtidas de cartilagem articular de joelho com osteoartrite, isoladas após digestão enzimática e ensaio de adesão à fibronectina (supostos "condroprogenitores") ou isoladas por migração de explante. Células migratórias demonstram menor expressão de marcadores de hipertrofia (RUNX2 e COL1A1) e maiores níveis de marcadores condrogênicos (agrecano e razão COL2A1/COL1A1).

Vinod *et al.*⁹¹, em 2023, comparam células isoladas por explante da cartilagem de joelhos adultos com osteoartrite ou de cartilagem articular de joelhos de fetos humanos. As células derivadas de cartilagem fetal apresentam menor expressão de CD106 e maior de CD146 em comparação às células adultas. Além disso, as células fetais demonstraram níveis significativamente mais altos de expressão de glicosaminoglicanos e colágeno tipo 2.

Vinod *et al.*⁹², em 2023, comparam quatro métodos de isolamento de células migratórias de explante de cartilagem proveniente de joelhos com osteoartrite: 1) fragmentos grandes de 8 mm a 15 mm cultivados continuamente; 2) fragmentos de 8 mm a 10 mm, que após 48 horas de cultura são banhados por solução de colagenase 0,1% por duas horas, para "amolecimento" da matriz extracelular; 3) fragmentos pequenos de 1 mm cultivados continuamente; 4) fragmentos muito grandes, de 25 mm, que após 48 horas sofreram lesão por arranhadura com agulha, e após 7 dias foram suspensas. Os quatro métodos resultam em células com perfis de marcadores de superfície, expressão gênica condrogênica e hipertrofia similares. Mas o tempo de migração foi maior quando usados os fragmentos menores, de apenas 1 mm.

3.2 Comparação de células condrais migratórias obtidas por explante de cartilagem e células condrais obtidas por digestão enzimática da cartilagem articular

Abaixo são revisados os estudos que comparam diretamente células extraídas por digestão enzimática, tradicionalmente denominados condrócitos, com células migratórias extraídas de forma seletiva pela sua capacidade de migração de explante de tecido condral, denominadas na literatura recente de "condroprogenitores migratórios". No contexto de terapia celular para cartilagem, entender as diferenças e semelhanças é essencial para inferir prós e contras, ou até mesmo superioridade ou inferioridade, com relação ao seu uso clínico.

Koelling *et al.*⁴⁸, em 2009, comparam condroprogenitores migratórios com condrócitos em primeira passagem. Ambos foram obtidos de cartilagem articular de joelhos humanos com osteoartrite: condroprogenitores por explante de fragmentos adjacentes à área de maior defeito ósseo, e condrócitos por digestão enzimática de uma área sem lesão visível. Condrócitos apresentam alta expressão de colágeno 2, níveis intermediários de SOX9 e baixos níveis de colágeno I e RUNX2. Já condroprogenitores apresentam níveis intermediários SOX9 e colágeno tipo II e altos de colágeno I e de RUNX2. Na análise imunocitoquímica, condrócitos são positivos para SOX9 e agrecano, e negativos para RUNX2, enquanto condroprogenitores são positivos para SOX9, RUNX2 e colágeno I. Na análise de citometria intracelular, condrócitos são positivos para SOX9, CD29 (beta 1 integrina) e CD49e (alfa 2 integrina), enquanto

condroprogenitores são positivos para CD29, CD49c (alfa 3 integrina) e CD49e. Na citometria de superfície, condroprogenitores tiveram maior expressão que condrócitos de CD13, CD44 e CD73 e menor de CD29, CD90, e CD105. Enquanto condroprogenitores são capazes de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica, condrócitos em primeira passagem são incapazes. A suplementação do cultivo de TGF β 3 e BMP-6 provoca aumento no nível de RNAm para colágeno II e diminuição para colágeno I, RUNX2 e metaloproteinase 13, mas não causa alteração na SOX9. Já o "knockdown" de RUNX2 (por interferência por RNA) provoca diminuição na expressão de colágeno I e metaloproteinase 13, e aumento da expressão de SOX9, colágeno II e agrecano. Portanto, o bloqueio de expressão de RUNX2 aumenta o potencial condrogênico dos condroprogenitores. Alguns detalhes são especialmente relevantes neste trabalho. Os dois tipos de células são extraídos de joelhos com osteoartrite. Além disso, os condrócitos foram avaliados em primeira passagem, quando apresentam um fenótipo sabidamente mais diferenciado. Porém, este não é o contexto clínico mais relevante na terapia celular de lesões condrais, que é dependente de um número de células grande, e não disponível na primeira passagem. Portanto, a comparação de células em passagens mais tardias seria relevante.

Seol *et al.*⁹³, em 2012, descrevem modelo *ex vivo* de áreas lesadas por trauma contuso em cartilagem articular bovina e humana saudáveis. As áreas contundidas no tecido osteocondral apresentam repovoamento por células após 5 dias. Os autores inferem que a grande quantidade de células

não pode ser justificada somente por migração, mas também por alta proliferação celular. Os autores cultivam condroprogenitores que migram a partir do explante de cartilagem contundida e condrócitos a partir de digestão enzimática da cartilagem, havendo crescimento mais rápido de condroprogenitores. Condroprogenitores cultivados apresentam capacidade de diferenciação condrogênica e osteogênica, porém pouca de diferenciação adipogênica. Avaliou-se a expressão gênica por técnica de *microarray* de condroprogenitores recém suspensos de placa de cultura de explante (sem passagem para cultura secundária), e de condrócitos *in situ* na cartilagem articular. Condroprogenitores expressam mais marcadores de células-tronco (como membro 2 da subfamília G de transportadores de cassetes de ligação de ATP [ABCG2], RUNX2 e notch-1), expressam também mais moléculas relacionadas à inflamação e migração celular (IL-6, SDF-1, IL-8), ao catabolismo de matriz (metaloproteinase de matriz 1 e 13), à proliferação celular (ciclina B1 e D1) e SOX9 (regulador chave de fenótipo condral), e expressam, por outro lado, menos genes para componentes de matriz extracelular (colágeno tipo II, aggrecan, proteína oligomérica de cartilagem [COMP]). Condroprogenitores expressam altos níveis de lubricina (proteoglicano 4 - PRG4). Condroprogenitores, em comparação com condrócitos, apresentam maior atividade de migração, e maior resposta quimioatrativa com exposição a lisado celular e proteína nuclear B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1). O bloqueio de HMGB1 suprimiu resposta quimioatrativa de forma significativa na exposição a lisado celular. Os autores inferem que a morte de condrócitos após trauma é o principal fator

de ativação de condroprogenitores no tecido nativo, por mecanismo mediado por HMGB1. Por fim, os autores concluem que condroprogenitores participam da resposta ao reparo de danos à cartilagem, pelo povoamento de zonas contundidas por condroprogenitores, mas que sua alta expressão de citocinas inflamatórias e metaloproteinases pode levar a inflamação e degeneração de articulações lesionadas. Por outro lado, essas características podem se dever a uma fase inicial de resposta ao dano, e a expressão de lubricina pode estar relacionada à restauração de lubrificação na cartilagem danificada. Este estudo demonstra que a cartilagem sem osteoartrite, traumatizada, tem resposta de repovoamento celular com condroprogenitores migratórios, e fazem comparação com condrócitos obtidos por digestão enzimática.

Zhou *et al.*⁹⁴, em 2014, comparam a expressão gênica de condroprogenitores obtidos por explante de cartilagem articular bovina saudável, após trauma por arranhadura da superfície condral, com condrócitos e sinoviócitos. 24 mil genes são analisados por "microarray". Condroprogenitores expressam menos genes para proteínas matriz da cartilagem articular, e mais genes para citocinas inflamatórias. Em análise de PCR confirmatória, condroprogenitores expressavam menos genes para proteínas da matriz (colágeno II, aggrecan, proteína de ligação, COMP), e mais genes para interleucina 8, ligante 2 do receptor de quimiocina de motivo C-C (CCL2), porém, não há diferença da expressão de SOX9. Condroprogenitores depositaram menos glicosaminoglicanos sulfatados em cultura de botão celular. Os autores concluem que condroprogenitores são

fenotipicamente mais semelhantes com sinoviócitos que condrócitos. Os autores inferem que condroprogenitores não são mais apropriados que condrócitos para regeneração de matriz. Este é mais um estudo que demonstra a obtenção de condroprogenitores migratórios de cartilagem saudável, porém, a sua capacidade de condrogênese foi menor que a de condrócitos.

Zhou *et al.*⁹⁵, em 2016, avaliam atividade fagocítica de condroprogenitores obtidos por explante de cartilagem articular bovina saudável, após trauma por arranhadura da superfície condral, com condrócitos e macrófagos. Condroprogenitores e macrófagos, em comparação com condrócitos, apresentam maior internalização de debris de condrócitos marcados. Condroprogenitores, em comparação com condrócitos, expressaram mais marcadores relacionados com fagocitose. Baseado nesses achados, em conjunto com os do estudo prévio do grupo⁹⁴, os autores inferem que condroprogenitores podem cumprir função na resposta a lesão e reparo tecidual na cartilagem, iniciando a cascata inflamatória, clareando debris celulares e de matriz, e potencialmente iniciando processo de reparo na matriz. Isto seria de imensa importância, uma vez que a cartilagem é tecido sem acesso vascular para células do sistema imune responsáveis por iniciar o processo de resposta a dano na maioria dos tecidos. Este trabalho demonstra a capacidade de clareamento de debris por condroprogenitores, propriedade relevante no processo de reparo ou regeneração condral.

Wang *et al.*⁵⁵, em 2019, comparam condroprogenitores migratórios obtidos por explante e condrócitos obtidos por digestão enzimática de cartilagem articular humana sadia (após amputação traumática por acidente). Condroprogenitores, em comparação com condrócitos, apresentam diferenciação osteogênica e adipogênica mais intensas, uma maior resposta à HMGB (quimioatrativo após lesão condral). Na citometria de fluxo, condroprogenitores têm positividade para CD29 (72,44%), CD90 (90,67%), e CD105 (84,67%), consideravelmente maior que condrócitos (CD29, 66,15%; CD90, 4,86%; e CD105, 6,11%). Ambos são negativos para marcador endotelial ou hematopoiético CD31 (4,6% contra 6,04%) e CD45 (4,47% contra 5,51%). Em análise de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), foram demonstradas as expressões relativas de condrócitos com relação a condroprogenitores para os genes: ABCG2 (0,25 vezes), Notch-1 (0,13 vezes), RUNX2 (0,21 vezes), SOX9 (18,6 vezes), aggrecan (5,1 vezes), colágeno II (22,2 vezes), e PPAR- γ (0,13 vezes). Após tratamento com plasma rico em plaquetas (PRP), condroprogenitores têm, em comparação com condrócitos, maior capacidade de proliferação. Em modelo *in vivo* de lesão condral em coelhos, implantes de PRP com condroprogenitores, diferentemente dos condrócitos, apresentaram capacidade de condrogênese. Os autores concluem que condroprogenitores podem ser uma fonte de células para terapia de cartilagem superior a condrócitos. Este trabalho demonstra a viabilidade de extração de células migratórias da cartilagem articular de joelhos saudáveis, sem osteoartrite. Além disso, relata uma maior capacidade condrogênica *in vivo* de condroprogenitores migratórios de cartilagem sadia com relação a condrócitos, quando estimulados por PRP.

Carluccio *et al.*⁸⁸, em 2020, comparam condroprogenitores migratórios, obtidos de explante cartilagem de osteoartrite humana, com condrócitos, obtidos por digestão enzimática do mesmo material, e a influência de meio enriquecido por lisado de plaquetas em comparação com soro fetal bovino. As análises são realizadas em segunda passagem. Os autores não têm sucesso no cultivo de condroprogenitores com uso de soro fetal bovino, apenas com LP. Tanto condrócitos quanto condroprogenitores apresentam marcadores relacionados a células-tronco mesenquimais. Condroprogenitores apresentam menor expressão de CD166 que condrócitos tratados com LP, enquanto condrócitos não tratados são negativos para CD166. O uso de plaquetas diminui marcadores de senescência nos dois tipos celulares. Condroprogenitores e condrócitos suplementados com LP têm capacidade semelhante de formar colônias quando semeados em baixa densidade, mas condrócitos sem uso de LP não formam colônias nesse ensaio. A expressão de nestina (um marcador de indiferenciação) é maior em condroprogenitores. Com relação a marcadores condrogênicos, colágeno II é mais expressado por condrócitos suplementados com soro fetal, seguido de condroprogenitores e condrócitos suplementados com LP, enquanto para SOX9, a expressão também é maior em condrócitos suplementados com soro fetal, mas semelhante entre condroprogenitores e condrócitos suplementados com LP. Tanto condroprogenitores quanto condrócitos, independentemente da suplementação, são capazes de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica, confirmando que os dois tipos celulares são multipotentes.

Além de estudar o potencial de LP como suplementação em terapia celular para cartilagem, é interessante notar que os autores não obtiveram sucesso no cultivo de condroprogenitores com soro fetal bovino.

Wagner *et al.*⁹⁶, em 2021, investigam os efeitos migratórios da proteína nuclear B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1), molécula quimioatrativa e pró-inflamatória liberada por morte celular, em condrócitos e condroprogenitores migratórios obtidos de cartilagem de joelho humano com osteoartrite. A expressão de HMGB1 na cartilagem doente e nos condrócitos da cartilagem doente é maior do que em espécimes saudáveis. HMGB1, RAGE, e TLR4 são expressos por condroprogenitores e condrócitos. A estimulação com HMGB1 aumenta a migração de condroprogenitores. Os autores concluem que HMGB1 é produzido por condrócitos e é um atrativo para condroprogenitores, com possível relevância da fisiopatologia de lesões condrais e osteoartrite. Este estudo elucidou possíveis mecanismos de interação entre condroprogenitores e condrócitos no reparo tecidual da cartilagem.

4 MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em parceria com o Laboratório de Investigações Médicas 19 (LIM-19) do Instituto do Coração da FMUSP.

Foi obtida aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número: 46438821.2.0000.0068 (Anexo B), sendo obtido termo de consentimento esclarecido dos doadores de material biológico (Anexo C).

Trata-se de estudo experimental laboratorial, pré-clínico, de caracterização de linhagens de cultura celular obtidas de tecidos humanos.

4.1 Critérios de inclusão

Foram selecionados doadores voluntários para obtenção de amostra de cartilagem articular seguindo os seguintes critérios:

Critérios de Inclusão:

- Paciente do Grupo de Joelho do IOT-HCFMUSP, em programação para cirurgia por artroscopia do joelho para tratamento de lesão meniscal ou ligamentar, de acordo com a rotina normal do grupo.
- Idade entre 18 e 55 anos.

Critérios de exclusão:

- Doença inflamatória, infecciosa.
- Ausência de consentimento ou incapacidade de compreensão do termo de consentimento.
- Não realização da cirurgia programada por qualquer motivo.

4.2 Obtenção de material biológico

No momento da cirurgia para o tratamento habitual de sua doença, os pacientes foram submetidos a biópsia de cartilagem. Após inspeção artroscópica do joelho de rotina, foi realizada biópsia de cartilagem, fora de área de carga, na borda lateral do tróclea ou do intercôndilo (Figura 1). Foi utilizada goiva artroscópica específica, de forma a retirar um fragmento de 5 mm por 10 mm de cartilagem com espessura total, sem violação do osso subcondral (Figura 2).

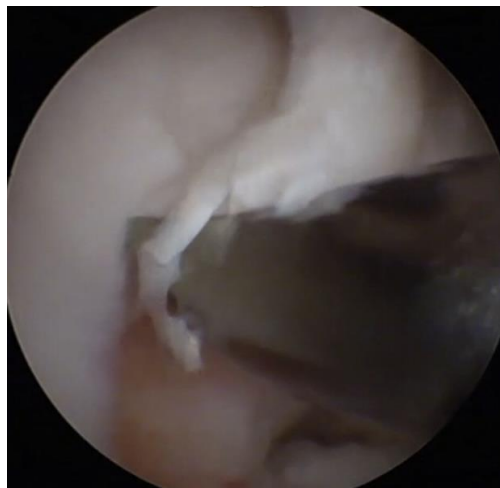


Figura 1 - Visualização por artroscopia de biópsia da cartilagem articular do joelho, sendo elevada por uma goiva artroscópica



Figura 2 - Amostra de cartilagem retirada por biópsia artroscópica

O fragmento foi imediatamente transferido para tubo plástico com fundo cônico de 15 mL, contendo 10 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) e encaminhado para o Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular (LIM-19), onde foi processado imediatamente.

4.3 Obtenção das células por método enzimático (tripsina/colagenase) (grupo colagenase)

As amostras foram lavadas três vezes em solução tampão fosfato-salino (*Phosphate-Buffered Saline* - PBS) contendo antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL). Foi realizada a dissociação mecânica das amostras em placas de cultura, com auxílio de lâmina de bisturi, até a obtenção de pequenos fragmentos homogêneos. Os fragmentos foram transferidos para tubo plástico com fundo cônico de 15 mL contendo 5 mL de tripsina 0,25% e mantido em estufa a 37 °C, sob agitação, por 30 minutos. Após esse período, a amostra foi centrifugada por 8 min à 300 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado ao material centrifugado 5 mL de solução de colagenase 0,3% (p/v), sendo incubada em estufa a 37 °C sob agitação por 2 horas. A amostra foi centrifugada por 5 minutos a 300 x g em temperatura ambiente e lavada 3 vezes com PBS.

As células foram transferidas para placas de cultivo de 8,5 cm² de área de crescimento (Corning®) e preenchidas com 5 mL de meio de cultivo completo (DMEM low glucose, suplementado com penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e 10% de soro fetal bovino [SFB]). As células

foram mantidas em incubadora a 37° C, em atmosfera úmida e com 5% de CO₂. Após 48 horas de cultivo, ocorreu a primeira substituição do meio de cultura, seguida por trocas de 70% do volume total do meio a cada três dias. Quando as células alcançaram 80% de confluência, foi executado o procedimento enzimático padrão com tripsina-versene-EDTA (ATV) para expandir as células, que foram então criopreservadas até serem utilizadas nos experimentos.

4.4 Obtenção de condroprogenitores migratórios por explante (grupo explante)

As amostras foram lavadas em PBS por três vezes e, em seguida, dissociadas mecanicamente em uma placa de cultivo de 56,5 cm² (Corning®) com o auxílio de uma lâmina de bisturi, gerando fragmentos homogêneos e pequenos. Os pedaços de tecido foram incubados em uma estufa a 37 °C, em atmosfera úmida e com 5% de CO₂, por 15 minutos sem a presença de líquidos. Depois desse tempo, 15 mL de meio de cultura completo foram adicionados, e as células foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmidas e com 5% de CO₂ por 72 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído e os fragmentos soltos de cartilagem foram removidos. Quando a confluência das células atingiu 80%, o procedimento enzimático padrão com ATV foi realizado para a expansão das células, que foram criopreservadas até serem usadas nos experimentos.

4.5 Congelamento e descongelamento das células

Após a realização do procedimento enzimático padrão com ATV, as células soltas da garrafa de cultivo celular foram transferidas para um tubo plástico de fundo cônico de 15 mL, e adicionado meio de cultura completo. O tubo foi centrifugado a 300 x g por 7 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram criopreservadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), na proporção de 1×10^6 células por mL de meio de congelamento. As células foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C ou nitrogênio líquido.

O descongelamento das células foi realizado rapidamente em banho-maria a 37°C . As células foram cultivadas em meio DMEM completo e transferidas para uma garrafa de cultivo celular de 75 cm^2 , mantida em incubadora a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO_2 .

Todos os experimentos foram realizados com células na passagem 4 (p4). A contagem de passagem ocorreu sempre que o procedimento enzimático padrão com ATV foi realizado, quando as células atingiram 80% de confluência.

4.6 Imunofenotipagem

A caracterização das células foi determinada pela análise de proteínas de membrana utilizando citometria de fluxo. Os antígenos foram identificados por meio de diferentes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês fluorescein isothiocyanate) e ficoeritina (PE, do inglês *phycoeritin*). Controles de marcação inespecífica foram usados para calibrar o equipamento, analisar os resultados e definir a positividade da amostra.

Após a dissociação celular por ATV, as células foram quantificadas e distribuídas em alíquotas de 5×10^5 células em tubos específicos para citometria (Becton Dickinson®, EUA). Em cada tubo, foi adicionado 1 mL de PBS para remover o meio de cultivo, seguido de centrifugação por 7 minutos a 300 G em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais CD29 (CD2004-RPE), CD90 (MHCD9001-FITC), CD105 (MHCD10504-RPE), CD34 (CD34-581-FITC), CD117 (CD11704-RPE), CD45 (MHCD4504R-PE), CD14 (MHCD1404-RPE) e CD80 (MHCD8001-FITC), HLA-DR (11-9956-42) da Invitrogen, EUA, na diluição 1:100, por 60 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz.

Posteriormente, 1 mL de PBS foi adicionado e as células foram centrifugadas a $300 \times g$ por 7 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi homogeneizado e ressuspenso em 500 μ L de solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich®, EUA) 1% em PBS.

As células, adequadamente marcadas, foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson®, EUA). A intensidade da fluorescência capturada pelo citômetro foi avaliada no software FlowJo V.10 (Becton Dickinson®, EUA). Em cada amostra, foram adquiridos 10.000 eventos. Os resultados foram apresentados e analisados como histogramas e como porcentagem da população celular que exibiu resposta positiva para cada anticorpo.

4.7 Plasticidade das células provenientes de cartilagem articular

4.7.1 Diferenciação osteogênica

As células foram semeadas em uma concentração de $0,5 \times 10^3$ células por poço em placas de 96 poços e cultivadas em meio completo, em incubadora a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂ até alcançarem 70-80% de confluência. Quando a confluência desejada foi atingida, o meio completo foi substituído pelo meio indutor de diferenciação osteogênica (Stem Cell Technologies®). Os controles de indiferenciação foram mantidos apenas com meio completo. A placa foi incubada a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ por 21 dias, trocando o meio de cultivo três vezes por semana.

Após 21 dias, o meio de diferenciação osteogênica foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 2 horas. Realizaram-se duas lavagens adicionais com PBS e as células foram coradas com 100 µL de solução de Alizarina Red (Sigma-Aldrich®, EUA) por 3 minutos, a fim de visualizar a

produção de íons cálcio pelas células tratadas e confirmar a diferenciação óssea. As células foram lavadas três vezes com PBS e as imagens foram capturadas utilizando um microscópio invertido com contraste de fase (Zeiss®). A solução de Alizarina Red foi preparada dissolvendo 2 g do corante em 100 mL de água MiliQ® e ajustando o pH para 4,2 com hidróxido de amônio.

4.7.2 Diferenciação adipogênica

As células foram semeadas em uma concentração de $0,5 \times 10^3$ células por poço em placas de 96 poços e cultivadas em meio completo, em incubadora a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂ até alcançarem 70-80% de confluência. Ao atingir a confluência desejada, o meio completo foi substituído pelo meio indutor de diferenciação adipogênica (Stem Cell Technologies®). Os controles de diferenciação foram mantidos em meio completo e a placa foi incubada a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ por 14 dias, trocando o meio de cultivo três vezes por semana. A diferenciação adipogênica foi confirmada pelo acúmulo de vacúolos lipídicos citoplasmáticos neutros por meio da coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich®, EUA).

Após o período de diferenciação, o meio indutor foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida, as células foram coradas com 100 µL de solução de Oil Red O por 15 minutos à temperatura ambiente. Depois da incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS para remover o excesso de

corante e as placas de cultura foram visualizadas em microscópio invertido com contraste de fase. A solução estoque do corante foi preparada com 0,5 g de Oil Red O dissolvido em 100 mL de isopropanol, seguida de filtração. Para as colorações, a solução de trabalho foi preparada misturando 20 mL da solução estoque com 30 mL de água MiliQ®, seguida de filtração.

4.7.3 Diferenciação condrogênica

As células foram semeadas na concentração de $1,0 \times 10^5$ células em microtubos de polipropileno de 2,0 mL e centrifugadas a $200 \times g$ por 10 minutos à temperatura ambiente. O meio de cultura foi trocado com cuidado para não desfazer o botão celular. Utilizou-se meio indutor de diferenciação condrogênica (*Stem Cell Technologies*) ou meio completo para as células destinadas ao controle de indiferenciação. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana, e os microtubos foram mantidos em incubadora a 37°C , atmosfera úmida e 5% de CO_2 por 21 dias.

A diferenciação condrogênica foi confirmada pela coloração de Safranina O (Sigma-Aldrich®). Após a diferenciação, o meio indutor foi descartado, as células lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida, as células foram coradas com solução de Safranina O 0,1% por 3 minutos à temperatura ambiente. Depois da incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS para remover o excesso de corante e visualizadas em um microscópio invertido com contraste de fase. A solução de Safranina foi preparada dissolvendo 0,05 g do corante em 50 mL de água MiliQ®.

4.8 Detecção das proteínas, colágeno I, colágeno II, Nanog, PPAR γ , RUNX2, SOX2, SOX9 por imunofluorescência indireta quantitativa *high-content screening*

As células foram semeadas em microplacas pretas de 96 poços de fundo chato (Corning®), na concentração de $1,5 \times 10^3$ células por poço, e cultivadas em meio completo a 37 °C, atmosfera úmida e 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma Aldrich) por 2 horas a 4 °C. As placas foram lavadas com *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) e as células permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1% a 4 °C por 15 minutos, seguido do bloqueio com BSA 5% por 40 minutos à temperatura ambiente.

Depois do bloqueio, as células foram incubadas por 16 horas com anticorpos para Colágeno I, Colágeno II, Nanog, PPAR γ , RUNX2, SOX9, SOX2. Detalhes sobre cada anticorpo utilizado estão disponíveis no Anexo D.

Após incubação com os anticorpos anti-Colágeno I, Colágeno II, PPAR γ , SOX2, as células foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-rabbit AlexaFluor® 488 (diluição 1:500; A-11008- Molecular Probes) e com Hoechst 33342 (0,1 mg/mL).

As células incubadas com anticorpos anti-RUNX2 e Sox9 foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-mouse R-phycoerythrin (diluição 1:500; P852- *Molecular Probes*®) e com Hoechst 33342. Os anticorpos Nanog já são marcados com AlexaFluor® 488 e foram incubados apenas com Hoechst 33342 por 2 horas. Após a incubação, as células foram

lavadas duas vezes com DPBS e as imagens capturadas utilizando o equipamento *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices®, CA, USA). Foram adquiridas imagens de cinco sítios por poço e dois poços marcados com o mesmo anticorpo. A intensidade de fluorescência das células e a porcentagem de células positivas foram determinadas usando o *Software Cell Scoring MetaXpress*®.

4.9 Análise de expressão gênica dos marcadores de diferenciação celular

4.9.1 Extração do RNA total

Após o crescimento celular e dissociação enzimática, as células foram contadas e alocadas em microtubos de 1,5 mL com 1×10^6 células por microtubo. Os microtubos foram centrifugados a $200 \times g$ por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado e 1 mL de Trizol (Invitrogen®) foi adicionado a cada microtubo, com as amostras armazenadas em freezer a -20°C por no mínimo 24 horas. Após o descongelamento à temperatura ambiente, 200 μL de clorofórmio (Sigma®) foram adicionados às amostras, seguido de agitação vigorosa e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. Depois, as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Na etapa subsequente à extração, o RNA foi precipitado utilizando 500 μL de álcool isopropílico (Sigma®) gelado para cada microtubo. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a $12.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol

75%, diluído em água livre de RNase, foi adicionado ao RNA precipitado. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e cada amostra recebeu 20 µL de água livre de RNase.

4.9.2 Tratamento com DNase

O kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega®) foi utilizado. Resumidamente, as amostras de RNA foram diluídas em água livre de RNase, garantindo 1 mg de RNA no volume final de 8 mL. O material foi incubado com a enzima RQ1 DNase 1U/µL e com RQ1 DNase Reaction Buffer 1X a 37 °C por 30 minutos para digestão do DNA genômico. Após a incubação, o tampão RQ1 DNase Stop foi adicionado para inativar a enzima, seguido de incubação a 65°C por 10 minutos.

4.9.3 Síntese do cDNA

Com o RNA tratado com DNase, a transcrição reversa foi realizada para síntese do cDNA usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, EUA), incluindo os seguintes componentes: dNTPs (4 mM de cada), primers (20 pmol), enzima transcriptase reversa (1,0 µL) e 1 X buffer (2,0 µL). As condições ideais para as reações foram 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos, usando o termociclador XP cycler (Bioer technology®, China).

4.9.4 Avaliação dos genes envolvidos na diferenciação celular

A análise da expressão gênica dos genes relacionados à diferenciação celular foi realizada por PCR em tempo real. A expressão de RNAm foi normalizada com base na expressão do gene endógeno GAPDH (Thermo Fisher®, EUA – 402869). Os ensaios foram feitos em duplicata, e a variação nos valores de *Cycle of Threshold* (CT) entre as duplicatas não excedeu 0,5. Cada ensaio incluiu uma amostra de referência e um controle negativo de amplificação, sem adição de amostra. O termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies®, EUA) foi usado com as seguintes condições: 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s. Os primers foram obtidos da DNA Integrated Technologies, utilizando-se ensaios pré-desenhados para sondas hidrolisáveis, conforme Quadro 1, e o Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®) foi empregado.

Quadro 1 - Primers utilizados para análise de diferenciação celular

Genes	SEQ REF	Assay ID (IDT Technologies®)
RUNX2	NM_001024630(3)	Hs.PT.56a.19568141
ALPL	NM_001127501(3)	Hs.PT.56a.40555206
Osteocalcina	NM_199173(1)	Hs.PT.56a.39318706.g
Osteopontina	NM_001251829	Hs.PT.58.192522426
CEBP α	NM_004364(1)	Hs.PT.58.4022335.g
PPAR γ	NM_005037(4)	Hs.PT.58.25464465
Sindecan 1	NM_002997	Hs.PT.58.1366577
Perlecan	NM_005529	Hs.PT.58.18698732

4.10 Análise de dados

As estatísticas foram analisadas com base nos dados obtidos em ensaios conduzidos com células isoladas por digestão enzimática ou explante. O teste t do software GraphPad Prism 8[®] foi utilizado para análise dos dados. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos distintos, realizados em duplicata. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Foram obtidas amostras finais de cartilagem de 8 voluntários, sendo cinco homens e três mulheres, com idades entre 19 e 54 anos que foram submetidos a procedimento cirúrgico no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As amostras foram processadas utilizando método enzimático (quatro amostras - grupo colagenase) ou explante de cartilagem (quatro amostras - grupo explante). Para o grupo explante, a migração progressiva de células entre o fragmento de tecido e o plástico da placa de cultura foi observada (Figura 3). Uma das amostras do grupo explante não resultou em células migratórias viáveis após 90 dias, sendo excluída das análises e substituída por coleta de amostra adicional. Não houve diferença da média de idade entre os doadores dos grupos analisados ($35,0 \pm 12,0$ e $32,0 \pm 12,0$ $p = 0,75$).

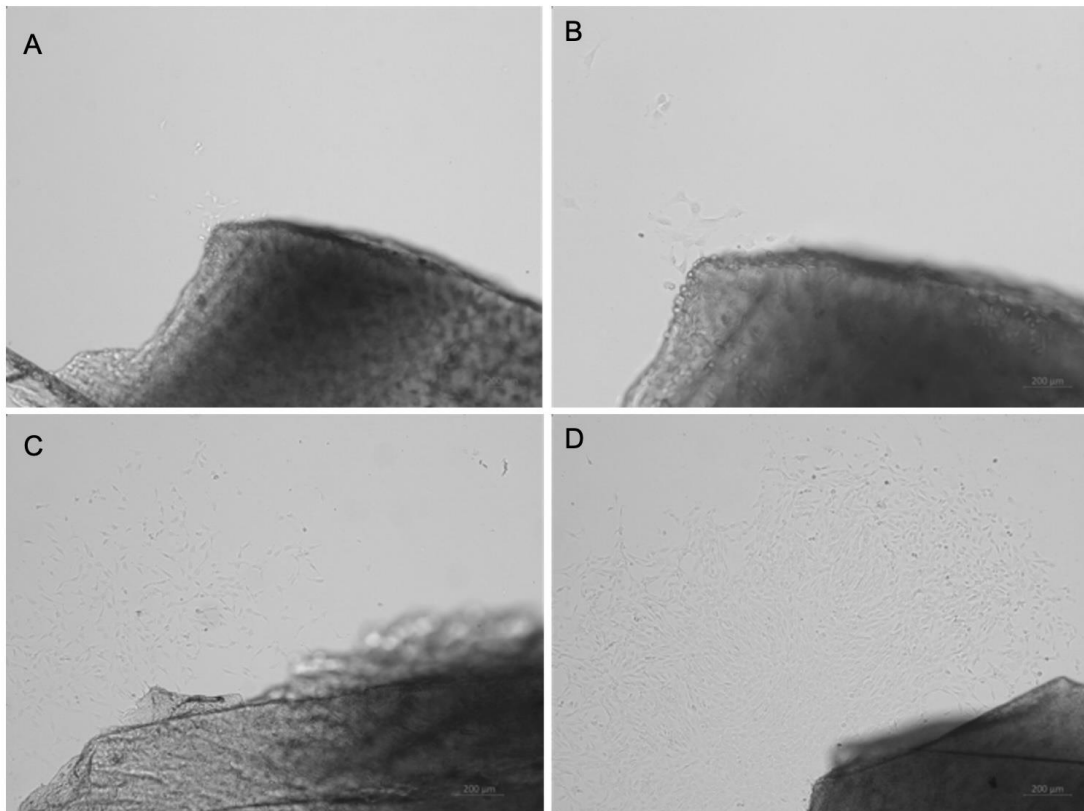


Figura 3 - Fotomicrografia de células migratórias a partir de explante de cartilagem. A) 4 dias de cultura; B) 9 dias de cultura; C) 12 dias de cultura e D) 15 dias de cultura. Células aderidas ao fundo das garrafas de cultivo celular em forma de fibroblasto. Imagens obtidas com microscópio invertido Zeiss Axio A.1 com objetiva de 10 X. Escala igual a 200 µm

A morfologia das células em cultura foi semelhante entre os grupos, com formato alongado, fusiforme e apresentando formato de fibroblasto (Figura 4). O crescimento observado foi semelhante entre os grupos, com tempo de dobramento de 2,55 dias para grupo explante e 2,98 dias para grupo colagenase.

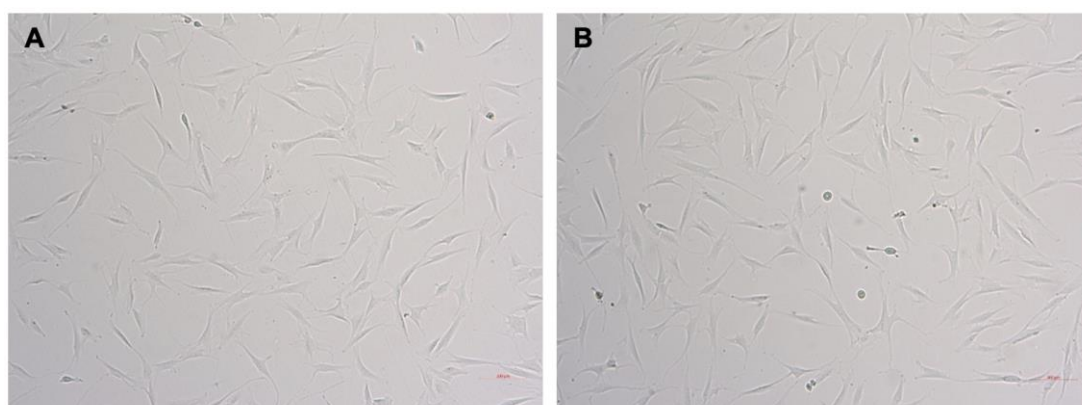


Figura 4 - Fotomicrografia de culturas celulares. A) grupo explante e B) grupo colagenase. Imagens obtidas com microscópio invertido Zeiss Axio A.1 com objetiva de 10 X. Escala igual a 200 μ m

5.1 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Foi realizada imunofenotipagem por meio de citometria de fluxo para marcadores mesenquimais e não mesenquimais, na passagem P4, para células dos dois grupos. Ambos os grupos expressaram, com positividade > 95%, CD29, CD90 e CD105, ao passo que não expressaram os marcadores de células hematopoiéticas e endoteliais CD14, CD34, CD45, CD80, CD117 e HLA-DR. Os resultados são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Resultados de citometria de fluxo para marcadores de células-tronco mesenquimais

	CD29	CD90	CD105
Explante	96,6 \pm 0,22	100,0 \pm 0,16	97,4 \pm 0,36
Colagenase	95,4 \pm 0,53	98,7 \pm 0,22	97,8 \pm 0,48

Resultados em porcentagem de células positivas \pm desvio padrão.

Tabela 2 - Resultados de citometria de fluxo para marcadores de células hematopoiéticas e endoteliais

	CD14	CD34	CD45	CD80	CD117	HLA-DR
Explante	0,6 ± 0,06	0,9 ± 0,10	3,8 ± 0,07	3,4 ± 0,01	1,2 ± 0,01	1,8 ± 0,05
Colagenase	1,2 ± 0,04	1,3 ± 0,01	2,1 ± 0,02	2,9 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,5 ± 0,02

Resultados em porcentagem de células positivas ± desvio padrão.

5.2 Plasticidade das células provenientes de cartilagem articular

Para caracterização da plasticidade das células, todas as amostras foram submetidas a diferenciação multipotente em três tipos celulares: adipócitos, osteoblastos e condroblastos, com a utilização dos meios de diferenciação comerciais padronizados.

Tanto células do grupo colagenase quanto explante tiveram capacidade de diferenciação nas três linhagens mesenquimais, caracterizando-as como células multipotentes. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela observação de vacúolos lipídicos com a coloração Oil Red (Figura 5 A e B). A osteogênica foi confirmada pela deposição de cálcio fixado com a coloração Vermelho de Alizarina (Figura 5 C e D). Por fim, a condrogênica foi confirmada pela formação do agregado celular condrogênico, observada com a coloração de Safranina O (Figura 5 E e F).

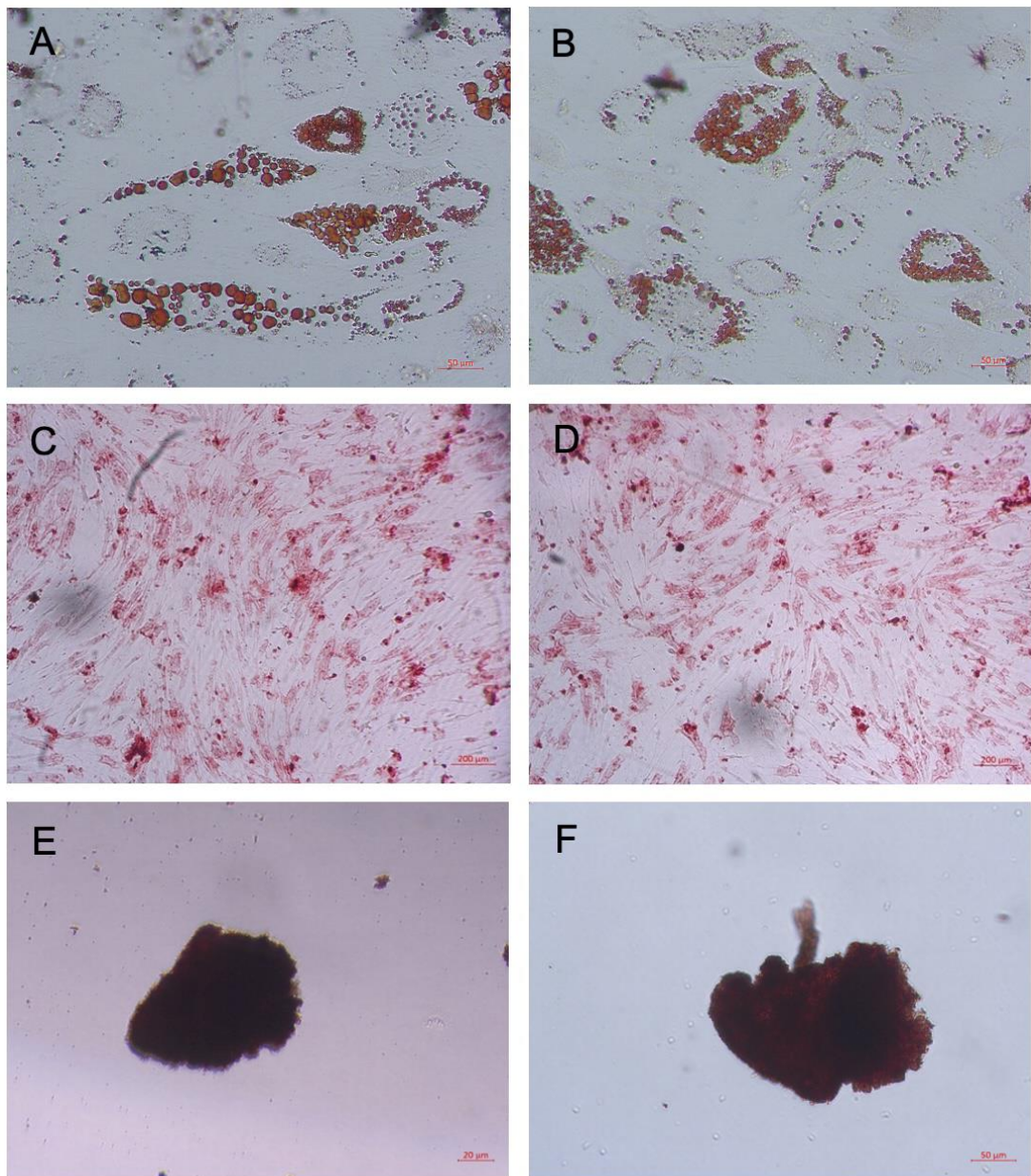


Figura 5 - Imagens representativas da diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos. A e B: diferenciação adipogênica (Oil Red O); C e D: diferenciação osteogênica (Alizarina Red); E e F: diferenciação condrogênica (Safranina O). Grupo explante: A, C, E; grupo colagenase: B, D, F. Imagens obtidas com microscópio invertido Zeiss Axio A.1. Escala igual a 200 μm em A,B, E e F e barra de calibração = 50 μm em C e D

5.3 Imunofluorescência indireta quantitativa *high-content screening*

5.3.1 Análise das proteínas de indiferenciação NANOG e SOX2

Foram analisados os marcadores de indiferenciação Nanog e SOX2 por meio de imunofluorescência indireta nas células obtidas pela técnica de explante ou colagenase. Não houve diferença na expressão entre os grupos: o fator transcricional Nanog foi positivo para $57,53\% \pm 3,75\%$ das células obtidas por explante e $52,78\% \pm 6,02\%$ das células obtidas por colagenase ($p = 0,519$; Gráfico 1). Já SOX2 foi positivo para $8,38\% \pm 3,01\%$ das células obtidas por explante e $8,08\% \pm 2,98\%$ das células obtidas por colagenase ($p > 0,999$, Gráfico 2).

Gráfico 1 - Análise do fator de transcrição de indiferenciação Nanog. Os dados são representados pela porcentagem de células positivas e desvio padrão para análise do grupo explante e do grupo colagenase. Foi utilizado o software Cell Scoring MetaXpress Software para análise de positividade. Foi realizado o Teste t no software GraphPad Prism 8. $p = 0,5191$

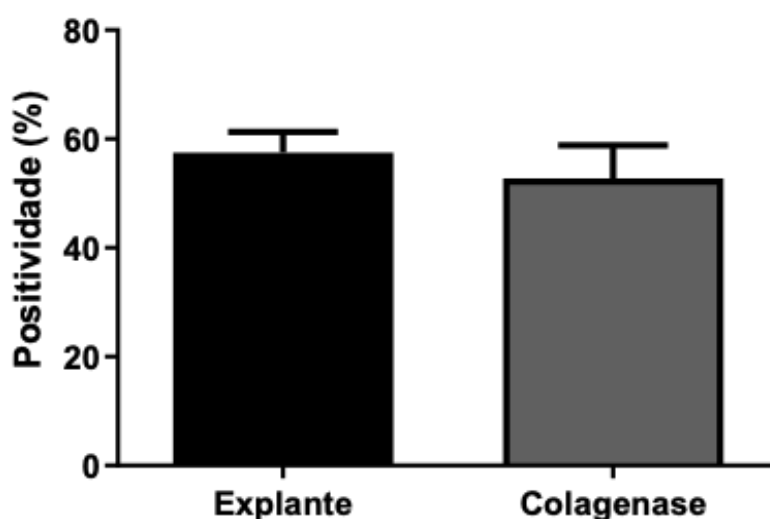
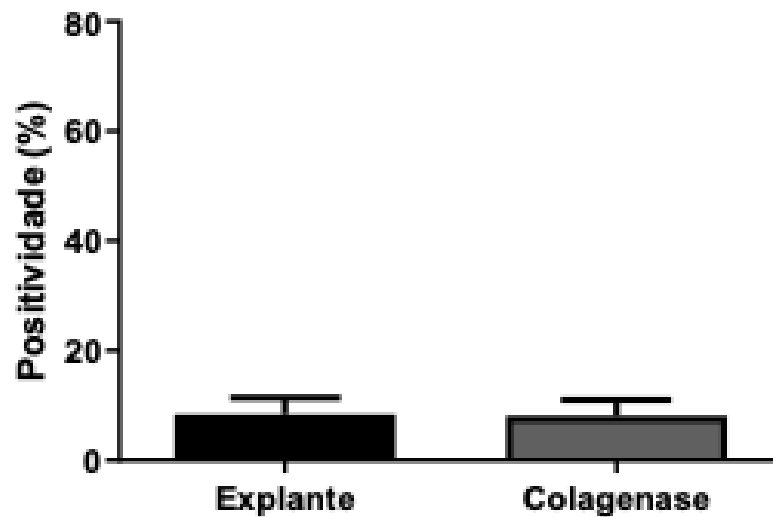


Gráfico 2 - Análise do fator de transcrição de indiferenciação SOX2. Os dados são representados pela porcentagem de células positivas e desvio padrão para análise do grupo explante e do grupo colagenase. Foi utilizado o software Cell Scoring MetaXpress Software para análise de positividade. Foi realizado o Teste t no software GraphPad Prism 8. $p > 0,999$

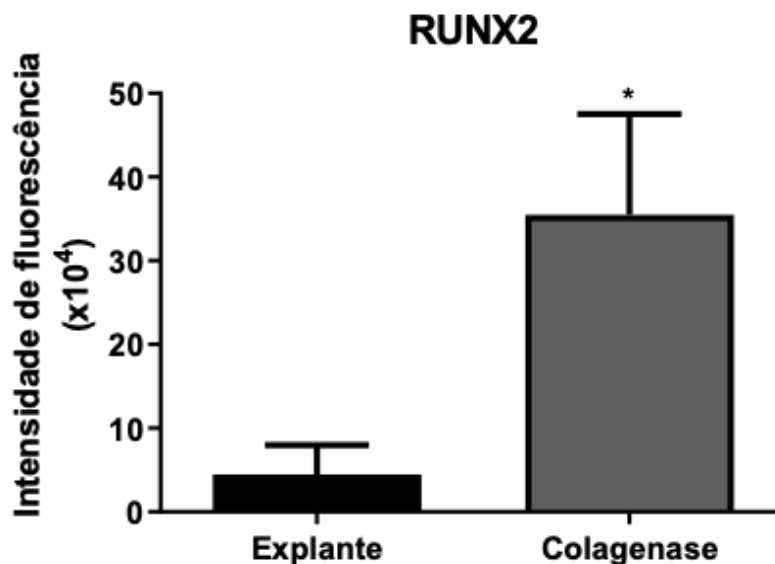


5.3.2 Análise das proteínas RUNX2, SOX9 e PPAR γ

As proteínas RUNX2, SOX9 e PPAR γ são os fatores chaves para as diferenciações osteogênica, condrogênica e adipogênica, respectivamente.

O fator transcricional RUNX2 foi expresso em todas as células analisadas independente da origem de obtenção. Foi observada maior intensidade de fluorescência e conseqüentemente uma maior quantidade de proteína RUNX2 quando as células foram obtidas pelo uso da colagenase ($4,47 \pm 3,51 \times 10^4$ contra $35,49 \pm 12,02 \times 10^4$; $p = 0,038$, Gráfico 3 e Figura 6).

Gráfico 3 - Análise do fator de transcrição Runx2. Os dados são representados pela intensidade de fluorescência das células que foi determinada utilizando o software Cell Scoring MetaXpress Software. Foi realizado o Teste t. As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 8. $p = 0,038$



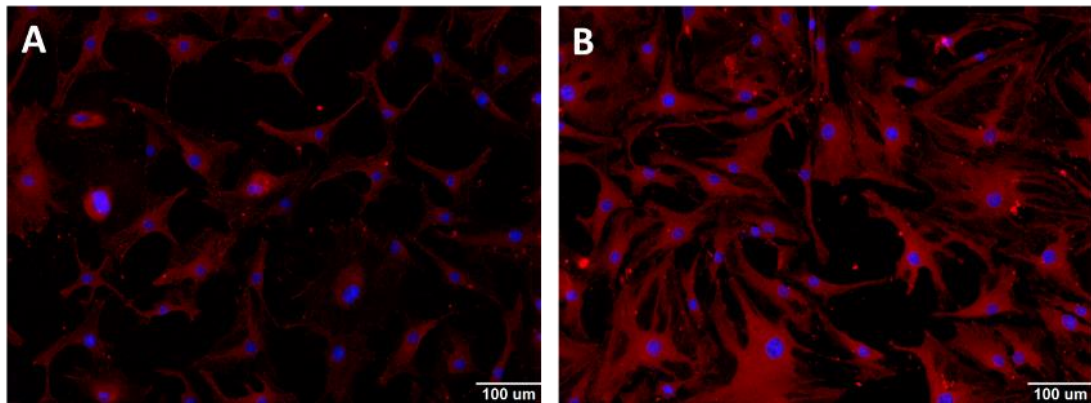


Figura 6 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da proteína Runx2. Os núcleos das células estão corados com Hoechst na cor azul, e a expressão da proteína Runx2 está em volta do núcleo na cor vermelha. A: grupo explante; B: grupo colagenase. Barra de calibração = 100 µm

Já o fator de transcrição SOX9, chave para a diferenciação condrogênica e produção de matriz condral, não teve expressão diferente nos grupos colagenase e explante ($407,9 \pm 67,22 \times 10^4$ contra $327,9 \pm 79,76 \times 10^4$, $p = 0,844$, Gráfico 4). A Figura 7 demonstra marcação representativa da imunofluorescência.

Gráfico 4 - Análise do fator de transcrição SOX9. Os dados são representados pela intensidade de fluorescência das células que foram determinadas utilizando o software Cell Scoring MetaXpress Software. Foi realizado o Teste t. As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 8. $p = 0,844$

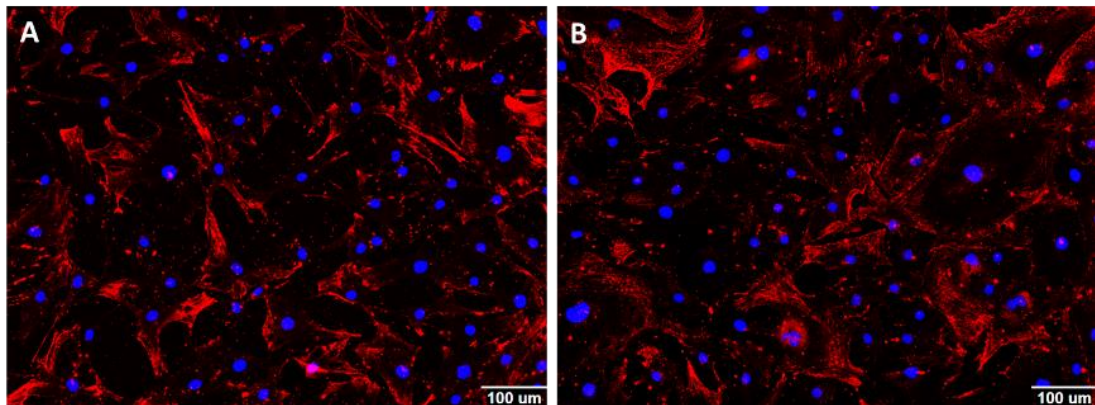
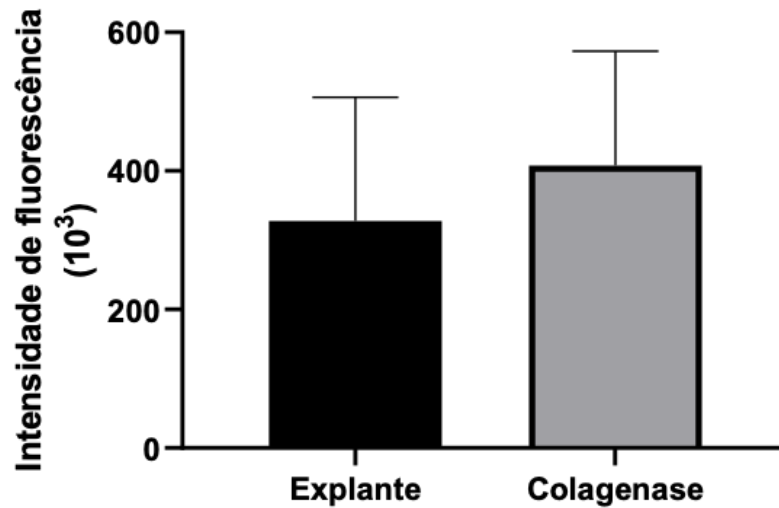


Figura 7 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da proteína SOX9. Os núcleos das células estão corados com Hoechst na cor azul, e a expressão da proteína SOX9 está em volta do núcleo na cor vermelha. A: grupo explante; B: grupo colagenase. Barra de calibração = 100 μm

Por fim, o receptor hormonal PPAR γ , essencial na diferenciação adipogênica e inibição da osteogênese, teve marcação citoplasmática semelhante entre os grupos, enquanto a porcentagem de marcação nuclear foi maior no grupo explante ($40,34\% \pm 8,23\%$ contra $6,12\% \pm 1,75\%$, $p = 0,0159$; Figura 8 e Gráficos 5).

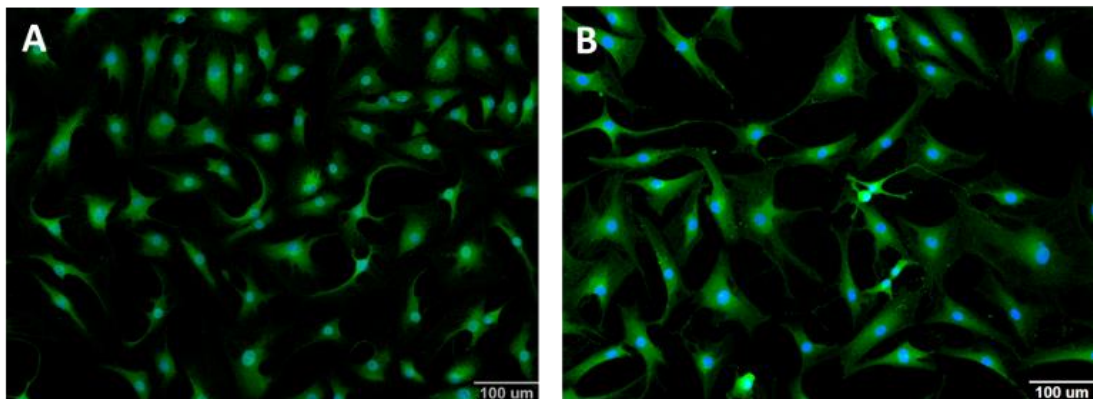
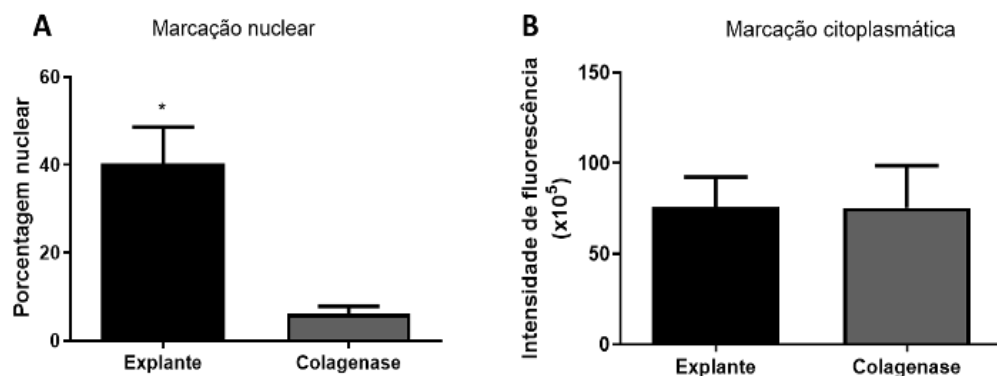


Figura 8 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta do receptor PPAR γ . Os núcleos das células estão corados com Hoechst na cor azul, e a expressão da proteína PPAR γ está em volta do núcleo na cor verde. A: grupo explante; B: grupo colagenase. Barra de calibração = 100 μ m

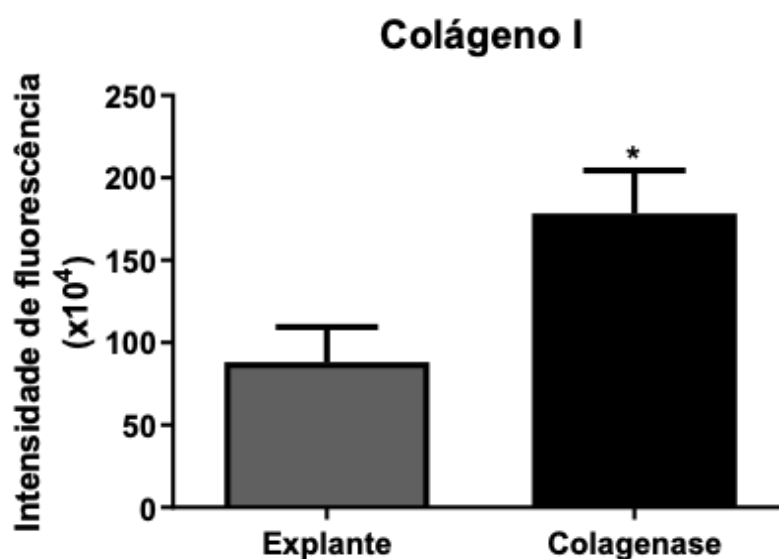
Gráfico 5 - Análise do fator do receptor PPAR γ . Os dados são representados pela porcentagem de marcação nuclear e pela intensidade de fluorescência citoplasmática das células. A porcentagem de células positivas foi determinada utilizando o software Cell Scoring MetaXpress Software. Foi realizado o Teste t. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8. $p = 0,0159$



5.3.3 Colágeno I e colágeno II

A marcação para colágeno I foi maior no grupo colagenase que no grupo explante ($178,5 \pm 21,06 \times 10^4$ contra $88,32 \pm 25,88 \times 10^4$, $p = 0,03$, Gráfico 6). A avaliação qualitativa das imagens demonstra, para o grupo explante, ramificações citoplasmáticas que se expandem no substrato de cultivo e expressão homogênea da síntese de colágeno I. Em contraste, no grupo colagenase, a perda dos prolongamentos citoplasmáticos é evidente na maioria das células, somadas à síntese exacerbada e heterogênea de colágeno I, na região perinuclear e do complexo golgiense (Figura 9).

Gráfico 6 - Análise do fator do colágeno tipo I. Os dados são representados pela intensidade de fluorescência das células. A intensidade de fluorescência foi determinada utilizando o software Cell Scoring MetaXpress Software. Foi realizado o Teste t. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8. $p = 0,003$



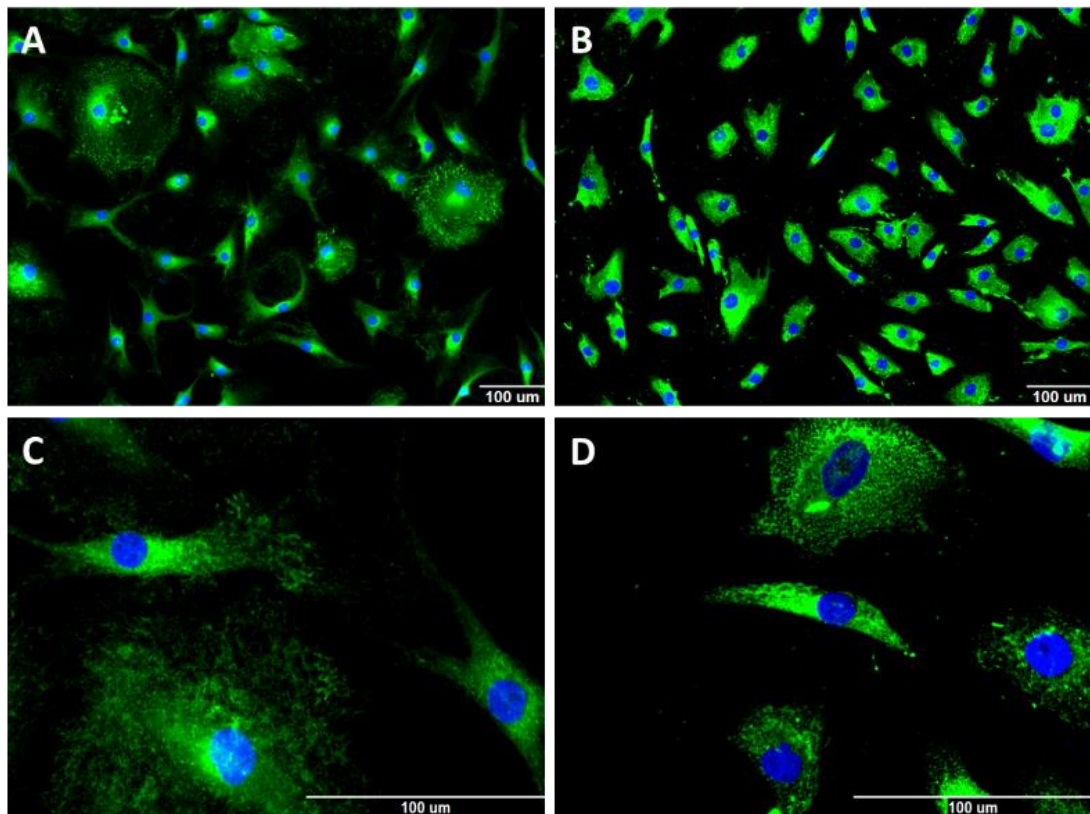


Figura 9 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta do colágeno tipo I. Os núcleos das células estão corados com Hoechst na cor azul, e a expressão de colágeno está em volta do núcleo na cor verde. A e C: grupo explante; B e D: grupo colagenase. Barra de calibração = 100 μ m

Da mesma forma, a marcação para colágeno II também foi maior no grupo colagenase que no grupo explante ($351,0 \pm 81,35 \times 10^4$ contra $66,0 \pm 14,01 \times 10^4$, $p = 0,004$, Gráfico 7). A avaliação qualitativa por imagem mostra, para o grupo explante, uma discreta síntese da proteína, com padrão homogêneo em todo o citoplasma das células cultivadas. Em contraste, no grupo colagenase, houve maior síntese de colágeno II, identificada na região perinuclear e do complexo golgiense e a presença de vesículas, evidenciadas pela imunomarcacão intensa (Figura 10).

Gráfico 7 - Análise do fator colágeno tipo II. Os dados são representados pela intensidade de fluorescência das células. A intensidade de fluorescência das células foi determinada utilizando o software Cell Scoring MetaXpress Software. Foi realizado o Teste t. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8. $p = 0,004$

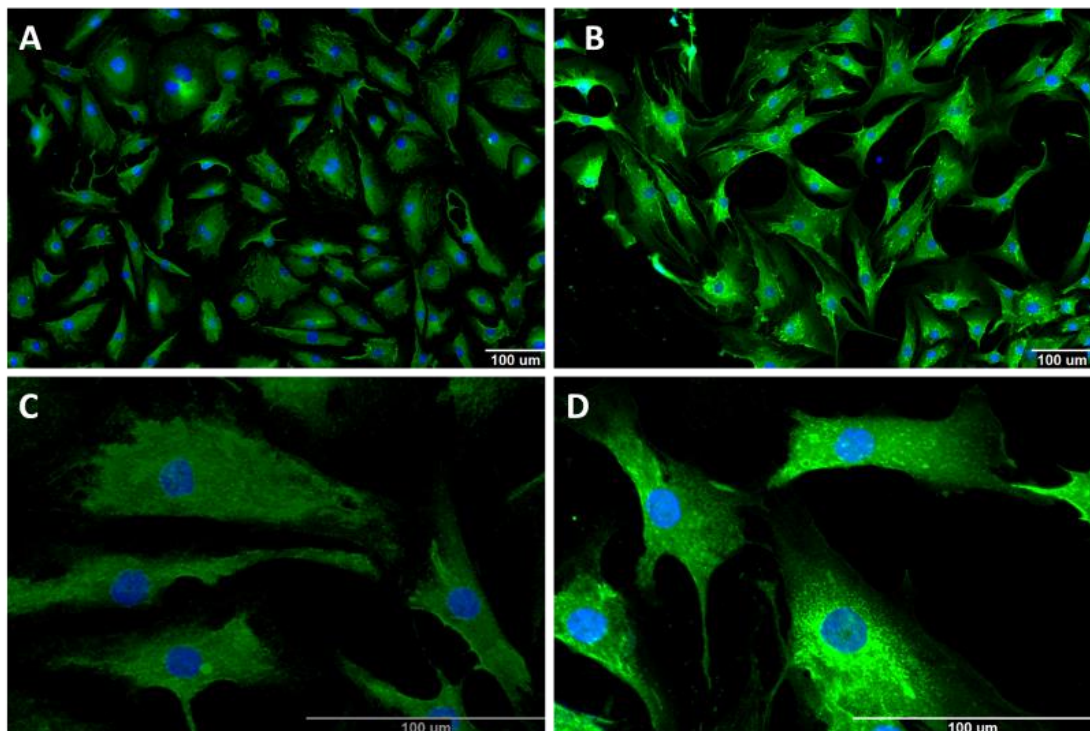
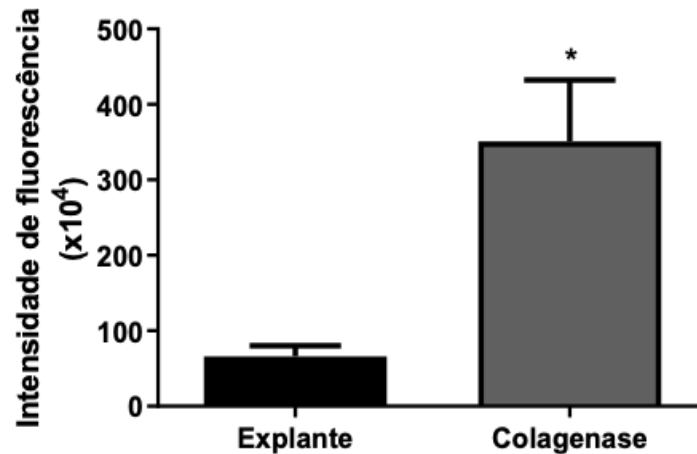
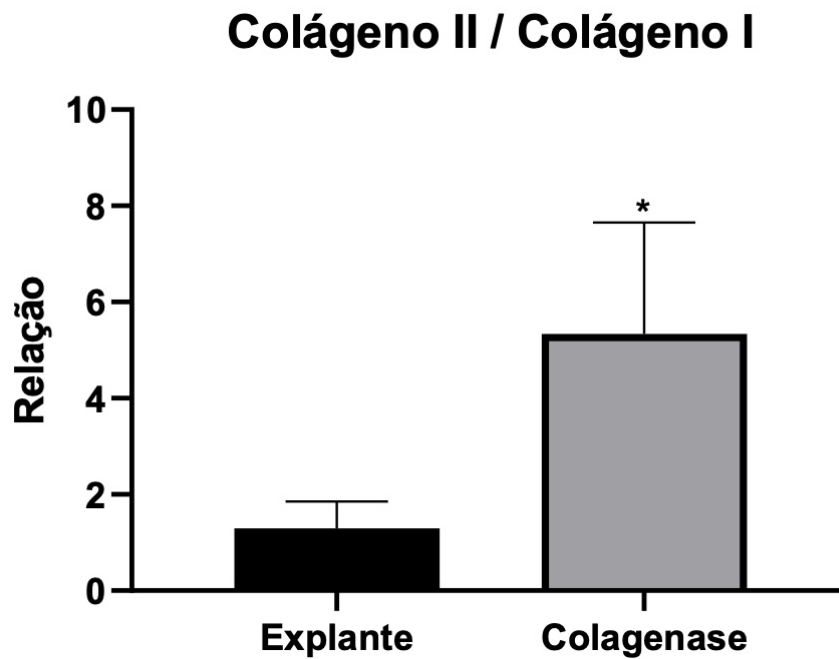


Figura 10 - Fotomicrografia da imunofluorescência indireta do colágeno tipo II. Os núcleos das células estão corados com Hoechst na cor azul, e a expressão de colágeno está em volta do núcleo na cor verde. A e C: grupo explante; B e D: grupo colagenase. Barra de calibração = 100 µm

A razão da marcação colágeno II/colágeno I foi utilizada como marcador do fenótipo condrogênico, e foi maior no grupo colagenase do que no explante ($5,34 \pm 1,15$ contra $1,29 \pm 0,15$, $p = 0,0004$, Gráfico 8).

Gráfico 8 - Análise da razão entre o colágeno tipo II e colágeno tipo I. Os dados são representados pela relação entre os colágenos. Foi realizado o Teste t. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8. $p < 0,001$



5.4 Análise de expressão gênica dos marcadores de diferenciação celular

Foi analisada a expressão dos genes relacionados à diferenciação das três linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, usando PCR em tempo real. A análise da expressão de RNA mensageiro foi normalizada em relação à expressão do gene endógeno GAPDH.

Os genes relacionados à diferenciação osteogênica testado foram ALPL, RUNX2, osteocalcina e osteopontina. As células do grupo explante tiveram uma maior expressão do gene do ALPL (gene para fosfatase alcalina, $p = 0,02$; Gráfico 9), porém uma menor expressão do gene RUNX2 ($p = 0,004$; Gráfico 10). Já as expressões de osteocalcina e osteopontina não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Gráficos 11 e 12).

Gráfico 9 - Expressão do gene ALPL (fosfatase alcalina) para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por colagenase. A análise foi determinada utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System. Os dados foram analisados usando Teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). $p = 0,02$

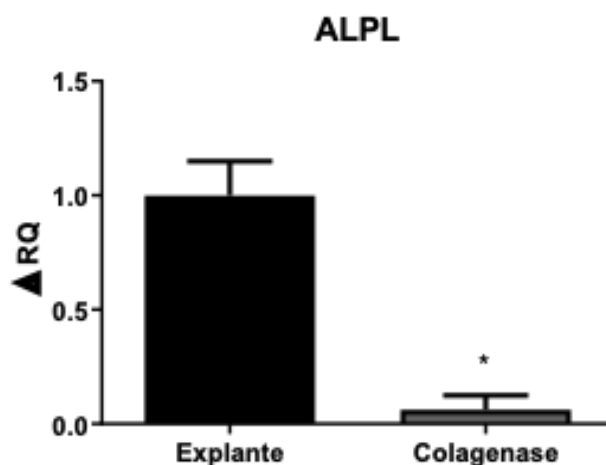


Gráfico 10 - Expressão do gene RUNX2 para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase. A análise foi determinada utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System. Os dados foram analisados usando Teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). $p = 0,004$

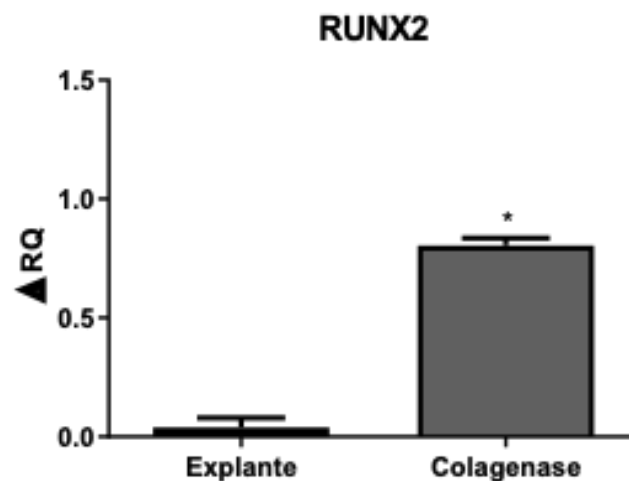


Gráfico 11 - Expressão do gene osteocalcina para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase. A análise foi determinada utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System. Os dados foram analisados usando Teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). $p = 0,695$

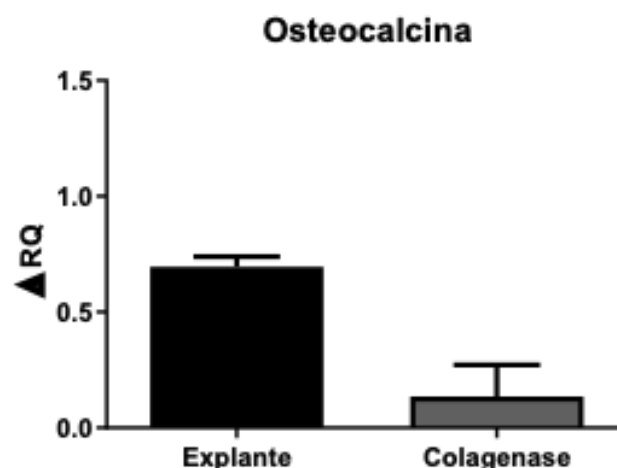
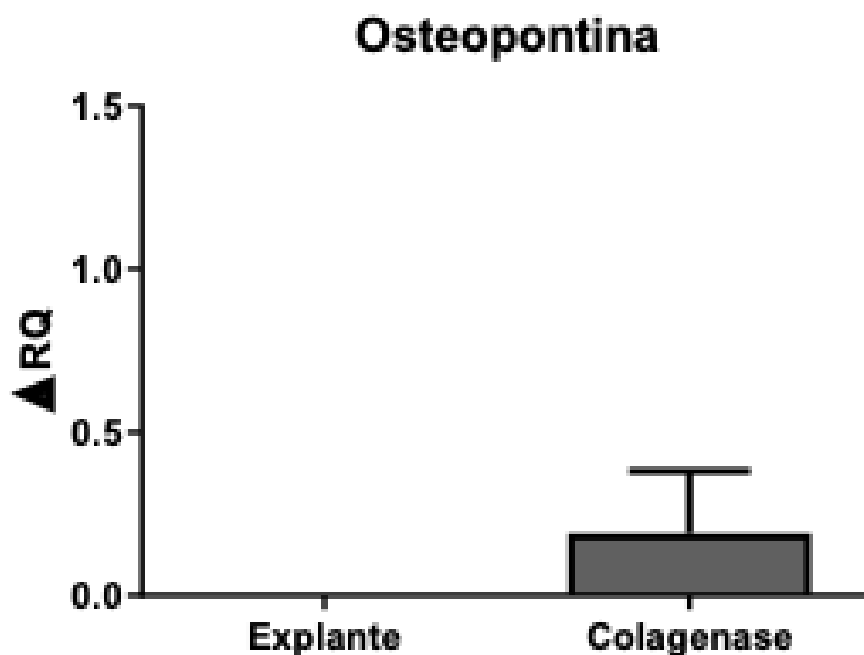


Gráfico 12 - Expressão do gene osteopontina para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase. A análise foi determinada utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System. Os dados foram analisados usando Teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). $p = 0,422$



Quanto aos genes relacionados à diferenciação adipogênica, PPAR γ e CEBP α , não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Gráficos 13 e 14).

Gráfico 13 - Expressão do gene PPAR γ para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase. A análise foi determinada utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System. Os dados foram analisados usando Teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). $p = 0,088$

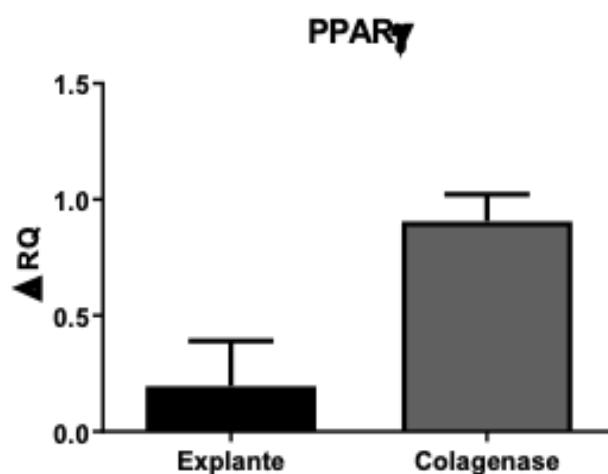
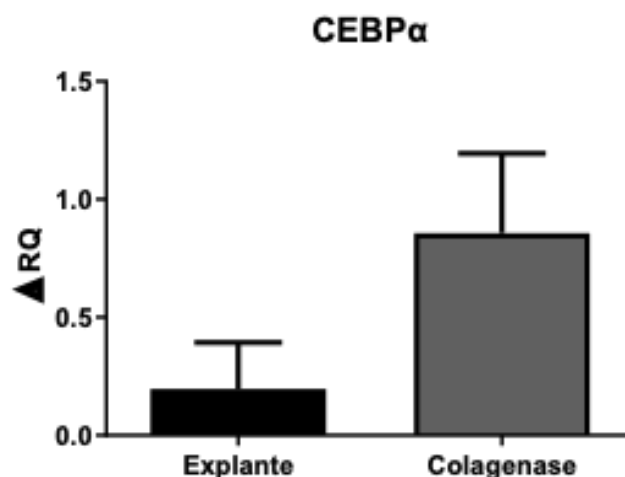


Gráfico 14 - Expressão do gene CEBP α para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por collagenase. A análise foi determinada utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System. Os dados foram analisados usando Teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). $p = 0,232$



Por fim, os genes relacionados à diferenciação condrogênica estudados foram sindecan e perlecan. A expressão do sindecan foi maior no grupo colagenase ($p = 0,04$), enquanto a expressão de perlecan foi semelhante entre os grupos.

Gráfico 15 - Expressão do gene Sindecan para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por colagenase. A análise foi determinada utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System. Os dados foram analisados usando Teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). $p = 0,04$

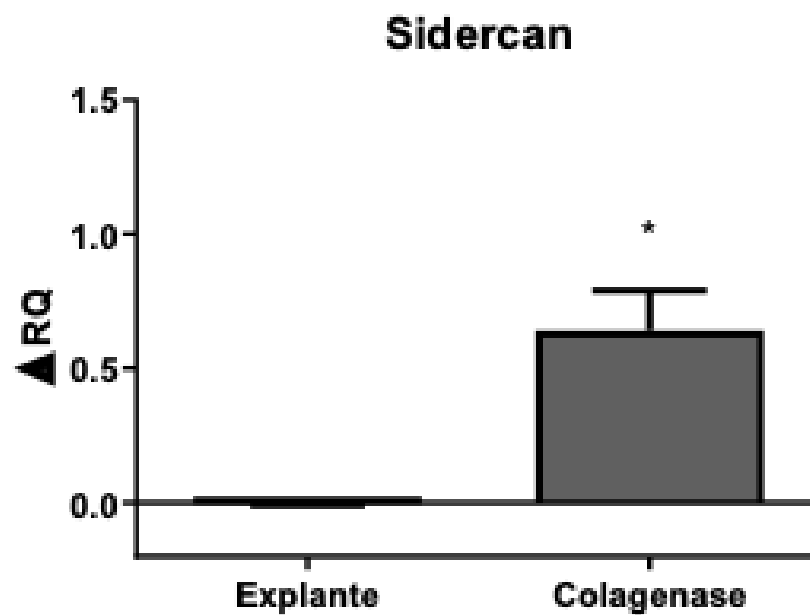
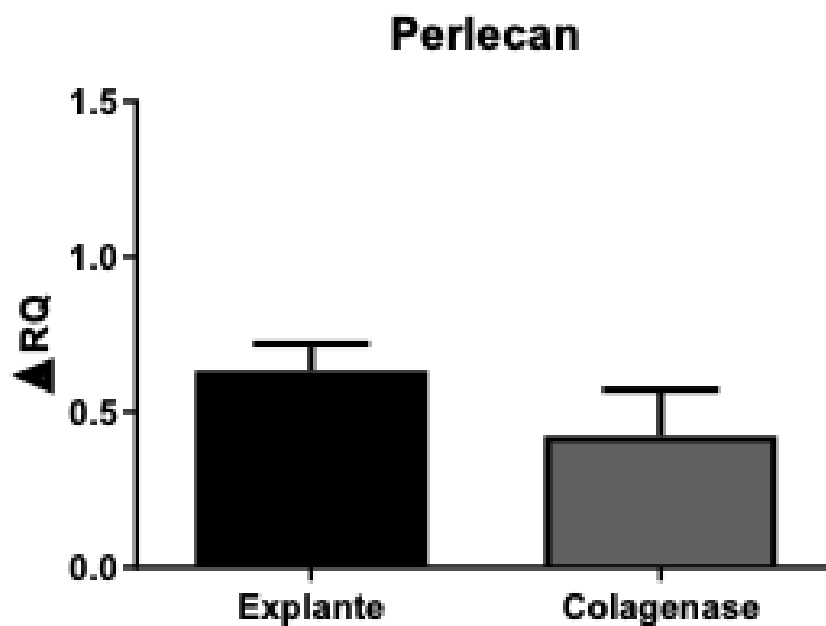


Gráfico 16 - Expressão do gene Perlecan para as células da cartilagem obtidas por explante ou digestão enzimática por colagenase. A análise foi determinada utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System. Os dados foram analisados usando Teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. $p = 0,34$



6 DISCUSSÃO

A principal motivação deste estudo foi o isolamento de células da cartilagem articular pelo método do explante, após biópsia artroscópica em joelhos sem osteoartrite, e sua caracterização comparativa com células isoladas com digestão enzimática por colagenase.

Este estudo é de especial importância, uma vez que as lesões da cartilagem articular ainda são desafios importantes para a medicina moderna, e um campo relevante de aplicação de técnicas de terapia celular⁸. A terapia celular com uso de células derivadas da cartilagem é realidade clínica em grande parte do mundo, sendo que a digestão enzimática com colagenase o método mais estabelecido para isolamento destas células²⁷. Recentemente, há interesse na literatura por células isoladas pela metodologia de migração de explante de cartilagem, que alguns autores consideram uma subpopulação especial de "condroprogenitores migratórios"^{48,55}, e em seu potencial uso em terapias regenerativas.

6.1 Isolamento e cultivo células derivadas da cartilagem saudável

Houve sucesso em desenvolver culturas de células isoladas de cartilagem articular humana, provenientes de biópsias por artroscopia de joelhos sem osteoartrite, tanto pelo método de digestão enzimática quanto por migração de células por explante.

O uso da digestão enzimática para este fim é consolidado na literatura, sendo o método clinicamente usado em biópsias artroscópicas para transplante autólogo de condrócitos^{26,60}.

Por outro lado, há controvérsia se a técnica de migração de explante é factível em articulações sem osteoartrite. Apenas uma publicação prévia descreve o isolamento de células por migração de explante de cartilagem articular de joelhos sem osteoartrite: em 2019, Wang *et al.*⁵⁵ utilizaram cartilagem saudável proveniente de amputações após trauma automobilístico. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho descrevendo o estabelecimento de culturas de células da cartilagem obtidas por migração de explante de cartilagem articular saudável obtida através de biópsia por artroscopia.

Em contraste com o presente estudo, quase a totalidade dos estudos prévios demonstraram a obtenção de células migratórias a partir de explante de cartilagem articular com osteoartrite^{48,54,56,57,83,86,87,94,96}, e não de tecido saudável. Por um lado, isto poderia ser explicado pela conveniência de obtenção do material biológico, descartado de rotina em cirurgias de prótese de joelho. Por outro lado, a literatura parece apontar para uma maior dificuldade de obtenção destas células em cartilagem saudável. Koelling *et*

*al.*⁴⁸ descreveram insucesso em obter células por migração de explante de cartilagem saudável, então inferiram que elas só estariam presentes ou ativadas como resultado do processo reparativo estimulado pela fisiopatologia da osteoartrite, e seu isolamento seria impossível na articulação sem osteoartrite⁴⁸. Já Wang *et al.*⁵⁷ demonstraram um maior número de células migratórias em áreas de maior lesão da osteoartrite, em comparação com áreas menos acometidas. Corroborando essa visão, outros autores descreveram o isolamento de células migratórias de cartilagem saudável bovina, porém após modelo experimental de traumatismo, o que supostamente ativaria ou recrutaria estas células^{85,93-95}.

Considerou-se importante o fato de o trabalho atual demonstrar sucesso na obtenção de células migratórias de explante de cartilagem em joelhos sem osteoartrite. Considerando o contexto clínico da terapia celular em cirurgia reparativa de cartilagem, são os pacientes com lesões condrais focais, porém sem osteoartrite instalada, a população de maior interesse²⁵. A osteoartrite afeta a fisiologia de todos os tecidos articulares, portanto, é possível haver diferenças importantes na biologia de células obtidas a partir de articulações com e sem osteoartrite⁹⁷.

6.2 Técnica para obtenção de células da cartilagem por migração de explante

Recentemente, em 2023, Vinod *et al.*⁹² compararam quatro métodos de processamento de cartilagem para obtenção de células por migração de explante, usando cartilagem de joelhos com osteoartrite. Foram comparados tamanhos de fragmentos cultivados grandes ou pequenos, lesão traumática dos fragmentos e tratamento rápido com collagenase para amolecimento da matriz extracelular. Todos os métodos obtiveram células com características semelhantes, mas houve uma quantidade menor de células disponíveis inicialmente com o uso de cartilagem picada em fragmentos pequenos, de 1 mm. No estudo atual, a amostra da cartilagem foi picada em pequenos fragmentos, o que, de acordo com os achados de Vinod *et al.*⁹², poderia resultar em um menor rendimento de células. Porém, a extrapolação destes resultados para o presente estudo são limitados: os autores utilizaram cartilagem descartada de artroplastias, enquanto no presente trabalho foram utilizadas biópsias por artroscopia de doadores sem osteoartrite. Ou seja, tanto o contexto fisiopatológico foi diferente, quanto a quantidade de tecido disponível foi menor. O estudo atual não se propôs a comparar diferentes tipos de preparo do fragmento de biópsia para a migração do explante, mas este é um objeto relevante para estudos futuros.

6.3 Cultivo celular

A morfologia das células observada nas culturas não foi diferente entre os grupos, tendo características semelhantes a fibroblastos. Esta morfologia é compatível com as descrições clássicas da literatura para células derivadas da cartilagem em cultura, para ambos os métodos de isolamento^{48,57,68,70,98}. Não houve diferença no tempo de crescimento entre as amostras.

6.4 Imunofenotipagem

A citometria de fluxo foi usada para avaliar os marcadores de superfície relacionados com a definição de células-tronco mesenquimais. Foram demonstrados perfis semelhantes nos dois grupos (CD105⁺, CD90⁺, CD34⁻, CD14⁻, HLA-DR⁻), ambos compatíveis com definição de CTM da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT)⁹⁹. Vários trabalhos prévios mostram resultados semelhantes, descrevendo imunofenótipo compatível com CTM para células migratórias da cartilagem^{48,55,83,88}, e células obtidas por digestão enzimática sem seleção^{74,81,100,101}. Por outro lado, Wang *et al.*⁵⁵, demonstraram marcadores semelhantes ao de CTM para células migratórias de explante condral, porém em condrócitos extraídos por colagenase CD90 era negativo (4,86%) e CD105 fracamente positivo (6,11%). O grupo de Diaz-Romero demonstrou, em dois trabalhos^{43,77}, que existe alteração do imunofenótipo ao longo do tempo de células da cartilagem extraídas por colagenase, como aumento de CD90 e diminuição de CD14, assumindo progressivamente um perfil mais semelhante aos de CTM. Estas alterações imunofenotípicas ocorreriam juntamente com outras relacionadas ao perfil "desdiferenciado" de condrócitos em cultura⁵⁸.

6.5 Genes indiferenciação

Além do imunofenótipo e da capacidade de diferenciação, o estudo atual avaliou outras características relacionadas à indiferenciação e à multipotência, como o fator transcricional Nanog e SOX2.

O fator transcricional Nanog está relacionado à manutenção de pluripotência de células mesenquimais por inibição de diferenciação¹⁰², e pôde ser identificado nas culturas de ambos os grupos, sem diferença entre eles. Além disso, Zeng *et al.*¹⁰³ demonstraram que o Nanog pode ter papel na manutenção da função condrogênica de células da cartilagem. A expressão gênica de Nanog em células extraídas da cartilagem por colagenase foi reportada previamente^{100,101}, mas nenhum trabalho, até o momento, avaliou a presença deste fator em células condrais extraídas por explante.

O fator transcricional SOX2 também está relacionado à manutenção de pluripotência em células-tronco¹⁰⁴, e foi identificado de forma similar nas células de ambos os grupos estudados. Sandrasaigaran *et al.*¹⁰⁰ previamente identificaram a expressão de RNAm para SOX2 em cultura de células de cartilagem extraídas por colagenase. Nenhum trabalho, até o presente momento, estudou este fator em células condrais isoladas por migração de explante.

6.6 Fatores de transcrição e genes relacionados à diferenciação em linhagens mesenquimais

O presente estudo analisou a expressão de fatores relacionados à diferenciação osteogênica (RUNX2, ALPL, osteocalcina e osteopontina), condrogênica (SOX9, sindecan e perlecan) e adipogênica (PPAR γ e CEBP α).

Quanto aos fatores relacionados à diferenciação osteogênica, houve maior expressão do fator transcricional RUNX2 em células extraídas da cartilagem por digestão enzimática do que por migração de explante, tanto no nível de RNAm por biologia molecular quanto de proteína por imunofluorescência. Já o gene para fosfatase alcalina (ALPL) foi mais expresso nas células extraídas por migração de explante. Por fim, osteocalcina e osteopontina não foram diferentes entre os grupos.

O RUNX2 é o principal fator relacionado com a proliferação e diferenciação de osteoblastos¹⁰⁵. A expressão deste fator em células condrais está relacionada com produção de colágeno I em detrimento de colágeno II, progressão para hipertrofia na ossificação endocondral¹⁰⁶ e osteoartrite do joelho¹⁰⁷. Já sua inibição promove o aumento de expressão de fatores relacionados ao potencial condrogênico, como SOX9, colágeno II e proteoglicanos⁴⁸. O estudo atual demonstrou maior expressão de RUNX2 em células isoladas por colagenase, em contraste com estudos prévios^{48,55,93,94}. Uma possível explicação é o uso de cartilagem de articulações com osteoartrite para obtenção de células migratórias nos estudos prévios, já que a osteoartrite se relaciona com expressão aumentada deste fator¹⁰⁷.

O gene da fosfatase alcalina é expresso na fase inicial do processo da osteogênese, seguido por expressão de osteocalcina^{108,109}. O fator RUNX2 é estimulador da produção de ALPL. No estudo atual, apesar da ALPL ter sido mais expressa em células obtidas por migração de explante, esse aumento não foi acompanhado de osteocalcina, osteopontina, e, principalmente, do RUNX2, principal regulador da osteogênese. A ALPL regula a expressão da fosfatase alcalina não específica, que pode ser influenciada por outros fatores, como estresse oxidativo relacionado à cultura celular. Portanto, não se acredita que a diferença de ALPL observada represente uma diferença na tendência de osteogênese dessas células.

A osteocalcina é a segunda proteína mais comum na matriz óssea, depois do colágeno. Sua expressão está relacionada à diferenciação osteogênica, e não foi diferente entre os grupos no presente estudo. A expressão de osteocalcina em células migratórias da cartilagem foi descrita previamente⁵⁷, mas este é primeiro estudo que compara a sua expressão com relação a células isoladas por digestão enzimática.

Quanto aos fatores relacionados à diferenciação condrogênica, foram avaliados SOX9, sindecan e perlecan, sendo que destes, apenas o sindecan foi diferente entre os grupos, com maior expressão para células extraídas por digestão enzimática.

O SOX9 é o fator chave na diferenciação de condrócitos e produção de matriz extracelular condral. Ele causa a ativação do gene COL2A1, estimulando a produção de colágeno II, principal proteína da matriz condral¹¹⁰, além de estar relacionado à recuperação do fenótipo

condrocítico⁷⁰ e maior produção de matriz extracelular quando células da cartilagem em cultura são estimuladas¹¹⁰⁻¹¹². Células da cartilagem em cultura que superexpressam SOX9 são capazes de maior produção de matriz condral. No presente estudo, foi demonstrada uma expressão semelhante de SOX9 entre os grupos, o que fala a favor de um potencial de diferenciação e produção de matriz condral semelhante, assim como mostrado por Koelling *et al.*⁴⁸ e Carluccio *et al.*⁸⁸ anteriormente. Porém a literatura é controversa, com estudos contraditórios demonstrando expressão maior de SOX9 em células obtidas por digestão enzimática⁵⁵, ou em células obtidas por migração de explante⁹³. Essas diferenças podem refletir condições específicas de cultura, como meio utilizado, tempo de cultura celular e número de passagens⁷⁰. Também podem ser afetadas pela intensidade de dano tecidual da cartilagem osteoartrítica, já que a doença provoca alteração na expressão deste fator¹¹³.

O perlecan é um proteoglicano de matriz extracelular presente em diversos tecidos¹¹⁴. Seu papel na condrogênese é associado a ligações das cadeias de sulfato de heparano (HS) e sulfato de condroitina(CS)¹¹⁵, à regulação da atividade do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e à regulação da atividade da proteína morfogenética óssea (BMP)^{116,117}, além de estar relacionado a mecanorreceptores da cartilagem e ao reparo de lesões teciduais¹¹⁸. Este é o primeiro estudo que investigou o perlecan em células de cultura extraídas da cartilagem, e não foram encontradas diferenças entre os grupos na sua expressão.

O sindecán é um proteoglicano transmembrana expresso em todas as células aderentes, que participa na adesão celular, regulação da sinalização dos fatores de crescimento, e sinalização da matriz celular. Acredita-se que o sindecán esteja relacionado à tentativa de reparo de dano condral na osteoartrite¹¹⁹ e à aderência de condrócitos ao plástico em culturas¹²⁰. Observou-se uma maior expressão de sindecán em nas células separadas por colagenase, sendo a primeira vez que este achado foi reportado.

Por último, os fatores relacionados à diferenciação adipogênica foram estudados: PPAR γ e CEBP α . O PPAR γ é um fator de transcrição relacionado a diferenciação e função de adipócitos. Também está associado à sobrevivência de células de cartilagem em condições de estresse por evitar inibição de autofagia¹²¹ e inibição de degradação de matriz extracelular¹²². A inibição de PPAR γ em modelos experimentais resulta em osteoartrite¹²³. No presente estudo, demonstrou-se maior presença de marcação nuclear de PPAR γ em células isoladas por explante, porém expressão semelhante biomolecular. Previamente, Wang *et al.*⁵⁵ demonstraram maior expressão de PPAR γ em células migratórias de explante condral. Atuando sinergicamente ao PPAR γ , o gene CEBP α também é essencial para a diferenciação adipogênica^{124,125}, e não foi diferente entre os grupos no presente estudo, sendo este um achado nunca antes reportado na literatura.

6.7 Produção de proteínas de matriz condral

Um dos aspectos mais importantes para avaliação do perfil condrogênico de células em cultura, no contexto de uso para terapia celular regenerativa, é a produção de proteínas de matriz. A principal proteína de matriz da cartilagem é o colágeno tipo II. Por outro lado, o colágeno tipo I é a proteína de matriz predominante na fibrocartilagem. Portanto, é desejável uma tendência maior de produção de colágeno II do que de colágeno I. Por conta disso, a razão de colágeno II/colágeno I é utilizada como um marcador de capacidade condrogênica de células em cultura, sendo desejável uma maior expressão de colágeno tipo II que de colágeno tipo I^{63,75,80}.

O trabalho atual mostrou maior intensidade de marcação na imunofluorescência tanto para colágeno II quanto para colágeno I nas células extraídas por digestão enzimática do que nas células extraídas por migração do explante. Adicionalmente, a razão colágeno II/colágeno I foi maior no grupo colagenase. Ou seja, células deste grupo tiveram maior produção de colágeno como um todo, e com predominância de colágeno tipo II para colágeno tipo I, em comparação com células do grupo explante.

Previamente, outros autores demonstraram expressão mais intensa de colágeno tipo II por células da cartilagem isoladas por digestão enzimática do que por migração de explante^{48,55,88,93,94}, e mais alto de colágeno tipo I⁴⁸. Nenhum estudo prévio comparou a razão de colágeno II/colágeno I entre estas células.

6.8 Diferenciação tri-linhagem (osteogênica, adipogênica e condrogênica)

No presente estudo, tanto as células da cartilagem extraídas por digestão enzimática da cartilagem quanto por migração de explante resultaram em populações cultivadas com capacidade de diferenciação tri-linhagem (osteogênica, adipogênica e condrogênica). Estas células, portanto, podem ser caracterizadas como multipotentes.

Com relação às células migratórias de explante, na literatura prévia existe concordância plena com relação à capacidade de diferenciação nas três linhagens^{48,55,57,83,93}.

Já com relação às células extraídas por digestão enzimática sem separação, há relatos controversos na literatura. Por um lado, a maior parte dos autores demonstrou diferenciação nas três linhagens de células da cartilagem isoladas por colagenase^{41-43,72-74,100}. Por outro, Koelling *et al.*⁴⁸ foram incapazes de diferenciar estas células nas três linhagens. Adicionalmente, De Luca *et al.*¹⁰¹ e Benz *et al.*⁸¹ demonstraram capacidade condrogênica e osteogênica, mas não adipogênica das células extraídas da cartilagem por colagenase. Por último, Wang *et al.*⁵⁵ relataram capacidade adipogênica e osteogênica menos intensa de células extraídas por digestão enzimática que de células extraídas por explante. São diversos os fatores potenciais que poderiam estar relacionados a estas diferenças: idade dos doadores, presença de osteoartrite, condições específicas de cultura, como meio utilizado e tempo das células em cultura.

6.9 Características de célula tronco mesenquimal

Demonstrou-se que ambos os métodos avaliados para isolamento de células da cartilagem articular saudável, digestão enzimática ou explante, resultaram em culturas com características semelhantes às células-tronco mesenquimais.

O critério mínimo para identificação de CTM pela ISCT⁹⁹ envolve: aderência das células ao plástico em condições de cultura; positividade ($\geq 95\%$) dos marcadores CD105, CD73 e CD90, negatividade ($\leq 5\%$) dos marcadores CD45, CD34, CD14 (ou CD11b), CD79 α (ou CD19) e HLA-DR; e diferenciação *in vitro* em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

Portanto, pelos critérios mínimos formais da ISCT, é possível classificar como CTM as células obtidas por ambos os métodos.

A seguir, será discutida a questão controversa da nomenclatura das células cultivadas derivadas de cartilagem, inclusive quanto sua classificação como CTM.

6.10 Nomenclatura de células derivadas da cartilagem cultivadas

A nomenclatura para células obtidas e cultivadas a partir da cartilagem não é padronizada. No estudo atual, houve o rigor em não atribuir denominações com conotações biológicas específicas às células estudadas, preferindo os termos descritivos: células isoladas por digestão enzimática e células isoladas por migração de explante.

As células isoladas da cartilagem por digestão enzimática da cartilagem, sem nenhum processo adicional, são comumente denominadas na literatura como "condrócitos". Esta denominação foi iniciada nos primeiros isolamentos de células de cartilagem⁵⁸ e é utilizada também no nome da terapia celular para cartilagem clinicamente mais consolidada: o transplante autólogo de condrócitos²⁶. Originalmente, a nomenclatura foi fruto da inferência histórica de que a cartilagem articular apresentaria um único tipo celular: condrócitos diferenciados. Portanto, as células cultivadas a partir da cartilagem seriam estes mesmos condrócitos. Porém, o comportamento biológico *in vitro* das células isoladas da cartilagem por digestão enzimática não é o esperado para uma célula em diferenciação terminal. Em cultura, estas células perdem características de diferenciação e produção de matriz, enquanto ganham características de indiferenciação, multiplicação e plasticidade, em um processo denominado tradicionalmente com desdiferenciação^{58,70,73,77,126}, que foi novamente demonstrado no estudo atual. É sabido que este processo é potencialmente reversível em condições que estimulam a condrogênese, ou com implantação *in vivo*^{60,65,79,127-129}.

Da mesma forma, as células obtidas por migração de explantes de cartilagem semeados em placas de cultura são comumente denominadas "condroprogenitores migratórios". O termo "condroprogenitor" foi utilizado pela primeira vez por Dowthwaite⁴⁶, que selecionou com ensaio de adesão à fibronectina uma subpopulação de células da cartilagem, supostamente uma reserva tecidual de células indiferenciadas, envolvidas no reparo tecidual. Por sua vez, Koelling⁴⁸, ao descrever as células obtidas por migração de explante, de forma análoga, as denominou "condroprogenitores migratórios". A justificativa para este nome foi as características de indiferenciação e plasticidade observadas nestas células. Porém, como discutido previamente, as células derivadas da cartilagem, mesmo sem processo de seleção específico, também apresentam características de indiferenciação e plasticidade em cultura. Ou seja, estas são características comuns de células derivadas da cartilagem em cultura, não de uma subpopulação de "condroprogenitores". A hipótese de subpopulações também é enfraquecida por estudo de expressão de RNAm célula a célula, de Benz *et al.*⁸¹, que demonstrou que a expressão gênica das células derivadas da cartilagem, apesar de variada, não permite a determinação de subpopulações *in vitro*.

Dificultando ainda mais uma nomenclatura precisa, as células derivadas da cartilagem obtidas pelos dois métodos apresentam características que permitem classificá-las formalmente como célula tronco mesenquimal pelos critérios da ISCT⁹⁹. Por conta disso, há autores que defendem que elas seriam de fato uma população CTM na cartilagem^{74,82,100,130}. Este é um ponto controverso, já que há características

que divergem de CTM bem estabelecidas de outros tecidos. Atualmente, CTM são entendidas como células do nicho perivascular, que está ausente na cartilagem avascular⁸¹. Além disso, enquanto em outros sítios, como medula óssea ou gordura, uma pequena fração das células apresentam critérios definidores de CTM, na cartilagem, há positividade de forma quase universal nas células obtidas^{74,77}, portanto divergente da característica de população de reserva observada em outros sítios. De fato, apesar de a ISCT estabelecer um critério mínimo para CTM, definições de nomenclatura específicas para diferentes tecidos são úteis, como a existente para CTM derivadas de gordura¹³¹, algo que não existe para a cartilagem. Adicionalmente, é importante contextualizar que o uso do termo "condrócitos" para células extraídas por digestão enzimática é anterior à popularização do termo CTM, por Caplan⁴⁴, em 1991, e seu isolamento em diversos tecidos adultos¹³².

Dessa forma, a maioria não denomina as células derivadas de cartilagem cultivadas como CTM, preferindo narrativas como a "desdiferenciação" de condrócitos para um fenótipo primitivo⁷⁷, a hipótese de seleção em cultura de subpopulações indiferenciadas^{42,46,48}, ou simplesmente considerar que células de cartilagem em cultura possuem inerentemente características de CTM, sem classificá-las como CTM⁸¹.

Portanto, consideramos que a nomenclatura utilizada para células em cultura derivadas da cartilagem seja imprecisa e pouco rigorosa. É da nossa opinião que os termos "condrócitos", "condrócitos desdiferenciados" ou "condroprogenitores" devem ser evitados, já que remetem a características

biológicas específicas, não necessariamente corroboradas pela literatura, dando preferência à denominação geral de "células derivadas da cartilagem", especificando a forma de obtenção utilizada.

6.11 Principais diferenças entre os grupos e inferências sobre o potencial para uso *in vivo*

Células da cartilagem isoladas por migração de explante condral foram descritas previamente como promissoras para uso como um produto de terapia celular de cartilagem⁴⁹. O estudo atual é um primeiro passo essencial dentro do contexto de translação para uso clínico desta técnica. Nele, foram investigadas questões primordiais: 1) a viabilidade do método para isolamento das células e estabelecimento de culturas, a partir de biópsia artroscópica de cartilagem saudável; 2) as características detalhadas das linhagens celulares obtidas; 3) a comparação direta destas características com o padrão clínico atual (células isoladas por digestão enzimática).

É importante reconhecer que a análise *in vitro* de características em células em cultura não são definitivas para determinar seu potencial *in vivo* no reparo de lesões condrais. A regeneração de tecido depende de interações complexas entre o ambiente biológico no local da lesão e células implantadas^{10,14,18}.

Mesmo assim, marcadores do perfil condrogênico previamente conhecidos permitem inferências sobre o potencial uso em terapias regenerativas. No estudo atual, células separadas por digestão enzimática apresentaram maior produção de colágeno II, maior relação colágeno

II/colágeno I, todos potencialmente indicativos de um perfil condrogênico mais favorável. Por outro lado, estas mesmas células também expressaram colágeno I, relacionado à formação de fibrose, e RUNX2, marcador de diferenciação osteogênica e inibidor de condrogênese. Já SOX9, o fator chave de diferenciação condrogênica, não teve diferença entre os grupos, enquanto o PPAR γ , fator chave da diferenciação adipogênica, foi mais expresso por células obtidas por migração de explante. Os dois tipos de linhagem não apresentaram diferenças nos marcadores de indiferenciação e plasticidade para diferenciação em linhagens mesenquimais.

Dentre estes achados, considerou-se mais importante a produção de colágeno II e sua proporção com colágeno I, por estarem relacionados de forma mais direta à função desejada destas células no reparo de lesão condral. Estes fatos levam a inferir que as células da cartilagem extraídas por colagenase teriam maior potencial para regeneração da cartilagem em comparação com as separadas por migração de explante para este uso.

Como exposto, estudos *in vivo* são essenciais para confirmar empiricamente a capacidade de regeneração de lesões condrais de produtos celulares, assim como evidenciar superioridade de uma ou outra para este uso.

Existe apenas um estudo em modelo animal comparando células obtidas por migração de explante e por digestão enzimática, por Wang *et al.*⁵⁵, de 2019. Os autores utilizaram um defeito condral de 5 mm em trócleas femorais de coelhos, comparando o tratamento de plasma rico em plaquetas acrescido de diferentes tipos de células. A melhor formação de regenerado

condral em 12 semanas foi, em ordem decrescente: de PRP + células da cartilagem extraídas por migração, depois PRP + células-tronco mesenquimais de medula óssea, seguido de PRP + células da cartilagem extraídas por digestão enzimática, e, por último, PRP isolado. É notável que, assim como no presente estudo, os autores demonstraram menor produção de colágeno II pelas células extraídas por migração. Porém, após o estímulo com PRP, houve maior resposta com multiplicação celular e aumento da produção de colágeno por estas células. Fica claro como o estudo de terapias biológicas regenerativas é complexo: tão importantes quanto o tipo e característica das células são o tipo de *scaffold* utilizado e o ambiente local *in vivo*. Atualmente, o transplante autólogo de condrócitos é realizado mais comumente com *scaffolds* de colágeno ou ácido hialurônico. Estudos futuros são essenciais para esclarecer a resposta biológica das células migratórias a esses *scaffolds*. A seguir, avaliar sua performance em modelos experimentais de lesão condral em animais, preferencialmente de maior porte, que refletem de forma mais próxima o contexto clínico humano¹³³.

6.12 Pontos fortes e limitações do estudo

Reconhecem-se limitações relevantes no estudo atual.

As amostras dos grupos não foram pareadas (o mesmo doador fornecendo uma amostra para cada grupo). O pareamento de amostras traria a vantagem de diminuir uma possível variabilidade entre indivíduos nos achados do estudo. No entanto, o material biológico foi obtido de doadores voluntários, por biópsia artroscópica, utilizando tamanho padronizado descrito para uso clínico em transplante autólogo de condrócitos²⁷. Para realizar o pareamento, uma opção seria aumentar a quantidade de tecido retirado, o que poderia ser questionado do ponto de vista ético e de segurança, pela possibilidade de aumento da morbidade do sítio doador. Por isso, optou-se por manter a técnica padronizada, com amplo uso clínico e com evidências de segurança¹³⁴. Outra opção seria dividir cada amostra em duas, o que poderia limitar a capacidade de isolamento das células¹²⁹, diminuindo a validade externa dos achados para um contexto clínico translacional. Por esses motivos, optou-se por realizar o estudo com amostras não pareadas, otimizando a segurança e aplicabilidade dos resultados.

O estudo atual utilizou uma amostra de oito linhagens celulares estabelecidas a partir de oito doadores. O número de linhagens celulares independentes tradicionalmente considerado mínimo em estudos de cultura celular é três¹³⁵, com o aumento do número de amostras trazendo retornos decrescentes com relação a poder estatístico, e aumento linear de custo de insumos e utilização de estrutura¹³⁵. É importante ressaltar que, em estudos *in vitro* com culturas celulares, mesmo se o número de amostras independentes

for pequeno, o número de observações na maioria dos experimentos é grande, o controle da aplicação da metodologia é rigoroso, e a variabilidade dos resultados é menor, em comparação com estudos clínicos. Há grande variação no tamanho de amostra de estudos prévios com linhagens celulares da cartilagem, havendo diversos exemplos de estudos com amostras menores que oito linhagens^{54,55,80,81,93}. Desta forma, considerou-se o tamanho da amostra do presente estudo adequado e dentro do padrão da literatura.

As características de células em culturas não são temporalmente estáveis, havendo diferenças importantes entre células frescas (primeira passagem), culturas precoces (até quarta passagem) e culturas tardias (mais de cinco passagens). Resultados contrastantes da literatura podem refletir essas diferenças temporais, e os presentes resultados poderiam ser diferentes em outros momentos da cultura^{43,75,129}. A análise de células de primeira passagem é relevante por refletirem uma condição celular mais próxima à do tecido original. Porém, para o contexto do uso clínico de células cultivadas, dependente da produção de um grande número de células, mais tempo de cultura é necessário. Dessa forma, optou-se por avaliar todas as amostras na mesma passagem, quando é possível a obtenção de um número de células adequado para terapia celular (10-20 x 10⁶ células) para as duas populações.

Por outro lado, este estudo possui pontos fortes dignos de nota. Trata-se de estudo pioneiro, com a caracterização de células com potencial uso em terapia celular para lesões condrais focais, obtidas a partir de biópsia artroscópica da cartilagem articular do joelho humano, em pacientes sem

osteoartrite do joelho. A quase totalidade dos estudos prévios da literatura avaliando células migratórias da cartilagem utiliza origem animal, ou então a partir de material desprezado de artroplastias do joelho para osteoartrite. O único estudo prévio com células de cartilagem humana sem osteoartrite, utilizou cartilagem saudável de cadáveres jovens. Nestes trabalhos, a diferença de espécie, de diagnóstico e do volume de amostra usado podem ter impacto relevante nas características biológicas das populações obtidas. Dessa forma, de forma a aumentar a validade externa dos achados para a situação de interesse clínico, para lesões focais de cartilagem, usou-se cartilagem de joelhos humanos sem osteoartrite, obtida de pequenos fragmentos obtidos por biópsia artroscópica. O presente estudo não se limitou a descrever e caracterizar as células da cartilagem obtidas por migração, mas comparar com o padrão atual para uso clínico, que são as células obtidas por digestão enzimática.

Quanto à metodologia, o uso de imunofluorescência indireta quantitativa *high-content screening* para avaliação de marcadores biológicos é um ponto positivo. Esta técnica permite não somente a avaliação da presença ou ausência de marcadores, mas também da sua quantificação e localização e distribuição nas células e no meio extracelular, permitindo outras dimensões de análise em comparação com a citometria de fluxo.

Do ponto de vista institucional, este foi um dos estudos que inauguraram a parceria entre o IOT-HCFMUSP e o LIM-19, a qual permitiu o desenvolvimento de linhas de pesquisa voltadas para terapias celulares e regenerativas musculoesqueléticas, usando materiais como células derivadas

da cartilagem, células-tronco mesenquimais de gordura, células-tronco de medula óssea e fração vascular estromal da gordura. A partir destes esforços, se constituiu o Núcleo de Ortopedia Regenerativa, Banco de Tecidos e Terapia Celular dentro do prédio do Instituto de Ortopedia, com estrutura para pesquisa básica celular. Atualmente, o grupo desenvolve trabalhos de todos os tipos: *in vitro*, modelos experimentais animais e ensaios clínicos em humanos.

Como perspectivas futuras, as terapias biológicas na ortopedia estão em momento de expansão. Elas geram interesse, já que são promissoras para tratamento de lesões crônicas e recalcitrantes, para as quais não há tratamento ideal atualmente. Por meio delas, vislumbra-se um futuro em que a ortopedia terá à sua disposição tratamentos de fato regenerativos, juntamente com o arsenal já tão avançado de técnicas reconstrutivas e substitutivas da atualidade.

Por outro lado, ainda existe uma carência de evidências, apesar de um número crescente de publicações sobre o tema, até mesmo quanto a produtos que são usados clinicamente¹³⁶. Faltam trabalhos em todos os degraus da pirâmide de evidências: estudos *in vitro*, caracterizando de forma detalhada os produtos biológicos, principalmente de forma comparativa; estudos em animais, para demonstrações iniciais de eficácia biológica, mas também para estudo das interações entre tratamento e hospedeiro e dos processos *in vivo* de regeneração; mas, principalmente, de ensaios clínicos comparativos¹³⁷. A maioria dos trabalhos clínicos sobre terapias ortobiológicas é séries de casos, não comparativas, que, portanto, não permitem conclusões definitivas sobre eficácia ou tamanho de efeito.

Adicionalmente, parte dos trabalhos comparativos publicados são ensaios não randomizados, sem grupos controles adequados, por incluir a terapia experimental não comprovada em ambos os grupos. Esse tipo de estudo, além de ser vulnerável a vieses, também não permite avaliação adequada do tamanho de efeito destas terapias, uma informação essencial para definir a sua utilidade e indicações clínicas reais.

Apesar disso, observou-se a divulgação disseminada destas terapias, acompanhada frequentemente de discursos que refletem de forma imprecisa ou exagerada a qualidade das evidências científicas disponíveis¹³⁸. Infelizmente, este tipo de prática pode atrapalhar o desenvolvimento e implementação destas terapias em benefício dos pacientes¹³⁸. A aplicação desenfreada e indiscriminada comercial de uma terapia nova, principalmente dentro de brechas regulatórias, pode gerar ceticismo e desconfiança do público e criação de barreiras regulatórias adicionais, coibindo abusos, mas também atrapalhando o desenvolvimento sério.

No Brasil, já houve exemplo concreto deste problema: a terapia com plasma rico em plaquetas, apesar de ser uma das mais estudadas dentro das terapias biológicas para ortopedia, é proibida para uso clínico por resolução de 2015 do Conselho Federal de Medicina¹³⁹. Na época, vivia-se uma grande expansão do uso do PRP, muitas vezes indiscriminado. O texto da resolução cita como justificativa a baixa qualidade de evidência, poucos estudos controlados, pouca padronização e descrição do produto. Hoje, quase 8 anos depois, apesar de haver um corpo de evidências mais robusto sobre a terapia^{140,141}, seu uso continua restrito.

Este trabalho, juntamente com as demais linhas de pesquisas do Núcleo de Ortopedia Regenerativa, Banco de Tecidos e Terapia Celular do IOT-HCFMUSP, se inserem no contexto de criar evidências sólidas e sérias dentro das terapias biológicas e celulares na ortopedia, contribuindo para realizar o seu potencial no tratamento clínico de lesões e doenças tão limitantes. Somente assim, com base científica rigorosa, é possível a implementação clínica de terapias biológicas de forma sustentável e ética, enfatizando a segurança e os benefícios reais aos pacientes.

7 CONCLUSÕES

Conclui-se que é viável, a partir de biópsia de cartilagem artroscópica em pacientes sem osteoartrite, o isolamento e estabelecimento de culturas de células derivadas da cartilagem por migração de explante, assim como por digestão enzimática. A caracterização comparativa entre as células obtidas por estes dois métodos demonstrou um perfil semelhante de marcadores de superfície, diferenciação e plasticidade. As células extraídas por digestão enzimática tiveram maior expressão de marcadores positivos para capacidade condrogênica como colágeno II e maior relação colágeno II/colágeno I, mas também dos marcadores negativos para condrogênese colágeno I e RUNX2, enquanto expressão de SOX9 foi semelhante entre as duas.

8 ANEXOS

Anexo A - Glossário de termos relacionados à terapia celular

Agrecano: principal proteoglicano na matriz extracelular da cartilagem, onde desempenha um papel crucial na manutenção da estrutura e da resistência da cartilagem à compressão.

BrdU (bromodesoxiuridina): análogo de nucleosídeo que é frequentemente usado em pesquisa de biologia celular para rastrear a proliferação celular. Quando adicionado a células em cultura, o BrdU é incorporado ao DNA no lugar da timidina durante a síntese do DNA, que ocorre quando a célula se divide.

CD: Conjuntos de Diferenciação são moléculas específicas presentes na superfície das células que servem como marcadores úteis para identificar e categorizar diferentes tipos de células.

Cultura em monocamada: Método de cultivo de células em que elas formam uma única camada ou plano, normalmente aderindo a um recipiente de plástico

Cultura em suspensão de agarose: método em que células são cultivadas em gotículas de agarose, um tipo de gel. Ao contrário de uma cultura monocamada, onde as células se aderem a uma superfície, neste método, as células crescem livremente em uma matriz tridimensional, simulando de forma mais realista o ambiente natural das células no corpo

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) low glucose: formulação específica de meio de cultura utilizado em biologia celular para o crescimento e manutenção de células em cultura. A variação "low glucose" indica que a concentração de glicose na formulação do meio é reduzida em comparação com a versão padrão.

Fator de transcrição SOX: família de proteínas que desempenham papéis fundamentais na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e na determinação do destino das células. O nome "SOX" é derivado de "*SRY-related HMG box*."

Fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs): são uma família de proteínas que desempenham papéis críticos na regulação do crescimento e desenvolvimento celular, cicatrização de feridas e angiogênese. Eles funcionam ligando-se a receptores específicos nas células, ativando vias de sinalização que levam à proliferação, sobrevivência e migração celular.

High-Content Screening: abordagem de triagem automatizada para imunofluorescência indireta que permite a análise quantitativa de múltiplos parâmetros celulares em larga escala.

Imunofluorescência indireta: uma técnica para detectar proteínas em células usando anticorpos primários e secundários marcados com fluoróforos.

Integrinas: família de proteínas transmembranares que medeiam a adesão celular ao ambiente extracelular, geralmente a matriz extracelular. Elas são compostas por duas subunidades, alfa e beta, que trabalham juntas para ligar-se a vários ligantes, como fibronectina, colágeno e laminina.

Microarray: tecnologia que permite analisar a expressão de milhares de genes simultaneamente em uma única amostra biológica. É usado para estudar padrões de expressão gênica e identificar genes relacionados a processos biológicos ou doenças.

Multipotência: propriedade de certas células que lhes permite se diferenciar em vários, mas não todos, tipos de células do corpo. Um exemplo é a célula-tronco mesenquimal, que pode se diferenciar em uma variedade de tipos de células, como osteoblastos (células formadoras de osso), adipócitos (células de gordura) e condroblastos (células que formam cartilagem), mas não em células de todos os tecidos.

NOTCH1: proteína receptor na superfície das células, que desempenha um papel crucial na sinalização celular, influenciando processos como diferenciação e proliferação celular. A ativação do NOTCH1 pode manter as células em um estado menos diferenciado ou progenitor.

Passagem: Processo de transferir ou subcultivar células de um recipiente de cultura para outro. Este processo é normalmente realizado quando as células atingem confluência (quando cobrem toda a superfície do recipiente) para evitar a superlotação e a morte celular. O número de passagens é frequentemente usado como uma maneira de rastrear a idade de uma linha celular.

Pluripotência: capacidade que algumas células-tronco, especialmente células-tronco embrionárias, têm de se diferenciar em qualquer tipo de célula de todos os três germes embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme. Isso significa que podem se tornar qualquer célula no corpo, excluindo a placenta e outros tecidos extraembrionários. A pluripotência permite o desenvolvimento de um organismo inteiro a partir de uma única célula.

Quinase do tipo receptor de ativina 1: receptor na superfície celular que se liga a membros da família do fator de transformação do crescimento-beta (TGF-beta), como a ativina e o BMP (proteína morfogenética óssea).

RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real): técnica molecular que permite a amplificação e quantificação de um segmento específico de DNA ou RNA em tempo real. É amplamente utilizada em pesquisa biomédica e diagnóstico molecular para detecção de vírus, análise de expressão gênica e quantificação de material genético em amostras biológicas.

RUNX2: fator de transcrição pertencente à família Runx (Runt-related transcription factor). O RUNX2 desempenha um papel essencial na diferenciação e desenvolvimento dos osteoblastos, as células responsáveis pela formação do tecido ósseo. É considerado um marcador de diferenciação osteoblástica e é importante para a mineralização e crescimento do osso durante o desenvolvimento e a remodelação óssea ao longo da vida.

Secretoma: o conjunto de proteínas e moléculas secretadas pelas células em um determinado ambiente celular ou tecidual.

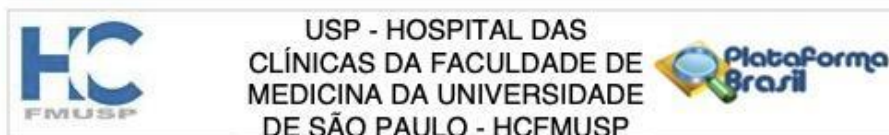
Totipotência: propriedade que algumas células têm de se diferenciar em todos os tipos de células possíveis de um organismo, incluindo tanto as células embrionárias quanto as extraembrionárias, como as da placenta. Em mamíferos, os únicos exemplos de células totipotentes são o zigoto (a célula formada pela fusão do espermatozoide e do óvulo) e os primeiros blastômeros, que são as células resultantes das primeiras divisões do zigoto.

Trypsin-Versene-EDTA: solução é usada para a remoção das células do substrato de cultura, permitindo sua suspensão e subsequente contagem ou processamento em experimentos ou análises adicionais.

Unipotência: capacidade de uma célula de se diferenciar em um único tipo de célula madura ou em uma linhagem celular específica.

Versican: grande proteoglicano que faz parte da matriz extracelular em muitos tipos de tecidos. Desempenha vários papéis importantes, incluindo a regulação da adesão celular, a proliferação celular e a migração celular, entre outras funções. Além disso, pode interagir com outros componentes da matriz extracelular, como ácido hialurônico e fibrilina-1.

Anexo B - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de condroprogenitores da cartilagem articular do joelho

Pesquisador: Marco Kawamura Demange

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46438821.2.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.834.722

Apresentação do Projeto:

Introdução: A cartilagem articular é composta por uma população heterogênea de células. Condroprogenitores são células que intermediárias entre células tronco mesenquimais e condrócitos, na sequência da condrogênese, que podem ser obtidas da população global de células extraídas da cartilagem articular madura por processos como ensaio de adesão com fibronectina, seleção por marcadores de superfície através de citometria, ou por propriedade de migração (explant). Existe considerável heterogeneidade na literatura sobre caracterização desse grupo de células, inclusive com resultados diferentes dependendo da forma de obtenção dessas células. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é comparar as características de células condroprogenitores e condrócitos cultivados a partir de cartilagem articular madura do joelho humano, incluindo marcadores de superfície, genes de indiferenciação, capacidade de diferenciação e características fenotípicas condrogênicas. **Métodos:** Biópsia de cartilagem fora da área de carga, de 4x10mm, será colhida de 10 pacientes voluntários submetidos a cirurgia do joelho. A partir dos fragmentos de cartilagem, serão separados condrócitos, através de digestão enzimática, e condroprogenitores, por explant celular, estabelecendo-se linhagens celulares distintas. Será

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.834.722

realizada caracterização e comparação das linhagens quanto a expressão de Oct4, SOX2, Nanog, Quiescência, Sox9, RunX2, VEGF, CD146, CFU, Syndecan, Col I, II, X, diferenciação tri-linhagem. As diferenças obtidas serão descritas, quantificadas e comparadas com teste T não pareado ou Mann Whitney, com $p > 0,05$ considerado significativo.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto tem o objetivo de Descrever e comparar as características de células condroprogenitoras e condrocitos cultivados a partir de cartilagem articular madura do joelho humano, incluindo marcadores de superfície, genes de indiferenciação, capacidade de diferenciação e características fenotípicas condrogênicas

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são inerentes ao procedimento cirúrgico de rotina para tratamento de patologias no joelho. A biópsia de cartilagem acarreta aumento não significativo no tempo cirúrgico, sendo realizada em menos de 5 minutos. O fragmento de cartilagem retirado, por seu tamanho pequeno e sendo fora da área de carga, não causará sintomas ou alterações funcionais no paciente, nem tem potencial para desencadear processos degenerativos. Há ampla experiência mundial de coleta de biópsias de cartilagem para transplante autólogo de condrocitos, e não há relato de morbidade do sítio doador da biópsia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo unicêntrico de análise de colágeno I e II em material obtido através de biópsia de cartilagem durante cirurgia de joelho no IOT do HCFMUSP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

foi recebida a correção do TCLE.

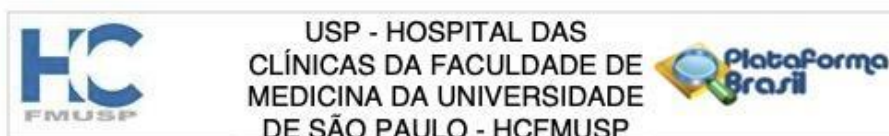
Recomendações:

sem novas recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.834.722

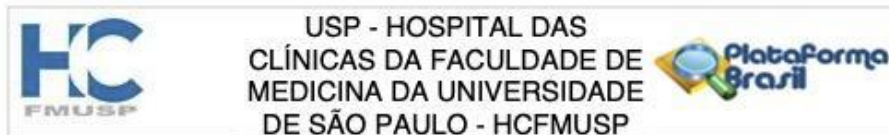
Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP Interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1719644.pdf	28/06/2021 10:04:28		Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_resposta_cappesq_condroprogenitores.pdf	28/06/2021 10:00:55	Marco Kawamura Demange	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_condroprogenitores_atualizado.pdf	28/06/2021 10:00:45	Marco Kawamura Demange	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	04/05/2021 14:47:45	Marco Kawamura Demange	Aceito
Orçamento	declaracao_custo.pdf	04/05/2021 14:47:33	Marco Kawamura Demange	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declacao_chefe_grupo.pdf	04/05/2021 14:47:22	Marco Kawamura Demange	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Parecer_Uso_de_dados_digitais.pdf	04/05/2021 14:47:03	Marco Kawamura Demange	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_LIM19.pdf	04/05/2021 14:46:52	Marco Kawamura Demange	Aceito
Declaração de Pesquisadores	assinaturas_autores.pdf	04/05/2021 14:46:23	Marco Kawamura Demange	Aceito
Declaração de Pesquisadores	checklist.pdf	04/05/2021 14:46:06	Marco Kawamura Demange	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_avaliacao_condroprogenitores.docx	04/05/2021 10:49:54	Marco Kawamura Demange	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_Avaliacao_de_condroprogenitores_da_cartilagem_articular_do Joelho.docx	04/05/2021 10:49:47	Marco Kawamura Demange	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.834.722

Folha de Rosto	FR_assinado_projeto_cartilagem.pdf	04/05/2021 10:48:04	Marco Kawamura Demange	Aceito
----------------	------------------------------------	------------------------	---------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Julho de 2021

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Avaliação de condroprogenitores da cartilagem articular do joelho

Pesquisador principal - Dr. MARCO KAWAMURA DEMANGE, Professor Dr. Grupo Joelho, IOT HC-FMUSP

Convidamos o(a) senhor(a) para participar desta pesquisa, **"Avaliação de condroprogenitores da cartilagem articular do joelho"**

O objetivo deste estudo é a comparação em laboratório de diferentes tipos células da cartilagem do joelho.

O(a) Sr.(a) está sendo convidado porque passará por uma cirurgia de artroscopia para tratamento de um problema no joelho. A indicação da cirurgia não tem nenhuma relação com a participação nesse estudo, ou seja, você será operado porque já tem um problema que demanda cirurgia, independente da participação neste estudo. Para essa pesquisa, durante sua cirurgia, um pequeno fragmento da sua cartilagem do joelho, de 5x10mm, em uma região que não há apoio de peso, será retirado e analisado em laboratório. As células desse fragmento serão retiradas, cultivadas e suas características analisadas com microscópios e técnicas especiais de laboratório.

O procedimento adicional aumentará em aproximadamente 5 minutos o tempo total de sua cirurgia. A pesquisa não vai interferir na cirurgia a que o(a) senhor(a) será submetido. A retirada do fragmento da cartilagem, não lhe causará prejuízos, uma vez que o fragmento retirado é pequeno, fora da área que suporta peso, e o tempo adicional não é significativo. Funciona como uma biópsia da cartilagem. Não haverá nenhum desconforto ou risco de complicação além daquele normalmente esperado para esse tipo de cirurgia, e não mudará a rotina do pós-operatório e reabilitação.

O material coletado será armazenado de acordo com as regras vigentes na duração do estudo, sendo posteriormente descartado num prazo máximo de 48 meses. Nenhuma amostra de tecido sua será encaminhada para qualquer outro local que não seja o laboratório parceiro do estudo Laboratório de Imunologia, Lipídios, Oxidação e Biologia Celular, no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR). Esse consentimento é específico para esse estudo. O material não será submetido a nenhum outro uso sem que haja novo consentimento.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Avaliação de condroprogenitores da cartilagem articular do joelho

Pesquisador principal - Dr. MARCO KAWAMURA DEMANGE, Professor Dr. Grupo Joelho, IOT HC-FMUSP

Com essa pesquisa, esperamos entender melhor as características das células presentes na cartilagem do joelho, para no futuro oferecer tratamentos cada vez melhores aos pacientes com esse problemas de cartilagem.

Seu acompanhamento clínico em nosso hospital não será afetado pela participação ou não nessa pesquisa, havendo a garantia de liberdade para escolher participar ou não, inclusive com direito de retirar seu consentimento para o estudo em qualquer fase, sem prejuízo ao seu tratamento ou qualquer tipo de penalização.

Seu sigilo e privacidade estão garantidos, e sua identificação não será divulgada. Este termo será assinado em duas vias, e uma lhe será entregue. Não haverá despesas para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, está garantido o ressarcimento pelo orçamento dessa pesquisa.

Em caso de dano originado em consequência da participação nesta pesquisa, o (a) Sr.(a) terá direito a indenização.

O material coletado será armazenado de acordo com as regras vigentes na duração do estudo, sendo posteriormente descartado. Esse consentimento é específico para esse estudo. O material não será submetido a nenhum outro uso sem que haja novo consentimento.

Sempre que tiver qualquer dúvida em relação ao estudo, poderá a qualquer momento perguntar para nossa equipe que esclarecerá as questões da melhor forma que puder.

O principal investigador é o Dr. Marco Kawamura Demange, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 333, Telefone (11) 2661-6912

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5o andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Avaliação de condroprogenitores da cartilagem articular do joelho

Pesquisador principal - Dr. MARCO KAWAMURA DEMANGE, Professor Dr. Grupo Joelho, IOT HC-FMUSP

Fui suficientemente informado a respeito do estudo **"Avaliação de condroprogenitores da cartilagem articular do joelho"**

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Dr. Marco Kawamura Demange) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (.....) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura legal do participante /representante

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Avaliação de condroprogenitores da cartilagem articular do joelho

Pesquisador principal - Dr. MARCO KAWAMURA DEMANGE, Professor Dr. Grupo Joelho, IOT HC-FMUSP

4

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO)
DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1.NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO No

APTO: BAIRRO: CIDADE

..... CEP:..... TELEFONE:

DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL

LEGAL

..... NATUREZA (grau
de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO No

APTO: BAIRRO: CIDADE

..... CEP:..... TELEFONE:

DDD (.....)

4

Anexo D - Anticorpos utilizados na análise das proteínas por imunofluorescência indireta

Anticorpo	Diluição	Fabricante	Catálogo
Colágeno I	1:100	Rockland®	600-401-103-0
Colágeno II	1:100	Rockland®	600-401-105-01
Nanog	1:200	BD®	560791
PPAR γ	1:100	Novusbio®	NB120-19481
RUNX2	1:100	Novusbio®	H860-M06
SOX9	1:100	Abnova®	400-509
SOX2	1:100	ABCam®	Ab92494

9 REFERÊNCIAS

1. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 2002;18(7):730–4.
2. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 1997;13(4):456–60.
3. Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, Faltus R, Szyluk K, Widuchowski J, Koczy B. Isolated full thickness chondral injuries. Prevalance and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2008;75(5):382–6.
4. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee*. 2007;14(3):177–82.
5. Krych AJ, Saris DBF, Stuart MJ, Hacken B. Cartilage Injury in the Knee: Assessment and Treatment Options. *J Am Acad Orthop Surg*. 2020;28(22):914–22.

6. Heir S, Nerhus TK, Røtterud JH, Løken S, Ekeland A, Engebretsen L, Arøen A. Focal cartilage defects in the knee impair quality of life as much as severe osteoarthritis: a comparison of knee injury and osteoarthritis outcome score in 4 patient categories scheduled for knee surgery. *Am J Sports Med.* 2010;38(2):231–7.
7. Merkely G, Ackermann J, Lattermann C. Articular Cartilage Defects: Incidence, Diagnosis, and Natural History. *Oper Tech Sports Med.* 2018;26(3):156–61.
8. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res.* 2002;4(Suppl 3):S63–8.
9. Woo SL, Buckwalter JA. AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *J Orthop Res.* 1988;6(6):907-31.
10. Sakata R, Iwakura T, Reddi AH. Regeneration of Articular Cartilage Surface: Morphogens, Cells, and Extracellular Matrix Scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21(5):461–73.
11. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(4):532–53.
12. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998;47:477–86.

13. Gomoll AH, Minas T. The quality of healing: articular cartilage. *Wound Repair Regen.* 2014;22(Suppl 1):30–8.
14. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med.* 2017;36(3):413–25.
15. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(402):21–37.
16. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* 1982;64(3):460–6.
17. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998;28(4):192–202.
18. Suh JK, Scherping S, Mardi T, Richard Steadman J, Woo SLY. Basic science of articular cartilage injury and repair. *Oper Tech Sports Med.* 1995;3(2):78–86.
19. Gratz KR, Wong BL, Bae WC, Sah RL. The effects of focal articular defects on intra-tissue strains in the surrounding and opposing cartilage. *Biorheology.* 2008;45(3-4):193–207.
20. Schinhan M, Gruber M, Vavken P, Dorotka R, Samouh L, Chiari C, Gruebl-Barabas R, Nehrer S. Critical-size defect induces unicompartmental osteoarthritis in a stable ovine knee. *J Orthop Res.* 2012;30(2):214–20.

21. Marcacci M, Filardo G, Kon E. Treatment of cartilage lesions: what works and why? *Injury*. 2013;44(Suppl 1):S11–5.
22. Messner K, Maletius W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand*. 1996;67(2):165–8.
23. Guermazi A, Hayashi D, Roemer FW, Niu J, Quinn EK, Crema MD, Nevitt MC, Torner J, Lewis CE, Felson DT. Brief Report: Partial- and Full-Thickness Focal Cartilage Defects Contribute Equally to Development of New Cartilage Damage in Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(3):560–4.
24. Houck DA, Kraeutler MJ, Belk JW, Frank RM, McCarty EC, Bravman JT. Do Focal Chondral Defects of the Knee Increase the Risk for Progression to Osteoarthritis? A Review of the Literature. *Orthop J Sports Med*. 2018;6(10):2325967118801931.
25. Welton KL, Logterman S, Bartley JH, Vidal AF, McCarty EC. Knee Cartilage Repair and Restoration: Common Problems and Solutions. *Clin Sports Med*. 2018;37(2):307–30.
26. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889–95.

27. Hinckel BB, Gomoll AH. Autologous Chondrocytes and Next-Generation Matrix-Based Autologous Chondrocyte Implantation. *Clin Sports Med.* 2017;36(3):525–48.
28. Gobbi RG, Demange MK, Barreto RB, Pécora JR, Rezende MU, Filho TE, Lombello CB. Autologous chondrocyte implantation: series of 3 cases. *Rev Bras Ortop.* 2015;45(4):449–56.
29. Giglio PN, Lizier NF, Levy D, Sobrado MF, Gobbi RG, Pécora JR, Bydlowski SP, Demange MK. Autologous chondrocyte implantation in Brazil. *Acta Ortop Bras.* 2020 May;28(3):131–6.
30. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. 1959. In: *Proceedings of the British Orthopaedic Association J Bone and Joint Surg.* 1959:618–9.
31. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Oper Tech Orthop.* 1997;7(4):300–4.
32. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med.* 2002;30(1):2–12.
33. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, Richardson JB. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(1):R60–73.

34. Briggs TWR, Mahroof S, David LA, Flannelly J, Pringle J, Bayliss M. Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85(7):1077–83.
35. Ozmeriç A, Alemdaroğlu KB, Aydoğan NH. Treatment for cartilage injuries of the knee with a new treatment algorithm. *World J Orthop.* 2014;5(5):677–84.
36. Camp CL, Stuart MJ, Krych AJ. Current concepts of articular cartilage restoration techniques in the knee. *Sports Health.* 2014;6(3):265–73.
37. Ogura T, Bryant T, Minas T. Long-term Outcomes of Autologous Chondrocyte Implantation in Adolescent Patients. *Am J Sports Med.* 2017;15(12):036354651668249–036354651668249.
38. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med.* 2010;38(6):1117–24.
39. Henderson I, Lavigne P, Valenzuela H, Oakes B. Autologous chondrocyte implantation: superior biologic properties of hyaline cartilage repairs. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;455:253–61.
40. Pareek A, Carey JL, Reardon PJ, Peterson L, Stuart MJ, Krych AJ. Long-Term Outcomes after Autologous Chondrocyte Implantation: A Systematic Review at Mean Follow-Up of 11.4 Years. *Cartilage.* 2016;7(4):298–308.

41. Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells in vivo. *Exp Cell Res*. 2003;287(1):16–27.
42. Thornemo M, Tallheden T, Sjogren Jansson E, Larsson A, Lovstedt K, Nannmark U, Brittberg M, Lindahl A. Clonal populations of chondrocytes with progenitor properties identified within human articular cartilage. *Cells Tissues Organs*. 2005;180(3):141–50.
43. Diaz-Romero J, Nestic D, Grogan SP, Heini P, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic changes of human articular chondrocytes during monolayer culture reflect bona fide dedifferentiation rather than amplification of progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2008;214(1):75–83.
44. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641–50.
45. Bozdağ SC, Yüksel MK, Demirer T. Adult Stem Cells and Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1079:17–36.
46. Douthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 6):889–97.
47. Khan IM, Bishop JC, Gilbert S, Archer CW. Clonal chondroprogenitors maintain telomerase activity and Sox9 expression during extended monolayer culture and retain chondrogenic potential. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(4):518–28.

48. Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N. Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell*. 2009;4(4):324–35.
49. Vinod E, Parameswaran R, Ramasamy B, Kachroo U. Pondering the Potential of Hyaline Cartilage-Derived Chondroprogenitors for Tissue Regeneration: A Systematic Review. *Cartilage*. 2020;1947603520951631.
50. McCarthy HE, Bara JJ, Brakspear K, Singhrao SK, Archer CW. The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived stromal cells as potential cell sources for cartilage repair in the horse. *Vet J*. 2012;192(3):345–51.
51. Marcus P, De Bari C, Dell'Accio F, Archer CW. Articular Chondroprogenitor Cells Maintain Chondrogenic Potential but Fail to Form a Functional Matrix When Implanted Into Muscles of SCID Mice. *Cartilage*. 2014;5(4):231–40.
52. Hayes AJ, Tudor D, Nowell MA, Caterson B, Hughes CE. Chondroitin sulfate sulfation motifs as putative biomarkers for isolation of articular cartilage progenitor cells. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(2):125–38.
53. Jayasuriya CT, Chen Q. Potential benefits and limitations of utilizing chondroprogenitors in cell-based cartilage therapy. *Connect Tissue Res*. 2015;56(4):265–71.

-
54. Janssen JN, Batschkus S, Schimmel S, Bode C, Schminke B, Miosge N. The Influence of TGF- β 3, EGF, and BGN on SOX9 and RUNX2 Expression in Human Chondrogenic Progenitor Cells. *J Histochem Cytochem.* 2019;67(2):117–27.
 55. Wang K, Li J, Li Z, Wang B, Qin Y, Zhang N, Zhang H, Su X, Wang Y, Zhu H. Chondrogenic Progenitor Cells Exhibit Superiority Over Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes in Platelet-Rich Plasma Scaffold-Based Cartilage Regeneration. *Am J Sports Med.* 2019;47(9):2200–15.
 56. Matta C, Boockock DJ, Fellows CR, Miosge N, Dixon JE, Liddell S, Smith J, Mobasheri A. Molecular phenotyping of the surfaceome of migratory chondroprogenitors and mesenchymal stem cells using biotinylation, glycocapture and quantitative LC-MS/MS proteomic analysis. *Sci Rep.* 2019;9(1):9018.
 57. Wang YX, Zhao ZD, Wang Q, Li ZL, Huang Y, Zhao S, Hu W, Liang JW, Li PL, Wang H, Mao N, Wu CT, Zhu H. Biological potential alterations of migratory chondrogenic progenitor cells during knee osteoarthritic progression. *Arthritis Res Ther.* 2020;22(1):62.
 58. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro, I. dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1960;46(12):1533–42.

59. Smith AU. Survival of Frozen Chondrocytes Isolated from Cartilage of Adult Mammals. *Nature*. 1965;205(4973):782–4.
60. Manning WK, Bonner WM Jr. Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 1967;10(3):235–9.
61. Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*. 1968;50(1):184–97.
62. Bentley G, Smith AU, Mukerjee R. Isolated epiphyseal chondrocyte allografts into joint surfaces. An experimental study in rabbits. *Ann Rheum Dis*. 1978;37(5):449–58.
63. Layman DL, Sokoloff L, Miller EJ. Collagen synthesis by articular chondrocytes in monolayer culture. *Exp Cell Res*. 1972;73(1):107–12.
64. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. 1977;267(5611):531–2.
65. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982;30(1):215–24.

66. Aulthouse AL, Beck M, Griffey E, Sanford J, Arden K, Machado MA, Horton WA. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1989;25(7):659-68.
67. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res.* 1989;7(2):208–18.
68. Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT, Muir HI. Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *J Cell Sci.* 1995;108(Pt 5):1991–9.
69. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(326):270–83.
70. Stokes DG, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J.* 2001;360(Pt 2):461–70.
71. Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum.* 2001;44(7):1608–19.

72. Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1315–25.
73. Tallheden T, Dennis JE, Lennon DP, Sjögren-Jansson E, Caplan AI, Lindahl A. Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A(Suppl 2):93–100.
74. de la Fuente R, Abad JL, García-Castro J, Fernández-Miguel G, Petriz J, Rubio D, Vicario-Abejón C, Guillén P, González MA, Bernad A. Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells. *Exp Cell Res.* 2004;297(2):313-28.
75. Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vécsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86(2):286–95.
76. Brittberg M, Sjögren-Jansson E, Thornemo M, Faber B, Tarkowski A, Peterson L, et al. Clonal growth of human articular cartilage and the functional role of the periosteum in chondrogenesis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(2):146–53.
77. Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nestic D, Trub T, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):731–42.

-
78. Grogan SP, Barbero A, Diaz-Romero J, Cleton-Jansen AM, Soeder S, Whiteside R, Hogendoorn PC, Farhadi J, Aigner T, Martin I, Mainil-Varlet P. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. *Arthritis Rheum.* 2007;56(2):586-95.
 79. Giovannini S, Diaz-Romero J, Aigner T, Mainil-Varlet P, Nestic D. Population doublings and percentage of S100-positive cells as predictors of in vitro chondrogenicity of expanded human articular chondrocytes. *J Cell Physiol.* 2010;222(2):411–20.
 80. Hamada T, Sakai T, Hiraiwa H, Nakashima M, Ono Y, Mitsuyama H, Ishiguro N. Surface markers and gene expression to characterize the differentiation of monolayer expanded human articular chondrocytes. *Nagoya J Med Sci.* 2013;75(1-2):101–11.
 81. Benz K, Stippich C, Freudigmann C, Mollenhauer JA, Aicher WK. Maintenance of “stem cell” features of cartilage cell sub-populations during in vitro propagation. *J Transl Med.* 2013;11:27.
 82. Karlsen TA, Sundaram AYM, Brinchmann JE. Single-Cell RNA Sequencing of In Vitro Expanded Chondrocytes: MSC-Like Cells With No Evidence of Distinct Subsets. *Cartilage.* 2021;13(2 suppl):774S-784S.

83. Joos H, Wildner A, Hogrefe C, Reichel H, Brenner RE. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R119.
84. Zingler C, Carl HD, Swoboda B, Krinner S, Hennig F, Gelse K. Limited evidence of chondrocyte outgrowth from adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(1):124–8.
85. Wang S, Zhou C, Zheng H, Zhang Z, Mei Y, Martin JA. Chondrogenic progenitor cells promote vascular endothelial growth factor expression through stromal-derived factor-1. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25(5):742–9.
86. Batschkus S, Atanassov I, Lenz C, Meyer-Marcotty P, Cingöz G, Kirschneck C, Urlaub H, Miosge N. Mapping the secretome of human chondrogenic progenitor cells with mass spectrometry. *Ann Anat.* 2017;212:4–10.
87. Nguyen VT, Cancedda R, Descalzi F. Platelet lysate activates quiescent cell proliferation and reprogramming in human articular cartilage: Involvement of hypoxia inducible factor 1. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(3):e1691–703.

88. Carluccio S, Martinelli D, Palamà MEF, Pereira RC, Benelli R, Guijarro A, Cancedda R, Gentili C. Progenitor Cells Activated by Platelet Lysate in Human Articular Cartilage as a Tool for Future Cartilage Engineering and Reparative Strategies. *Cells*. 2020;9(4):1052.
89. Janssen JN, Izzi V, Henze E, Cingöz G, Lowen F, Küttner D, Neumann R, Lenz C, Rosen V, Miosge N. Enhancing the chondrogenic potential of chondrogenic progenitor cells by deleting RAB5C. *iScience*. 2021;24(5):102464.
90. Vinod E, Johnson NN, Kumar S, Amirtham SM, James JV, Livingston A, Rebekah G, Daniel AJ, Ramasamy B, Sathishkumar S. Migratory chondroprogenitors retain superior intrinsic chondrogenic potential for regenerative cartilage repair as compared to human fibronectin derived chondroprogenitors. *Sci Rep*. 2021;11(1):23685.
91. Vinod E, Parasuraman G, Lisha J J, Amirtham SM, Livingston A, Varghese JJ, Rani S, Francis DV, Rebekah G, Daniel AJ, Ramasamy B, Sathishkumar S. Human fetal cartilage-derived chondrocytes and chondroprogenitors display a greater commitment to chondrogenesis than adult cartilage resident cells. *PLoS One*. 2023;18(4):e0285106.
92. Vinod E, Parasuraman G, Livingston A, Amirtham SM, Rebekah G, Lisha JJ, Daniel AJ, Sathishkumar S. Comparison of methods for the isolation and culture of Migratory chondroprogenitors from Human articular cartilage. *Connect Tissue Res*. 2023:1-11.

93. Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter MW, Lehman AD, Ding L, Buckwalter JA, Martin JA. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3626-37.
94. Zhou C, Zheng H, Seol D, Yu Y, Martin JA. Gene expression profiles reveal that chondrogenic progenitor cells and synovial cells are closely related. *J Orthop Res.* 2014;32(8):981–8.
95. Zhou C, Zheng H, Buckwalter JA, Martin JA. Enhanced phagocytic capacity endows chondrogenic progenitor cells with a novel scavenger function within injured cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(9):1648–55.
96. Wagner G, Lehmann C, Bode C, Miosge N, Schubert A. High Mobility Group Box 1 Protein in Osteoarthritic Knee Tissue and Chondrogenic Progenitor Cells: An Ex Vivo and In Vitro Study. *Cartilage.* 2021;12(4):484–95.
97. Stoop R, Albrecht D, Gaissmaier C, Fritz J, Felka T, Rudert M, Aicher WK. Comparison of marker gene expression in chondrocytes from patients receiving autologous chondrocyte transplantation versus osteoarthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(3):R60.

98. Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J*. 2001;358(Pt 1):17–24.
99. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
100. Sandrasaigaran P, Algraittee SJR, Ahmad AR, Vidyadaran S, Ramasamy R. Characterisation and immunosuppressive activity of human cartilage-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. 2018;70(3):1037–50.
101. De Luca P, Kouroupis D, Viganò M, Perucca-Orfei C, Kaplan L, Zagra L, de Girolamo L, Correa D, Colombini A. Human Diseased Articular Cartilage Contains a Mesenchymal Stem Cell-Like Population of Chondroprogenitors with Strong Immunomodulatory Responses. *J Clin Med*. 2019;8(4):423.
102. Heurtier V, Owens N, Gonzalez I, Mueller F, Proux C, Mornico D, Clerc P, Dubois A, Navarro P. The molecular logic of Nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun*. 2019;10(1):1109.

103. Zheng H, Gourronc F, Buckwalter JA, Martin JA. Nanog maintains human chondrocyte phenotype and function in vitro. *J Orthop Res.* 2010;28(4):516–21.
104. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003;17(1):126–40.
105. Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):313–23.
106. Chen H, Tan XN, Hu S, Liu RQ, Peng LH, Li YM, Wu P. Molecular Mechanisms of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:664168.
107. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* 2006 ;54(8):2462-70.
108. Siller AF, Whyte MP. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res.* 2018;33(2):362–4.
109. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020 Sep 5;754:144855.

110. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol.* 1997;17(4):2336–46.
111. Li Y, Tew SR, Russell AM, Gonzalez KR, Hardingham TE, Hawkins RE. Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. *Tissue Eng.* 2004;10(3-4):575–84.
112. Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, Tweats LM, Hawkins RE, Hardingham TE. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(1):80–9.
113. Brew CJ, Andrew JG, Boot-Handford R, Hardingham TE. Late osteoarthritic cartilage shows down regulation of SOX9 and aggrecan expression but little evidence of chondrocyte hypertrophy. *Trans Orthop Res Soc.* 2004;50:938.
114. Knox SM, Whitelock JM. Perlecan: how does one molecule do so many things? *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(21):2435–45.
115. French MM, Gomes RR Jr, Timpl R, Höök M, Czymmek K, Farach-Carson MC, Carson DD. Chondrogenic activity of the heparan sulfate proteoglycan perlecan maps to the N-terminal domain I. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):48-55.

116. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell*. 2002;3(3):439–49.
117. Gomes RR Jr, Farach Carson MC, Carson DD. Perlecan-stimulated nodules undergo chondrogenic maturation in response to rhBMP-2 treatment in vitro. *Connect Tissue Res*. 2003;44(Suppl 1):196–201.
118. Hayes AJ, Farrugia BL, Biose IJ, Bix GJ, Melrose J. Perlecan, A Multi-Functional, Cell-Instructive, Matrix-Stabilizing Proteoglycan With Roles in Tissue Development Has Relevance to Connective Tissue Repair and Regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:856261.
119. Salminen-Mankonen H, Säämänen AM, Jalkanen M, Vuorio E, Pirilä L. Syndecan-1 expression is upregulated in degenerating articular cartilage in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*. 2005;34(6):469–74.
120. Barre PE, Redini F, Boumediene K, Vielpeau C, Pujol JP. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of syndecan-1 and -4 messages in cartilage and cultured chondrocytes from osteoarthritic joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8(1):34–43.
121. Dell'Accio F, Sherwood J. PPAR γ /mTOR signalling: striking the right balance in cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(3):477–9.

122. Sabatini M, Bardiot A, Lesur C, Moulharat N, Thomas M, Richard I, Fradin A. Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on proteoglycan degradation and matrix metalloproteinase production in rat cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(9):673-9.
123. Vasheghani F, Monemdjou R, Fahmi H, Zhang Y, Perez G, Blati M, St-Arnaud R, Pelletier JP, Beier F, Martel-Pelletier J, Kapoor M. Adult cartilage-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout mice exhibit the spontaneous osteoarthritis phenotype. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1099-106.
124. Clarke SL, Robinson CE, Gimble JM. CAAT/Enhancer Binding Proteins Directly Modulate Transcription from the Peroxisome Proliferator- Activated Receptor γ 2 Promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Nov 7;240(1):99–103.
125. Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):124.
126. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(1):62-70.

127. Haudenschild DR, McPherson JM, Tubo R, Binette F. Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation. *Anat Rec.* 2001;263(1):91–8.
128. Jakob M, Démariseau O, Schäfer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem.* 2001;81(2):368-77.
129. Kisiday JD. Expansion of chondrocytes for cartilage tissue engineering: A review of chondrocyte dedifferentiation and redifferentiation as a function of growth in expansion culture. *Regenerative Medicine Frontiers.* 2019;2(1).
130. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008;17(4):761-73.
131. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013;15(6):641-8.

-
132. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
 133. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(1):105–15.
 134. McCarthy HS, Richardson JB, Parker JCE, Roberts S. Evaluating Joint Morbidity after Chondral Harvest for Autologous Chondrocyte Implantation (ACI): A Study of ACI-Treated Ankles and Hips with a Knee Chondral Harvest. *Cartilage*. 2016;7(1):7–15.
 135. Naegle K, Gough NR, Yaffe MB. Criteria for biological reproducibility: what does “n” mean? *Sci Signal*. 2015;8(371):fs7.
 136. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N, Armstrong L, Djonov V, Lako M, Stojkovic M. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci*. 2018;15(1):36-45.
 137. Rodeo SA. Cell therapy in orthopaedics: where are we in 2019? *Bone Joint J*. 2019;101-B(4):361–4.
 138. Turner L, Knoepfler P. Selling Stem Cells in the USA: Assessing the Direct-to-Consumer Industry. *Cell Stem Cell*. 2016;19(2):154–7.

139. Conselho Federal de Medicina. Resolução CFM nº 2.128/2015. Diário Oficial da União. 2015 Oct 20;(I):236.
140. Chen X, Jones IA, Park C, Vangsness CT Jr. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Tendon and Ligament Healing: A Systematic Review and Meta-analysis With Bias Assessment. *Am J Sports Med.* 2018 ;46(8):2020–32.
141. Belk JW, Kraeutler MJ, Houck DA, Goodrich JA, Dragoo JL, McCarty EC. Platelet-Rich Plasma Versus Hyaluronic Acid for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Sports Med.* 2020;363546520909397.