

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

NATHALIA CHICON ELERT

**EFEITOS *IN VITRO* DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA DIFERENCIAÇÃO
CONDROGÊNICA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO
ADIPOSO DE RATAS**

ALEGRE-ES

2017

NATHALIA CHICON ELERT

**EFEITOS *IN VITRO* DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA DIFERENCIAÇÃO
CONDROGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO
ADIPOSO DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Jankerle Neves Boeloni

ALEGRE-ES

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Felício Gomes Corteletti – CRB-6 ES-000646/O

E37e Elert, Nathalia Chicon 1991-
Efeito in vitro da triiodotironina (T3) na diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas / Nathalia Chicon Elert. – 2017.
77 f. : il.

Orientador: Jankerle Neves Boeloni.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Cartilagem. 2. Hormônios tireoidianos. 3. Células. 4. Tecido adiposo. I. Boeloni, Jankerle Neves. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 619

NATHALIA CHICON ELERT

**EFEITOS *IN VITRO* DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA
DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-cirúrgicas.

Aprovado em 26 de julho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof.^a Dr.^a Klesia Pirola Madeira
Universidade Federal do Espírito Santo

Ao meu pai Edson, minha mãe Sueli e meu irmão Edgar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que ajudaram no meu desenvolvimento científico e pessoal durante esses dois anos, pois o curto tempo de um mestrado é, acima de tudo, uma experiência de vida. E nessa minha experiência, contei com a ajuda de muitos, cada um colocando um pedacinho para construir a pessoa que sou agora.

Agradeço a Deus, pela presença constante em minha vida, pelo discernimento em minhas escolhas e pelas bênçãos concedidas. Agradeço a minha mãezinha Maria por ter passado na frente e aberto todas as portas para a realização desse projeto. Muitas foram as dificuldades, mas fui amparada a todo momento.

A Universidade Federal do Espírito Santo, através do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade em realizar este curso.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

Agradeço imensamente à minha orientadora Jankerle Boeloni, que se mostrou solícita e acessível desde o primeiro momento que entrei em contato pedindo orientação para o mestrado. Agradeço por ter acreditado em mim e no meu potencial, mesmo com todas as dificuldades. Sua alegria e seu otimismo diário fez com que eu acreditasse cada dia mais que eu era capaz. Agradeço pela amizade, por toda sua dedicação, ensinamentos, paciência, compreensão e confiança. Agradeço muito pelas oportunidades oferecidas e o privilégio de trabalhar ao seu lado; um exemplo de pessoa, professora e orientadora. Este trabalho é fruto de sua orientação.

Ao meu companheiro de pesquisa, que mais pareceu um coorientador, Higor Assis, que sempre se mostrou solícito quando precisei. Você foi fundamental para a realização desse trabalho, sua ajuda em todas as etapas muito acrescentou nos resultados obtidos.

Ao professor Francisco Careta e as alunas do laboratório de cultivo celular Elaine Gimenez e Thainara Vimercati. Agradeço pelos ensinamentos, companheirismo e ajuda sempre que solicitadas.

Ao Joaquim Gasparini por toda ajuda durante a execução do projeto. Seu conhecimento sobre biologia molecular muito contribuiu para a realização desse trabalho.

Ao professor Leonardo Trivilin por toda ajuda na análise estatística.

Aos estagiários do laboratório de patologia Adriano Stelzer, Cleverson Paixão, Gabrielly Portela, Iolanda Braga e Letícia Parmanhani, a técnica Adelaide Moura e a mestranda Natalia Tamiasso. Agradeço pelo convívio diário e por toda ajuda sempre que solicitados. Obrigada por me receberem tão bem e por compartilharem as experiências e o carinho.

A família que o mestrado me deu, Julianne Rodrigues e Alda Lanna. A vida em Alegre se tornou muito mais fácil porque tenho vocês comigo.

A minha amiga, companheira de laboratório e de casa Isabella Cosmo por todo incentivo, companheirismo, apoio, paciência e disponibilidade. Obrigada por compartilhar minhas conquistas, momentos de incerteza e de alegria.

A minha família, pela formação dada que me proporcionou a continuidade nos estudos, obrigada pelo apoio, incentivo e compreensão incondicionais na busca da minha realização pessoal. Mãe, obrigada pelas orações constantes; Pai, obrigada por se orgulhar tanto de mim fazendo-me acreditar que sou capaz e Edgar, obrigada por todas palavras de conforto quando precisei.

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

(Santa Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

ELERT, NATHALIA CHICON. **Efeitos *in vitro* da triiodotironina (T3) na diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas.** 2017. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) são células com alta capacidade de diferenciação, inclusive condrogênica e existem protocolos bem definidos para que essa diferenciação ocorra *in vitro*. No entanto, ainda não existem estudos verificando o efeito dos hormônios tireoidianos sobre o potencial condrogênico das CTM-TA. O que se sabe é que essas células apresentam receptores para hormônios tireoidianos. O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito *in vitro* da triiodotironina (T3) na diferenciação condrogênica de CTM-TA de ratas, durante vários períodos e em várias doses. Foram coletadas CTM-TA de ratas Wistar, que expressaram CD54, CD73 e CD90 e foram cultivadas em meio condrogênico com ou sem T3. Constitui-se cinco grupos: 1) CTM-TA sem T3; e 2,3,4,5) CTM-TA com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM, respectivamente). Foram avaliados aos sete, 14 e 21 dias: morfologia celular, formação de matriz condrogênica e expressão de Sox9 e colágeno II, e colágeno X aos 21 dias. Para as análises foi utilizado o teste de Student Newman Keuls ou o teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste post hoc de Dunn. A dose de 1000 nM aparentemente induziu um aumento celular precoce aos 7 dias de diferenciação. O tratamento hormonal não alterou a formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 aos 14 e 21 dias e expressão dos colágenos II e X em nenhum dos períodos avaliados. No entanto, as doses de 0,01; 1 e 1000 nM T3 diminuíram a expressão de Sox9 aos 7 dias. Conclui-se que o T3 não interfere na diferenciação condrogênica das CTM-TA de ratas, pois, apesar de induzir um aumento celular precoce e diminuir a expressão de Sox9 de forma dose dependente em pelo menos um dos períodos avaliados, não altera a formação de matriz condrogênica, nem a expressão de colágenos II e X em todos os períodos avaliados.

Palavras-chave: condrogênese. hormônio tireoidiano. tecido diposo

ABSTRACT

ELERT, NATHALIA CHICON. **In Vitro Effects of Triiodothyronine on the Chondrogenic Differentiation of Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells**. 2017. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs) are cells with high differentiation capacity, including chondrogenic, and there are well-defined protocols to stimulate this differentiation *in vitro*. Even though these cells have receptors for thyroid hormones, there are no studies investigating the effect of thyroid hormones on the chondrogenic potential of AT-MSCs. The objective of the present study was to investigate the *in vitro* effect of triiodothyronine (T3) on the chondrogenic differentiation of the AT-MSCs of female rats, over several time periods and at several doses. AT-MSCs that expressed CD54, CD73, and CD90 were collected from female Wistar rats and were cultured in chondrogenic medium with or without T3. Five groups were established: 1) AT-MSCs without T3; and 2,3,4,5) AT-MSCs with 0.01, 1, 100, and 1000 nM T3, respectively). The following were evaluated at 7, 14 and 21 days: cell morphology, chondrogenic matrix formation, and expression of Sox9 and collagen II; at 21 days, collagen X expression was evaluated. For the analyses, the Student-Newman-Keuls test or the Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's post hoc test. The 1000 nM dose induced an early cell-size increase at 7 days of differentiation. The hormone treatment did not alter chondrogenic matrix formation, Sox9 expression at 14 or 21 days, or expression of collagen II or collagen X at any time. However, the 0.01, 1, and 1000 nM T3 doses decreased Sox9 expression at 7 days. We conclude that T3 does not affect the chondrogenic differentiation of AT-MSCs from female rat adipose tissue because it does not alter the expression of collagen II or collagen X or the formation of chondrogenic matrix. However, it induces an early cell-size increase and decreases the expression of Sox9 in a dose-dependent manner.

Keywords: chondrogenesis. thyroid hormone. adipose tissue

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Modelo esquemático da diferenciação condrogênica <i>in vivo</i> das CTM (Adaptado de SHUM et al., 2003).....	31
Figura 2	Fluxograma demonstrando os procedimentos realizados ao longo de todo o período experimental. *HE: hematoxilina e eosina; PAS: ácido periódico de Schiff; qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	39
Figura 3	Análise morfológica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C, D, E), 14 (F, G, H, I, J) e 21 (K, L, M, N, O) dias de diferenciação condrogênica. HE, Barra = 48,01µm	47
Figura 4	Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C, D, E), 14 (F, G, H, I, J) e 21 (K, L, M, N, O) dias de diferenciação condrogênica. Alcian Blue-PAS, Barra = 96,02µm.....	48
Figura 5	Produção de matriz condrogênica AB+ em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de diferenciação condrogênica. * $P < 0,05$	49
Figura 6	Produção de matriz condrogênica PAS+ em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de diferenciação condrogênica. * $P < 0,05$	49

Figura 7	Expressão relativa de Sox9, colágeno II (Col II) e colágeno X (Col X) (média ± desvio padrão) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas ou não com triiodotironina (T3) aos sete (A, D), 14 (B, E) e 21 dias (C, F, G) de diferenciação condrogênica. *p<0.05.	50
Figura 8	Expressão relativa de Sox9 (média ± desvio padrão) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas nos grupos controle (A) e tratados com 0,01 nM (B), 1 nM (C), 100 nM (D) e 1000 nM T3 (E) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. *p<0.05.....	51
Figura 9	Expressão relativa de colágeno II (Col II) (média ± desvio padrão) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas nos grupos controle (A) e tratados com 0,01 nM (B), 1 nM (C), 100 nM (D) e 1000 nM T3 (E) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. *p<0.05	51

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

AB – Alcian blue;

AB-PAS - Alcian blue-ácido periódico de Schiff;

ADAS – *Adipose tissue derived adult stem cells*;

ADSC,ATSC – *Adipose tissue derived stromal cells*;

Agc1 - Agrecan

AKI - Injúria Renal Aguda;

ALF - Insuficiência Hepática Aguda;

ASC - *adipose tissue-derived stem cells*;

ATDC – *Clonal mouse embryonal carcinoma cells*;

AMP ciclico – Adenosina monofosfato;

ATP – Adenosina trifosfato;

BMP – Proteínas morfogenéticas ósseas;

BMP-2 – Proteína morfogenética do osso 2;

BMP-4 – Proteína morfogenética do osso 4;

BMP-6 – Proteína morfogenética do osso 6;

BMP-7 – Proteína morfogenética do osso 7;

BSP - Sialoproteína óssea;

Ca+ - Cálcio;

CCAIE – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias;

CCENS – Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde;

CD – Célula Dendrítica;

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais;

CFU-Fs - Unidades formadoras de colônias de fibroblastos;

Col II – Colágeno II;

Col X - Colágeno X;

Col2a1- Colágeno II;

Col10a1 – Colágeno X;

COMP - Proteína oligomérica da matriz da cartilagem;

CT – Células-tronco;

CTA – Células-tronco adultas;

CTCUh - Células-tronco do cordão umbilical humano;

CTE – Células-tronco embrionárias;

CTM – Células-tronco mesenquimais;

CTM-MO – Células-tronco mesenquimais da medula óssea;

CTM-TA – Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo;

D1 - Iodotironinas desiodinases tipo I;

D2 - Iodotironinas desiodinases tipo II;

D3 - Iodotironinas desiodinases tipo III;

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*;

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular;

FACScan – *Fluorescence Activated Cell Analyser*;

FGF – Fator de crescimento fibroblástico;

FGF-2 – Fator de crescimento fibroblástico 2;

Fgfr3 - *Fibroblast growth factor receptor 3*;

FGFb – Fator de crescimento fibroblástico básico;

FL1 – Fluorescência relativa 1;

FSC – *Forward scatter*;

GAG – Glicosaminoglicanos;

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;

G-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos;

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos;

HE – Hematoxilina e eosina;

HGF - Fator de crescimento de hepatócitos;

HIF-1 α - *Hypoxia-inducible factor-1*;

HLA - Antígenos leucocitários humanos;

HPT - Hipotálamo-hipófise-tireoide;

HT – Hormônio tireoidiano;

IFATS – *International Federation of adipose therapeutics and sciences*;

IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina;

IGF-I – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1;

Ihh – *Indian hedgehog*;

IL – Interleucina;

iPS – Células-tronco de pluripotência induzida;

K+ - Potássio;

Klf4 - *Kruppel-Like Factor 4*;

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno;

M-CSF - Fator estimulador de crescimento de macrófago;

MHC I – Complexo principal de histocompatibilidade de classe I;

MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade de classe II;

Mmp13 - *Matrix metalloproteinase 13*;

Na+ - Sódio

N-CAM – Moléculas da célula neural;

OVX – Ovariectomizadas;

PAS – Ácido periódico de Schiff;

PBS – Tampão de fosfato-salino;

PEGDG - *Crosslinked porous three-dimensional hyaluronic acid scaffold*;

PCR – Reação em cadeia da polimerase;

PKA – Proteínas quinase A;

PKC – Proteína quinase C;

PLA - *Processed lipoaspirate cells*;

Ppr - *Parathyroid hormone-related protein receptor*;

PRG4 - *proteoglycan 4*;

PTHrP – Peptídio relacionado ao paratormônio;

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real;

RNA – Ácido ribonucleico;

Runx2 – *Runt-related trasncription factor 2*;

SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo;

SFB – Soro fetal bovino;

Shh – *Sonic hedgehog*;

Sox9 – *SRY-related high mobility group-box gene 9*;

SSC – *Side scatter*;

T3 – Triiodotironina;

T4 – Tiroxina;

TCE - Traumatismo Crânio-encefálico

TGF – Fator de crescimento transformador;

TGF- β – Fator de crescimento transformador β ;

TGF- β 1 – Fatores de crescimento transformador β 1;

TGF- β 2 – Fatores de crescimento transformador β 2;

TGF- β 3 – Fatores de crescimento transformador β 3;

TR – Receptor de hormônio tireoidiano;

TR α – Receptor do hormônio tireoidiano alfa;

TR β - Receptor de hormônio tireoidiano beta;

TRH – Hormônio liberador de tireotrofina;

TSH – Hormônio tireotrófico;

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo;

UFMG – Universidade federal de Minas Gerais;

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Hormônios tireoidianos.....	20
2.2 Células-tronco.....	22
2.3 Células-tronco mesenquimais.....	24
2.3.1 Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.....	26
2.4 Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.....	28
2.4.1 Diferenciação condrogênica <i>in vivo</i> das células-tronco mesenquimais.....	29
2.4.2 Diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.....	34
2.4.2.1 Fatores que influenciam a diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.....	35
2.4.2.1.1 Influência de fatores hormonais na diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Extração e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo em DMEM.....	40
3.2 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.....	40
3.3 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán.....	41
3.4 Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.....	42
3.5 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica...	42
3.6 Expressão dos fatores de transcrição Sox9, colágeno II e colágeno X por qPCR.....	43
3.7 Análise estatística.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais do tecido	

adiposo.....	46
4.2 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán.....	46
4.3 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica...	46
4.3.1 Análise morfológica das células pela coloração de HE.....	46
4.3.2 Formação de matriz condrogênica pela coloração de Alcian Blue-PAS.....	47
4.4 Expressão dos fatores de transcrição Sox9, Col II e Col X.....	49
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICE.....	75

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas com células-tronco têm aumentado de forma extraordinária nos últimos anos, principalmente com relação à sua utilização para o tratamento de diversas doenças incluindo as doenças ou defeitos cartilaginosos (KURODA et al., 2007; WAKITANI et al., 2007; RASTEGAR et al., 2010; NEJADNIK et al., 2010; WAKITANI et al., 2011; LIN; OTSU; NAKAUCHI, 2013; CHENG et al., 2014). Assim, estudos utilizando as células-tronco têm sido desenvolvidos com o intuito de tratar ou prevenir a progressão de lesões no tecido cartilaginoso, pois a progressiva degeneração da cartilagem inevitavelmente conduz a dor, inchaço ou rigidez das articulações. Dessa forma, a regeneração da cartilagem por meio da terapia com células-tronco é uma alternativa promissora para o tratamento de doenças ou defeitos no tecido cartilaginoso. Entretanto, é necessário buscar fatores que poderiam otimizar ou aumentar a diferenciação condrogênica das células-tronco antes do tratamento *in vivo*.

Neste sentido, o tecido adiposo é uma fonte considerável de célula-tronco mesenquimal (CTM) com capacidade de diferenciação multipotente, inclusive condrogênica (ZUK et al., 2001; DAI et al., 2016) e que por isso são amplamente estudadas com a finalidade de serem utilizadas para terapia celular (OEDAYRAJSINGH-VARMA et al., 2006; RADA; REIS; GOMES, 2009; FREITAG et al., 2015). Além disso, a obtenção dessas células é pouco invasiva e oferece uma grande quantidade de CTM no total celular lipoaspirado (DAI et al., 2016, ANSAR et al., 2012), sem necessidade de se realizar um procedimento invasivo (CASTEILLA et al., 2011; LEE et al., 2016; ZHOU et al., 2016; ANSAR et al., 2012).

Especificamente sobre a diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA), já existem protocolos bem definidos (PUETZER et al., 2010; BEANE; DARLING, 2012). No entanto, muitos fatores e mecanismos ainda precisam ser elucidados, principalmente com relação ao aumento do potencial condrogênico dessas células. É sabido que a diferenciação condrogênica pode ser regulada por diferentes fatores como TGF- β , proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (ESTES et al., 2010; PARK et al., 2011), fator de crescimento fibroblástico (FGF) (CHIOU; XU; LONGAKER, 2006), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (ZHOU et al., 2016), fator de

transcrição Sox (ZHANG et al., 2015), estímulo mecânico (FOCAROLI et al., 2014), condições de hipóxia (MERCERON et al., 2010), estrógeno e paratormônio (PTHrP) (KIM; KIM; IM, 2008; SADEGHI et al., 2015). Além disso, a combinação de TGF- β 2 e BMP-7 (KIM; IM, 2009b), TGF- β 2 e IGF-I (KIM; IM, 2009a), TGF- β 1 e BMP-2 (MEHLHORN et al., 2007), TGF- β 3 e BMP-6 (ESTES et al., 2010) potencializam a diferenciação condrogênica de CTM-TA. Adicionalmente, as CTM-TA apresentam receptores nucleares para hormônios tireoidianos (ORTEGA et al., 2009). Por isso, é provável que essas células respondam à adição de T3 com aumento da diferenciação condrogênica.

Os hormônios tireoidianos influenciam *in vivo* o crescimento ósseo, pois regulam os processos de diferenciação e maturação dos condrócitos da zona hipertrófica ou de maturação da placa epifisária (ROBSON et al., 2000). Esses hormônios estimularam também o crescimento e a maturação *in vitro* do tecido cartilaginoso embrionário (BURCH; LEOVITZ, 1982). Além disso, em cultura de tíbias de ratos, os hormônios tireoidianos estimularam o crescimento dos condrócitos da placa epifisária, principalmente da zona hipertrófica (MIURA et al., 2002) e em culturas de condrócitos e de ATDC cells (*clonal mouse embryonal carcinoma cells*) estimularam a hipertrofia dessas células (ROBSON et al., 2000; SIEBLER et al., 2002; OKUBO; REDDI, 2003; MUELLER; TUAN, 2008).

No entanto, não existem estudos verificando o efeito dos hormônios tireoidianos sobre o potencial condrogênico das CTM do tecido adiposo. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito *in vitro* da triiodotironina (T3) na diferenciação condrogênica de CTM-TA, nos períodos de sete, 14 e 21 dias e nas doses de 0,01; 1; 100 e 1000 nM de T3.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hormônios tireoidianos

A tireoide é uma glândula endócrina que sintetiza dois hormônios principais, a tiroxina e a triiodotironina, usualmente chamados de T4 e T3, respectivamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; GUYTON; HALL, 2011). A função desses dois hormônios são qualitativamente iguais, mas diferem na intensidade de ação, sendo a T3 cerca de quatro vezes mais potente que a T4 (GUYTON; HALL, 2011). A ação desses hormônios se inicia durante a embriogênese e persiste durante toda a vida adulta, uma vez que alguns órgãos que sofrem ação dos hormônios tireoidianos (HT) ainda são imaturos ao nascimento (NUNES, 2003).

A síntese dos HT é altamente dependente do iodo. Primeiramente, o iodo é absorvido por meio da alimentação pelo trato digestório e transportado pelas proteínas da membrana basal das células foliculares para o citoplasma. Após ocorrer a captação do íon de iodo, o íon é oxidado e convertido para sua forma ativa pela enzima tireoperoxidase. A tireoperoxidase catalisa a incorporação do I^+ aos resíduos tirosina e liga as moléculas de iodotirosina na tireoglobulina, que é a forma armazenada dos dois hormônios dentro do folículo tireoideo. A tirosina, posteriormente, passa a ser iodada pela tireoide, podendo receber um átomo de iodo (monoidotirosina) ou dois (diidotirosina). O hormônio T3 (triiodotironina) é formado pela ligação entre uma monoidotirosina e uma diidotirosina e o T4 (tetraiodotironina ou tiroxina) pela ligação de duas diidotirosinas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; GUYTON; HALL, 2011).

A secreção tireoidiana é regulada principalmente pelo hormônio liberador de tirotrófina (TRH), que é produzido no hipotálamo e, por meio do sistema porta hipotalâmico-hipofisário, se dirige à adenoipófise, se liga em receptores específicos no tirotrofo e induz a síntese e secreção de hormônio tireotrópico (TSH) (NUNES, 2003; GUYTON; HALL, 2011; WOJCICKA; BASSET; WILLIANS, 2013). O TSH se liga então à receptores presentes na membrana da célula folicular tireoidiana e induz a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos HT e estimula a secreção hormonal (NUNES, 2003). A circulação de T3 e T4 atua no hipotálamo e na hipófise para inibir a síntese e a secreção de TRH e TSH. Assim, o estado sistêmico da

tireoide é mantido pelo hipotálamo-hipófise-tireóide (HPT) por meio de um *loop* de retroalimentação negativa (WOJCICKA; BASSET; WILLIANS, 2013).

A sinalização dos HT ocorre por meio da interação de receptores tireoidianos (TRs) com promotores da expressão gênica e esse processo pode ativar ou reprimir a transcrição de genes (NUNES, 2003; BIANCO; KIM, 2006). Isso implica no estímulo ou bloqueio da síntese de proteínas específicas, mecanismo pelo qual os HT exercem seus efeitos biológicos nas células (NUNES, 2003), como por exemplo a proliferação, diferenciação e apoptose (WOJCICKA; BASSET; WILLIANS, 2013).

Porém, antes de agir sobre os genes, um átomo de iodo é removido de quase todas as moléculas de tiroxina, formando então a triiodotironina (GUYTON; HALL, 2011). Esse fenômeno é chamado de desiodinação. As iodotironinas desiodinases do tipo I, II e III (D1, D2 e D3, respectivamente) regulam a atividade dos HT via remoção de iodo da molécula precursora (NUNES, 2003; BIANCO; KIM, 2006). A proteína D2 gera o T3 via desiodação de T4. No entanto, D3 inativa o T3, em menor grau, impedindo que o T4 seja ativado (BIANCO; KIM, 2006). A D1 é expressa predominantemente no fígado e rins e tem sua atividade aumentada no hipertireoidismo, no entanto é diminuída no hipotireoidismo. A D2 é altamente expressa no sistema nervoso central, hipófise, tecido adiposo marrom e placenta. Ao contrário, ela tem sua atividade aumentada no hipotireoidismo e diminuída no hipertireoidismo. A D3 tem alta taxa de expressão nos tecidos em desenvolvimento e, assim como a D1, tem sua atividade aumentada no hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo (NUNES, 2003).

Os receptores para os hormônios tireoidianos variam em quantidade e em expressão nos variados tipos de tecidos do organismo. As três proteínas TR funcionais, TR α 1, TR β 1 e TR β 2, são codificados pelos genes THR α e THR β , localizados no cromossomo 17 e 3, respectivamente (NUNES, 2003; WOJCICKA; BASSET; WILLIANS, 2013).

Os receptores TR α 1 e TR β 1 são expressos em praticamente todos os tecidos, mas a quantidade e os papéis diferem dependendo do estágio de desenvolvimento do organismo e no tipo de tecido. No entanto, a expressão de TR β 2 é restrita ao hipotálamo, hipófise e órgãos sensoriais onde o ele regula o eixo HPT e o tempo de início da audição e da visão (WOJCICKA; BASSET; WILLIANS, 2013).

Apesar do consenso que a ação dos HT se dê por ativação/inibição da

transcrição de genes específicos, alguns efeitos são observados em tempo muito curto para justificar uma ação nuclear. Nesse contexto, foi sugerido que os HT também exerçam atividades extracelulares e não genômicas (NUNES, 2003). Como exemplo de ações não genômicas, os HT atuam na membrana plasmática na modulação de níveis intracelulares de Na^+ , Ca^{2+} , K^+ ; transporte de glicose e aminoácidos em hemácias e cardiomiócitos em cultura (NUNES, 2003), elevação da síntese de ATP mitocondrial, fosforilação oxidativa e parece envolver a ativação de mensageiros secundários intracelulares, tais como o AMP cíclico (GUYTON; HALL, 2011). Outras funções não genômicas dos HT incluem a ativação da PKA (proteína quinase A), da PKC (proteína quinase C), da ERK/MAPK (quinase regulada por sinais extracelulares e proteína cinase ativada por mitógeno, respectivamente) e a regulação do metabolismo fosfolipídico (KAVOK et al., 2001).

Adicionalmente, tem-se o conhecimento as CTM apresentam receptores nucleares para hormônios tireoidianos (GRUBER et al., 1999; SIDDIQI et al., 2002) e sabe-se também que os hormônios tireoidianos influenciam in vivo o crescimento ósseo, pois regulam os processos de diferenciação e maturação dos condrócitos da zona hipertrófica ou de maturação da placa epifisária (ROBSON et al., 2000). Além disso, é sabido ainda que os hormônios tireoidianos estimulam o crescimento e a maturação in vitro do tecido cartilaginoso embrionário (BURCH; LEBOVITZ, 1982). Em cultura de CTM-MO de humanos, a triiodotironina (T3) mediada pela BMP-4 estimula a hipertrofia dessas células (KARL et al., 2014).

Dessa maneira, as ações que os HT desencadeiam nas células alvo repercutem em efeitos biológicos na atividade dos vários tecidos e sistemas, os quais, em geral, têm sua atividade elevada quando sob a ação destes hormônios (NUNES, 2003).

2.2 Células-tronco

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem um elevado potencial proliferativo e capacidade de auto-renovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população e podem se diferenciar em vários tipos celulares especializados (LEMISCHKA, 2005; BYDLOWSKI et al., 2009; DU et al., 2015), como

condroblastos, osteoblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (PITTENGER et al., 1999). Em virtude a essas características, a terapia celular utilizando células-tronco emergiu como uma terapêutica promissora para diversas doenças ou lesões em órgãos como a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), Injúria Renal Aguda (AKI), Insuficiência Hepática Aguda (ALF), Acidente vascular cerebral, Traumatismo Crânio-encefálico (TCE) (MONSEL et. al, 2014), lesões articulares com perda ou deformação de discos cartilagosos (KUNISAKI et al., 2007), lesões no tecido ósseo (CHEN et al., 2012) e doença de Parkinson (WOLFF et al. 2011).

As células-tronco podem ser subdivididas em células-tronco embrionárias (CTE), células-tronco adultas (CTA), células-tronco do cordão umbilical humano (CTCUh) e células-tronco de pluripotência induzida (iPS - *induced Pluripotent Stem Cells*). As CTE são derivadas da massa interna do blastocisto e são classificadas como pluripotentes (DU et al., 2015), pois podem se diferenciar em todas as células do indivíduo em formação, ou seja, em qualquer tipo celular originário de uma das três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma (WAGERS; WEISMAN, 2004). Porém, as principais desvantagens das CTE são a dificuldade no isolamento, potencial capacidade de formar teratomas e controvérsias éticas relacionadas à utilização de embriões humanos (DU et al., 2015). No entanto, no Brasil, de acordo com o Art. 5º da Lei da Biossegurança Nº 11.105, de 24 de março de 2005, é permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de CTE obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento, atendidas as seguintes condições: I- sejam embriões inviáveis; ou II- sejam embriões congelados há três anos ou mais.

As CTA são células indiferenciadas, multipotentes e provenientes do feto ou de indivíduos adultos. São encontradas em quase todos os tecidos, incluindo a tecido adiposo, medula óssea, sangue periférico, sangue do cordão umbilical, cérebro, timo, músculo, fígado e pulmão. Sabe-se que as CTA se encontram tipicamente em um estado de dormência sob circunstâncias normais e começam a proliferar e diferenciar em resposta a alterações patológicas e a estímulos externos (DU et al., 2015). Uma vantagem em se utilizar CTA é que as mesmas são pouco imunogênicas, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alogênicos (BOBIS; JARROCHA; MAJKA, 2006).

As CTCUh são células-tronco hematopoiéticas e apresentam algumas vantagens quando comparadas a CTE e CTA, pois o cordão umbilical é rotineiramente descartado e a natureza extracorpórea desta fonte celular facilita o isolamento e extração. Além disso, outra vantagem na utilização dessas células é que as mesmas não expressam moléculas de MHC II (complexo principal de histocompatibilidade de classe II) e possuem baixa expressão de moléculas MHC I (complexo principal de histocompatibilidade de classe I), sendo assim possível fonte de transplante celular alogênico (FAN et al., 2010).

As células-tronco de pluripotência induzida (iPS) são células geneticamente modificadas e reprogramadas por meio de mecanismos de transfecção celular, gerando exemplares similares às células embrionárias (TAKAHASHI et al., 2007) pela incorporação de fatores transcricionais que são altamente expressados pelas CTE, como os fatores Oct3/4, Sox2, c-Myc, e *Kruppel-Like Factor 4* (Klf4), por meio de transdução retroviral (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Essas células foram primeiramente desenvolvidas em 2006 utilizando fibroblastos de ratos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Em 2007 essa técnica foi aplicada em fibroblastos dérmicos humanos (TAKAHASHI et al., 2007). Essa técnica consiste na reprogramação do DNA pela inserção de vírus contendo os genes Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc. Esses genes atuam fazendo com que a célula volte ao estágio de uma célula-tronco embrionária, possuindo mesma morfologia, proliferação, antígenos de superfície, expressão gênica e atividade da telomerase (TAKAHASHI et al., 2007).

2.3 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM), também chamadas de células-tronco estromais, células-tronco mesenquimais da medula, células estromais da medula e células progenitoras adultas multipotentes (LINDNER et al., 2010), foram inicialmente descritas por Friedenstein e colaboradores em 1966 como uma subpopulação de células da medula óssea, não hematopoiéticas. Os autores descreveram o isolamento de células clonogênicas aderentes ao substrato, que possuíam formato de espículas e eram depositadas em monocamadas e que foram definidas como unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-Fs) (BYDLOWSKI et al., 2009).

Essas células foram classificadas como multipotentes, uma vez que dão origem a vários tipos de células maduras da linhagem mesodérmica, como condrócitos, osteoblastos e adipócitos *in vitro* e *in vivo* (BYDLOWSKI et al., 2009; LINDNER et al., 2010). Sabe-se que, além da linhagem mesodérmica, as CTM também possuem potencial de diferenciação endodérmico e neuroectodérmico *in vitro* (KOLF; CHO; TUAN, 2007).

As CTM também são capazes de se diferenciar *in vitro*, sob condições apropriadas, em outras linhagens celulares, como tenócitos e células endoteliais. Também há relatos de que essas células podem diferenciar-se em miócitos esqueléticos e cardiomiócitos e em células de origem não mesodérmica, como hepatócitos, células produtoras de insulina e neurônios (BYDLOWSKI et al., 2009).

As CTM podem ser obtidas de diversos tecidos como: medula óssea (TAE et al., 2006), tecido adiposo (ZUK et al., 2002; BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006), placenta (IN 'T ANKER et al., 2004), pele (SHIH et al., 2005), sangue do cordão umbilical (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000; SARUGASER et al., 2005; BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006), polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000), pulmão, músculo esquelético (TAE et al., 2006), fluido amniótico (NADRI; SOLEIMANI, 2007) e membrana sinovial (TAE et al., 2006).

Uma limitação especial em estudos com CTM é a ausência de um marcador específico, embora um grande número de marcadores tem sido verificados (LINDNER et al., 2010). A expressão dos diversos marcadores pode ser devido aos diferentes métodos de isolamento celular e características da cultura, mas também à variação na origem do tecido e às diferentes espécies (BYDLOWSKI et al., 2009).

De forma geral, as CTM expressam CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD71, CD73 (SH3/4), CD105 (SH2), CD106, CD140b, CD166, Stro1, ICAM-1 (molécula intercelular de adesão 1), CD90 (Thy-1), pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e não expressam CD45, CD31, CD34, CD14, CD18, CD56, CD79, HLA-DR, CD80, CD86 e MHC-II (PITTENGER et al., 1999; LE BLANC; RINGDEN, 2005). Além disso, as CTM são capazes de expressar marcadores de indiferenciação como OCT-4, NANOG e SSAE 3/4 (BAKSH; SONG; TUAN, 2004).

No entanto, segundo a *International Society for Cellular Therapy*, os critérios mínimos para que as células-tronco sejam consideradas CTM são: a) aderência a superfícies plásticas quando mantidas em meio de cultura; b) serem capazes de se

diferenciar em células condrogênicas, osteogênicas e adipogênicas de acordo com o padrão de diferenciação *in vitro* (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006); c) presença de expressão de marcadores na superfície celular como CD73, CD90 e CD105; e d) ausência de marcadores hematopoiéticos CD34, CD45, CD19A (CD79), CD14 ou CD11b (um marcador de célula imune) e HLA tipo II (DOMINICI et al., 2006).

As CTM em contato com outras células, produzem diferentes tipos de fatores de crescimento como fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de crescimento de macrófago (M-CSF), além de interleucinas (IL-1, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15) (MONTEIRO et al., 2010).

2.3.1 Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

O tecido adiposo possui uma complexa organização, composto basicamente por adipócitos maduros e imaturos, células da musculatura lisa vascular, células endoteliais, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e CTM (CASTEILLA et al., 2005; SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007).

O primeiro trabalho que evidenciou a presença de CTM no lipoaspirado humano foi produzido em 2001, e, após essa afirmação, deu-se início a uma série de pesquisas, tornando as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) uma fonte alternativa as células-tronco mesenquimais da medulla óssea (CTM-MO) (ZUK et al., 2001). As CTM-TA podem ser extraídas do tecido adiposo intra-abdominal (omento, próximo aos intestinos e em áreas perirenais) ou subcutâneo (nádegas, subcutâneo posterior ao fêmur e abdômen) (LOCKE; WINDSOR; DUNBAR, 2009; RADA; REIS; GOMES, 2009; CASTEILLA et al., 2011), sendo que já foram isoladas de diversas espécies como ratos (ZAMINY et al., 2008; ARRIGONI et al., 2009; BOELONI et al., 2013b), camundongos (MALLADI et al., 2006), coelhos (PEPTAN; HONG; MAO, 2006; ARRIGONI et al., 2009), cães (LI et al., 2007; VIEIRA et al., 2010), suínos (QU et al., 2007; ARRIGONI et al., 2009) e humanos (ZUK et al., 2002; TOYODA et al., 2009; CHEN et al., 2012).

Para o isolamento das CTM-TA utiliza-se o método enzimático pelo emprego da enzima colagenase tipo I (ZUK et al., 2001; MIZUNO, 2009; BEANE; DARLING,

2012). Sendo que inicialmente são feitos cortes no tecido adiposo e lavagem em solução salina para remover as células sanguíneas com posterior incubação com colagenase tipo I a 37°C e 5% CO₂ para separar a fração celular (ZUK et al., 2001; BEANE; DARLING, 2012; BOELONI et al., 2013b). Após esse processo, as CTM-TA podem ser cultivadas e apresentam a capacidade de se aderir às placas ou garrafas de cultivo (LEVI; LONGAKER, 2011).

Não há consenso sobre a nomenclatura ideal para essas células. Alguns autores referem-se a essas células como células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASC - *adipose tissue-derived stem cells*), células estromais de adulto derivado de tecido adiposo (ADAS - *adipose tissue derived adult stem cells*), células estromais derivadas de tecido adiposo (ADSC, ATSC - *adipose tissue-derived stromal cells*) e células do processado de lipoaspirado (PLA - *processed lipoaspirate cells*). Para resolver esta questão, a *International Fat Applied Technology Society* adotou o termo células-tronco derivadas do tecido adiposo para identificar a população de células multipotentes que são aderentes a superfícies plásticas (BUNNELL et al., 2008).

De forma geral, as células-tronco obtidas do tecido adiposo possuem as mesmas características das CTM-MO (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007) como facilidade de proliferação, capacidade de se diferenciarem em células de origem mesodérmica (condrócitos, osteoblastos, miócitos e adipócitos), expressão de marcadores de superfície e utilização para terapia celular (GRONTHOS et al., 2001; ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; MUSINA; BEKCHANOVA; SUKHIKH, 2005; BEANE; DARLING, 2012).

As CTM-TA secretam fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) e IGF-I (REHMAN et al., 2004; CAO et al., 2005; NAKAGAMI et al., 2005).

Quando se compara as CTM-TA com outras CTM, verifica-se que as CTM-MO apresentam grande capacidade de expansão *in vitro* e de diferenciação e por isso são muito estudadas (TAE et al., 2006). Porém, o método de extração das mesmas por meio da aspiração da medula óssea é invasivo (DU et al., 2015) e se apresentam em pequeno número na medula óssea, correspondendo a cerca de 0,01% a 0,0001% das células nucleadas (BYDLOWSKI et al., 2009).

Em contrapartida, o tecido adiposo é uma fonte atrativa para pesquisadores

para a terapia celular (CASTEILLA et al., 2005; OEDAYRAJSINGH-VARMA et al., 2006, ZHOU et al., 2016), uma vez que existem grandes vantagens em se utilizar esse tecido como fonte de células-tronco a citar: a) presença de grandes quantidades de CTM correspondendo a cerca de 2% do total celular lipoaspirado (KINGHAM et al., 2007); e b) essas células são facilmente obtidas de lipoaspirações com pouco desconforto para o paciente e sem haver necessidade de se realizar um procedimento invasivo (ZUK et al., 2001; CASTEILLA et al., 2011).

Adicionalmente, pesquisas demonstraram diferenças entre as CTM com relação aos potenciais osteogênico e condrogênico. Estudos verificaram que: a) as CTM-TA de ratas jovens e de ratas ovariectomizadas com osteoporose possuem maior potencial osteogênico quando comparadas às CTM-MO; b) as CTM-TA de ratas adultas apresentam potencial osteogênico semelhante ao das CTM-MO e as CTM-TA de ratas OVX com osteoporose têm potencial osteogênico semelhante ao das CTM-MO de ratas jovens (BOELONI et al., 2014); c) o potencial osteogênico de CTM-MO de cães jovens foi maior em comparação às CTM-TA (ALVES et al., 2014). Assim, O potencial osteogênico entre as CTM do tecido adiposo e da medula óssea depende da idade, da higidez do tecido ósseo da rata (BOELONI et al., 2014), bem como da espécie do indivíduo (ALVES et al., 2014).

Com relação a diferenciação condrogênica, verificou-se que as CTM-TA de humanos apresentam potencial superior em comparação as CTM-MO de pacientes com osteoartrite (PAGANI et al., 2017). No entanto, outro estudo constatou o oposto, ou seja, as CTM-MO de humanos apresentaram potencial de diferenciação condrogênico superior as CTM-TA quando cultivados em associação com biomateriais (KOHLLI et al., 2015). Além disso, pesquisas demonstram que as CTM do da medula óssea apresentam um potencial condrogênico superior as CT do tecido adiposo e do cordão umbilical de humanos saudáveis (DANIŠOVIČ et al., 2016).

2.4 Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

As CTM-TA exibem um grande potencial de diferenciação, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em diversos tipos celulares como condrócitos, adipócitos, miócitos e

osteócitos (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007). Especificamente, a diferenciação condrogênica dessas células pode ser mediada por fatores de transcrição, pela adição de indutores químicos específicos como componentes da família TGF- β , dexametasona, insulina, entre outros (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011). Além disso, a eficiência da diferenciação depende de outros fatores como *status* de saúde e idade do paciente doador (BUNNELL et al., 2008; BOELONI et al., 2013b; FAFIÁN-LABORA et al., 2015), visto que estudos sugeriram que o potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica é maior em cultura de células de pacientes humanos e ratos mais jovens quando comparados a doadores mais velhos (BUNNELL et al., 2008; BOELONI et al., 2013a; FAFIÁN-LABORA et al., 2015).

2.4.1 Diferenciação condrogênica *in vivo* das células-tronco mesenquimais

O processo de condrogênese *in vivo* pode ser dividido em algumas etapas, sendo: proliferação, condensação, determinação, diferenciação e hipertrofia (SHUM et al., 2003).

Inicialmente ocorre uma agregação das células mesenquimais condroprogenitoras precedido de um processo de condensação que se caracteriza por alterações no citoesqueleto e adesão celular (DELISE; FISCHER; TUAN, 2000; HALL; MIYAKE, 2000). Nessa etapa as células começam a expressar moléculas de adesão que mediam as interações célula-célula como N-caderina (DELISE; TUAN, 2002), moléculas da célula neural (N-CAM) (HALL; MIYAKE, 2000), fibronectina e laminina (SHUM et al., 2003). A expressão da fibronectina é regulada pelo fator de crescimento transformante beta (TGF- β), que controla o início da fase de condensação (ROARK; GREER, 1994). Durante toda a condensação ocorre a expressão de N-caderinas, que podem ser co-reguladas pela proteína morfogenética óssea (BMP) e Wnts (SHUM et al., 2003). As interações célula-célula e célula-matriz ativam quinases citoplasmáticas, fosfatases e GTPases, que podem ser moduladas por fatores de crescimento e fatores de diferenciação, como BMP e Wnts (OH et al., 2000).

Já condensadas, as células mesenquimais iniciam um processo de

determinação celular, no qual uma série de interações genéticas dirigem a progressão do desenvolvimento de uma linhagem celular. Durante essa fase ainda há expressão de N-caderinas e fibronectinas e ocorre o início da expressão de colágeno II, colágeno IX, colágeno XI e hialuronato.

Após a determinação, essas células passam por um processo de diferenciação e se tornam condroprogenitoras, posteriormente se diferenciam em condrócitos e, eventualmente, tornam-se condrócitos hipertróficos. Com o início da fase de diferenciação, há expressão de agrecan, aumento da expressão de proteoglicanos e colágeno II que compõem a matriz extracelular.

À medida que as células se diferenciam em condrócitos hipertróficos há a produção de colágeno X e exposições aos níveis aumentados de fosfatase alcalina, enquanto a secreção de colágeno tipo II e IX é reduzida. O colágeno I está presente especificamente na matriz de células mesenquimais indiferenciadas e é substituído por colágeno II, tal como os condroprogenitores se diferenciam em condrócitos. A *proteína oligomérica da matriz da cartilagem* (COMP) é expressa durante condensação das células mesenquimais e continua durante a hipertrofia celular. A expressão de colágeno X é restrito aos condrócitos hipertróficos antes de ocorrer a mineralização (SHUM et al., 2003), como está esquematizado na figura 1. Assim, os condrócitos hipertróficos sofrem apoptose, ocorre a mineralização e conseqüentemente permitem a ossificação (DE CROMBRUGGHE et al., 2000; DE COMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001).

Resumidamente, cada condrócito durante a condrogênese é caracterizado pela expressão de genes específicos (LEFEBVRE; SMITS, 2005). Por exemplo, condrócitos iniciais expressam Col2a1 (colágeno II) e Agc1 (agrecan); condrócitos colunares expressam Fgfr3 (*fibroblast growth factor receptor 3*); condrócitos pré-hipertróficos expressam Ppr (*parathyroid hormone-related protein receptor*), *Ihh* (*Indian hedgehog*) e Col10a1 (colágeno X); e condrócitos hipertróficos expressam Col10a1 somente. Condrócitos terminais expressam Mmp13 (*matrix metalloproteinase 13*) e BSP (sialoproteína óssea) e mineralizam a matriz extracelular juntamente com osteoblastos (DY et al., 2012).

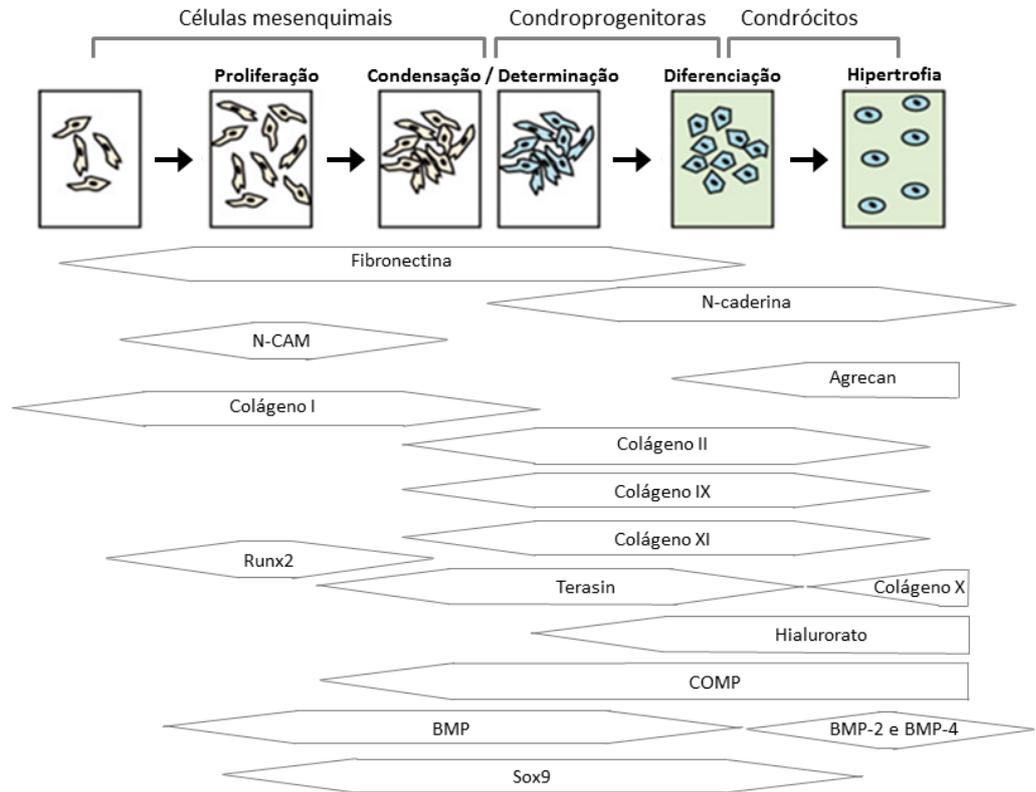


Figura 1. Modelo esquemático da diferenciação condrogênica *in vivo* das CTM (Adaptado de SHUM et al., 2003)

Importante ressaltar que todo o processo de maturação dos condrócitos e do desenvolvimento ósseo endocondral são regulados por vários fatores como BMP, IGF, *Ihh*, PTHrp, Wnt, Sox9, Runx2 e hormônios tireoidianos (LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998; DE CROMBRUGGHE et al., 2000; LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001; WANG; SHAO; BALLOCK, 2007; SHU et al., 2011; DY et al., 2012; CHEN et al., 2014).

Nesse contexto, a via de sinalização BMP-Smad tem papel fundamental no desenvolvimento ósseo endocondral visto que está envolvida em todas as fases da condrogênese. BMP se liga aos receptores serina e treonina que subsequentemente fosforila Smad1, 5 e 8 (R-Smads) que por sua vez forma um complexo com Smad4 antes de entrar no núcleo para regular a transcrição do gene alvo (BANDYOPADHYAY et al., 2006).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) estimulam a condensação, proliferação e a síntese de matriz condrogênica (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004; VAN DER KRAAN; DAVIDSON; VAN DEN BERG, 2010). BMP-2 e BMP-4 são altamente

expressos em condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos na placa de crescimento (FENG et al., 2003; NILSSON et al., 2007).

Especificamente a proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) é um membro da super-família TGF- β que é essencial para a proliferação e maturação durante o desenvolvimento endocondral. Essa proteína induz a expressão de Runx2 (*Runx2* (*Runx2* *related transcription factor 2*)) tanto em nível transcricional quanto pós transcricional (SHU et al., 2011). Além disso, BMP-2 também estimula a expressão de Sox9 (UUSITALO et al., 2001).

O Runx2 também é um fator de transcrição essencial para a condrogênese. Esse fator regula diretamente genes do ciclo celular (Gpr132, Sfn, c-Myb e Cyclin A1) e assim controla a proliferação, além de influenciar também na diferenciação de condrócitos (CHEN et al., 2014). Consequentemente, Runx2 é considerado um dos responsáveis pelos estágios finais do desenvolvimento ósseo endocondral (YOSHIDA et al., 2004). *In vivo*, o Runx2 pode ser inibido diretamente pelo Sox9 (ZHOU et al., 2006).

Sox9 (SRY-box 9) começa a ser expresso em células mesenquimais antes da condensação e continua sua expressão durante todos os estágios da condrogênese, mas não é expresso em condrócitos hipertróficos (WRIGHT et al., 1995; NG et al., 1997; ZHAO et al., 1997; LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998; AKIYAMA et al., 2002; DY et al., 2012). Sox9 regula a expressão de marcadores importantes para a proliferação e hipertrofia de condrócitos (BELL et al., 1997; DY et al., 2012) e bloqueia a diferenciação osteoblástica (DY et al., 2012). Sox5 e Sox6 também são expressos durante a condrogênese e não são expressos em condrócitos hipertróficos, mas ao contrário do Sox9, não são expressos durante a condensação mesenquimal (WRIGHT et al., 1995; NG et al., 1997; ZHAO et al., 1997; LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998; KOCH et al., 2000). No entanto, somente o Sox9 é importante para estimular a expressão de *Ihh* e PTHrP em condrócitos (SMITS et al., 2001; AKIYAMA et al., 2002).

A expressão de Sox9 é controlada por alguns fatores como BMP-2, BMP-4 e *Sonic hedgehog* (Shh) que induzem e mantem a expressão desse gene (MURTAUGH; CHYUNG; LASSAR, 1999; ZEHENTNER; DONY; BURTSCHER, 1999; SEMBA et al., 2000). O FGF também aumenta a expressão de Sox9 tanto em condrócitos quanto em células mesenquimais indiferenciadas mediado via proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (MURAKAMI et al., 2000). Além disso, os

hormônios tireoidianos inibem a ação do Sox9, a fim de promover a hipertrofia dos condrócitos (OKUBO; REDDI, 2003).

Existem outros dois ligantes (PTHrP e *Ihh*), secretados pelos condrócitos, que são reguladores importantes na condrogênese e formação óssea endocondral. Esses ligantes promovem a proliferação de condrócitos, sendo que o *Ihh* é secretado por condrócitos pré-hipertróficos e induz a expressão de PTHrP na região periarticular e que por sua vez promove a proliferação celular (KRONENBERG, 2006). Adicionalmente, as vias TGF- β /BMPs, FGF e Wnt/ β -catenin juntamente com *Ihh* regulam a diferenciação de condrócitos (ZOU; NISWANDER, 1996; ZOU et al., 1997; MININA et al., 2001; SPÄTER et al., 2006).

Os fatores de transcrição Wnts também têm uma importante função moduladora durante a condrogênese. Wnt9a regula a expressão de *Ihh* em condrócitos pré-hipertróficos pela via Wnt/beta-catenina (SPÄTER et al., 2006). Essa via é regulada pelo TGF- β e pela BMP-2 em condrócitos de pintainhos que, por sua vez, medeia a hipertrofia de condrócitos por meio da ativação de Runx2 que consequentemente induz a expressão de Col10a1 (DONG et al., 2006).

Estudos relataram que Wnt-4 age como um regulador positivo na diferenciação terminal dos condrócitos ao passo que bloqueia o início da condrogênese, enquanto Wnt-5 possui efeito oposto em um modelo de pintainho (CHURCH et al., 2002). Além disso, um estudo demonstra que a via canônica Wnt3a aumenta a condrogênese induzida por BMP-2 e Wnt3a por sua vez, regula a expressão de BMP-2, sugerindo um circuito regulador durante a diferenciação condrogênica (KOLF et al., 2007).

A triiodotironina (T3) regula a diferenciação terminal de condrócitos da placa epifisária de ratos cultivada *in vitro*, e isso é modulado em parte pela via Wnt/ β -catenina. A T3 regula a expressão de Wnt-4, promove o acúmulo intracelular de β -catenina e estimula a expressão de Runx2/cbfa1. Sendo que a superexpressão de Wnt-4 ou de β -catenina promove a diferenciação terminal dos condrócitos da placa de crescimento (WANG; SHAO; BALLOCK, 2007).

O IGF-I é um importante regulador da ossificação endocondral visto que estimula a proliferação e hipertrofia de condrócitos (AKIYAMA et al., 2004; LOGAN; NUSSE, 2004; DONG et al., 2005; DONG et al., 2006). Além disso, IGF-I promove condrogênese por induzir a expressão de colágeno II, agrecan e Sox9 e a formação

de colágeno II e agrecan, sendo esse efeito potencializado pela ação do TGF- β 1 (ZHOU et al., 2016).

2.4.2 Diferenciação condrogênica *in vitro* das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

Para induzir a diferenciação condrogênica das CTM-TA e das demais CTM, muitas estratégias têm sido exploradas *in vitro*, como a adição de fatores de crescimento no meio de cultivo, estimulação mecânica, uso de biomateriais ou uma combinação dessas técnicas (NESIC et al., 2006).

De maneira geral, a diferenciação ocorre em aproximadamente duas a três semanas e é realizada em um sistema de *pellet* com protocolos bem definidos que consiste na presença de meio básico denominado *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) enriquecido com antibióticos, antifúngicos e 10% de soro fetal bovino. No meio de cultura são adicionados fatores como dexametasona, ácido ascórbico, insulina, transferrina, ácido selenoso, ácido linoleico e albumina sérica bovina (BEANE; DARLING, 2012). Outros suplementos podem ser adicionados como piruvato de sódio, prolina, L-glutamina, TGF- β e BMP (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011).

Segundo Barry e colaboradores (2001), durante a diferenciação condrogênica *in vitro* ocorrem três estágios bem definidos: 1) estágio I, diferenciação inicial com expressão de fibromodulina, COMP, agrecan, versican e decorin, deposição inicial de glicosaminoglicanos, além da formação de colágeno I e X; 2) estágio II, expressão de colágeno II e condroaderin e produção de sulfato de condroitina e; 3) estágio III, acúmulo de glicosaminoglicanos e formação de condrócitos maduros.

Os modelos *tridimensionais* de cultura celular (*pellets*) favorecem a indução da primeira fase da condrogênese que consiste em uma condensação celular, juntamente com interações célula-célula e célula-matriz extracelular (AULETTA et al., 2011; GIULIANI et al., 2013). Inicialmente, as células apresentam um formato fibroblastoide e posteriormente, as células aumentam de volume, proliferam e sintetizam componentes típicos da matriz cartilaginosa como colágenos tipo I (LARSSON et al., 1991; BARRY et al., 2001), tipo II (LARSSON et al., 1991; BARRY et al., 2001; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; GIULIANI et al., 2013) e tipo X

(LARSSON et al., 1991; BARRY et al., 2001; GIULIANI et al., 2013), proteoglicanos como agrecan (LARSSON et al., 1991; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; BARRY et al., 2001; GIULIANI et al., 2013), versican (MEHLHORN et al., 2006), decorin, biglican e fibronectina (LARSSON et al., 1991; BARRY et al., 2001) e glicosaminoglicanos (BARRY et al., 2001). Sendo o colágeno II e o agrecan os constituintes da matriz observados em maior quantidade (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011). Por fim, as células adquirem um formato arredondado semelhante ao condroblasto (GIULIANI et al., 2013).

Após duas a três semanas de diferenciação, alguns marcadores da condrogênese são utilizados como colágenos II, IX, X e XI (JACKSON et al., 2007; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011), proteoglicanos como o agrecan e glicosaminoglicanos (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011). Os proteoglicanos são detectados por colorações como azul de toluidina, os glicosaminoglicanos pelas colorações de alcian blue ou safranina-O (ESTES et al., 2010; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; BEANE; DARLING, 2012), e os tipos de colágeno podem ser detectados pela técnica de imunohistoquímica ou pela expressão gênica por PCR (reação em cadeia da polimerase) (ESTES et al., 2010; SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011).

2.4.2.1 Fatores que influenciam a diferenciação condrogênica *in vitro* das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

Para que ocorra a diferenciação condrogênica das CTM é necessário meio básico suplementado com diversos fatores . Além disso, faz-se necessário saber como os fatores influenciam na condrogênese *in vitro* para uma melhor compreensão. Neste sentido, é sabido que os estágios da diferenciação condrogênica são regulados por diferentes fatores como TGF- β , proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (ESTES et al., 2010; PARK et al., 2011), fator de crescimento fibroblástico (FGF) (CHIOU; XU; LONGAKER, 2006), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) (ZHOU et al., 2016), fator de transcrição Sox (ZHANG et al., 2015), estímulo mecânico (FOCAROLI et al., 2014), condições de hipóxia (MERCERON et al., 2010) e fatores hormonais (KIM; KIM; IM,

2008; SADEGHI et al., 2015).

Os fatores de crescimento TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 promovem a diferenciação condrogênica das CTM-TA (ESTES et al., 2010; PARK et al., 2011). Estudos demonstraram uma potencialização na diferenciação condrogênica das CTM-TA quando é utilizada a combinação de TGF- β 2 e BMP-7 (KIM; IM, 2009b), TGF- β 2 e IGF-I (KIM; IM, 2009a), TGF- β 1 e BMP-2 (MEHLHORN et al., 2007), TGF- β 3 e BMP-6 (ESTES et al., 2010). Além disso, quando TGF- β é combinado com baixas concentrações de BMP-6 e FGF-2 ocorre uma melhora na condrogênese das CTM-TA proporcionando aumentos significativos dos fatores de transcrição Sox9 e aumento na composição total de glicosaminoglicano, enquanto inibe a osteogênese (QUARTO; LONGAKER, 2006).

O fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) também conhecido como FGF básico (FGFb) é outro fator que melhora a diferenciação condrogênica *in vitro* das CTM-TA de humanos por induzir a expressão de N-caderina, receptor para FGF-2 e Sox9 (CHIOU; XU; LONGAKER, 2006).

Pesquisas demonstraram que o IGF-I associado a estímulo mecânico promove a diferenciação condrogênica de CTM-TA de coelhos, pois potencializa a expressão de colágeno II, agregan e Sox9, promove a proliferação celular e a deposição de proteoglicanos e colágeno, mas não tem efeito na expressão de colágeno X (LI et al., 2012). Além disso, o IGF-I também promove a diferenciação condrogênica de CTM-TA humanas por induzir a expressão de colágeno II, agregan e Sox9 e a expressão de proteínas como colágeno II e agregan, sendo esse resultado potencializado quando se associa IGF-I com TGF- β 1 (ZHOU et al., 2016).

Sox9 (SRY-box 9) é um fator de transcrição que também influencia na condrogênese de CTM-TA visto que, quando esse fator é transfectado em CTM-TA de ratos e essas células são submetidas a um estímulo mecânico, ocorre uma potencialização da proliferação celular e da diferenciação, pois ocorre um aumento da expressão de PRG4 (*proteoglycan 4*), PTHrp, colágeno II, agregan, Sox9 e HIF-1 α , mas não altera colágeno X (ZHANG et al., 2015).

Fatores mecânicos como biomateriais (do inglês *scaffolds*) também podem potencializar a diferenciação condrogênica de CTM, já que fornecem uma estrutura modelo para o desenvolvimento da cartilagem, e também, servem como uma matriz extracelular facilitando a ligação celular, proliferação, diferenciação e integração com a cartilagem adjacente (YOON et al., 2011).

Quando se associou um biomaterial (*porous gelatin based scaffold genipin*) ao cultivo de CTM-TA humanas, houve uma superexpressão de marcadores condrogênicos (SOX9, colágeno II, agregan e versican), o que não ocorreu quando a cultura foi realizada em monocamada (FOCAROLI et al., 2014).

Adicionalmente, quando se cultivou CTM-TA humanas com um biomaterial (*PEGDG-crosslinked porous three-dimensional hyaluronic acid scaffold*) houve potencialização na proliferação celular e na diferenciação condrogênica pois aumentou produção de glicosaminoglicanos e a expressão de Sox9, agregan, colágeno II e colágeno X (YOON et al., 2011).

A hipóxia é outro fator que pode influenciar a condrogênese de CTM-TA. Nesse sentido, quando as CTM-TA humanas foram expostas a condições de hipóxia (5% de tensão de oxigênio) houve expressão precoce de colágeno II e produção de matriz colagênica, mas não alterou a expressão de agregan e síntese de glicosaminoglicanos (MERCERON et al., 2010).

2.4.2.1.1 Influência de fatores hormonais na diferenciação condrogênica *in vitro* das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

Existem poucos estudos sobre a influência de fatores hormonais sobre a diferenciação condrogênica *in vitro* das CTM-TA. Pesquisas demonstram que o estrogênio influencia negativamente a diferenciação condrogênica das CTM-TA humanas, visto que inibe a expressão de colágeno tipo II e reduz a expressão de agregan (SADEGHI et al., 2015).

O peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-TA humanas de forma dose-dependente aumentando a expressão de SOX9 e COL2A1 e a formação de glicosaminoglicanos, porém diminui a expressão de COL10A1 e inibe a hipertrofia celular (KIM; KIM; IM, 2008).

Adicionalmente, sabe-se que a administração de plasma rico em plaquetas autólogo (PRP) a 5% juntamente com insulina (100 nM) associado a *scaffolds* de colágeno em 3D, melhora a diferenciação condrogênica e osteogênica de CTM-TA de humano (SCIOLI et al., 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto utilizou as bases físicas e a infra-estrutura dos seguintes laboratórios: 1) Laboratório de Cultivo de Células do Departamento de Farmácia e Nutrição do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da UFES (CCENS/UFES), 2) Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia e Nutrição do CCENS/UFES; 3) Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Biologia do CCENS/UFES; e 4) Laboratório de Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES). Para a caracterização fenotípica foi utilizado o citômetro de fluxo do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFES. Todos os procedimentos experimentais foram executados segundo as recomendações e a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo conforme protocolo número 062/2013 (Apêndice).

Foram utilizadas quatro ratas Wistar com um mês de idade que foram eutanasiadas com sobredose de anestesia (pentobarbital sódico [30m/kg] por via peritoneal). Imediatamente após este procedimento, o tecido adiposo visceral foi colhido assepticamente e, em seguida, submetido à digestão enzimática para obtenção de um *pool* de células. As CTM-TA foram cultivadas inicialmente em meio de indiferenciação (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) para avaliação da fenotipagem por citometria de fluxo. Posteriormente, as células foram cultivadas em meio de diferenciação condrogênico, acrescido ou não de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dependendo do grupo, por sete, 14 e 21 dias em um sistema de *pellets*. Foram constituídos cinco grupos experimentais de CTM-TA cultivadas em meio condrogênico: 1) CTM-TA sem T3; 2) CTM-TA com T3 (0,01 nM); 3) CTM-TA com T3 (1 nM); 4) CTM-TA com T3 (100 nM); e 5) CTM-TA (1000 nM). Após sete, 14 e 21 dias, foram avaliados: morfologia celular pela coloração de hematoxilina e eosina, formação de matriz condrogênica pela coloração de alcian blue-PAS (ácido periódico de Schiff) e expressão de Sox9 e colágeno II pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Foi avaliada ainda a expressão de colágeno X após 21 dias de diferenciação

condrogênica. Todos os ensaios *in vitro*, foram realizados com quatro repetições em cada grupo e em cada período como descrito detalhadamente a seguir. A ordem dos procedimentos realizados ao longo de todo o período experimental está demonstrada resumidamente na Figura 2.

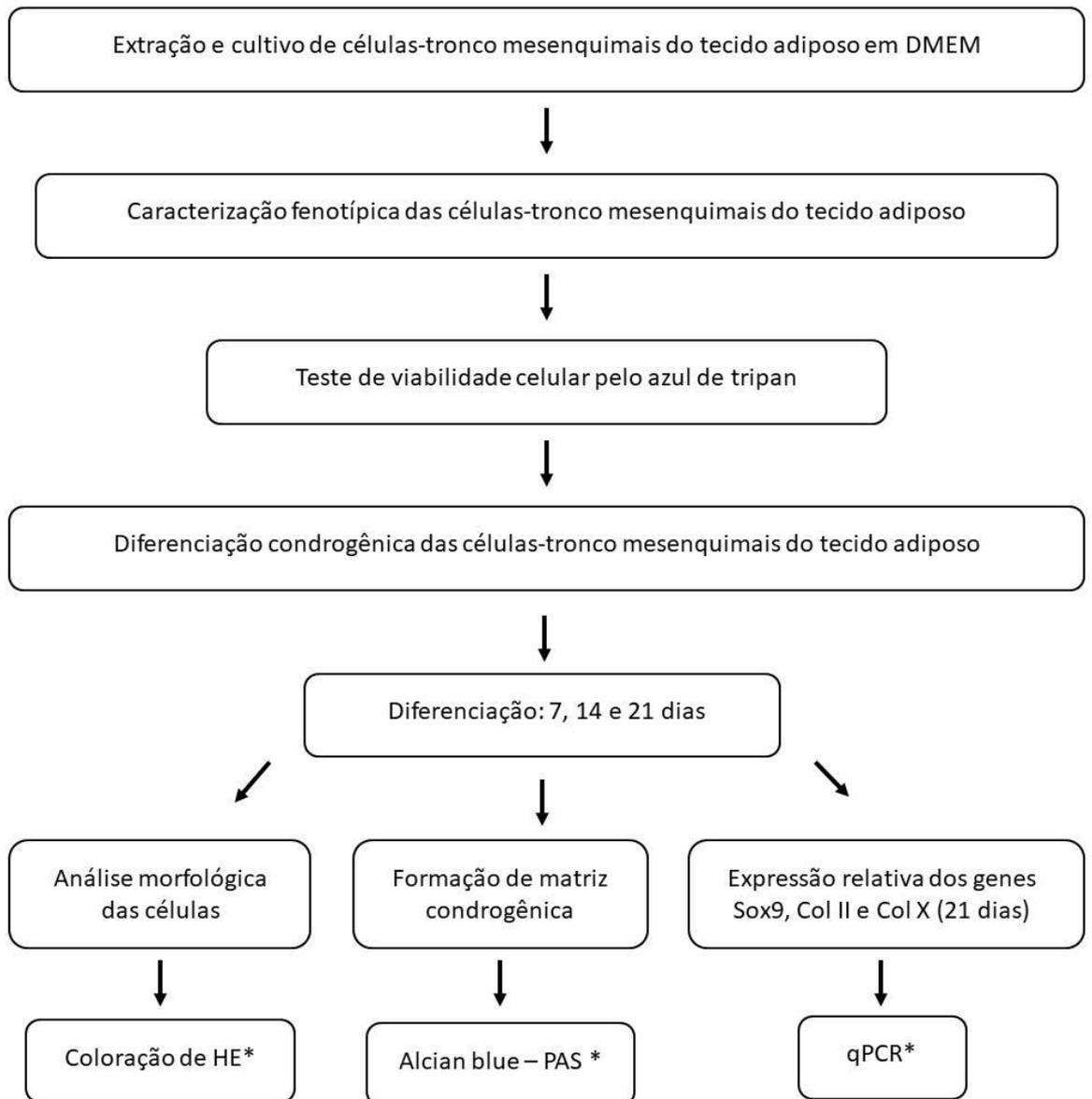


Figura 2. Fluxograma demonstrando os procedimentos realizados ao longo de todo o período experimental. *HE: hematoxilina e eosina; PAS: ácido periódico de Schiff; qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real.

3.1 Extração e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo em DMEM

A extração das CTM-TA foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (BOELONI et al., 2013c; BOELONI et al., 2014). Em um ambiente cirúrgico realizou-se a remoção dos pelos e a antissepsia na pele da região abdominal ventral com posterior laparotomia para colheita do tecido adiposo abdominal. Esse tecido foi colocado em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Invitrogen, CA, USA) enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L) (Gibco, USA). Em seguida, o tecido, cortado em pequenos fragmentos, foi transferido para um tubo com colagenase tipo I a 0,15% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em PBS (solução tampão de fosfato padrão) 0,15M e incubado por 60 minutos a 37°C e 5% de CO₂, agitando-o de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a colagenase foi inativada pela adição de DMEM com 10% SFB (soro fetal bovino) (LGC Biotecnologia, Brasil). Posteriormente, fez-se a centrifugação por 10 minutos a 1400g, obtendo-se três fases: gordura, hemácias e outras células sanguíneas e precipitado (fase estromal). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos mais 10% SFB e cultivado em garrafas T75 em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de microrganismos.

3.2 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, foi realizada a caracterização fenotípica das CTM-TA por citometria de fluxo conforme protocolo já estabelecido (BOELONI et al., 2013ac; BOELONI et al., 2014). Inicialmente, as células foram tripsinizadas com tripsina (0,05% *Trypsin-EDTA* 1X; Gibco, USA), contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços (fundo redondo) com concentração de 1×10^6 células/poço, sendo um poço

para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação. Posteriormente, foi realizada a centrifugação da placa por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante (DMEM) e adição de 2µL do anticorpo primário e 20µL de PBS 0,15M/poço. A placa foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e a placa foi novamente agitada em vórtex. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante e de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço, agitação em vórtex e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Adicionou-se o anticorpo secundário (Alexa Flúor 488, Molecular Probes, Oregon, USA) com diluição de 1:200. A placa foi envolta por papel alumínio e incubada por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e agitação em vórtex. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante, de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µL de PBS 0,15M e 100µL de formaldeído a 4%. A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo *FACScan* (*Fluorescence Activated Cell Analyser*) empregando o *software Cell Quest*, com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (*Forward scatter*) e SSC (*Side scatter*) em escala linear e FL1 (fluorescência relativa) em escala logarítmica que detecta luz de comprimento de onda de 530nm, que corresponde a fluorescência verde, para análises pelo programa *WinMDI* por gráficos de dot plot e histogramas. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 *mouse*), anti-CD54 (clone 1A29 *mouse*), anti-CD73 (clone 5 F/B9 *mouse*) e anti-CD90 (clone Ox-7 *mouse*) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.3 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripan

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação, as CTM-TA foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de Tripan. Inicialmente, as células foram cultivadas em garrafas T75 com DMEM e no momento do teste foram lavadas com PBS (0,15M) e tripsinizadas. As células foram colhidas, centrifugadas a 1400rpm por 10 minutos, ressuspensas em meio e coradas pelo azul

de Tripan. As células inviáveis (em azul) e viáveis (transparentes) foram quantificadas em câmara de Neubauer.

3.4 Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

A diferenciação condrogênica das CTM-TA foi feita por sete, 14 e 21 dias e realizado conforme protocolos previamente definidos (ESTES et al., 2010; SOLCHAGA, PENICK, WELTER, 2011; BEANE; DARLING, 2012). Após o cultivo em DMEM e obtenção de confluência de 80 a 90% das células, o meio foi substituído por meio condrogênico (StemPro Chondrogenesis; Gibco, USA) e as células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, sendo a troca de meio realizada sistematicamente uma vez por semana. Assim, as CTM-TA das ratas foram cultivadas em sistema de *pellets* em uma quantidade previamente padronizada (5×10^5 células), em quatro repetições, em tubos de 15 mL durante sete, 14 e 21 dias com um volume de 500 µL de meio condrogênico por tubo. Após esses períodos foram avaliados: morfologia celular, formação de matriz condrogênica e expressão de Sox9 e Col II. Avaliou-se também expressão de Col X aos 21 dias de diferenciação. As doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina foram estabelecidas conforme estudos realizados por Boeloni et al. (2009) e Boeloni et al. (2013ab), sendo a dose de 0,01 nM semelhante à dose fisiológica.

3.5 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica

Ao término de cada período (sete, 14 e 21 dias), as células cultivadas em tubos de 15 mL e em sistema de *pellets*, foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas em formaldeído 10% tamponado por uma hora e processadas pelo método rotineiro de inclusão em parafina que consistiu na seguinte sequência: 1) álcool 70% (30 minutos), 2) álcool 80% (30 minutos), 3) álcool 90% (30 minutos), 4) álcool absoluto I (30 minutos), 5) álcool absoluto II (30 minutos), 6) álcool absoluto III (30 minutos), 7)

xilol I (20 minutos), 7) xilol II (20 minutos), 8) xilol III (20 minutos), 9) parafina I (20 minutos), 10) parafina II (20 minutos) e, 11) parafina III (20 minutos).

Após o processamento, as amostras foram cortadas em micrótomo (4 µm) e submetidas às colorações de hematoxilina-eosina (HE) e AB-PAS (alcian blue-ácido periódico de Schiff) para a análise da morfologia e da formação de matriz condrogênica (especificamente glicosaminoglicanos – GAG), respectivamente. As técnicas das colorações estão descritas a seguir. Como controle positivo das colorações especiais foi utilizado tecido cartilaginoso presente na orelha dos ratos..

a) Hematoxilina e eosina: 1) desidratação; 2) água corrente (passagem); 3) água destilada (passagem); 4) hematoxilina de Harris (5 min); 5) álcool de passagem; 6) eosina (1min); 7) desidratação e montagem utilizando Bálsamo do Canadá (Dinâmica, São Paulo, Brasil).

b) Alcian blue-PAS: 1) desidratação; 2) alcian blue (30min); 3) ácido periódico 0,5% (15min); 4) água corrente (10 min); 5) água destilada (passagem); 6) reativo de shiff (15 min); 7) sem lavar passar metabissulfito de sódio 1% (5 min); 8) água corrente (10 min); 9) água destilada (passagem); 10) desidratação e montagem utilizando Bálsamo do Canadá.

A análise da formação de matriz condrogênica (AB+ e PAS+) foi feita por dois observadores e os escores das amostras foram determinados por análise semiquantitativa, considerando-se a distribuição e intensidade da marcação para AB e para PAS. As comparações entre os grupos seguiu os seguintes parâmetros: distribuição [ausente=0, focal=1, multifocal=2, difusa=3] e intensidade [ausente=0, discreta=1, moderada=2, acentuada=3]. Os parâmetros foram multiplicados de acordo com Braz et al(2003) e Trivilin et al (2017) e o escore resultante foi utilizado.

3.6 Expressão dos fatores de transcrição Sox-9, colágeno II e colágeno X por qPCR

A qPCR foi utilizada nas culturas de CTM-TA de todos os grupos experimentais para a avaliação quantitativa da expressão de Sox-9 e colágeno II aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação e de colágeno X aos 21 dias de diferenciação. A extração do RNA total das células cultivadas foi feita pelo uso do Trizol (Trizol®

Reagent, Invitrogen, CA, USA). Inicialmente foi realizada a lise e homogenizado da monocamada de células por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL, acrescido de 0,2mL de clorofórmio, sendo homogeneizado por 15 segundos e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 15 minutos à 4°C, objetivando separar em três fases, sendo a fase incolor e superficial, a que conterà o RNA. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5mL de álcool isopropílico e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O pellet foi lavado com 1mL de etanol a 75%, homogenizado e centrifugado a 7.500g por 5 minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em água livre de RNase e imediatamente estocado a -80°C. A qualidade das amostras de RNA de cada cultura foi analisada por espectrofotometria. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se Kit comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, CA, USA). Foram realizadas as reações no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems Inc., CA, USA). A expressão relativa de cada gene foi normalizada com o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) usando o método 2- $\Delta\Delta C_t$ (SCHEFE et al., 2006). Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* e estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (pPCR) para *Rattus norvegicus*.

Genes	Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')
GAPDH	<i>Forward primer</i> CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA
	<i>Reverse primer</i> GGCATGGACTGTGGTCATGA
Sox-9	<i>Forward primer</i> CTGAAGGGCTACGACTGGAC
	<i>Reverse primer</i> TACTGGTCTGCCAGCTTCCT
Colágeno II	<i>Forward primer</i> AGGGGTACCAGGTTCTCCATC
	<i>Reverse primer</i> CTGCTCATCGCCGCGGTCCGA
Colágeno X	<i>Forward primer</i> TGGGTAGGCCTGTATAAAGAACGG
	<i>Reverse primer</i> CATGGGAGCCACTAGGAATCCTGAGA

3.7 Análise estatística

O delineamento foi multifatorial (5 grupos x 3 períodos). Para as análises da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste *post hoc* de Dunn. Diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$. Para as análises dos resultados do qPCR, realizou-se análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de *Student Newman Keuls* (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

As características fenotípicas das células extraídas do tecido adiposo de ratas jovens foram compatíveis com a de células-tronco. Houve expressão de CD45 em 3,04% das células e expressão para CD54, CD73 e CD90 de 91,90%, 99,24% e 90,26% das células, respectivamente.

4.2 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação condrogênico, as CTM-TA apresentavam no mínimo 90% de viabilidade. Assim, garantiu-se que as células utilizadas para a diferenciação condrogênica estavam viáveis e que isso não seria um fator limitante para a próxima etapa do cultivo.

4.3 Análise morfológica das células e formação de matriz cartilaginosa

4.3.1 Análise morfológica das células pela coloração de HE

Aos sete dias, o grupo controle exibiam células pequenas redondas, ovais a alongadas, núcleos ovais a alongados deslocados para a periferia com cromatina predominantemente condensada. Observou-se também raras células binucleadas. Os grupos tratados com 0,01; 1 e 100 nM de T3 exibiram morfologia semelhante à descrita no grupo controle. Em contrapartida, o grupo tratado com 1000 nM de T3 exibiu células redondas e volumosas e núcleo oval. Com relação a cromatina, os grupos tratados com 0,01; 100 e 1000 nM T3 apresentaram cromatina frouxa, o que não foi observado no grupo controle (Figura 3A-E).

Aos 14 dias, o grupo controle exibia células predominantemente redondas, núcleos

ovais a alongados e cromatina frouxa, além de raras células binucleadas. Todos os grupos tratados com T3 exibiam morfologia semelhante ao grupo controle (Figura 3F-J).

Assim como aos 14 dias de diferenciação, aos 21 dias, o grupo controle exibia células predominantemente redondas, núcleos redondos a ovais e cromatina frouxa, além de raras células binucleadas. Os demais grupos tratados com T3 exibiram morfologia celular e nuclear semelhante ao grupo controle. No entanto, o grupo tratado com 100 nM de T3 exibia células redondas, ovais a alongadas, diferente do grupo controle (Figura 3K-O).

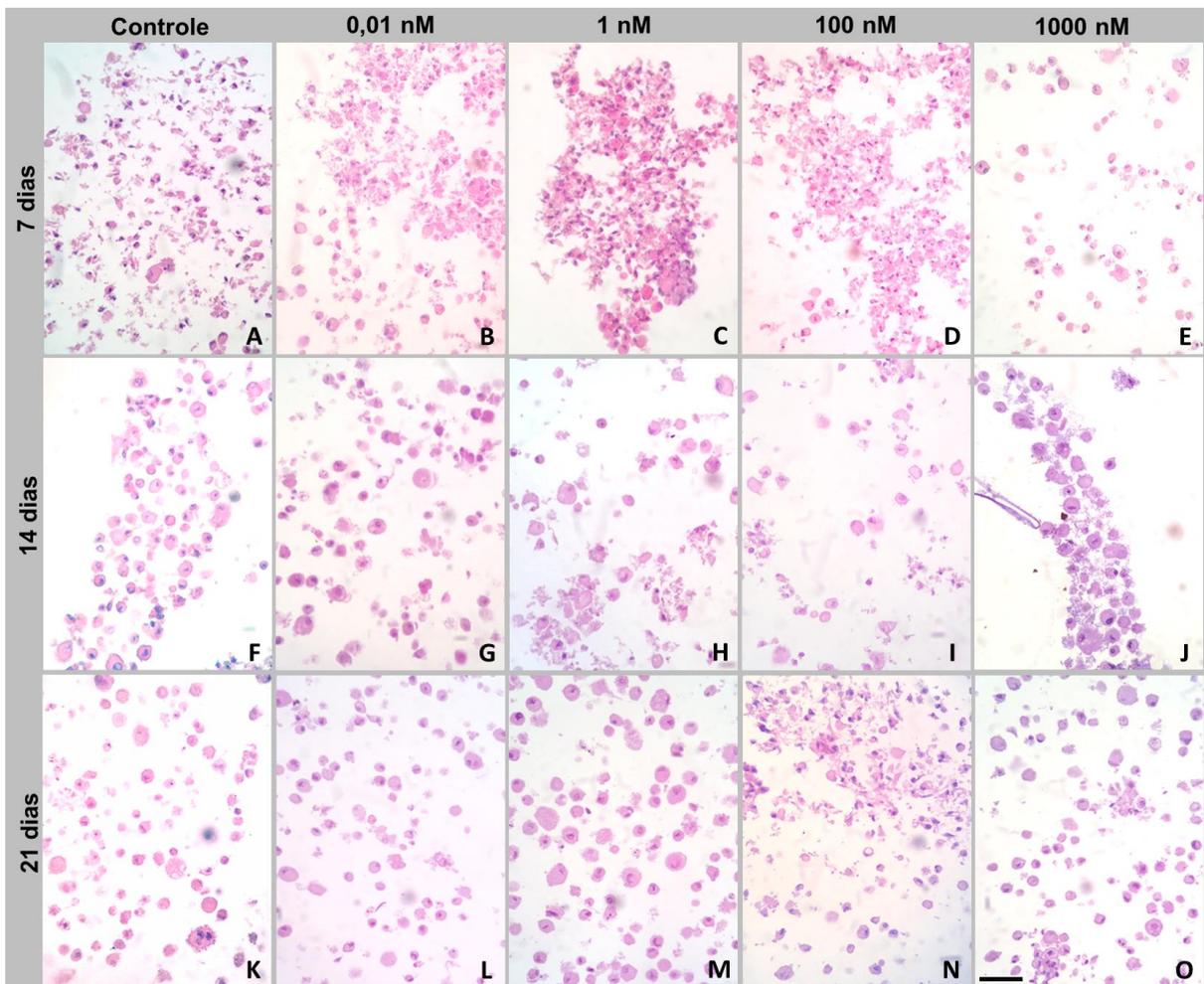


Figura 3. Análise morfológica de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C, D, E), 14 (F, G, H, I, J) e 21 (K, L, M, N, O) dias de diferenciação condrogênica. HE, Barra = 48,01µm

4.3.2 Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+

Aos sete, 14 e 21 dias, todos os grupos tratados com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM) apresentaram formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+, semelhantes ao grupo controle ($P>0,05$) (Figuras 4, 5, 6).

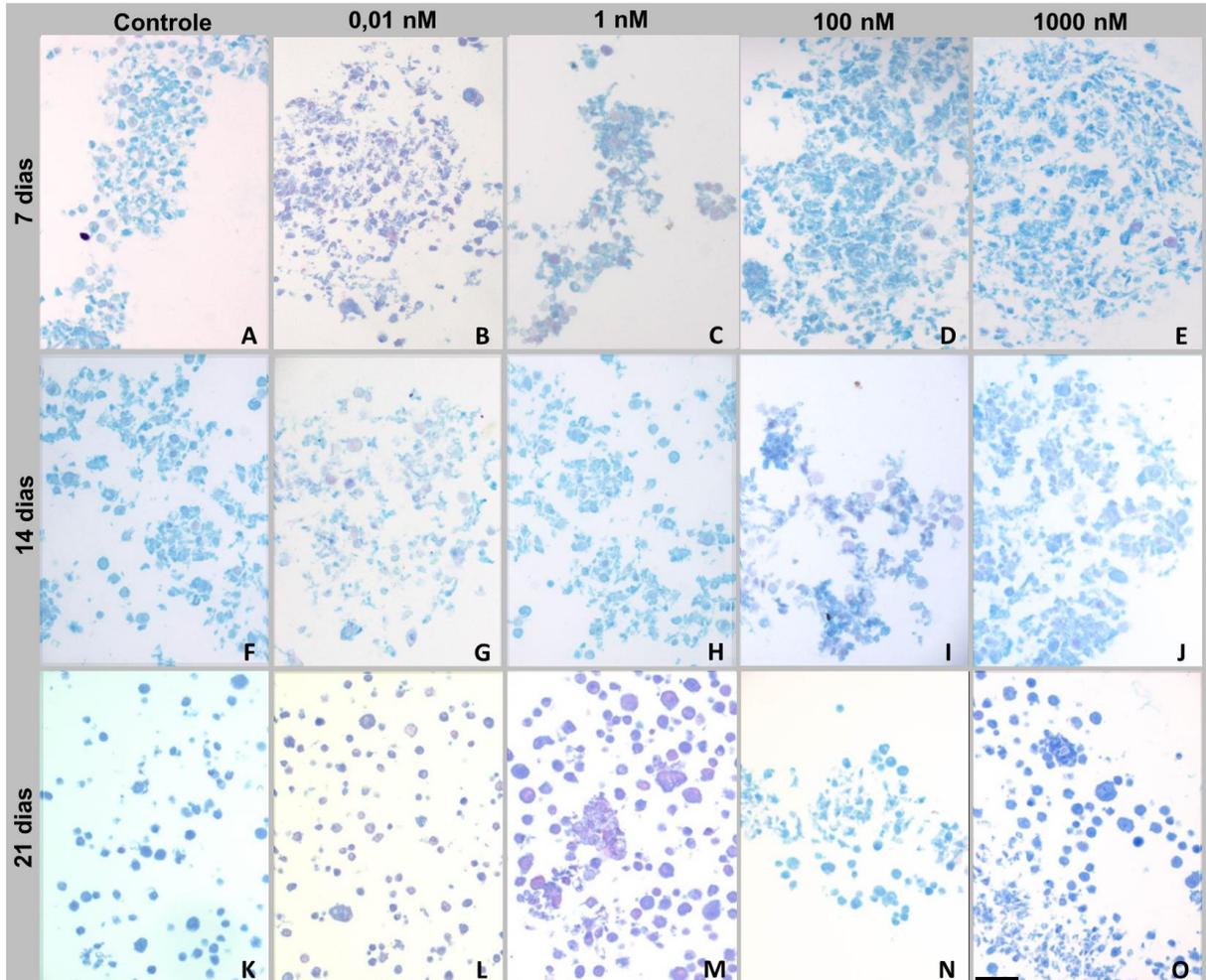


Figura 4. Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C, D, E), 14 (F, G, H, I, J) e 21 (K, L, M, N, O) dias de diferenciação condrogênica. Alcian Blue-PAS, Barra = 96,02µm.

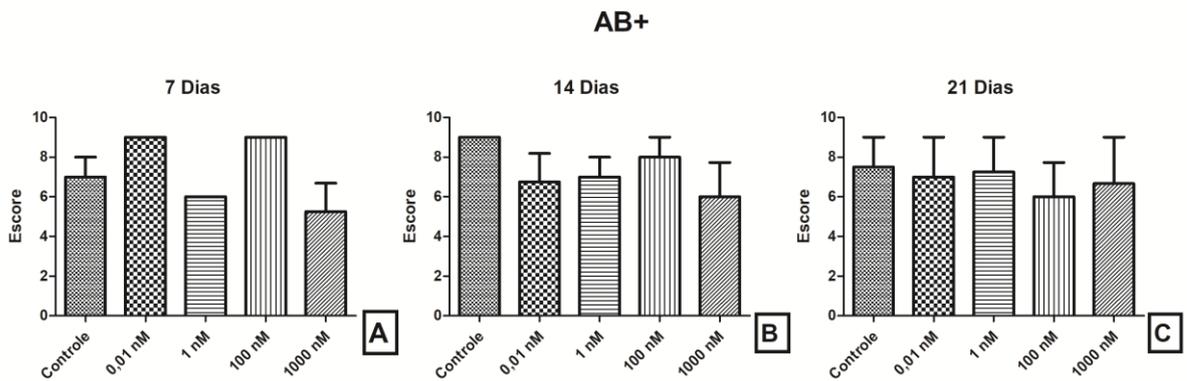


Figura 5. Produção de matriz condrogênica AB+ em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de diferenciação condrogênica. * $P > 0,05$.

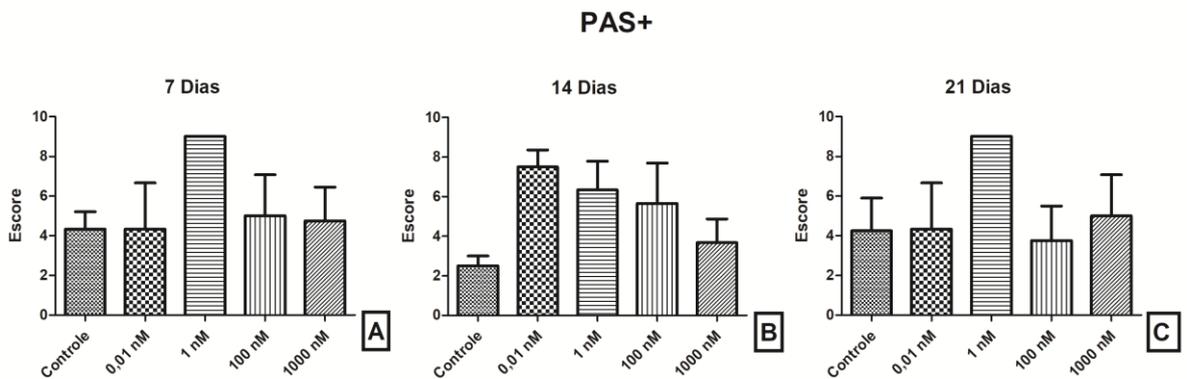


Figura 6. Produção de matriz condrogênica PAS+ em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de diferenciação condrogênica. * $P > 0,05$.

4.4 Expressão dos fatores de transcrição Sox9, Col II e Col X

Com relação a expressão de Sox9 aos sete dias de diferenciação, os grupos tratados 0,01; 1 e 1000 nM de T3 mostraram expressão estatisticamente inferior em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Enquanto o grupo tratado com 100 nM foi semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 7A). Aos 14 e e 21 dias de diferenciação não houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($p > 0,05$) (Figura 7B-C).

Em relação à expressão de Col II, em todos os períodos avaliados (7, 14 e 21 dias), todos os grupos tratados com T3 mostraram expressão semelhante ao grupo

controle ($p>0,05$) (Figura 7D-F).

Em relação à expressão de Col X aos 21 dias de diferenciação, todos os grupos tratados com T3 mostraram expressão igual ao grupo controle ($p>0,05$) (Figura 7G).

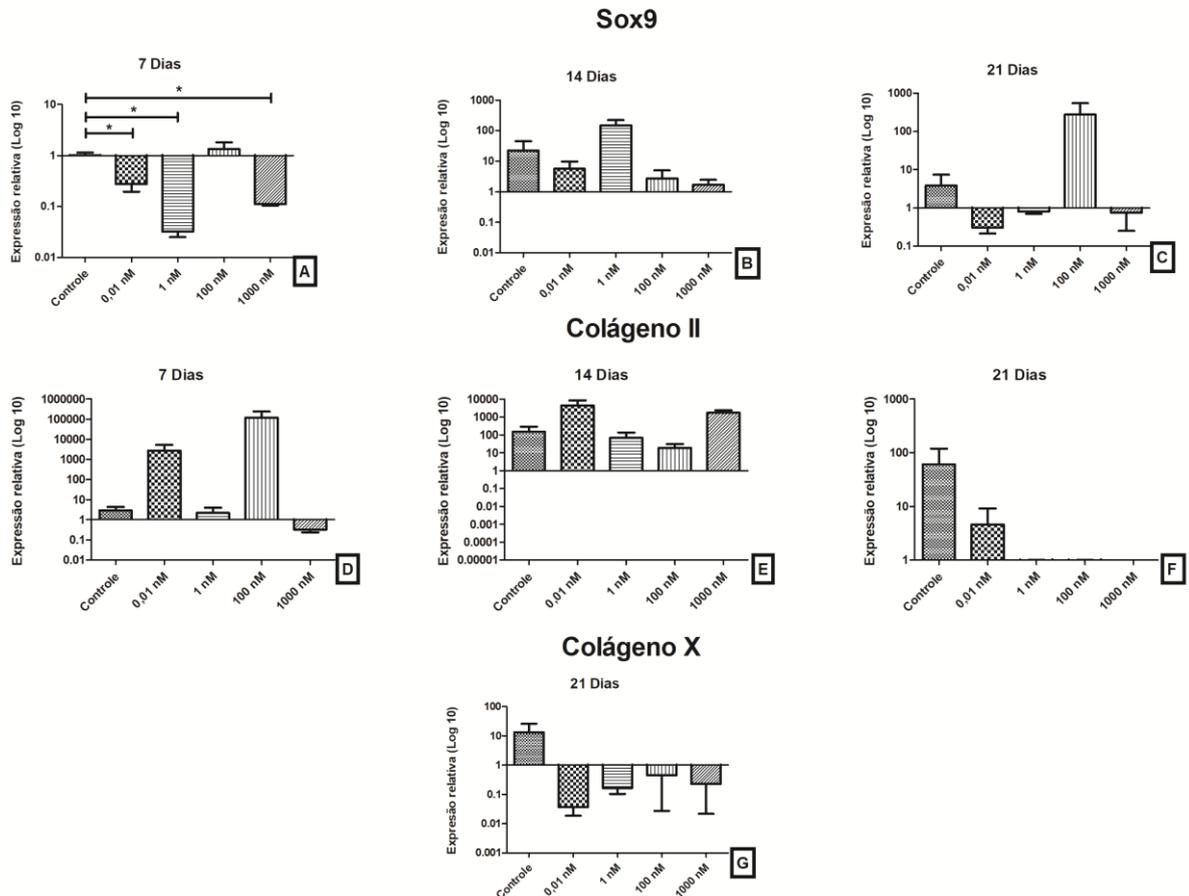


Figura 7. Expressão relativa de Sox9, colágeno II (Col II) e colágeno X (Col X) (média \pm desvio padrão) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas tratadas ou não com triiodotironina (T3) nas doses de 0,01; 1; 100 e 1000 nM, aos sete (A, D), 14 (B, E) e 21 dias (C, F, G) de diferenciação condrogênica. $*p>0,05$.

Quando se avaliou a expressão de Sox9 e Col II ao longo do tempo de diferenciação, não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Figuras 8 e 9).

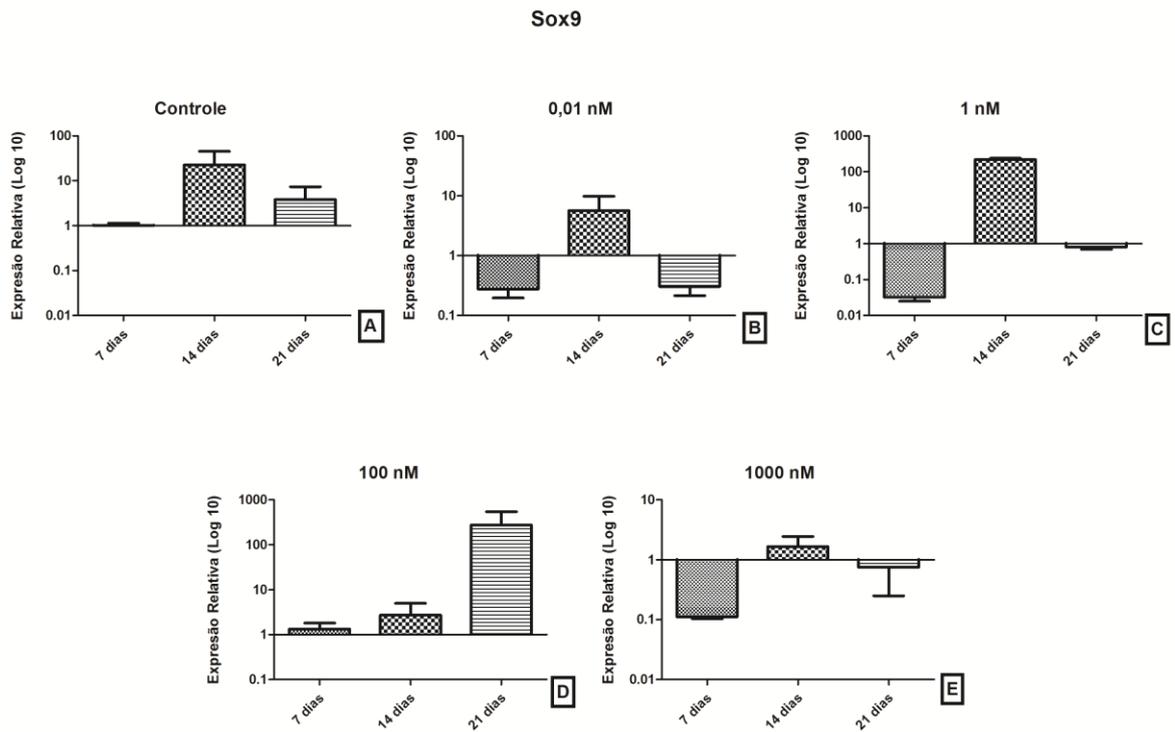


Figura 8. Expressão relativa de Sox9 (média \pm desvio padrão) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas nos grupos controle (A) e tratados com 0,01 nM (B), 1 nM (C), 100 nM (D) e 1000 nM T3 (E) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. * $p > 0.05$.

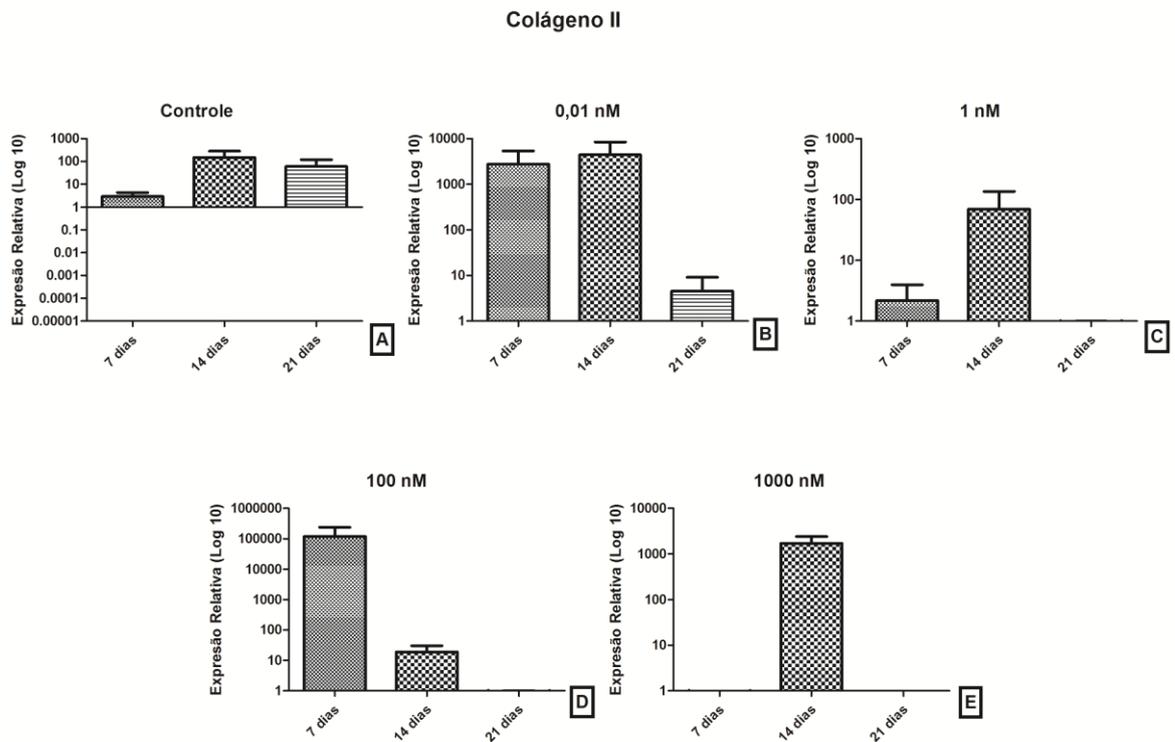


Figura 9. Expressão relativa de colágeno II (Col II) (média \pm desvio padrão) pela técnica de qPCR em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas nos grupos controle (A) e tratados com 0,01 nM (B), 1 nM (C), 100 nM (D) e 1000 nM T3 (E) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. * $p < 0.05$.

5. DISCUSSÃO

A triiodotironina influenciou de forma dose e período dependentes a diferenciação condrogênica das CTM-TA de ratas, porém não potencializa essa diferenciação, uma vez que não interfere na expressão de Col II e Col X e na formação de matriz condrogênica, apesar de induzir um aumento celular precoce na dose de 1000 nM. No entanto, o tratamento hormonal (0,01; 1 e 1000 nM) diminuiu a expressão de Sox9 aos 7 dias de diferenciação .

O potencial condrogênico das CTM-TA tem sido amplamente investigado (CHIOU; XU; LONGAKER, 2006; KIM; KIM; IM, 2008; ESTES et al., 2010; ZHANG et al., 2015; ZHOU et al., 2016). Porém, acredita-se que esta seja a primeira pesquisa a estudar o efeito da T3 sobre a diferenciação condrogênica de CTM-TA de ratas. Nesse estudo, houve baixa expressão de CD45 e alta expressão dos marcadores CD54, CD73 e CD90, mostrando assim, que as características fenotípicas das células extraídas do tecido adiposo foram compatíveis com as de CTM-TA, corroborando o preconizado pelo International Society for Cellular Therapy e a International Federation of Adipose Therapeutics and Sciences (IFATS) (CAMILLERI et al., 2016; DZOBO et al., 2016; CALABRESE et al., 2017). O tecido adiposo mostra-se como uma fonte atrativa de células-tronco mesenquimais, uma vez que as células-tronco extraídas desse tecido possuem os marcadores característicos de células-tronco mesenquimais (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007), além de possuir uma grande quantidade de células-tronco quando comparadas a outra fonte tecidual (KINGHAM et al., 2007; ZHOU et al., 2016)

O CD45 é um marcador de células hematopoiéticas e macrófagos (CRAIG et al., 1994; MCINTOSH et al., 2006; PILLING et al., 2009) que também pode ser expresso em fibroblastos (ISHII et al., 2005). Assim, a baixa expressão desse marcador nas CTM-TA pode ter ocorrido, pois o tecido adiposo possui, além de CTM, adipócitos maduros e imaturos, células da musculatura lisa vascular, células endoteliais, macrófagos, linfócitos e fibroblastos (CASTEILLA et al., 2005; SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007; GIMBLE et al. 2011; BAER; GEIGER, 2012; ARONOWITZ; ELLENHORN, 2013).

O CD54, além de ser observado em CTM-TA (MCINTOSH et al., 2006), também é expresso em pequenas concentrações em células endoteliais e leucócitos

(ROEBUCK, FINNEGAN, 1999). Além disso, CD90 e CD73 também são expressos em fibroblastos (PILLING et al., 2009; ALT et al., 2011) além de serem observados em CTM-TA (ALT et al., 2011; TRIVANOVIĆ et al., 2014; FERNG et al., 2016).

A despeito dessas informações, células hematopoiéticas não aderem a superfícies plásticas (PAYUSHINA, DOMARATSKAYA, STAROSTIN, 2006) e, dentre as células presentes no tecido adiposo, somente as CTM apresentam capacidade de diferenciação condrogênica.

Para caracterizar a diferenciação condrogênica das CTM-TA com ou sem a adição de T3 *in vitro*, foram utilizados parâmetros como síntese de matriz condrogênica e expressão de genes importantes durante a diferenciação, como Sox9, Col II e Col X. Assim, garantiu-se a adequada avaliação da condrogênese. Somente o tratamento hormonal na dose de 1000 nM induziu aparentemente um aumento celular precoce em CTM-TA e essa característica se manteve até o final da diferenciação condrogênica em todos os grupos avaliados, inclusive no grupo controle. Diferente do observado no presente estudo, faz-se importante ressaltar que no início da diferenciação condrogênica *in vitro* as células apresentam uma morfologia fibroblastoide, e somente ao longo desse processo sofrem aumento de volume (hipertrofia) (STUDER et al., 2012; LI et al., 2015). Ao passo que *in vivo* isto acontece somente no final da condrogênese (SHUM et al., 2003), onde os condrócitos hipertróficos expressam colágeno X e MMP13 (KARSENTY; WAGNER, 2002; GOLDRING; TSUCHIMOCHI; IJIRI, 2006; CAWSTON; YOUNG, 2010), sofrem apoptose e as células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos e substituem a cartilagem por osso mineralizado (DE CROMBRUGGHE et al., 2000; HARTMANN; TABIN, 2000; DE CROMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001; SHUM et al., 2003).

Segundo MACKIE et al., 2011, a hipertrofia de condrócitos envolve alterações na osmolaridade intra e extracelular (agrecan é o principal componente da matriz que contribui para esse efeito, tanto pela abundância quanto pela sua alta carga negativa), degradação da matriz ao redor dos condrócitos e um aumento na quantidade de organelas. Por isso estratégias para minimizar essa hipertrofia têm sido investigadas como uso de PTHrp, TGF- β 1 e inibidor de MMP13, entre outros (CHEN et al., 2015). Outros fatores também podem causar hipertrofia durante a diferenciação condrogênica de CTM-MO em humanos, como ausência de TGF- β associada a dexametasona (1nM) e T3 (1nM) (MUELLER; TUAN, 2008). Além disso,

a adição de T3 (1nM) no período de 21 e 28 dias, durante a condrogênese de CTM-MO de humanos, induziu hipertrofia celular mediado pela BMP-4 e esse efeito foi bloqueado pelo seu antagonista (BMP antagonist Noggin). Além de induzir uma hipertrofia, o tratamento hormonal adicionado a BMP-4 aumentou a produção de colágeno II e X (KARL et al., 2014). Semelhante aos estudos anteriores, no presente trabalho, o tratamento hormonal (independente da dose), também causou hipertrofia celular aparente, porém neste caso não interferiu com a formação de matriz condrogênica.

Com relação à expressão gênica, o tratamento hormonal (doses de 0,01; 1 e 1000 nM de T3) diminuiu a expressão de Sox9 aos sete dias de diferenciação. O Sox9 é o principal fator que atua na diferenciação condrogênica de CTM (AUGELLO; DE BARI, 2010), é expresso durante todo o período de diferenciação (KOCH et al., 2000), porém não é expresso em condrócitos hipertróficos (LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998; AKIYAMA et al., 2002; DY et al., 2012). Por isso especula-se que, pelo menos na dose de 1000 nM, a expressão desse gene diminuiu aos 7 dias em decorrência das células já se apresentarem hipertróficas nesta fase experimental.

Nesse contexto, estudos comprovaram que o hormônio tireoidiano (T4 [30ng/mL]) atua *in vitro* sobre condrócitos em fase terminal de diferenciação diminuindo a expressão de Sox9 aos sete dias e conseqüentemente estimulando a hipertrofia celular (OKUBO; REDDI, 2003). Estes resultados corroboram em parte com o observado no presente estudo, porém em uma dose diferente e em outro tipo celular.

Aos 14 e 21 dias de diferenciação o tratamento hormonal não alterou a expressão de Sox9.. Como já citado, nesses períodos, as células já apresentavam, independente do tratamento, hipertrofia celular aparente. Isto poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de que Sox9 é expresso em células condroprogenitoras e em condrócitos diferenciados, mas não é expresso em condrócitos hipertróficos (NG et al., 1997; ZHAO et al., 1997).

No presente estudo, a presença do hormônio T3 não alterou a expressão de Col II e X em CTM-TA em nenhum dos períodos avaliados. Corroborando em parte, estudo *in vitro* comprovou que o tratamento hormonal (T4 [30ng/mL]) não alterou a expressão de Col II aos 21 dias de cultivo de condrócitos em fase terminal de diferenciação (OKUBO; REDDI, 2003 Além disso, sabe-se que *in vivo* o Col II é

expresso ao longo da diferenciação condrogênica e à medida que as células se diferenciam em condrócitos hipertróficos, sua expressão diminui enquanto aumenta a expressão de colágeno X (SHUM et al., 2003). Pode-se sugerir que, tanto o tratamento hormonal quanto a fonte doadora de células-tronco, influenciam na diferenciação condrogênica. Adicionalmente, os resultados *in vitro* podem ser diferentes dos observados *in vivo*, uma vez que a interação de fatores que ocorrem *in vivo* não está presente em culturas.

6. CONCLUSÕES

A triiodotironina não altera a diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas, uma vez que não modifica a expressão de Col II e Col X e a formação de matriz condrogênica. Mas, induz um aumento celular precoce e diminuir a expressão de Sox9 de forma dose dependente.

7. REFERÊNCIAS

ALT, E.; YAN, Y.; GEHMERT, S.; SONG, Y.H; ALTMAN, A.; GEHMERT, S.; VYKOUKAL, D.; BAI, X. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biology of the Cell*, v.103, n.4, p.197-208, 2011.

AKIYAMA, H.; CHABOISSIER, M.C.; MARTIN, J.F.; SCHEDL, A.; DE CROMBRUGGHE, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Development*, v.16, n.21, p.2813-2828, 2002.

AKIYAMA, H.; LYONS, J.P.; MORI-AKIYAMA, Y.; YANG, X.; ZHANG, R.; ZHANG, Z.; DENG, J.M.; TAKETO, M.M.; NAKAMURA, T.; BEHRINGER, R.R.; MCCREA, P.D.; DE CROMBRUGGHE, B. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes & Development*, v.18, n.9, p.1072-1087, 2004.

ALVES, E.G.; SERAKIDES, R.; BOELONI, J.N.; ROSADO, I.R.; OCARINO, N.M.; OLIVEIRA, H.P.; GÓES, A.M.; REZENDE, C.M. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. *BMC Veterinary Research*, v.10, p.190-198, 2014.

ANSAR, M.M; ESFANDIARIY, E.; MARDANI, M.; HASHEMIBENI, B.; ZARKESH-ESFAHANI, S.H; HATEF, M.; KABIRI, A. A comparative study of aggrecan synthesis between natural articular chondrocytes and differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells in 3D culture. *Advanced Biomedical Research*, v.1, n.24, 2012.

ARONOWITZ, J.A.; ELLENHORN, J. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.132, n.6, p.932–939, 2013.

ARRIGONI, E.; LOPA, S.O.; GIROLAMO, L.; STANCO D.; BRINI, A.T. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose tissue derived stem cells: from small to large animal models. *Cell and Tissue Research*, v.338, n.3, p.401-411, 2009.

AUGELLO, A.; DE BARI, C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human Gene Therapy*, v.21, n.10, p.1226-1238, 2010.

AULETTA, J.J.; ZALE, E.A.; WELTER, J.F.; SOLCHAGA, L.A. Fibroblast growth factor-2 enhances expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells without diminishing their immunosuppressive potential. *Stem Cells International*, v.2011, p.10, 2011.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.8, n.3, p.301-316, 2004.

BANDYOPADHYAY, A.; TSUJI, K.; COX, K.; HARFE, B.D.; ROSEN, V.; TABIN, C.J. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genetics*, v.2, n.12, p.e216, 2006.

BARRY, F.; BOYNTON, R.E.; LIU, B.; MURPHY, M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental Cell Research*, v.268, n.2, p.189-200, 2001.

BEANE, O.A.; DALING, E.M. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Annals of Biomedical Engineering*, v.40, n.10, p.2079–2097, 2012.

BIANCO, A.C.; KIM, B.W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*, v.116, n.10, p.2571-2579, 2006.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N. M; GOES, A. M; SERAKIDES, R. Efeito *in vitro* da triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e com osteoporose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v.57, n.2, p.98-111, 2013a.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Triiodotironina não aumenta a diferenciação osteogênica reduzida pela idade de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v.57, n.1, p.62-70, 2013b.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Comparative study of osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue of osteoporotic female rats. *Connective tissue research*, v.55, n.2, p.103-114, 2014.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; BOZZI, A.; SILVA, J. F.; CASTANHEIRA, P.; GOES, A. M.; SERAKIDES, R. Dose-dependent effects of triiodothyronine on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Hormone Research*, v.71, n.2, p.88-97, 2009.

BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; SILVA, J. F.; CORRÊA, C. R; BERTOLLO, C. M.; HELL, R. C. R.; PEREIRA, M. M.; GOES, A. M.; SERAKIDES, R. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and non-ovariectomized female rats with thyroid dysfunction. *Pathology Research and Practice*, v.209, n.1, p. 44-51, 2013c.

BAER, P.C., GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells International*, v.2012, p.11, 2012.

BELL, D.M.; LEUNG, K.K.; WHEATLEY, S.C.; NG, L.J.; ZHOU, S.; LING, K.W.; SHAM, M.H.; KOOPMAN, P.; TAM, P.P.; CHEAH, K.S. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature Genetics*, v.16, n.2, p.174-178, 1997.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica Cytobiologica*, v.44, n.4, p.215-230, 2006.

BRAZ, F.; RAHAL, S.C.; ROCHA, N.S.; TAGA, E.; BIASI, F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.17, n.1, p.19-24, 2003.

BUNNELL, B.A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods in stem cell research*, v.45, n.2, p.115-120, 2008.

BURCH, W.M.; LEOVITZ, H.E. Triiodothyronine stimulation of in vitro growth and maturation of embryonic chick cartilage. *Endocrinology*, v.111, n.2, p.462-468, 1982.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.31, n.1, p.25-35, 2009.

CALABRESE, G.; FORTE, S.; GULINO, R.; CEFALÌ, F.; FIGALLO, E.; SALVATORELLI, L.; MANISCALCHI, E.T.; ANGELICO, G.; PARENTI, R.; GULISANO, M.; MEMEO, L.; GIUFFRIDA, R. Combination of collagen-based scaffold and bioactive factors induces adipose-derived mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation *in vitro*. *Frontiers in Physiology*, v.8, n.50, 2017.

CAMILLERI, E.T.; GUSTAFSON, M.P.; DUDAKOVIC, A.; RIESTER, S.M.; GARCES, C.G.; PARADISE, C.R.; TAKAI, H.; KARPERIEN, M.; COOL, S.; SAMPEN, H.J.; LARSON, A.N.; QU, W.; SMITH, J.; DIETZ, A.B.; VAN WIJNEN, A.J. Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production. *Stem Cell Research & Therapy*, v.7, n.1, p.107, 2016.

CAO, Y.; SUN, Z.; LIAO, L.; MENQ, Y.; HAN, Q.; ZHAO, R.C. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.332, n.2, p.370-379, 2005.

CASTEILLA, L.; PLANAT-BÉNARD, V.; COUSIN, B.; SILVESTRE, J.S.; LAHARRAGUE, P.; CHARRIÈRE, G.; CARRIÈRE, A.; PÉNICAUD, L. Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases? *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, v.98, n.9, p.922-926, 2005.

CASTEILLA, L.; PLANAT-BÉNARD, V.; LAHARRAGUE, P.; COUSIN, B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World Journal of Stem Cells*, v.3, n.4, p.25-33, 2011.

CAWSTON, T.E.; YOUNG, D.A. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell and Tissue Research*, v.339, n.1, p. 221–235, 2010.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, v. 22, n.4, p.233-41, 2004.

CHEN, H.; GHORI-JAVED, F.Y.; RASHID, H.; ADHAMI, M.D.; SERRA, R.; GUTIERREZ, S.E.; JAVED, A. Runx2 regulates endochondral ossification through control of chondrocyte proliferation and differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.29, n.12, p.2653-2665, 2014.

CHEN, H.T.; LEE, M.J.; CHEN, C.H.; CHUANG, S.C.; CHANG, L.F.; HO, M.L.; HUNG, S.H.; FU, Y.C.; WANG, Y.H.; WANG, H.I.; WANG, G.J.; KANG, L.; CHANG, J.K. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.16, n.3, p.582-592, 2012.

CHEN, S.; FU, P.; CONG, R.; WU, H.; PEI, M. Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration. *Genes & Diseases*, v.2, n.1, p.76-95, 2015.

CHENG, Y.; CHENG, P.; XUE, F.; WU, K.M.; JIANG, M.J.; JI, J.F.; HANG, C.H.; WANG, Q.P. Repair of ear cartilage defects with allogenic bone marrow mesenchymal stem cells in rabbits. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v.70, n.2, p.1137-1143, 2014.

CHIOU, M.; XU, Y.; LONGAKER, M.T. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.343, n.2, p.644-652, 2006.

CHURCH, V.; NOHNO, T.; LINKER, C.; MARCELLE, C.; FRANCIS-WEST, P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *Journal of Cell Science*, v.115, n.24, p.4809-4818, 2002.

CRAIG, W.; POPPEMA, S.; LITTLE, M.T.; DRAGOWSKA, W.; LANSDORP, P.M. CD45 isoform expression on human haemopoietic cells at different stages of development. *British Journal of Haematology*, v.88, n.1, p.24-30, 1994.

DAI, R.; WANG, Z.; SAMANIPOUR, R.; KOO, K.; KIM, K. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells International*, v.2016, p.19, 2016

DANIŠOVIČ, L.; BOHÁČ, M.; ZAMBORSKÝ, R.; ORAVCOVÁ, L.; PROVAZNÍKOVÁ, Z.; CSÖBÖNYEIOVÁ, M.; VARGA, I. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering. *General Physiology and Biophysics*. v.35, n.2, p.207-214, 2016.

DE CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V.; BEHRINGER, R.R.; BI, W.; MURAKAMI, S.; HUANG, W. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biology*, v.19, n.5, p.389-394, 2000.

DE CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V.; NAKASHIMA, K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Current Opinion in Cell Biology*, v.13, n.6, p.721-727, 2001.

DELISE, A.M.; FISCHER L.; TUAN, R.S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, v.8, n.5, p.309-334, 2000.

DELISE, A.M.; TUAN, R.S. Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis *in vitro*. *Developmental Dynamics*, v.225, n.2, p.195-204, 2002.

DOMINICI, M.; BLANC, K.L.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p.315-317, 2006.

DONG, Y.; DRISSI, H.; CHEN, M.; CHEN, D.; ZUSCIK, M.J.; SCHWARZ, E.M.; O'KEEFE, R.J. Wnt-mediated regulation of chondrocyte maturation: Modulation by TGF-beta. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.95, n.5, p.1057–1068, 2005.

DONG, Y.F.; SOUNG, DO, Y.; SCHWARZ, E.M.; O'KEEFE, R.J.; DRISSI, H. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *The Journal of Cellular Physiology*, v.208, n.1, p.77-86, 2006.

DU, X.; YUAN, Q.; QU, Y.; ZHOU, Y.; BEI, J. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from menstrual blood by adherence. *Stem Cells International*, v. 2016, p.8, 2015.

DY, P.; WANG, W.; BHATTARAM, P.; WANG, Q.; WANG, L.; BALLOCK, R.T.; LEFEBVRE, V. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Developmental Cell*, v.22, n.3, p.597-609, 2012.

DZOBO, K.; TURNLEY, T.; WISHART, A.; ROWE, A.; KALLMEYER, K.; VAN VOLLENSTEE, F.A.; THOMFORD, N.E. DANDARA, C.; CHOPERA, D.; PEPPER, M.S.; PARKER, M.I. Fibroblast-derived extracellular matrix induces chondrogenic differentiation in human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, n.8, p.1259, 2016.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal Haematology*, v.109, p.235–242, 2000.

ESTES, B.T.; DIEKMAN, B.O.; GIMBLE, J.M.; GUILAK, F. Isolation of adipose derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nature protocols*, v.5, n.7, p.1294-1311, 2010.

FAFIÁN-LABORA, J.; FERNÁNDEZ-PERNAS, P.; FUENTES, I.; DE TORO, J.; OREIRO, N.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; MATEOS, J.; ARUFE, M.C. Influence of age on rat bone marrow mesenchymal stem cells potential. *Scientific Reports*, v.5, p. 16765, 2015.

FAN, Y.; CHONG, Y.S.; CHOOOLANI, M.A.; CREGAN, M.D.; CHAN, J.K.Y. unravelling the mystery of stem/progenitor cells in human breast milk. *PLoS ONE*, v.12, n.5, p.14421, 2010.

FENG, J.Q.; XING, L.; ZHANG, J.H.; ZHAO, M.; HORN, D.; CHAN, J.; BOYCE, B.F.; HARRIS, S.E.; MUNDY, G.R.; CHEN, D. NF-kappaB specifically activates BMP-2 gene expression in growth plate chondrocytes in vivo and in a chondrocyte cell line *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, n.31, p.29130-29135, 2003.

FERNANDEZ-PERNAS, P.; FAFIAN-LABORA, J.; LESENDE-RODRIGUEZ, I.; MATEOS, J.; FUENTE, A.; FUENTES, I.; SANTOS, J.T.; GARCIA, F.B.; ARUFE, M.C. 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine increases in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells from human umbilical cord stroma through SRC2. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.117, n.9, p.2097-2108, 2016.

FERNG, A.S.; MARSH, K.M.; FLEMING, J.M.; CONWAY, R.F.; SCHIPPER, D.; BAJAJ, N.; CONNELL, A.M.; PILIKIAN, T.; JOHNSON, K.; RUNYAN, R.; BLACK, S.M.; SZIVEK, J.A.; KHALPEY, Z. Adipose-derived human stem/stromal cells: comparative organ specific mitochondrial bioenergy profiles. *SpringerPlus*, v.5, n.1, p.2057, 2016.

FOCAROLI, S.; TETI, G.; SALVATORE, V.; DURANTE, S.; BELMONTE, M.M.; GIARDINO, R.; MAZZOTTI, A.; BIGI, A.; FALCONI, M. Chondrogenic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells: influence of a biomimetic gelatin genipin crosslinked porous scaffold. *Microscopy Research and Technique*, v.77, n.11, p.928-934, 2014.

FREITAG, J.; FORD, J.; BATES, D.; BOYD, R.; HAHNE, A.; WANG, Y.; CICUTTINI, F.; HUGUENIN, L.; NORSWORTHY, C.; SHAH, K. Adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of isolated knee chondral lesions: design of a randomised controlled pilot study comparing arthroscopic microfracture versus arthroscopic microfracture combined with postoperative mesenchymal stem cell injections. *BMJ Open*, v.5, p.9232, 2015.

GIMBLE, J.M.; GRAYSON, W.; GUILAK, F.; LOPEZ, M.J.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Adipose tissue as a stem cell source for musculo skeletal regeneration. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, v.3, p.69–81, 2011.

GIULIANI, N.; LISIGNOLI, G.; MAGNANI, M.; RACANO, C.; BOLZONI, M.; PALMA, B.D.; SPOLZINO, A.; MANFERDINI, C.; ABATI, C.; TOSCANI, D.; FACCHINI, A.; AVERSA, F. New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics. *Stem Cells International*, v.2013, p.11, 2013.

GOLDRING, M.B.; TSUCHIMOCHI, K.; IJIRI, K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.97, n.1, p.33-44, 2006.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.97, n.25, p.13625–13630, 2000.

GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D.M.; LEDDY, H.A.; ROBEY, P.G.; STORMS, R.W.; GIMBLE, J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived

stromal cells. *The Journal of Cellular Physiology*, v.189, n.1, p.54—63, 2001.

GUIMONT, P.; GRONDIN, F.; DUBOIS, C.M. Sox9-dependent transcriptional regulation of the proprotein convertase furin. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v. 293, n.1, p.172-183, 2007.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 12^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2011., p.955-967.

HARTMANN, C.; TABIN, C.J. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*, v.127,n.14, p.3141-3159, 2000.

HENNIG, T.; LORENZ, H.; THIEL A, GOETZKE, K.; DICKHUT, A.; GEIGER, F.; RICHTER, W. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *Journal of Cellular Physiology*, v.211, n.3, p.682–691, 2007.

HUANG, W.; CHUNG, U.I.; KRONENBERG, H.M.; DE CROMBRUGGHE, B. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormonelated peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, n.1, p.160-165, 2001.

HALL, B. K.; MIYAKE, T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays*, v.22, n.2, p.138-147, 2000.

HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER I.; SLAPER-CORTENBACH I.; MARINI, F.C.; DEANS, R.J.; KRAUSE, D.S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v.7, n.5, p.393-395, 2005.

IN 'T ANKER, P.S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; DE GROOT-SWINGS, G.M.; CLAAS, F.H.; FIBBE, W.E.; KANHAI, H.H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, v.22, n.7, p.1338–1345, 2004.

ISHII, M.; KOIKE, C.; IGARASHI, A.; YAMANAKA, K.; PAN, H.; HIGASHI, Y.; KAWAGUCHI, H.; SUGIYAMA, M.; KAMATA, N.; IWATA, T.; MATSUBARA, T.; NAKAMURA, K.; KURIHARA, H.; TSUJI, K.; KATO, Y. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.332, n.1, p.297-303, 2005.

JACKSON, L.; JONES, D.R.; SCOTTING, P., SOTTILE, V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *Journal of Postgraduate Medical Institute*, v.53, n.2, p.121-127, 2007.

JOHANSSON, N.; SAARIALHO-KERE, U.; AIROLA, K.; HERVA, R.; NISSINEN, L.; WESTERMARCK, J.; VUORIO, E.; HEINO, J.; KAHARI, V.M. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Developmental Dynamics*, v.208, n.3, p.387–397,1997.

JUNQUEIRA, L.C.U. ; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KARL, A.; OLBRICH, N.; PFEIFER, C.; BERNER, A.; ZELLNER, J.; KUJAT, R.; ANGELE, P.; NERLICH, M.; MUELLER, M.B. Thyroid hormone-induced hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis is mediated by bone morphogenetic protein-4. *Tissue Engineering Part A*, v.20, n.1-2, p.178-188, 2014.

KARSENTY, G.; WAGNER, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell*, v.2, n.4, p.389-406, 2002.

KAVOK, N.S.; KRASILNIKOVA, O.A.; BABENKO, N.A. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. *BMC Cell Biology*, v,2, n.5, 2001.

KIM., H.J.; IM, G.I. Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: greater doses of growth factor are necessary. *Journal of Orthopaedic Research*, v.27, n.5 p.612-619, 2009a.

KIM, H. J.; IM, M.D. Combination of transforming growth factor-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*, v.15, n.7, p.1543-1551, 2009b.

KIM, Y.J.; KIM, H.J.; IM, G.I. PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.373, n.1, p.104-108, 2008.

KINGHAM, P.J.; KALBERMATTEN, D.F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S.J.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology*, v.207, n.2, p.267-274, 2007.

KOCH, M.; MURRELL, J.R.; HUNTER, D.D.; OLSON, P.F.; JIN, W.; KEENE, D.R. A novel member of the netrin family, -netrin, shares homology with the chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. *The Journal of Cell Biology*, v.34, n.151, p.221-234, 2000.

KOHLI, N.; WRIGHT, K.T.; SAMMONS, R.L.; JEYS, L.; SNOW, M.; JOHNSON, W.E. An *in vitro* comparison of the incorporation, growth, and chondrogenic potential of human bone marrow versus adipose tissue mesenchymal stem cells in clinically relevant cell scaffolds used for cartilage repair. *Cartilage*, v.6, n.4, p.252-263, 2015.

KOLF, C.M.; CHO, E.; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research and Therapy*, v.9, n.1, p.204, 2007.

KRONENBERG, H.M. PTHrP and skeletal development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1068, p.1-13, 2006.

KUNISAKI, S.M.; ARMANT, A.; KAO, G.S.; STEVENSON, K.; KIM, H.; FAUZA, D.O. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials. *Journal of Pediatric Surgery*, v.42, n.6, p.974–980, 2007.

KURODA, R.; ISHIDA, K.; MATSUMOTO, T.; AKISUE, T.; FUJIOKA, H.; MIZUNO, K.; OHGUSHI, H.; WAKITANI, S.; KUROSAKA, M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.15, n.2, p.226 – 231, 2007.

LARSSON, T.; SOMMARIN, Y.; PAULSSON, M.; ANTONSSON, P.; HEDBOM, E.; WENDEL, M.; HEINEGÅRD, D. Cartilage matrix proteins. A basic 36-kDa protein with a restricted distribution to cartilage and bone. *The Journal of Biological Chemistry*, v.266, n.30, p.20428-20433, 1991.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v.11, n.5, p.321-334, 2005.

LEE, H.L.; YU, B.; DENG, P.; WANG, I.C; HONG, C. Transforming growth factor- β -induced kdm4b promotes chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, v.34, n.3, p.711–719, 2016.

LEFEBVRE, V., BEHRINGER, R.R., DE CROMBRUGGHE, B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.9, p.69-75, 2001.

LEFEBVRE, V.; DE CROMBRUGGHE, B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biology*, v.16, n.9, p.529-540, 1998.

LEFEBVRE, V.; SMITS, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*, v.75, n.3, p.200–212, 2005.

LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: a view toward the future. *Annals of the New York Academy Sciences*, v.1044, p.132-138, 2005.

LEVI, B.; LONGAKER, M.T. Adipose derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells*, v.29, n.4, p.576-582, 2011.

LI, C.Y.; WU, X.Y.; TONG, J.B.; YANG, X.X.; ZHAO, J.L.; ZHENG, Q.F.; ZHAO, G.B.; MA, Z.J. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research and Therapy*. v.55, n.6, p.1-13, 2015.

LI, H.; DAI, K.; TANG, T.; ZHANG, X.; YAN, M.; LOU, J. Bone regeneration by implantation of adipose derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.356, n.4, p.836-842, 2007.

LI, J.; ZHAO, Q.; WANG, E.; ZHANG, C.; WANG, G.; YUAN, Q. Dynamic

compression of rabbit adipose-derived stem cells transfected with insulin-like growth factor 1 in chitosan/gelatin scaffolds induces chondrogenesis and matrix biosynthesis. *Journal of Cellular Physiology*, v.227, n.5, p.2003-2012, 2012.

LIN, H.T.; OTSU, M.; NAKAUCHI, H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.368, n.1609, p.20110334, 2013.

LINDNER, U.; KRAMER, J.; ROHWEDEL, J.; SCHLENKE, P. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v.37, n.2, p.75–83, 2010.

LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ Journal of Surgery*, v.79, n.4, p.235-244, 2009.

LOGAN, C.Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.20, p.781–810, 2004.

MALLADI, P.; XU, Y.; YANG, G.P.; LONGAKER, M.T. Functions of vitamin D, retinoic acid, and dexamethasone in mouse adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, v.12, n.7, p.2031-2040, 2006.

MEHLHORN, A.T.; NIEMEYER, P.; KASCHE, K.; MULLER, L.; FINKENZELLER, G.; HARTL, D.; SUDKAMP, N.P.; SCHMAL, H. Differential effects of BMP-2 and TGF- β 1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Proliferation*, v.40, n.6, p.809-823, 2007.

MERCERON, C.; VINATIER, C.; PORTRON, S.; MASSON, M.; AMIAUD, J.; GUIGAND, L.; CHÉREL, Y.; WEISS, P.; GUICHEUX, J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *The American Journal of Physiology*, v.298, n.2, p.355-364, 2010.

MININA, E.; WENZEL, H.M.; KRESCHEL, C.; KARP, S.; GAFFIELD, W.; MCMAHON, A.P.; VORTKAMP, A. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*, v.128, n.22, p.4523-4534, 2001.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School*, v.76, n.2, p.56-66., 2009.

MONSEL, A.M.D.; ZHU, Y.M.D.; GENNAI, S.M.D; HAO, Q. PhD; LIU, J.M.D.; LEE, J.W.M.D. Cell-based Therapy for Acute Organ Injury: Preclinical Evidence and Ongoing Clinical Trials Using Mesenchymal Stem Cells. *Anesthesiology*, v.121, n.5, p.1099-1121, 2014.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, v.40, n.1, p.238-245, 2010.

MURAKAMI, S.; KAN, M.; MCKEEHAN, W.L.; DE CROMBRUGGHE, B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, n.3, p.1113-1118, 2000.

MURTAUGH, L.C.; CHYUNG, J.H.; LASSAR, A.B. Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes and Development*, v.13, n.2, p.225-237, 1999.

MUSINA, R.A.; BEKCHANOVA, E.S.; SUKHIKH, G.T. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v.139, p.504-509, 2005.

MACKIE, E.J.; TATARCZUCH, L.; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology*, v.211, n.2, p.109–121, 2011.

MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; MITCHELL, J.B.; FLOYD, Z.E.; HAMMILL, L.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; TING, J.P.; STORMS, R.W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J.M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes *in vitro*. *Stem Cells*, v.24, n.5, p.1246-1253, 2006.

MELLO, M.A.; TUAN, R.S. Effects of TGF-beta1 and triiodothyronine on cartilage maturation: in vitro analysis using long-term high-density micromass cultures of chick embryonic limb mesenchymal cells. *Journal of Orthopaedic Research*, v.24, n.11, p.2095- 2105, 2006.

MIURA, M.; TANAKA, K., KOMATSU, Y.; SUDA, M.; YASODA, A.; SAKUMA, Y.; OZASA, A.; NAKAO, K. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 Cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.17, n.3, p.443-454, 2002.

MUELLER, M.B.; TUAN, R.S. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis and Rheumatism*, v.58, n.5, p.1377-1388, 2008.

NADRI, S.; SOLEIMANI, M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Cytotherapy*, v.9, n.8, p.729–737, 2007.

NAKAGAMI, H.; MAEDA, K.; MORISHITA, R.; IGUCHI, S.; NISHIKAWA, T.; TAKAMI, Y.; KIKUCHI, Y.; SAITO, Y.; TAMAI, K.; OGIHARA, T.; KANEDA, Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.25, n.12, p.2542-2547, 2005.

NEJADNIK, H.; HUI, J.H.; CHOONG, E.P.F.; TAI, B.C.; LEE, E.H. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: An observational cohort study. *The American Journal of Sports*

Medicine, v.38, n.6, p.1110-1116, 2010.

NESIC, D.; WHITESIDE, R.; BRITTBURG, M.; WENDT, D.; MARTIN, I.; VARLE, P.M. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.58, n.2, p.300–322, 2006.

NG, L.J.; WHEATLEY, S.; MUSCAT, G.E.; CONWAY-CAMPBELL, J.; BOWLES, J.; WRIGHT, E.; BELL, D.M.; TAM, P.P.; CHEAH, K.S.; KOOPMAN, P. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental Biology*, v.183, n.1, p.108-121, 1997.

NILSSON, O.; PARKER, E.A.; HEGDE, A.; CHAU, M.; BARNES, K.M.; BARON, J. Gradients in bone morphogenetic protein-related gene expression across the growth plate. *Journal of Endocrinology*, v.193, n.1, p.75-84, 2007.

NUNES, M.T. Hormônios tireoidianos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.47, n.6, 2003.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M.J.; VAN HAM, S.M.; KNIPPENBERG, M.; HELDER, M.N.; KLEIN-NULEND, J.; SCHOUTEN, T.E.; RITT, M.J.P.F.; VAN MILLIGEN, F.J. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue harvesting procedure. *Cytotherapy*, v.8, n.2, p.166-177, 2006.

OH, C.D.; CHANG, S.H.; YOON, Y.M.; LEE, S.J.; LEE, Y.S.; KANG, S.S.; CHUN, J.S. Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, erk-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymal cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.8, p.5613–5619, 2000.

OKUBO, Y.; REDDI, A.H. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.306, n.1, p.186-190, 2003.

ORTEGA, F.L.; MORENO-NAVARRETE, J.M.; RIBAS, V.; ESTEVE, E.; RODRIGUEZ-HERMOSA, J.I.; RUIZ, B.; PERAL, B.; RICART, W.; ZORZANO, A.; FERNANDEZ-REAL, J.M. Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor- α 1 gene expression than omental fat. *Obesity (Silver Spring)*, v.17, p.2134–2141, 2009

PAGANI, S.; BORSARI, V.; VERONESI, F.; FERRARI, A.; CEPOLLARO, S.; TORRICELLI, P.; FILARDO, G.; FINI, M. Increased chondrogenic potential of mesenchymal cells from adipose tissue versus bone marrow-derived cells in osteoarthritic in vitro models. *Journal of Cellular Physiology*, v.232, n.6, p.1478-1488, 2017.

PARK, J.S.; SHIM, M.S.; SHIM, S.H.; YANG, H.N.; JEON, S.Y.; WOO, D.G.; LEE, D.R.; YOON, T.K.; PARK, K.H. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- β 3. *Biomaterials*, v.32, n.32, p.8139-8149, 2011.

PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem

cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Biology Bulletin*, v.33, n.1, p.2-18, 2006.

PEPTAN, I.A.; HONG, L.; MAO, J.J. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.117, n.5, p.1462-1470, 2006.

PILLING, D.; FAN, T.; HUANG, D.; KAUL, B.; GOMER, R.H. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One*, v.4, n.10, p.7475, 2009.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science*, v.284, n.5411, p.143–147, 1999.

PUETZER, J.L.; PETITTE, J.N.; LOBOA, E.G. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Engineering Part B*, v.16, n.4, p.435-444, 2010.

QU, C.Q.; ZHANG, G.H.; ZHANG, L.J.; YANG, G.S. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v.43, n.2, p.95-100, 2007.

QUARTO, N.; LONGAKER, M.T. FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Engineering*, v.12, n.6, p.1405-1418, 2006.

RADA, T.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering*, v.15, n.2, p.113-125, 2009.

RANDAU, T.M.; SCHILDBERG, F.A.; ALINI, M.; WIMMER, M.D.; HADDOUTI, EI-M.; GRAVIUS, S.; ITO, K.; STODDART, M.J. The effect of dexamethasone and triiodothyronine on terminal differentiation of primary bovine chondrocytes and chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells. *Plos One*, v.8, n.8, p.72973, 2013.

RASTEGAR, F.; SHENAG, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.Q.; HE, B.C.; CHEN, L.; ZUO, G.W.; L.U.O.Q.; SHI, Q.; WAGNER, E.R.; HUANG, E.; GAO, Y.; GAO, J.L.; KIM, S.H.; ZHOU, J.Z.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.; LUO, J.; LUO, X.; QIN, J.; REID, R.R.; LUU, H.H.; HAYDON, R.C.; DENG, Z.L.; HE, T.C. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World Journal of Stem Cells*, v.2, n.4, p.67-80, 2010.

REHMAN, J.; TRAKTUEV, D.; LI, J.; MERFELD-CLAUSS, S.; TEMM-GROVE, C.J.; BOVENKERK, J.E.; PELL, C.L.; JOHNSTONE, B.H.; CONSIDINE, R.V.; MARCH, K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, v.109, n.10, p.1292-1298, 2004.

ROARK, E.F.; GREER, K. Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Developmental Dynamics*, v.200, n.2, p.103-116, 1994.

ROBSON, H.; SIEBLER, T.; STEVENS, D.A.; SHALET, S.M.; WILLIAMS, G.R. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology*, v.141, n.10, p.3887-3897, 2000.

ROEBUCK, K.A.; FINNEGAN, A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, v.66, n.6, p.876-888, 1999.

SADEGHI, F.; ESFANDIARI, E.; HASHEMIBENI, B.; ATEF, F.; SALEHI, H.; SHABANI, F. The effect of estrogen on the expression of cartilage-specific genes in the chondrogenesis process of adipose-derived stem cells. *Advanced Biomedical Research*, v.11, n.4, p.43, 2015.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells- basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, v.25, n.4, p.818-827, 2007.

SARUGASER, R.; LICKORISH, D.; BAKSH, D.; HOSSEINI, M. M.; DAVIES, J. E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, v.23, n.2, p.220-229, 2005.

SCHEFE, J.H.; LEHMANN, K.E.; BUSCHMANN, I.R.; UNGER, T.; FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *Journal of Molecular Medicine*, v.84, n.11, p.901-910, 2006.

SEMBA, I.; NONAKA, K.; TAKAHASHI, I.; TAKAHASHI, I.K.; DASHNER, R.; SHUM, L.; NUCKOLLS, G.H.; SLAVKIN, H.C. Positionally-dependent chondrogenesis induced by BMP4 is co-regulated by Sox9 and Msx2. *Developmental Dynamics*, v.17, n.4, p.401-414, 2000.

SIEBLER, T.; ROBSON, H.; SHALET, S.M.; WILLIAMS, G.R. Dexamethasone inhibits and thyroid hormone promotes differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells. *Bone*, v.31, n.4, p.457-464, 2002.

SHIH, D.T.; LEE, D.C.; CHEN, S.C.; TSAI, R.Y.; HUANG, C.T.; TSAI, C.C.; SHEN, E.Y.; CHIU, W.T. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*, v.23, n.7, p.1012-1020, 2005.

SHIMIZU, H.; YOKOYAMA, S.; ASAHARA, H. Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Development, Growth & Differentiation*, v.49, n.6, p.449, 2007.

SHU, B.; ZHANG, M.; XIE, R.; WANG, M.; JIN, H.; HOU, W.; TANG, D.; HARRIS, S.E.; MISHINA, Y.; O'KEEFE, R.J.; HILTON, M.J.; WANG, Y.; CHEN, D. BMP2, but

not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *Journal of Cell Science*, v.124, n.Pt20, p.3428-3440, 2011.

SHUM, L.; COLEMAN, C.M.; HATAKEYAMA, Y.; TUAN, R.S. Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Research*, v.69, n.2, p.102–122, 2003.

SMITS, P.; LI, P.; MANDEL, J.; ZHANG, Z.; DENG, J.M.; BEHRINGER, R.R.; DE CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Developmental Cell*, v.1, n.2, p.277–290, 2001.

SPÄTER, D.; HILL, T.P.; O'SULLIVAN, R.J.; GRUBER, M.; CONNER, D.A.; HARTMANN, C. Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of *Ihh* during chondrogenesis. *Development*, v.133, n.15, p.3039–3049, 2006.

SOLCHAGA, L.A.; PENICK, K.; WELTER, J.F. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. *Methods in Molecular Biology*, v.698, p.253-278, 2011.

STUDER, D.; MILLAN, C.; ÖZTÜRK, E.; MANIURA-WEBER, K.; ZENOBI-WONG, M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *European Cells & Materials*, v.24, n.24, p.118-135, 2012.

TAE, S.; LEE, S.; PARK, J.; IM, G. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomedical Materials*, v.1, n.2, p. 63-71, 2006.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, v.126, n.4, p.663–676, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, v.131, n.5, p.861–872, 2007.

TANG, Y.; WANG, B. Gene and stem cell-based therapeutics for cartilage regeneration and repair. *Stem Cell Research & Therapy*, v.15, n.6, p.78, 2015.

TOYODA, M.; MATSUBARA, Y.; LIN, K.; SUGIMACHI, K.; FURUE, M. Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues. *Cell Biochemistry and Function*, v.27, n.7, p.440-447, 2009.

TRIVANOVIĆ, D.; NIKOLIĆ, S.; KRSTIĆ, J.; JAUKOVIĆ, A.; MOJSILOVIĆ, S.; ILIĆ, V.; OKIĆ-DJORDJEVIĆ, I.; SANTIBANEZ, J.F.; JOVČIĆ, G.; BUGARSKI, D. Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line MCF-7 in vitro. *Cell Biology International*, v.38, n.2, p.254-265, 2014.

TRIVILIN, L.O.; CASSIANO, D.C.; MENDES, S.O.; BORÇOI, A.R.; ARCHANJO, A.B.; CUNHA, E.R.; PULIDO, J.Z.; BOELONI, J.N.; CONFORTI, A.M.A.S. Exposure to cigarette smoke alters AgNOR number and HIF-1 α expression in colorectal tubular adenocarcinoma in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v.10, n.3, p.3822-3829, 2017.

UUSITALO, H.; HILTUNEN, A.; AHONEN, M.; GAO, T.J.; LEFEBVRE, V.; HARLEY, V.; KÄHÄRI, V.M.; VUORIO, E. Accelerated up-regulation of L-Sox5, Sox6, and Sox9 by BMP-2 gene transfer during murine fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.16, n.10, p.837-845, 2001.

VAN DER KRAAN, P.M.; DAVIDSON, E.N.B.; VAN DEN BERG, W.B. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: to serve and protect or a wolf in sheep clothing's? *Osteoarthritis Cartilage*, v.18, n.6, p.735-741, 2010.

VATER, C.; KASTEN, P.; STIEHLER, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, v.7, n.2, p.463-477, 2011.

VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B.E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation*, v.19, n.3, p.279-289, 2010.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v.116, n.5, p.639-648, 2004.

WAKITANI, S.; NAWATA, M.; TENSHO, K.; OKABE, T.; MACHIDA, H.; OHGUSHI, H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.1, n.1, p.74-79, 2007.

WAKITANI, S.; OKABE, T.; HORIBE, S.; MITSUOKA, T.; SAITO, M.; KOYAMA, T.; NAWATA, M.; TENSHO, K.; KATO, H.; UEMATSU, K.; KURODA, R.; KUROSAKA, M.; YOSHIYA, S.; HATTORI, K.; OHGUSHI, H. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed up to 11 years and 5 months. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.5, n.2, p.146-150, 2011.

WANG, L.; SHAO, Y.Y.; BALLOCK, R.T. Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.22, n.12, p.1988-1905, 2007.

WOLFF, E.F.; GAO, X.B.; YAO, K.V.; ANDREWS, Z.B.; DU, H.; ELSWORTH, J.D.; TAYLOR, H.S. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.15, n.4, p.747-755, 2011.

WRIGHT, E.; HARGRAVE, M.R.; CHRISTIANSEN, J.; COOPER, L.; KUN, J.; EVANS, T.; GANGADHARAN, U.; GREENFIELD, A.; KOOPMAN, P. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature genetics*,

v.9, n.1, p.15-20, 1995.

YOON, I.; CHUNG, C.W.; SUNG, J.; CHO, H.; KIM, J.S.; SIM, W.; SIM, C.; CHUNG, S.; KIM, D. Proliferation and chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in porous hyaluronic acid scaffold. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, n.4, v.112, p. 402–408, 2011.

YOSHIDA, C.A.; YAMAMOTO, H.; FUJITA, T.; FURUICHI, T.; ITO, K.; INOUE, K.; YAMANA, K.; ZANMA, A.; TAKADA, K.; ITO, Y.; KOMORI, T. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes & Development*, v.18, n.8, p.952–963, 2004.

ZAMINY, A.; KASHANI, I.R.; BARBARESTANI, M.; BARBARESTANI, M.; HEDAYATPOUR, A.; MAHMOUDI, R.; FARZANEH NEJAD, A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. *Iran. Biomedical Journal*, v.12, n.3, p.133-141, 2008.

ZEHENTNER, B.K.; DONY, C.; BURTSCHER, H. The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.14, n.10, p.1734-1741, 1999.

ZHANG, Y.; TANG, C.L.; CHEN, W.J.; ZHANG, Q.; WANG, S.L. Dynamic compression combined with exogenous SOX-9 promotes chondrogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells in PLGA scaffold. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.19, n.14, p.2671-2678, 2015.

ZHAO, H.; EBERSPAECHER, V.; LEFEBVRE, V.; DE CROMBRUGGHE, B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis, *Developmental Dynamics*, v.209, n.4, p.377-386, 1997

ZHOU, G.; ZHENG, Q.; ENGIN, F.; MUNIVEZ, E.; CHEN, Y.; SEBALD, E.; KRAKOW, D.; LEE, B. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.103, n.50, p.19004-19009, 2006.

ZHOU, Q.; LI, B.; ZHAO, J.; PAN, W.; XU, J.; CHEN, S. IGF-I induces adipose derived mesenchymal cell chondrogenic differentiation in vitro and enhances chondrogenesis *in vivo*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Animal*, v.52, n.3, p.356-354, 2016.

ZOU, H.; NISWANDER, L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science*, v.272, n.5262, p.738–741, 1996.

ZOU, H.; WIESER, R.; MASSAGUE, J.; NISWANDER, L. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes & Development*, v.11, n.17, p.2191–2203, 1997.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human

adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, v.13, n.12, p.4279–4295, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE. Protocolo (número 062/2013) de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 062/2013, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **“Efeitos in vitro da triiodotironina (T3) na diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas.”**, que tem como responsável o (a) docente **Jankerle Neves Boeloni**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 20/12/13.

Vitória (ES), 20 de dezembro de 2013.

Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES
Prof. Dr. Douglas Severo Silveira
CRM-ES 06820/Medicina 01546811
Presidente CEUA-UFES