

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

ISABELLA COSMO DA SILVA

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS
***Wistar* IDOSAS NÃO DIMINUEM O POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO**
CONDROGÊNICO SOB EFEITO DA TRIIODOTIRONINA

ALEGRE-ES

2019

ISABELLA COSMO DA SILVA

**CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS
WISTAR IDOSAS NÃO DIMINUEM O POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO
CONDROGÊNICO SOB EFEITO DA TRIIODOTIRONINA**

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. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jankerle Neves Boeloni.

ALEGRE-ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S586c Silva, Isabella Cosmo da, 1995-
Células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas Wistar
idosas não diminuem o potencial de diferenciação condrogênico
sob efeito da triiodotironina / Isabella Cosmo da Silva. - 2019.
77 f. : il.

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

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

CDU: 619

ISABELLA COSMO DA SILVA

**CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS
WISTAR IDOSAS NÃO DIMINUEM O POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO
CONDROGÊNICO SOB EFEITO DA TRIIODOTIRONINA**

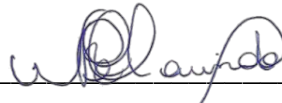
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades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

Aprovado em 25 de Fevereiro de 2019.

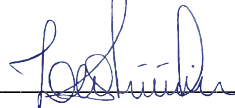
COMISSÃO EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo
Universidade Federal de Viçosa



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

Aos meus pais João e Néia, meu irmão Rick e à memória viva de minha
amada avó Maria Guinsberg.

AGRADECIMENTOS

Gratidão ao meu Deus que esteve comigo todos os dias, aos anjos que ele enviou para me acompanharem, e à sua mão que nunca me desamparou ou me deixou só. Em Jesus “encontrei o grande amor, amor que sara a dor; que cura as feridas e traz sentido à vida; amor que aquece a alma, conforta e acalma o coração aflito e o faz alcançar a paz”.

Aos meus pais, João e Dulcinéia pela vida, coragem, educação, amor e força que sempre me deram. Ao meu irmão João Henrique e cunhada Maria Rita por serem um exemplo para mim, pelo amor e conselhos. Agradeço a vocês família por terem feito a distância não parecer tão grande sendo sempre presentes em minha vida. Se não fossem vocês eu nada seria, vocês dão sentido aos meus dias. Obrigada por todo apoio e por serem minha base, meu porto, meu cais.

À Prof. Jankerle Boeloni, minha orientadora desde o TCC até a Dissertação, agradeço pela experiência e ensinamentos transmitidos a mim. Por ter me desafiado e estimulado em diversas situações, me mostrando que eu podia superar mesmo que fosse difícil. Sou muito grata pelas cobranças e “puxões de orelha”, sei que me fizeram mais forte. Seu profissionalismo, educação e ética profissional são exemplos a todos os alunos e professores à sua volta. Muito obrigada.

Ao Prof. Leonardo Trivilin, pelas imensas contribuições no decorrer do desenvolvimento deste trabalho e por ter me ajudado tanto com as análises estatísticas.

Aos amigos, colegas e funcionários do HOVET, do Laboratório de Patologia Animal e da turma de Ciências Veterinárias 2017/1.

Aos meus amigos pessoais Gabriel Uzai, Adriano Stelzer, Brenda Fayla, Barbara Moraes, Ana Naisa Beserra e Larissa Vidal, que se fizeram presentes nesses dois anos, dividindo o peso dos momentos de lutas e dificuldades, tornando os dias mais alegres e suportáveis. Obrigada pela compreensão, ajuda emocional e pela amizade.

À minha amiga Nathalia Chicon Elert, por ter me ensinado com maestria as atividades do laboratório e do mestrado, sendo praticamente minha co-orientadora, me ajudando no desenvolvimeto do experimento e da minha dissertação, pela ajuda incalculável e

por ter compartilhado diversos momentos bons e ruins, sem você teria sido quase impossível, minha eterna gratidão.

Ao meu amigo Higor Assis, por ter me ajudado com o processamento das lâminas da parte da morfologia, obrigada por ter se colocado a disposição, sua experiência passada a mim e ajuda foram fundamentais.

À Mellina Mitrogiannis, por todo suporte emocional e pela presença nessa reta final, não deixando faltar amor e apoio. Por me aconselhar e ouvir os meus lamentos nos momentos difíceis durante o mestrado. Por ter tornado os dias mais lindos, coloridos e cheios de amor, fazendo da rotina menos pesada. Por ser um exemplo de pessoa, companheira e profissional, que bom que você existe nesse mundo. Minha eterna gratidão por ter você ao meu lado.

À Alegre, cidade que amo, onde vivi momentos indescritíveis. Aqui aprendi a viver, lutar pelo que é meu, aprendi a chorar e a sorrir, a amar e ser amada. Fiz amigos e irmãos, e conheci pessoas extraordinárias. Estará sempre em meu coração como o lugar que despertei para vida e me tornei quem sou hoje.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Todo dia de ontem pode ter sido árduo. Muitas lutas vieram, deixando-te o cansaço. Provas inesperadas alteram-te os planos. Soma, porém, as bênçãos que Deus te entregou. Esquece qualquer sombra, não pares, serve e segue. Agora é novo dia, tempo de caminhar"

Chico Xavier

RESUMO

SILVA, ISABELLA COSMO. **Células Tronco Mesenquimais Da Medula Óssea De Ratas Wistar Idosas Não Diminuem O Potencial De Diferenciação Condrogênico Sob Efeito Da Triiodotironina**. 2019. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

O potencial de diferenciação das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) diminui em humanos e ratos *Sprague Dawley* idosos. Além disso, o tratamento com triiodotironina (T3) melhora o potencial condrogênico em CTM-MO de ratas *Wistar* jovens. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de diferenciação condrogênico de CTM-MO de ratas *Wistar* idosas e a influencia da T3. Para isso foi realizada a coleta asséptica de CTM-MO de seis ratas *Wistar* idosas (12 meses de idade) e seis ratas *Wistar* jovens (um mês de idade). As células foram cultivadas *in vitro* em meio básico de cultivo e distribuídas nos seguintes grupos: 1) CTM-MO ratas jovens sem tratamento com T3; 2) CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3; 3) CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3; 4) CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3. Após sete, 14 e 21 dias de diferenciação foram avaliados a expressão de Sox-9, agrecano (Agg) e colágeno II (Col II), morfologia celular e formação de matriz condrogênica. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de testes estatísticos de acordo com os dados amostrais. A expressão de Sox9 e Agg foi superior no grupo (2) em comparação ao grupo (1) de forma período dependente. No entanto, a formação de glicosaminoglicanos foi semelhante entre esses grupos. O uso de 0,01 e 1000 nM de T3 reduziu a expressão de Agg de forma período dependentes, porém não alterou a expressão de Sox9 e Col II e a formação de glicosaminoglicanos. Conclui-se que na idade de 12 meses, as ratas *Wistar* fornecem boa fonte celular e o tratamento hormonal não se faz necessário, pois o potencial de diferenciação condrogênico de CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 não é alterado com a idade cronológica.

Palavras-chave: idade cronológica. hormônio tireoidiano. condrogênese.

ABSTRACT

SILVA, ISABELLA COSMO. **Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Of *Wistar* Elderly Rats Do Not Decrease Potential Of Chondrogenic Differentiation Under Effect Of Triiodothyronine.** 2019. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

The potential for bone marrow mesenchymal stem cell differentiation (CTM-MO) decreases in humans and older Sprague Dawley rats. In addition, triiodothyronine (T3) treatment improves the chondrogenic potential in CTM-MO of young *Wistar* rats. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential for chondrogenic differentiation of CTM-MO from older *Wistar* rats and the influence of T3. For this purpose, aseptic CTM-MO was collected from six old *Wistar* rats (12 months old) and six young *Wistar* rats (one month old). The cells were cultured in vitro in basic culture medium and distributed in the following groups: 1) CTM-MO young rats without T3 treatment; 2) CTM-MO of elderly rats without T3 treatment; 3) CTM-MO of aged rats treated with 0.01 nM T3; 4) CTM-MO of 1000 nM T3 treated elderly rats. After seven, 14 and 21 days of differentiation, the expression of Sox-9, aggrecan (Agg) and collagen II (Col II), cell morphology and chondrogenic matrix formation were evaluated. Analysis of variance (ANOVA) was performed followed by statistical tests according to the sample data. The expression of Sox9 and Agg was higher in group (2) compared to group (1) periodically. However, glycosaminoglycan formation was similar between these groups. The use of 0.01 and 1000 nM T3 reduced Agg expression in a period-dependent manner, but did not alter Sox9 and Col II expression and glycosaminoglycan formation. It was concluded that at 12 months of age, *Wistar* rats provide good cell source and hormonal treatment is not necessary, since the potential of chondrogenic differentiation of CTM-MO from elderly rats without T3 treatment is not changed with chronological age

Key-words: chondrogenesis. chronological age. thyroid hormone.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 -	Esquema da diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> das CTM e os principais fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras (adaptado de RICHARDSON <i>et al.</i> , 2016).....	19
Figura 2 -	Expressão relativa de Sox9 (A,B,C), colágeno II (Col II) (D,E,F) e agrecano (Agg) (G,H,I) (média ± desvio padrão) pela técnica de qPCR de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas <i>Wistar</i> nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de diferenciação condrogênica. Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste T não pareado. *P<0,05.....	34
Figura 3 -	Expressão relativa de Sox9 (A,C), colágeno II (Col II) (B,E) e agrecano (Agg) (C,F) (média ± desvio padrão) pela técnica de qPCR de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas <i>Wistar</i> nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (A,B,C) e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (D,E,F) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste T não pareado. *P<0,05; **P<0,01.....	35
Figura 4 -	Morfologia das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas <i>Wistar</i> nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (A,B,C) e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (D,E,F) nos períodos de sete (A,D), 14 (B,E) e 21 (C,F) dias de diferenciação condrogênica. Hematoxilina e eosina, Barra=59,4µm.....	37
Figura 5 -	Produção de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em células	

tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (A,B,C) e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (D,E,F) aos sete (A,D), 14 (B,E) e 21 (C,F) dias de diferenciação condrogênica. Alcian-Blue-Ácido Periódico de Schiff. Barra=59,4µm.....

38

Figura 6 - Gráficos dos escores de produção de matriz condrogênica AB+ e PAS+ de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas *Wistar*, nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 aos sete (A,D), 14 (B,E) e 21 (C,F) dias de diferenciação condrogênica. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney.....

39

Figura 7 - Expressão relativa de Sox9 (A,B,C), colágeno II (Col II) (D,E,F) e agrecano (Agg) (G,H,I) (média ± desvio padrão) pela técnica de qPCR de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3, CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3 aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de diferenciação condrogênica. Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste de *Student Newman Keuls*. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.....

41

Figura 8 - Expressão relativa de Sox9 (A,B,C), colágeno II (Col II) (D,E,F) e agrecano (Agg) (G,H,I) (média ± desvio padrão) pela técnica de qPCR de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (A,D,G), CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 (B,E,H) e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3 (C,F,I) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste de *Student Newman Keuls*. *P<0,05; **P<0,01.....

42

Figura 9 - Morfologia das células tronco mesenquimais da medula óssea

(CTM-MO) de ratas *Wistar* idosas, nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (A,B,C), CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 (D,E,F) e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3 (G,H,I), aos períodos de sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de diferenciação condrogênica. Hematoxilina e eosina, Barra=59,4µm.....

44

Figura 10- Produção de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (A,B,C), CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 (D,E,F) e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3 (G,H,I) aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de diferenciação condrogênica. Alcian-Blue-Ácido Periódico de Schiff. Barra=59,4µm.....

46

Figura 11- Gráficos dos escores de produção de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3, CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3, aos sete (A,D), 14 (B,E) e 21 (C,F) dias de diferenciação condrogênica. Para análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do *post hoc* de Dunn.....

47

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

Agg – Agrecano;

BMP – Proteínas morfogenéticas ósseas;

Col II – Colágeno II;

Col X– Colágeno X;

Col XI – Colágeno XI;

CTA – Células tronco adultas;

CTM – Células tronco mesenquimais;

CTM-MO – Células tronco mesenquimais da medula óssea;

CTM-TA – Células tronco mesenquimais do tecido adiposo;

Dex – Dexametasona;

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*;

FGF – Fator de crescimento fibroblástico;

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;

MEC – Matriz extracelular;

PBS – Tampão de fosfato-salino;

PCR – Reação em cadeia da polimerase;

PTH – Paratormônio;

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real;

Runx2 – *Runt-related transcription factor 2*;

SFB – Soro fetal bovino;

Sox – *SRY-related high mobility group-box gene*

T3 – Triiodotironina;

TGF- β – Fator de crescimento transformante β ;

UFC – Unidades Formadoras de Colônias;

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Células tronco.....	15
2.2 Células tronco mesenquimais (CTM).....	16
2.3 Células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO)	17
2.4 Diferenciação condrogênica <i>in vivo</i> de células tronco mesenquimais	18
2.5 Diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> de células tronco mesenquimais	21
2.5.1 Fatores que influenciam na diferenciação condrogênica <i>in vitro</i>	22
2.5.2 Fatores hormonais que influenciam a diferenciação condrogênica.	24
2.5.3 Efeito da idade na diferenciação condrogênica	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 Extração e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em DMEM	27
3.2 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán	28
3.3 Diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea.....	2828
3.4 Expressão dos fatores de transcrição Sox9, Col II e Agg.....	29
3.5 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica.	29
3.6 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Viabilidade celular pelo teste de Azul de Tripán.....	32
4.2 Análise da expressão gênica de Sox9, Col II e Agg.....	32

4.3 Avaliação da influência do tratamento com T3 sobre o potencial de diferenciação condrogênico das CTM-MO de ratas idosas.....	39
4.3.1 Análise da expressão gênica de Sox9, Col II e Agg.....	39
4.3.2 Análise da morfologia celular pela coloração de HE.....	42
4.3.3 Análise da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+.....	45
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÃO.....	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
8. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

O tecido cartilaginoso tem um potencial reduzido de regeneração decorrente de propriedades intrínsecas como baixo potencial mitótico (BROWN *et al.*, 2006) e ausência de vascularização e inervação (DANISOVIC; VARGA; POLÁKI, 2012). Assim, a terapia celular alternativa com células tronco tem sido empregada para melhorar esse potencial de diferenciação (WAKITANI *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2014). As pesquisas com células tronco têm sido amplamente difundidas e estudadas nos últimos anos, principalmente com relação à utilização das mesmas para o tratamento de diversas doenças, dentre elas as doenças do tecido cartilaginoso (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).

As células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) são uma boa fonte celular, visto que podem se diferenciar em condrócitos, osteoblastos, adipócitos, tenócitos e miócitos (HASHIMOTO, KARIYA, MIYAZAKI, 2006; PAYUSHINA, DOMARATSKAYA, STAROSTIN, 2006). Especificamente sobre a diferenciação condrogênica de CTM-MO, existem protocolos bem definidos (SOLCHAGA *et al.*, 2011; VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011). No entanto, muitos fatores e mecanismos ainda precisam ser elucidados, principalmente com relação aos que podem influenciar ou potencializar a diferenciação condrogênica dessas células.

Existem diversos fatores e condições de cultivo que influenciam na diferenciação condrogênica das CTM-MO, dentre eles os fatores de crescimento e de transcrição (BARRY *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2011), o estímulo mecânico, as condições de hipóxia (MARKWAY *et al.*, 2010), o uso de biomateriais (NESIC *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2011), os hormônios (ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014; ASSIS *et al.*, 2018), os fármacos como a dexametasona (Dex) (DERFOUL *et al.*, 2006), a saúde e a idade do doador (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; PAYNE *et al.*, 2010; ASUMDA; CHASE, 2011; KANAWA *et al.*, 2013; FAFIÁN-LABORA *et al.*, 2015). A idade do doador é um importante fator que pode interferir na diferenciação condrogênica das CTM-MO, pois essa diferenciação diminui em ratos *Sprague Dawley* idosos, inclusive com diminuição da expressão de agrecano (Agg) (ASUMDA; CHASE, 2011),

glicosaminoglicanos e de colágeno II (Col II) (ZHENG *et al.*, 2007). Em humanos também ocorre a diminuição da formação de glicosaminoglicanos em cultura de CTM-MO de indivíduos idosos (PAYNE *et al.*, 2010; KANAWA *et al.*, 2013) e da expressão de SOX9, Col II e Agg (KANAWA *et al.*, 2013).

Por outro lado, fatores hormonais também têm sido considerados importantes para a diferenciação condrogênica de CTM-MO. O paratormônio (PTH) influencia nesta diferenciação em ratos de forma dose-dependente por aumentar a expressão de Sox9, Col II e PTH1R (ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014). A Dexametasona (Dex) em concentração de 1 μ M potencializa essa diferenciação em bovinos por aumentar a produção de glicosaminoglicanos e a expressão de colágeno X (Coll X) (RANDAU *et al.*, 2013). Em humanos, 100 nM de Dex, em associação com fator de crescimento transformante β 3 (TGF- β 3), potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-MO, pois aumenta a produção de proteoglicanos e a expressão de agregano, Col II e colágeno XI (Coll XI) (DERFOUL *et al.*, 2006). Em cultura de CTM-MO de humanos, 1 nM de triiodotironina (T3) juntamente com a proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) estimulam a hipertrofia dessas células (KARL *et al.*, 2014). No entanto, em cultura de CTM-MO de bovinos, 100 nM de T3 não interfere na diferenciação condrogênica, pois não altera a expressão de Coll X nem a produção de glicosaminoglicanos (RANDAU *et al.*, 2013).

Entretanto, a T3 tem efeito dose-dependente sobre a diferenciação condrogênica das CTM-MO de ratas *Wistar* jovens, sendo que as concentrações de 0,01 e 1000 nM de T3 promoveram o aumento da formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 em pelo menos um dos períodos avaliados (sete, 14 e 21 dias) (ASSIS *et al.*, 2018). Corroborando, estudos prévios demonstraram que os hormônios tireoidianos também podem influenciar positivamente na diferenciação osteogênica *in vitro* das CTM-MO de ratas jovens, de forma dose-dependente (BOELONI *et al.*, 2009). No entanto, o tratamento *in vitro* com T3 apresenta efeitos negativos sobre fatores envolvidos na diferenciação osteogênica de CTM-MO de ratas adultas (BOELONI *et al.*, 2013b).

Partindo do conhecimento que a idade e o tratamento hormonal influenciam na diferenciação de CTM-MO, esse estudo permite avaliar se essa influência seria positiva ou negativa. Contudo, surgem as seguintes hipóteses: a idade influencia ou não na diferenciação de CTM-MO de ratas *Wistar* idosas; o tratamento hormonal com

T3 influencia no potencial de diferenciação de CTM-MO de ratas *Wistar* idosas. Assim, se houver influencia positiva ou negativa da idade sobre a diferenciação das CTM-MO, o tratamento hormonal com T3 em ratas idosas poderia potencializar ou amenizar essa influência. Dessa forma, o tratamento hormonal com T3 poderia melhorar o potencial das CTM-MO de ratas idosas para ser utilizado posteriormente para o tratamento autólogo de doenças ou defeitos no tecido cartilaginoso.

Objetivo geral

Avaliar, por meio de expressão gênica e formação de matriz condrogênica, o potencial de diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas *Wistar* idosas, sob tratamento ou não com T3.

Objetivos específicos

a) Realizar o cultivo *in vitro* da CTM-MO em meio de indiferenciação (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium) acrescido de 10% de soro fetal bovino, tanto de ratas jovens quanto de ratas idosas separadamente.

b) Realizar teste de viabilidade celular utilizando azul de Tripán, tanto em células de ratas jovens quanto de ratas idosas separadamente.

c) Realizar o cultivo *in vitro* das CTM-MO de ratas jovens em meio de diferenciação condrogênica por sete, 14 e 21 dias de diferenciação sem a adição de triiodotironina (T3). Avaliar, após esses períodos (sete, 14 e 21 dias), a formação de matriz condrogênica utilizando as colorações de alcian blue (AB) e PAS (ácido periódico de Schiff); além de avaliar a expressão de Sox9, colágeno II (Col II) e agrecano por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

d) Realizar o cultivo *in vitro* das CTM-MO de ratas idosas em meio de diferenciação condrogênica sem ou com T3 (doses: 0,01 e 1000 nM) por sete, 14 e 21 dias de diferenciação. Avaliar, após esses períodos (sete, 14 e 21 dias), a formação de matriz condrogênica utilizando as colorações de alcian blue (AB) e PAS (ácido periódico de Schiff); além de avaliar a expressão de Sox9, Col II e agrecano por qPCR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células tronco

As células tronco são células indiferenciadas que apresentam alto potencial de diferenciação em variados tipos celulares especializados, possuem alta capacidade proliferativa e capacidade de auto renovação (PITTENGER *et al.*, 1999; BYDLOWSKI *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2015; DUSCHER *et al.*, 2016). Além disso, funcionam como um reservatório e sistema de reparo, dividindo-se para reabastecer as células que foram perdidas como resultado de lesões ou doenças (KOBOLAK *et al.*, 2016).

De acordo com a capacidade de diferenciação, essas células podem ser subdivididas em células tronco totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes ou onipotentes (JAENISCH; YOUNG, 2008; ZOMER *et al.*, 2015; KOBOLAK *et al.*, 2016). As células tronco totipotentes são originadas do zigoto e são capazes de formar todos os tecidos do indivíduo, inclusive extraembrionários, como a placenta. (JAENISCH; YOUNG, 2008; ZOMER *et al.*, 2015). As células tronco pluripotentes são mais especializadas e são obtidas da massa celular interna do blastocisto, produzindo então qualquer célula das três camadas germinativas, (ectoderma, endoderma e mesoderma) (JAENISCH; YOUNG, 2008; ZOMER *et al.*, 2015) e são denominadas células tronco embrionárias. As células tronco multipotentes podem se converter em vários tipos celulares do mesmo folheto germinativo a qual foram obtidas (TARNOWSKI.SIERON, 2006; JAENISCH; YOUNG, 2008; ZOMER *et al.*, 2015). Por fim, as células unipotentes podem se transformar apenas em um único tipo celular de um determinado folheto embrionário (JAENISCH; YOUNG, 2008; ZOMER *et al.*, 2015).

De acordo com a origem, as células tronco podem ser de origem embrionária (CTE), adultas (CTA) e de pluripotência induzida (iPS – *induced Pluripotent Stem Cells*). As CTE são derivadas do embrião na fase de blastocisto e apresentam capacidade de diferenciação em células dos três folhetos embrionários (WAGERS; WEISMAN, 2004).

As CTA são assim denominadas pois procedem de um tecido adulto, como tecido adiposo, pele, medula óssea, dentre outros (LEE *et al.*, 2004; JAENISCH; YOUNG, 2008; ZOMER *et al.*, 2015; KOBOLAK *et al.*, 2016). As CTA se subdividem em células tronco hematopoiéticas (CTH), que dão origem aos componentes sanguíneos e, células tronco mesenquimais (CTM) (YARAK; OKAMOTO, 2010).

As iPS são células somáticas geneticamente modificadas e reprogramadas por meio de transfecção celular, na qual são incorporados genes que codificam fatores transcricionais altamente expressados pelas células tronco embrionárias, como os fatores *Octamer-binding transcription fator 4* (Oct3/4), *SRY-related high mobility group-box gene 2* (Sox2), *c-Myc*, e *Kruppel-Like Factor 4* (Klf4), gerando exemplares similares às células embrionárias (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2007; JAENISCH; YOUNG, 2008; ZOMER *et al.*, 2015).

2.2 Células tronco mesenquimais (CTM)

Dentre os diferentes tipos de células tronco, encontram-se as CTM. Essas células são ditas como clonogênicas e possuem grande capacidade de expansão, migração, e se diferenciam facilmente, tanto *in vivo* como *in vitro*, em adipócitos, osteócitos e condrócitos (DUSCHER *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2016). Em virtude da sua plasticidade, as CTM são consideradas as mais atrativas para a medicina regenerativa, pois possuem vantagens como o fácil isolamento, alto rendimento, rápida proliferação e potencial de cultivo *in vitro* sem alterações de cariótipo durante várias passagens (ZOMER *et al.*, 2015). Porém, esta plasticidade *in vitro* depende do ambiente de matriz extracelular (MEC) e de fatores de crescimento solúveis (ZOMER *et al.*, 2015).

AS CTM podem ser encontradas em diversos órgãos e tecidos do indivíduo, incluindo sangue fetal (NOORT *et al.*, 2002), polpa dentária (GRONTHOS *et al.*, 2000), músculo esquelético (LIU *et al.*, 2015), cordão umbilical (WEISS; TROYER, 2006), líquido sinovial (HARVANOVÁ *et al.*, 2011), pulmão (LIU; DRISKELL, ENGELHARDT; 2006), tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001) e medula óssea (JIANG *et al.*, 2002). De acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular (*International Society for*

Cellular Therapy - ISCT), as normas para as células serem consideradas como CTM são: aderência a uma superfície plástica, capacidade de diferenciação osteoblástica, adipocítica e condrogênica, expressão de marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105, e pela falta de expressão de marcadores hematopoéticos CD14, CD34, CD45, CD11b/CD79 e CD19/HLA-DR (HORWITZ *et al.*, 2005; DOMINICI *et al.*, 2006; BYDLOWSKI *et al.*, 2009; KOBOLAK *et al.*, 2016). Contudo, um problema relacionado à caracterização fenotípica é a falta de marcador positivo definido e definitivo para CTM (BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

2.3 Células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO)

O primeiro estudo evidenciando a existência das células tronco da medula óssea, inicialmente chamadas de células estromais da medula, foi realizado em meados dos anos 60 (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1968), nessa ocasião foi colocada medula óssea de roedores em placas de plástico, após quatro horas foi feita uma lavagem e as células não aderentes foram descartadas, restando apenas as que se aderiram à placa. As células aderentes eram aparentemente heterogêneas e com o passar das trocas do meio de cultura, essas células tornavam-se mais homogêneas com formato fibroblastoide. Os pesquisadores também observaram que as células poderiam se diferenciar em pequenas colônias, que a partir de uma célula isolada originavam-se várias outras, formando agregados chamados de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

As células tronco obtidas a partir da medula óssea podem ter variadas nomenclaturas. Dentre elas destacam-se as células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO). No entanto, essas células também são conhecidas como células do estroma da medula óssea, células tronco estromais da medula óssea, células precursoras do estroma e células tronco esqueléticas (CHEN *et al.*, 2008).

As CTM-MO são usualmente isoladas da camada mononuclear da medula óssea após a separação por centrifugação (COLTER *et al.*, 2000), e cultivadas em meio básico de cultivo (*Dulbecco's Modified Eagles Medium* [DMEM]) com adição de 10% de soro fetal bovino (SFB), o qual atua como estimulante da proliferação celular (BARA *et al.*, 2014), em recipiente plástico como garrafas T75 e T25 a 37°C e 5% de

CO₂ (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). Na medula, as CTM constituem uma população celular muito pequena, com cerca de 0,01% a 0,0001% das células nucleadas, o que pode representar uma dificuldade na obtenção imediata de grande quantidade de células, porém o cultivo *in vitro* permite expandir gradualmente o número de células (BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

2.4 Diferenciação condrogênica *in vivo* de células tronco mesenquimais

Para que se inicie a condrogênese, durante a vida intrauterina é necessário que ocorra o recrutamento, migração e proliferação das células tronco mesenquimais condroprogenitoras que produzirão nessa fase matriz extracelular (MEC) (SANDELL *et al.*, 1991). Essa matriz é rica em ácido hialurônico, glicosaminoglicanos, tenascina, trombospondina, colágenos tipo I e tipo II (RICHARDSON *et al.*, 2016), os quais estão ligados com a manutenção do fenótipo dos condrócitos e sua correta organização na placa de crescimento (SHUM *et al.*, 2003). A condrogênese *in vivo* está esquematizada na Figura 1.

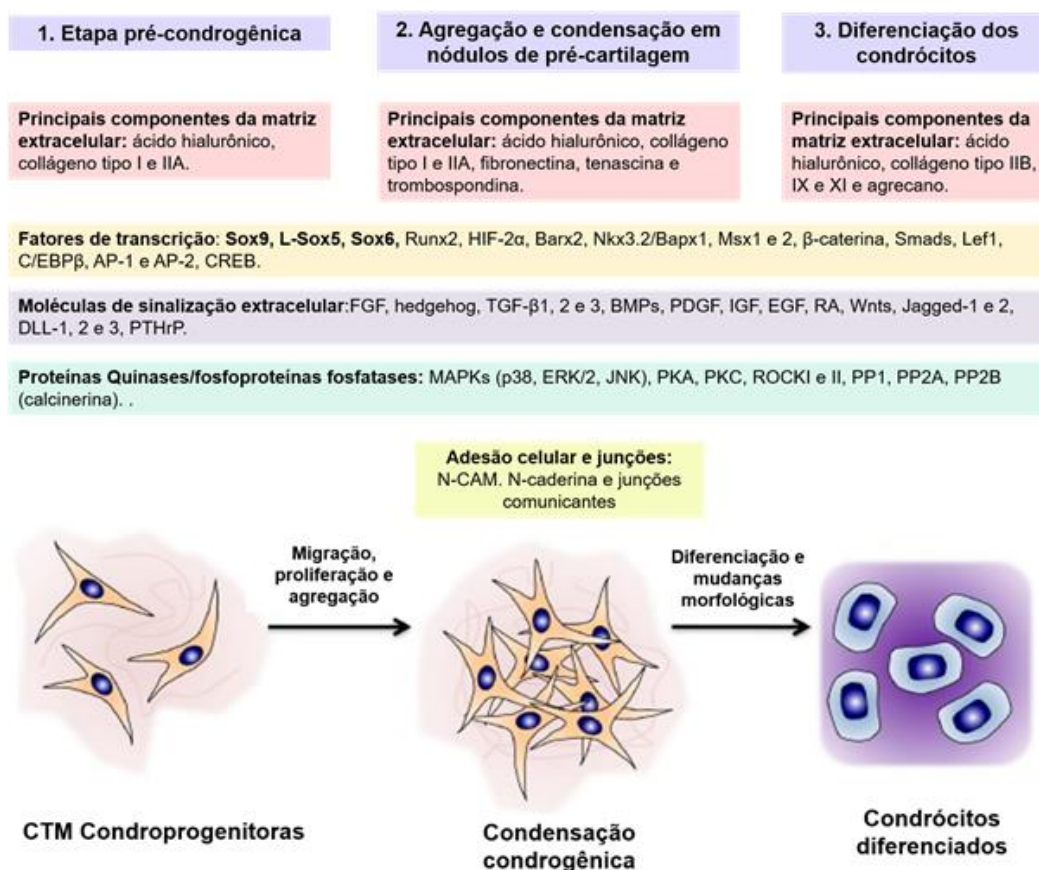
Há uma discussão em torno da origem das CTM, acreditava-se que eram derivadas apenas do mesoderma, porém estudos mostraram que podem ter origem também do neuroepitélio e da crista neural (TAKASHIMA *et al.*, 2007; MORIKAWA *et al.*, 2009).

A condrogênese pode seguir por duas vias, sendo uma delas a ossificação endocondral, em que ocorre a formação dos centros de ossificação primária, secundária e da placa epifisária, e a segunda via condrogênica é a formação de cartilagem hialina (PROVOT, 2005). A placa epifisária de mamíferos funciona como uma zona de crescimento que permite a formação e o crescimento ósseo, e é dividida em três camadas: zona de repouso, proliferativa e hipertrófica (ABAD *et al.*, 2002; MACKIE *et al.*, 2008).

Após o recrutamento, as CTM começam a sofrer um processo de condensação, que aumenta a interação célula a célula, e algumas moléculas de adesão, como a *Neural cell adhesion molecule* (N-CAM), possibilitam a formação dos primeiros agregados de células pré-cartilagem. Essas células juntamente com algumas

proteínas (como fibronectina, tenascina e trombospondina) desencadeiam cascatas de sinalização intracelular, que induzem a alteração morfológica das células condroprogenitoras para um aspecto esférico característico dos condrócitos (SHUM *et al.*, 2003).

Figura 1. Esquema da diferenciação condrogênica *in vivo* das CTM e os principais fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras envolvidos neste processo (adaptado de RICHARDSON *et al.*, 2016).



A regulação desse início da fase de condensação é feita pelo fator de crescimento transformante beta (TGF- β) que controla a expressão da fibronectina (ROARK; GREER, 1994). A partir daí se inicia a fase de determinação, onde as moléculas de adesão continuam agindo e a MEC inicia a síntese de moléculas

específicas da cartilagem, como o colágeno tipo IIB, IX e XI e o Agg (DELISE; FISCHER; TUAN, 2000). Então as células começam o processo de diferenciação, formando os primeiros condrócitos que gradativamente vão se tornando hipertróficos como resultado do aumento da expressão de componentes da MEC. A medida que se tornam mais hipertróficos, os condrócitos expressam Coll X e param de produzir colágeno I, II e IX (SHUM *et al.*, 2003).

A diferenciação condrogênica é regulada e induzida por fatores de sinalização como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), TGF- β , peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTHrp), via de sinalização (Wnt), *indian hedgehog* (Ihh), *runt-related transcription fator 2* (Runx2), hormônios tireoidianos, Sox5, Sox6, Sox9 (DE CROMBRUGGHE *et al.*, 2000; LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001; CHEN *et al.*, 2014).

O Sox9 é um fator de transcrição que possui ligação em dois sítios no domínio HMG das proteínas e ativa elementos promotores de Col2a1, Col9a1, Col11a2 e Agg (GIULIANI *et al.*, 2013). Ele atua principalmente na fase inicial da condrogênese e controla a expressão de outros genes como Agg e Col II (WANG *et al.*, 2014) mostrando-se um dos fatores mais importantes na regulação *in vitro* da diferenciação condrogênica (LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998). Sua importância também ocorre na fase de condensação celular e é expresso nos condrócitos e células condroprogenitoras embrionárias, não sendo expresso nos condrócitos hipertróficos (LEFEBVRE; DE CROMBRUGGHE, 1998).

As BMP, como BMP-2 (SEKIYA *et al.*, 2005), BMP-4 (MILJKOVIC; COOPER; MARRA, 2008) e BMP-7 (SHEN *et al.*, 2010), também são fatores importantes para a diferenciação condrogênica das CTM-MO. A BMP-2 aumenta a proliferação e a formação de matriz condrogênica (SEKIYA *et al.*, 2005). A BMP-4 também aumenta a formação de matriz condrogênica por estimular a síntese de Col II e Agg e diminuir a expressão de colágeno I e X (MILJKOVIC; COOPER; MARRA, 2008). Enquanto a BMP-7 aumenta a expressão de Col II (SHEN *et al.*, 2010).

Os fatores da família Wnts desempenham funções importantes nas etapas da condrogênese (WANG; SHAO; BALLOCK, 2007) e dependendo do tipo pode promover ou inibir esse processo (CHURCH *et al.*, 2002; KOLF; CHO, TUAN, 2007). Estudos em pintainhos mostraram que Wnt-4 age como regulador e bloqueia o início da condrogênese, enquanto o Wnt-5 apresenta efeito contrário (CHURCH *et al.*,

2002). Além disso, outro estudo relatou que a via canônica Wnt3a pode modular a diferenciação condrogênica, estimulando a ação do BMP-2 (FISCHER, BOLAND, TUAN, 2002) que é um importante regulador da condrogênese, e por meio de um *loop* regulatório também controla a expressão de BMP-2 (FISCHER, BOLAND, TUAN, 2002).

2.5 Diferenciação condrogênica *in vitro* de células tronco mesenquimais

A diferenciação condrogênica *in vitro*, desde a extração das células e início do cultivo, pode ocorrer em três semanas. As células são cultivadas em um sistema de agregados (BOSNAKOVSKI *et al.*, 2004; COLEMAN; CASE; GULDBERG, 2007) o que favorece a interação entre as células e a formação de MEC (COLEMAN; CASE; GULDBERG, 2007; AULETTA, 2011). Durante o cultivo utiliza-se um meio básico (DMEM), o qual contém os reagentes/compostos químicos necessários para o desenvolvimento e proliferação celular, acrescido de 10% de soro fetal bovino, além de uma combinação de antibióticos e antifúngicos (gentamicina, penicilina, estreptomicina e anfotericina) para prevenir contaminações durante o cultivo.

O atual meio de diferenciação condrogênica amplamente utilizado foi estabelecido por JOHNSTONE *et al.* (1998). Neste meio são adicionados fatores como dexametasona (Dex), ácido ascórbico, insulina, transferrina, ácido selenoso, ácido linoleico e albumina sérica bovina (OKAMOTO *et al.*, 2002; BEANE; DARLING, 2012). Outros compostos podem ser adicionados, tais como piruvato de sódio, prolina, L-glutamina, TGF- β e BMP (OKAMOTO *et al.*, 2002; VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011).

No início da diferenciação condrogênica *in vitro* as células apresentam formato fibroblastoide tornando-se mais redondas a ovais e também sofrem aumento de volume ao longo dessa diferenciação (ALMALKI; AGRAWAL, 2016). O TGF induz o início da diferenciação, podendo qualquer uma de suas três isoformas estarem relacionadas TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. O TGF- β 1 é o menos eficaz na promoção da condrogênese, enquanto isso as outras duas isoformas promovem acúmulo dobrado

de glicosaminoglicanos e deposição mais precoce de colágeno tipo II. Após 24h os componentes da matriz tornam-se evidentes (BARRY *et al.*, 2001).

A condrogênese se divide em três fases principais e o seu processo de diferenciação pode durar em torno de três semanas (BARRY *et al.*, 2001). A primeira fase é a de condensação na qual ocorrem interações intercelulares e também entre célula e matriz, nessa fase as células ainda conservam um formato fibroblastoide e expressam Col I e GAG. Os eventos da condensação são potencializados pela cultura tridimensional. Após a condensação, inicia-se a segunda fase, com a expressão de Col II e sulfato de condroitina. Na terceira fase as células começam a adquirir formato arredondado e a aumentar de volume e a produzir maior quantidade de componentes da matriz cartilaginosa (BARRY *et al.*, 2001; AULETTA *et al.*, 2011; ALMALKI; AGRAWAL, 2016) como glicosaminoglicanos, Agg, fibronectina e Col I, II e X, sendo o Col X característico já das células hipertróficas (LARSSON *et al.*, 1991; SOLCHAGA *et al.*, 2011; BARRY *et al.*, 2001).

2.5.1 Fatores que influenciam na diferenciação condrogênica *in vitro*

A diferenciação condrogênica *in vitro* está diretamente relacionada a diversos fatores como, fatores de crescimento, biomateriais, estimulação mecânica, condições de hipóxia, fonte tecidual, fatores hormonais, idade cronológica do doador, sexo, entre outros (MARKWAY *et al.*, 2010; ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014).

O TGF- β é o principal componente utilizado para promover a diferenciação condrogênica, principalmente por meio do complexo TGF- β /Smad, que é ativado por vias de sinalização da proteína quinase (MAPK) (LI *et al.*, 2010). TGF- β induz a expressão do fator condrogênico SOX9 (LEFEBVRE *et al.*, 1998; LEFEBVRE; SMITS, 2005), que regula a condrogênese e produção de MEC (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010). TGF- β 1 aumenta a formação de matriz condrogênica e a expressão de Col II e Agg (DANISOVIC; VARGA; POLÁK, 2012) e o TGF- β 3 também aumenta a formação de glicosaminoglicanos (THORPE *et al.*, 2010).

O FGF-2 aumenta a proliferação (SOLCHAGA *et al.*, 2010) e a diferenciação condrogênica *in vitro* de CTM-MO por aumentar a formação de matriz condrogênica (SOLCHAGA *et al.*, 2010). A combinação de TGF- β com fatores de crescimento de BMP leva a uma maior diferenciação condrogênica em CTM-MO (TOH *et al.*, 2005) e amplifica a expressão de marcadores hipertróficos como fosfatase alcalina (ALP) e COL X (MEHLHORN *et al.*, 2007). Em CTM-MO de coelhos a adição de BMP2 em combinação com TGF- β é mais eficaz na indução da diferenciação condrogênica do que o TGF- β sozinho, entretanto, observou-se um aumento da hipertrofia quando usado o BMP2 (NASRABADI *et al.*, 2018).

A insulina é um fator primário que está envolvido no início da condrogênese e que atua de uma maneira dose-dependente (1-10 $\mu\text{g/mL}$) juntamente com o TGF- β (MUELLER *et al.*, 2013a). Além disso, a insulina pode facilitar a captação de glicose (KONO *et al.*, 1982) e melhorar a síntese de DNA e produção de proteoglicanos em culturas de cartilagem (MAOR *et al.*, 1993; ROSEN, 1987).

Um estudo mostrou que o uso de glicose em meio de cultura durante o cultivo em sistema de agregados de CTM humanas interfere no processo de diferenciação condrogênica. Em níveis altos de concentração de glicose houve diminuição da diferenciação condrogênica, agindo negativamente no receptor de TGF- β II interferindo na sua sinalização durante a diferenciação condrogênica. Além disso, reduziu a atividade da proteína quinase C (PKC) que atua positivamente na expressão de TGF- β II, diminuindo assim a atividade e sinalização de moléculas importantes durante a condrogênese (TSAI; MANNER; LI, 2013).

Tanto o ácido ascórbico como a prolina são essenciais para a produção de colágeno na cartilagem. O ácido ascórbico aumenta a proliferação celular, e estimula a MEC a sintetizar colágeno I e II e GAG (CHOI *et al.*, 2008) e também contribui para a manutenção do fenótipo de CTM (POTDAR; D'SOUZA, 2010). O ácido ascórbico estabiliza a estrutura tripla helicoidal de colágeno por meio da redução de ferro, que é importante para a hidroxilação de resíduos de prolina em procolágeno e hidroxiprolina e a maturação do procolágeno ao colágeno (PADH, 1991; PETERKOFISKY, 1991).

As BMP pertencem à superfamília TGF- β e possuem papel regulatório da condrogênese e a esqueletogênese durante o desenvolvimento embrionário (Hogan, 1996). Essas proteínas estão envolvidas em vários estágios de diferenciação

condrogênica, desde iniciação da diferenciação condrogênica, à regulação da maturação de condrócitos e diferenciação terminal (PIZETTE; NISWANDER, 2000, CARON *et al.*, 2013). As BMP *in vitro* promovem a expressão de SOX9 e COL II, no entanto, eles também podem influenciar num fenótipo hipertrófico das células (NONAKA *et al.*, 1999).

O FGF *in vitro* nas CTM-MO aumenta a produção de proteoglicanos (PARK; NA, 2008) e potencializa a formação de matriz cartilaginosa (SOLCHAGA *et al.*, 2010) o que contribui de forma positiva para a diferenciação condrogênica.

A hipóxia pode facilitar a diferenciação condrogênica *in vitro* das CTM, uma vez que o microambiente das CTM-MO apresenta baixa tensão de oxigênio (< 32 mmHg, 4,2% de oxigênio) (OZE *et al.*, 2012; SPENCER *et al.*, 2014). Assim, a condrogênese é aumentada quando as CTM são cultivadas em hipóxia (5% de oxigênio) em comparação com a normóxia (20% de oxigênio) (LEE *et al.*, 2013).

Sugere-se que a fonte tecidual também é um fator que pode influenciar na diferenciação condrogênica das CTM, pois sua taxa de proliferação e crescimento *in vitro* é dependente do tecido a qual foi extraído (TAWONSAWATRUK *et al.*, 2012). Kim *et al.* (2009) verificou que as CTM-TA apresentam menor potencial de diferenciação condrogênica em comparação às CTM-MO de humanos.

2.5.2 Fatores hormonais que influenciam a diferenciação condrogênica

Hormônios influenciam diretamente na diferenciação condrogênica de CTM-MO. O paratormônio (PTH) atua aumentando a expressão de Sox9, Col II e PTH1R durante a diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratos em baixas doses (0,1; 1 e 10 nM), mas apresenta efeito contrário em alta dosagem (1000 nM) (ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014).

Dex é um glicocorticoide sintético, que promove o aumento da expressão de COL XI durante a condrogênese (CHEN *et al.*, 2005; DERFOUL *et al.*, 2006). Estudos relataram que a fonte tecidual de CTM é um determinante no efeito de Dex na diferenciação condrogênica, em que as células provenientes da medula óssea e induzidas por TGF- β 1 mostraram-se superiores na diferenciação condrogênica quando comparadas a CTM do líquido sinovial induzida por TGF- β 1 ou BMP2 (PARK

et al., 2005; SHINTANI; HUNZIKER, 2011). 100 nM de Dex associada com TGF- β 3 em CTM-MO de humanos aumentou a produção de componentes da MEC como proteoglicanos e a expressão de Agg, Col II e Coll XI, resultando em maior potencial de diferenciação condrogênica (DERFOUL *et al.*, 2006).

Assis *et al.* (2018) verificaram que T3 tem efeito dose-dependente sobre a diferenciação condrogênica das CTM-MO de ratas jovens, em que a dose de 0,01 nM de T3 culminou em aumento da formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 e Col II, em pelo menos um dos períodos avaliados. Em bovinos, 100 nM T3 não alterou a produção de Coll X e glicosaminoglicanos e não melhorou a diferenciação condrogênica de CTM-MO (RANDAU *et al.*, 2013). Em humanos, 1 nM de T3 juntamente com BMP-4 estimula a hipertrofia de CTM-MO (KARL *et al.*, 2014).

O PTHrP inibe a hipertrofia induzida por TGF- β , regulando positivamente os marcadores condrogênicos COL2A1 e SOX9 e regulando negativamente os marcadores hipertróficos COL10A1 e RUNX2 durante a condrogênese *in vitro* de CTM-TA (KIM *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2010).

2.5.3 Efeito da idade na diferenciação condrogênica

Estudos em ratos e humanos apontaram que a idade do doador influencia na diferenciação condrogênica (ZHENG *et al.*, 2007; BYDLOWSKI *et al.*, 2009; ASUMDA; CHASE, 2011; FAFIÁN-LABORA *et al.*, 2015). Estudos em humanos demonstraram que a diferenciação condrogênica de CTM-MO diminuem em indivíduos idosos, pois ocorre redução da formação de glicosaminoglicanos em cultura de CTM-MO destes indivíduos (PAYNE *et al.*, 2010; KANAWA *et al.*, 2013) e diminuição da expressão de SOX9, Col II e Agg (KANAWA *et al.*, 2013).

Em ratos Sprague-Dawley também foi constatado que o potencial de diferenciação condrogênico diminui em indivíduos idosos, inclusive com diminuição da formação de Agg (ASUMDA; CHASE, 2011), de glicosaminoglicanos e diminuição da expressão de Col II e Agg (ZHENG *et al.*, 2007). No entanto, existem resultados divergentes observados na literatura, em humanos não houve influência da idade sobre a proliferação e diferenciação condrogênica de CTM-MO (SCHARSTUHL *et al.*,

2007), o que indica que podem existir respostas diferentes de acordo com a espécie do indivíduo.

3. METODOLOGIA

O estudo utilizou as bases físicas e a infraestrutura 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 Histopatologia do Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES).

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 68/2017.

Seis ratas *Wistar* idosas com 12 meses de idade (de acordo com YAMAGUSHI; GAO, 1997; ZHENG *et al.*, 2007; KRETHLOW *et al.*, 2008; BAKER; BOYETTE; TUAN, 2015; AKAHANE *et al.*, 2017) foram eutanasiadas com sobredose de anestesia (anestesia pelo uso de 30m/kg de pentobarbital sódico por via peritoneal). Imediatamente após este procedimento, seus ossos longos (fêmur e tíbia) foram colhidos assepticamente e, em seguida, submetidos à extração da medula óssea para obtenção de um *pool* de células. CTM-MO de ratas jovens foram incluídas com o intuito de serem comparadas com as CTM-MO de ratas idosas (grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3) com relação ao potencial de diferenciação condrogênico. Após essa comparação procedeu-se a análise entre os grupos de CTM-MO de ratas idosas tratadas ou não com T3.

As CTM-MO das ratas foram cultivadas inicialmente em meio básico de cultivo para manutenção do estado indiferenciado (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) para avaliação da viabilidade celular. Posteriormente, as células foram cultivadas em meio de diferenciação condrogênico, acrescido ou não de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3), em doses que variaram de acordo com os grupos experimentais delineados e descritos a seguir.

Após o cultivo das células em meio indiferenciado, quatro grupos experimentais de CTM-MO foram constituídos para cultivo em meio condrogênico: Grupo 1) CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3; Grupo 2) CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3; Grupo 3) CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM de T3; e Grupo 4) CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3. As doses de T3 (Sigma-Aldrich) foram estabelecidas conforme estudos realizados por Boeloni e colaboradores (2009; 2013ab) e por Assis e colaboradores (2018), sendo a dose de 0,01 nM semelhante à dose fisiológica.

Após sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica, a análise semi-quantitativa da expressão de Sox9, agregano (Agg) e colágeno II (Col II) foi feita, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Após esses períodos realizou-se também análise morfológica das células e da formação de glicosaminoglicanos utilizando-se respectivamente as colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e Alcian Blue (AB) - Ácido Periódico de Schiff (PAS) Todos os ensaios *in vitro* foram realizados com quatro repetições em cada grupo e em cada período e estão detalhados a seguir.

3.1 Extração e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em DMEM

A extração das CTM-MO de ratas idosas e de ratas jovens foi realizada conforme protocolos previamente estabelecidos (OCARINO *et al.*, 2008; BOELONI *et al.*, 2009; BOELONI *et al.*, 2013ab; ASSIS *et al.*, 2018). Imediatamente após a eutanásia das ratas foi realizada a tricotomia das regiões abdominal ventral, dorso-lombar e dos membros posteriores, procedeu-se com a antissepsia dessas áreas. Em seguida, foi feita incisão de pele medial nos membros pélvicos e dissecação dos tecidos musculares e conectivos, adjacentes ao fêmur e tíbia. Esses ossos foram desarticulados e acondicionados em tubo estéril contendo 30 mL de DMEM (Gibco, USA) SFB (LGC Biotecnologia, Brasil) e transportados para o laboratório de cultivo celular.

No fluxo laminar, a ressecção nas diáfises proximais e distais de fêmur e tíbia foi realizada para propiciar a lavagem do conteúdo do canal medular no interior de um tubo de 50 mL com DMEM enriquecido com 60 µg/L de gentamicina, penicilina (100

U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina (25 µg/L) (Sigma, USA) sem adição de SFB. O tubo com o lavado da medula óssea foi centrifugado por 10 min a 1400 rpm, o precipitado foi ressuspendido em DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos e 10% de SFB e distribuído em garrafas T75 (Sarstedt, Numbrecht, Germany) mantidas em estufa controlada a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana.

Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, foi realizado o teste de viabilidade celular pelo Azul de Tripán. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de micro-organismos.

3.2 Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán

A viabilidade celular das CTM-MO (de ratas jovens e ratas idosas) mantidas em meio de cultivo DMEM acrescido de SFB foi avaliada, antes de receber o meio de diferenciação condrogênica, utilizando-se o teste de azul de Tripán (OCARINO *et al.*, 2008; BOELONI *et al.*, 2009; BOELONI *et al.*, 2013ab; ASSIS *et al.*, 2018). Inicialmente, as células foram lavadas com tampão de fosfato-salino (0,15 M PBS), tripsinizadas e centrifugadas por 10 min a 1400 rpm. O precipitado foi ressuspendido e uma alíquota contendo células foi retirada, coradas com azul de Tripán, colocadas em câmara de Neubauer e avaliadas em microscópio óptico. As células marcadas pelo azul de Tripán foram consideradas inviáveis e as células transparentes (não coradas em azul) foram consideradas viáveis.

3.3 Diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea

Posteriormente à confirmação da viabilidade celular, as células foram colocadas em tubos de 15 mL e o meio de cultivo indiferenciado foi substituído por meio indutor da condrogênese (Stem Pro[®] Chondrogenesis Differentiation Kit; Gibco, USA). As CTM-MO foram cultivadas em sistema de agregados em uma quantidade previamente padronizada (5 x 10⁵ células) durante os períodos de sete, 14 e 21 dias,

com um volume de 500 µL de meio condrogênico por tubo, em quatro repetições. A distribuição dos grupos foi conduzida conforme os tratamentos delineados: Grupo 1) CTM-MO ratas jovens sem tratamento com T3; Grupo 2) CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3; Grupo 3) CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM de T3; e Grupo 4) CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente aos períodos de diferenciação condrogênica, as análises de expressão gênica e também da morfologia e formação de matriz condrogênica foram feitas.

3.4 Expressão dos fatores de transcrição Sox9, Col II e Agg

A extração do RNA total das células cultivadas foi realizada pelo uso do Trizol (Trizol[®] Reagent, Invitrogen, CA, USA) conforme recomendações do fabricante. Foram realizadas reações de transcrição reversa utilizando-se Kit comercial SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, CA, USA). As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se 2 µg de cDNA, 600 nM de cada iniciador e 17 µL do reagente Syber Green em um volume final de 25 µL de reação, no aparelho 79500HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc., CA, USA). Como normalizador das expressões, foi utilizado o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (SCHEFE *et al.*, 2006). Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus*: *forward primer* 5'-CTGAAGGGCTACGACTGGAC-3' e *reverse primer* 5'-TACTGGTCTGCCAGCTTCCT-3' para Sox9; *forward primer* 5'-CACACGCTACACACTGGACT-3' e *reverse primer* 5'-TCACACTGGTGGAAAGCCATC-3' para Agg; *forward primer* 5'-AGGGGTACCAGGTTCTCCATC-3' e *reverse primer* 5'-CTGCTCATCGCCGCGGTCCGA-3' para Col II; *forward primer* 5'-ATGCCTTGTTCTCCTCTTACTGGA-3' e *reverse primer* 5'-CTTTCTGCTGCTAATGTTCTTGACC-3' para GAPDH.

3.5 Análise morfológica das células e formação de matriz condrogênica

Os agregados dos grupos cultivados nos períodos de sete, 14 e 21 dias foram lavados com PBS 0,15 M e fixados em formaldeído 10% tamponado por uma hora e processados pelo método rotineiro de inclusão em parafina que consistiu nas seguintes etapas: 1) álcool 70% (30 min), 2) álcool 80% (30 min), 3) álcool 90% (30 min), 4) álcool absoluto I (30 min), 5) álcool absoluto II (30 min), 6) álcool absoluto III (30 min), 7) xilol I (20 min), 7) xilol II (20 min), 8) xilol III (20 min), 9) parafina I (20 min), 10) parafina II (20 min) e, 11) parafina III (20 min).

Os blocos de parafina com as amostras foram cortados em micrótomo em 4 µm e posteriormente submetidas as colorações de A) Hematoxilina e Eosina e B) Alcian Blue-PAS. Sequencialmente, foram determinadas as características morfológicas e a afinidade tintorial de matriz condrogênica em um microscópio óptico. As técnicas das colorações estão descritas a seguir. Como controle positivo das colorações especiais foi utilizado tecido cartilaginoso presente na orelha.

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

A coloração de Alcian blue-PAS consistiu nas seguintes etapas: 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) passar em metabissulfito de sódio 1% (5 min) sem lavagem prévia; 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 seguiram 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 Análise estatística

A análise dos grupos propostos foi feita de forma inteiramente ao acaso. Para as análises dos resultados da qPCR, quando foi avaliado o efeito da idade sobre o potencial condrogênico entre os grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3, foi realizada transformação logarítmica dos dados, análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste t não pareado (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software San Diego, CA, USA). Para as análises dos resultados da qPCR, quando se avaliou o efeito do tratamento com T3 sobre as CTM-MO de ratas idosas, foi realizada transformação logarítmica dos dados, 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). Foi aplicado o teste de aderência de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software San Diego, CA, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas significativas se $P < 0,05$ (SAMPAIO, 2002).

Para as análises da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+, quando foi avaliado o efeito da idade sobre o potencial condrogênico entre os grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3, foram utilizados testes não paramétricos para amostras independentes, devido ao número pequeno de amostras, as médias foram comparadas pelo teste Mann-Whitney (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software San Diego, CA, USA). Para as análises da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+, quando se avaliou o efeito do tratamento com T3 sobre as CTM-MO de ratas idosas, as médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste *post hoc* de Dunn (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software San Diego, CA, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas significativas se $P < 0,05$ (SAMPAIO, 2002).

4. RESULTADOS

4.1 Viabilidade celular pelo teste de Azul de Tripán

O resultado do teste viabilidade celular pela coloração com azul de Tripán, determinou por meio de contagem das células que no mínimo 80% eram viáveis, pois não foram coradas em azul, possibilitando a continuidade para exposição ao meio indutor da condrogênese.

4.2 Comparação do potencial de diferenciação condrogênico entre CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3

4.2.1 Análise da expressão gênica de Sox9, Col II e Agg

O grupo de CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 apresentou maior valor de expressão em relação ao grupo CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 ($P < 0,05$) quando foi avaliada a expressão relativa de Sox9 fixando os períodos e comparando os grupos, aos 14 dias de diferenciação. Nos demais períodos avaliados não foi observada diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$) (Figura 2A, B, C).

Os níveis médios de expressão relativa de Coll II foram estatisticamente idênticos entre todos os tratamentos, independente dos períodos de tempo avaliados ($P > 0,05$) (Figura 2D, E, F).

O grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 apresentou valores superiores de expressão relativa de Agg, aos sete e 14 dias de diferenciação condrogênica exibindo diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (Figura 2G, H, I).

Os grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 não exibiram diferença significativa ($P > 0,05$) dentro dos grupos, quando avaliadas as expressões relativas de Sox9, Col II fixando os grupos e comparando os períodos de diferenciação condrogênica de sete, 14 e 21 dias (Figura 3A, B, D, E). No entanto, no grupo de CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3, houve diminuição da expressão de Agg ao longo do tempo e o período de sete dias de diferenciação apresentou maior expressão relativa em relação aos períodos de 14 e 21 dias ($P < 0,05$) (Figura 3C, F).

Figura 2. Expressão relativa de Sox9 (A,B,C), colágeno II (Col II) (D,E,F) e agrecano (Agg) (G,H,I) (média \pm desvio padrão) pela técnica de qPCR de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de diferenciação condrogênica. Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste T não pareado. * $P < 0,05$.

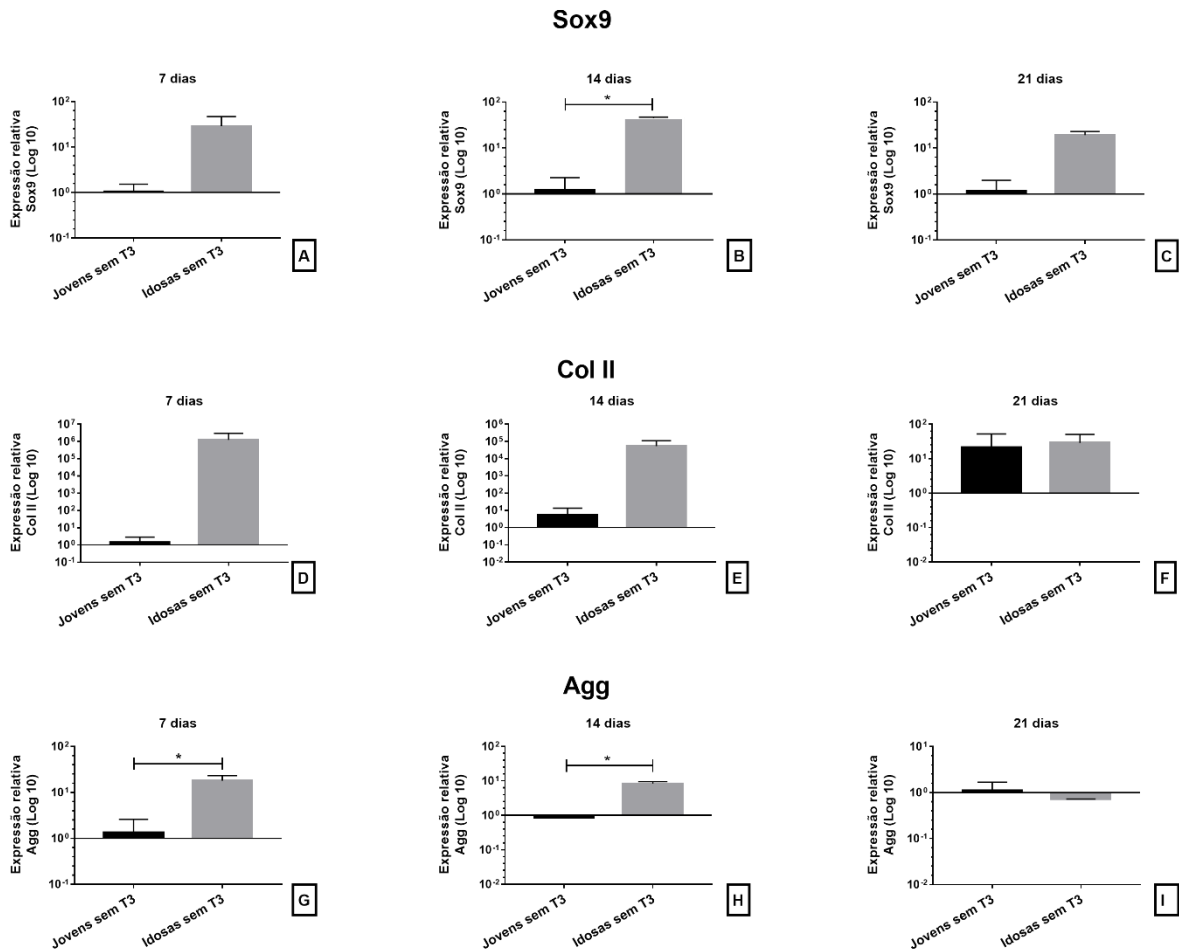
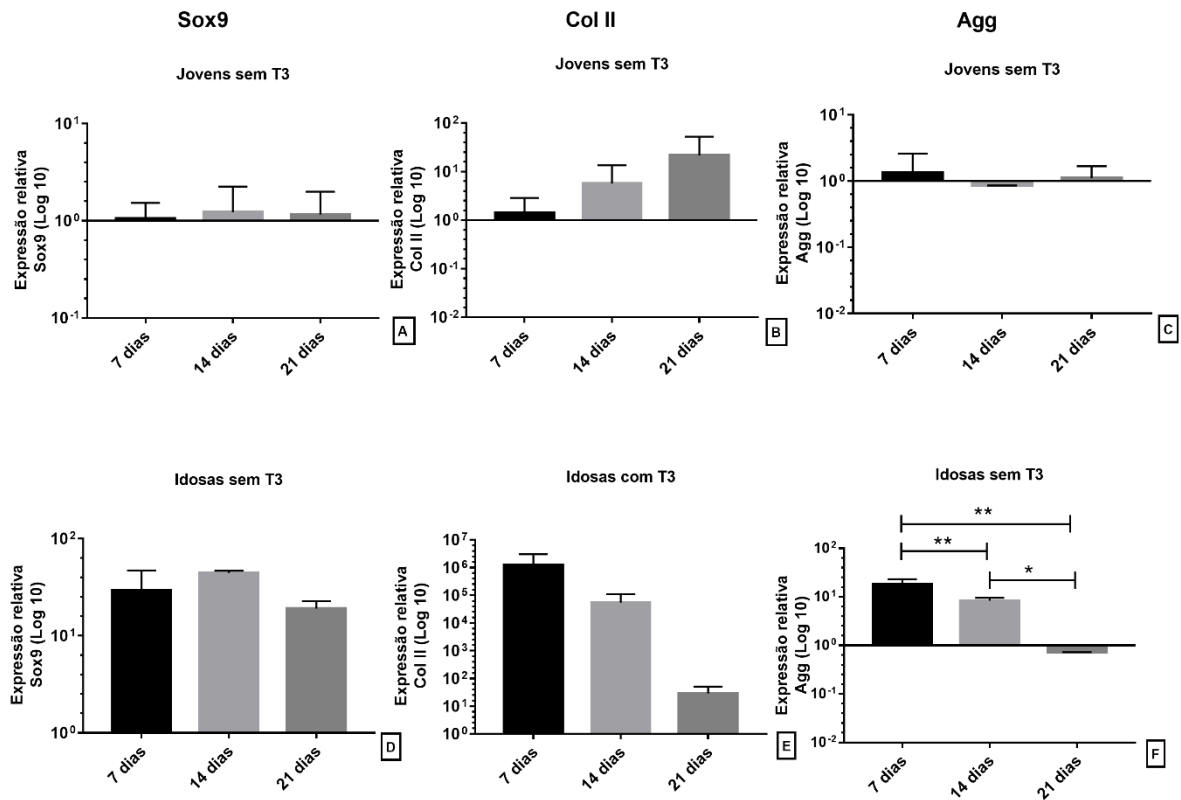


Figura 3. Expressão relativa de Sox9 (A,C), colágeno II (Col II) (B,E) e agrecano (Agg) (C,F) (média \pm desvio padrão) pela técnica de qPCR de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (A,B,C) e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (D,E,F) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste T não pareado. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



4.2.2 Análise da morfologia celular pela coloração de HE

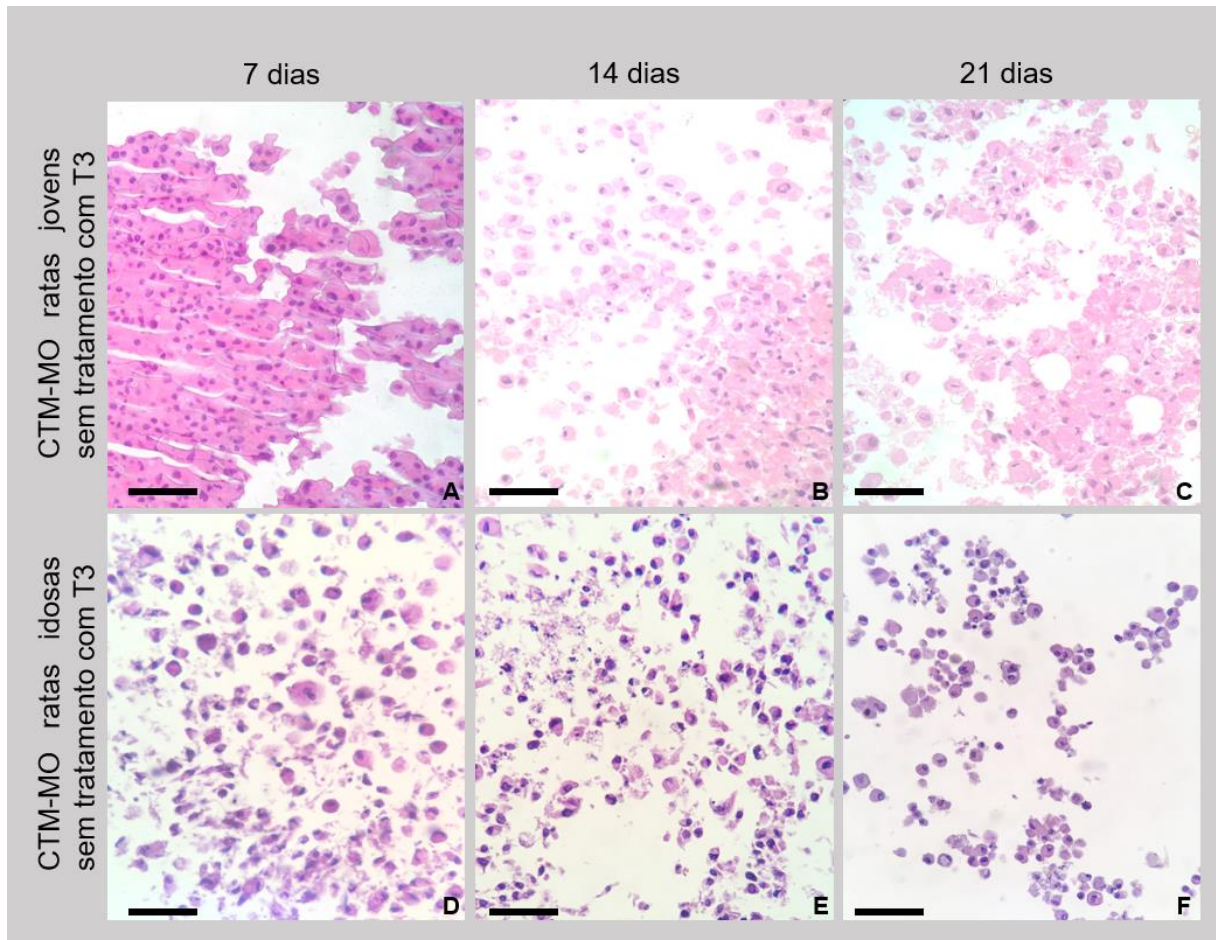
Aos sete dias de diferenciação condrogênica, o grupo CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 apresentava células pequenas redondas a ovais com núcleos picnóticos. As células do grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 estavam dispostas separadamente variando de redondas a ovais, sendo predominantemente ovais. Os núcleos variavam de redondos, ovais e alongados,

sendo predominantemente ovais e deslocados para a periferia com cromatina predominantemente condensada (heterocromatina). Além disso, foram observados núcleos edentados em discreta quantidade, raras células binucleadas e moderada quantidade de células volumosas (Figura 4A, D).

No período de 14 dias de diferenciação, o grupo CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 apresentava células volumosas, núcleos ora picnóticos ora volumosos e discreta quantidade de células binucleadas. As células do grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 eram arranjadas em grupamentos, redondas, ovais a alongadas, com predomínio de células ovais. Os núcleos eram redondos, ovais e alongados, com predomínio de ovais, predominantemente deslocados para a periferia e com cromatina ora frouxa (eucromatina) ora condensada (heterocromatina). Além disso, foram observados núcleos edentados em discreta quantidade, raras células binucleadas e moderada quantidade de células volumosas. Observou-se ainda material amorfo eosinofílico intercelular (Figura 4B, E).

No período de 21 dias de diferenciação, o grupo CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 apresentava células volumosas com núcleo ora picnótico ora grande, predominantemente deslocado para a periferia e discreta quantidade de células binucleadas e cromatina ora frouxa (eucromatina) ora condensada (heterocromatina). As células do grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 apresentavam-se arranjadas em grupamentos, variando de redondas a ovais, com predomínio de ovais. Os núcleos eram redondos a ovais, predominantemente ovais e deslocados para a periferia, com cromatina predominantemente frouxa (eucromatina). Núcleos edentados em discreta quantidade também foram observados, assim como raras células binucleadas e intensa quantidade de células volumosas (Figura 4C, F).

Figura 4. Morfologia das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (A,B,C) e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (D,E,F) nos períodos de sete (A,D), 14 (B,E) e 21 (C,F) dias de diferenciação condrogênica. Hematoxilina e eosina, Barra = 59,4 μ m.



4.2.3 Análise da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+

Na análise da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+, não se observou diferença entre os grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 ($P > 0,05$). Porém, na maioria dos períodos avaliados o grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 tendenciou a ter valores superiores em relação ao grupo CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Produção de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (A,B,C) e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (D,E,F) aos sete (A,D), 14 (B,E) e 21 (C,F) dias de diferenciação condrogênica. Alcian-Blue-Ácido Periódico de Schiff. Barra = 59,4 μm .

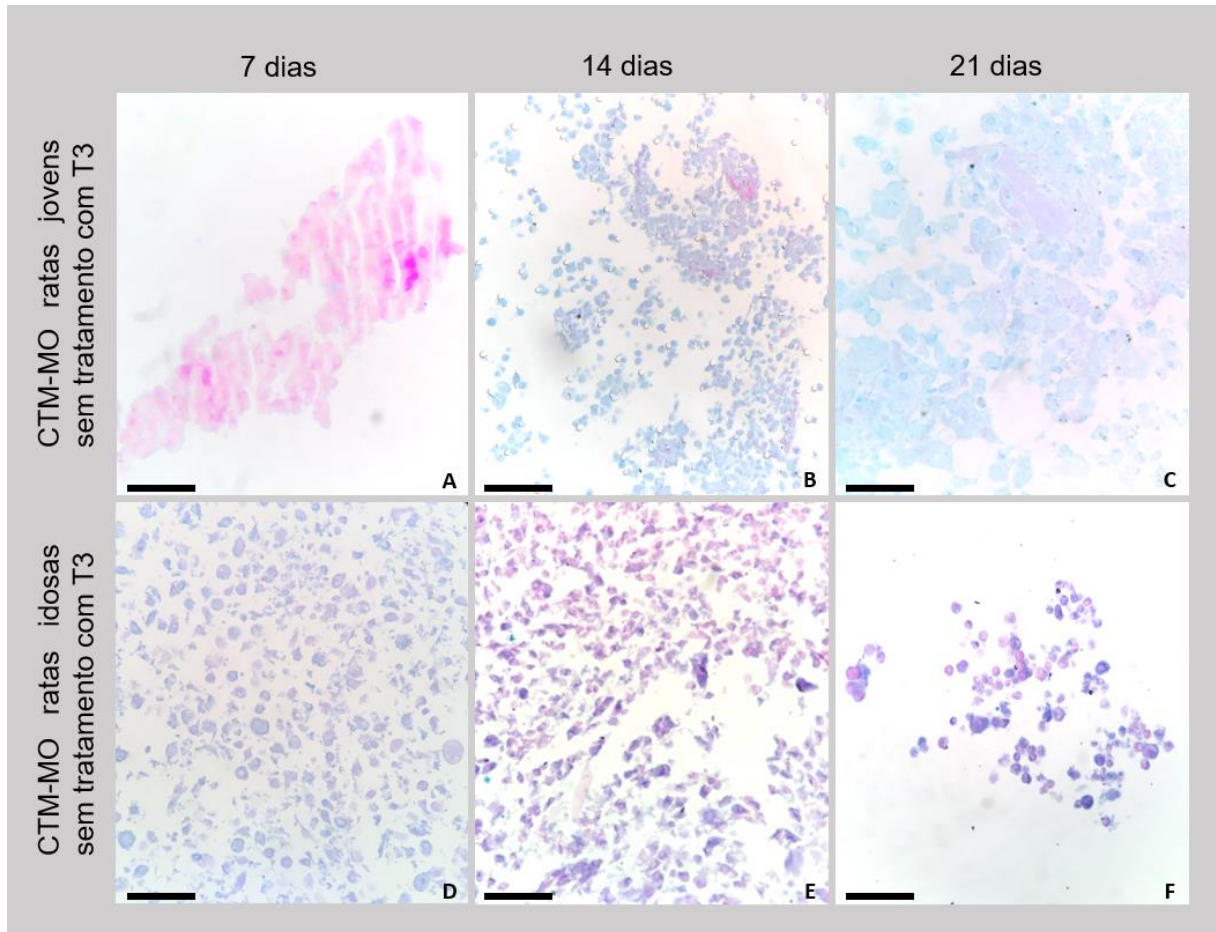
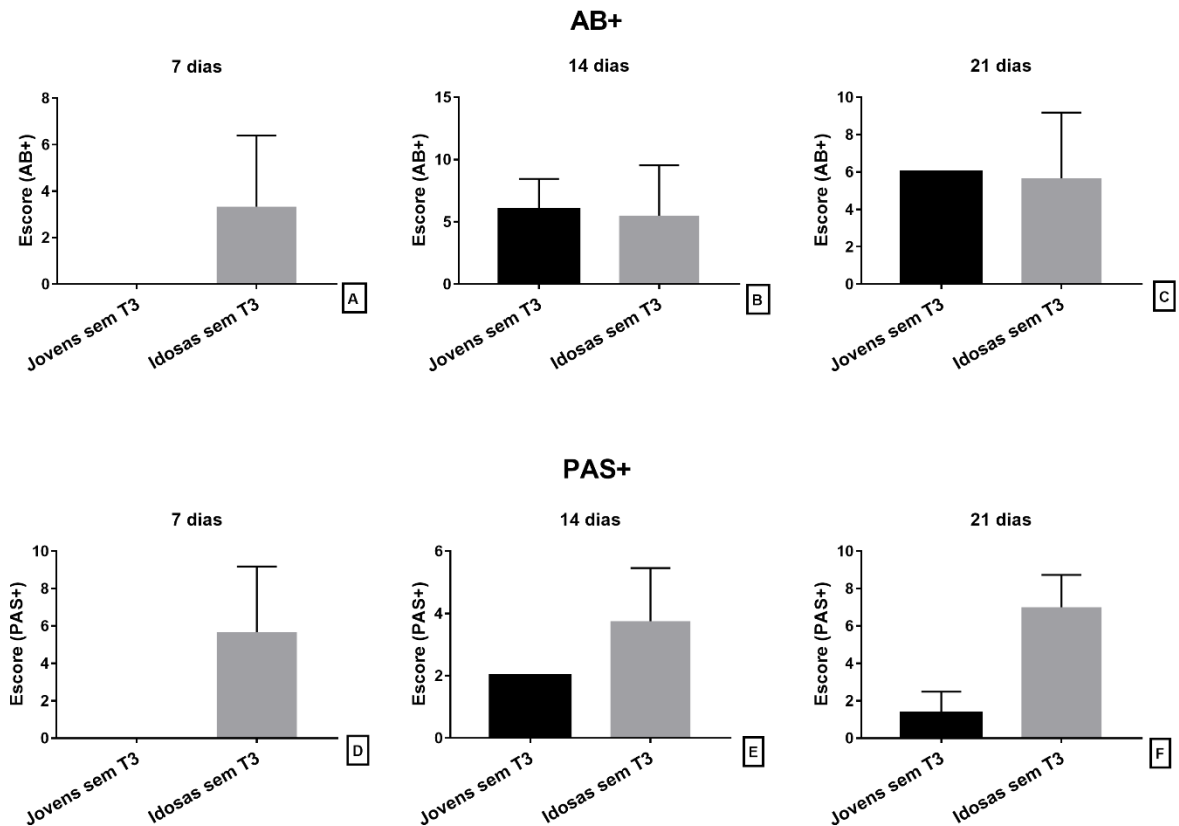


Figura 6. Gráficos dos escores (mediana e erro padrão) de produção de matriz condrogênica AB+ e PAS+ de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas *Wistar*, nos grupos CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 aos sete (A,D), 14 (B,E) e 21 (C,F) dias de diferenciação condrogênica. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney.



4.3 Avaliação da influência do tratamento com T3 sobre o potencial de diferenciação condrogênica das CTM-MO de ratas idosas

4.3.1 Análise da expressão gênica de Sox9, Col II e Agg

Com relação a expressão relativa de Sox9, aos sete e 21 dias de diferenciação não houve diferença significativa entre os grupos estudados ($P > 0,05$). No entanto, aos 14 dias de diferenciação o grupo de CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01

nM T3 apresentou maior expressão de Sox9 em relação ao grupo CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3 ($P < 0,05$) (Figura 7A, B, C).

Quando avaliada a expressão de Sox9 ao longo do tempo em cada grupo separadamente, o grupo idoso tratado com 1000 nM de T3 apresentou expressão relativa de Sox9 superior aos 21 dias de diferenciação em comparação aos sete dias de diferenciação ($P < 0,05$). No entanto, os demais grupos estudados (CTM-MO de ratas idosas sem tratamento e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3) não apresentaram alteração na expressão de Sox9 ao longo do tempo ($P > 0,05$) (Figura 8A, B, C).

Na expressão relativa de Col II não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados e também entre os períodos de diferenciação condrogênica ($P > 0,05$) (Figuras 7D, E, F e 8D, E, F).

Quando avaliada a expressão relativa de Agg aos sete e 14 dias de diferenciação, o grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 foi superior aos demais grupos estudados (CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3) ($P < 0,05$). Contudo, aos 21 dias de diferenciação não houve alteração na expressão relativa de Agg entre os grupos estudados ($P > 0,05$) (Figura 7G, H, I).

Quando avaliados os grupos separadamente ao longo do tempo, a expressão relativa de Agg no grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 foi maior no período de sete dias em relação aos 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica ($P < 0,05$). Nos demais grupos estudados (CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3), a expressão relativa de Agg não apresentou alteração ao longo do tempo ($P > 0,05$) (Figura 8G, H, I).

Figura 7. Expressão relativa de Sox9 (A,B,C), colágeno II (Col II) (D,E,F) e agrecano (Agg) (G,H,I) (média \pm desvio padrão) pela técnica de qPCR de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3, CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3 aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de diferenciação condrogênica. Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste de Student Newman Keuls. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

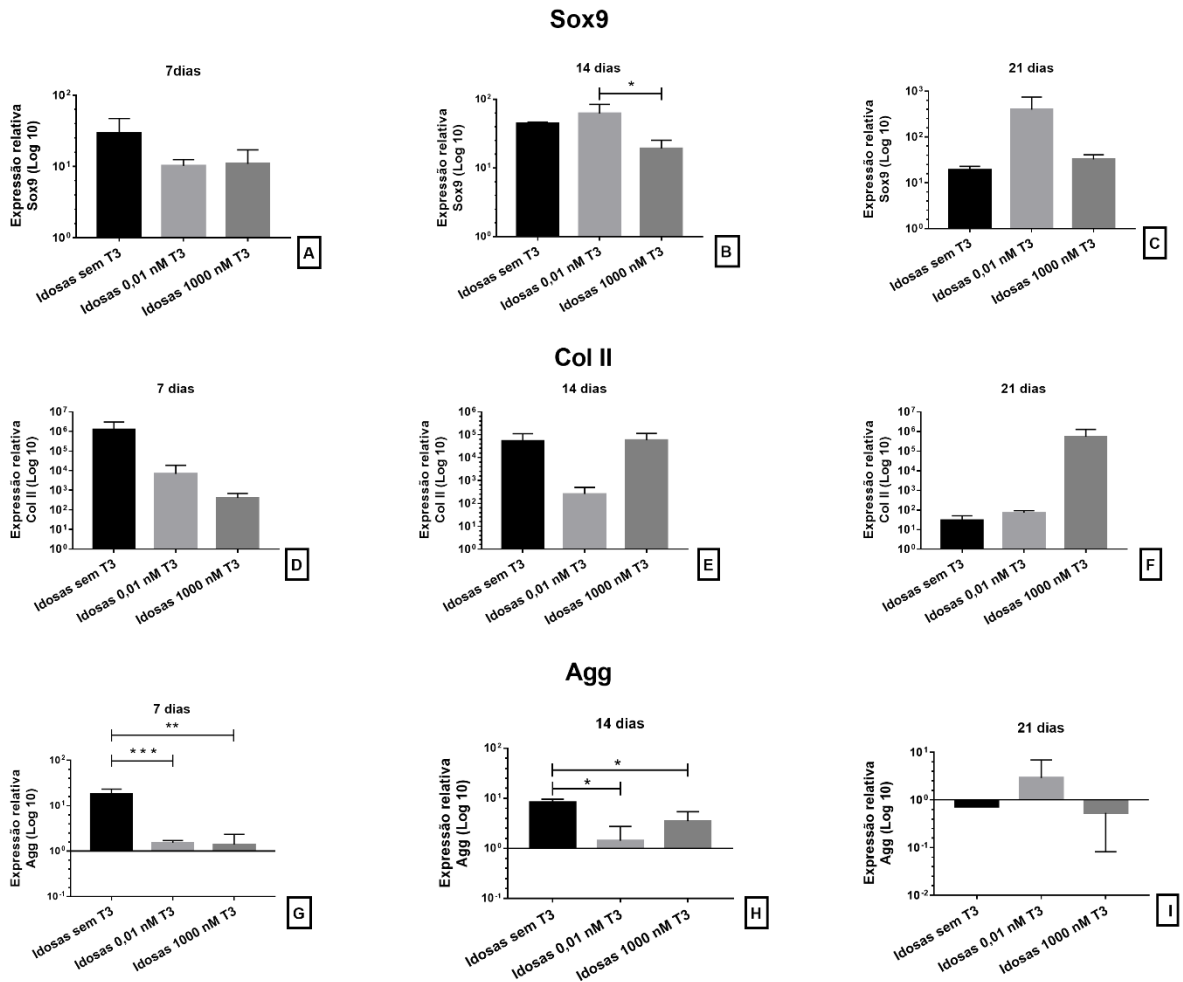
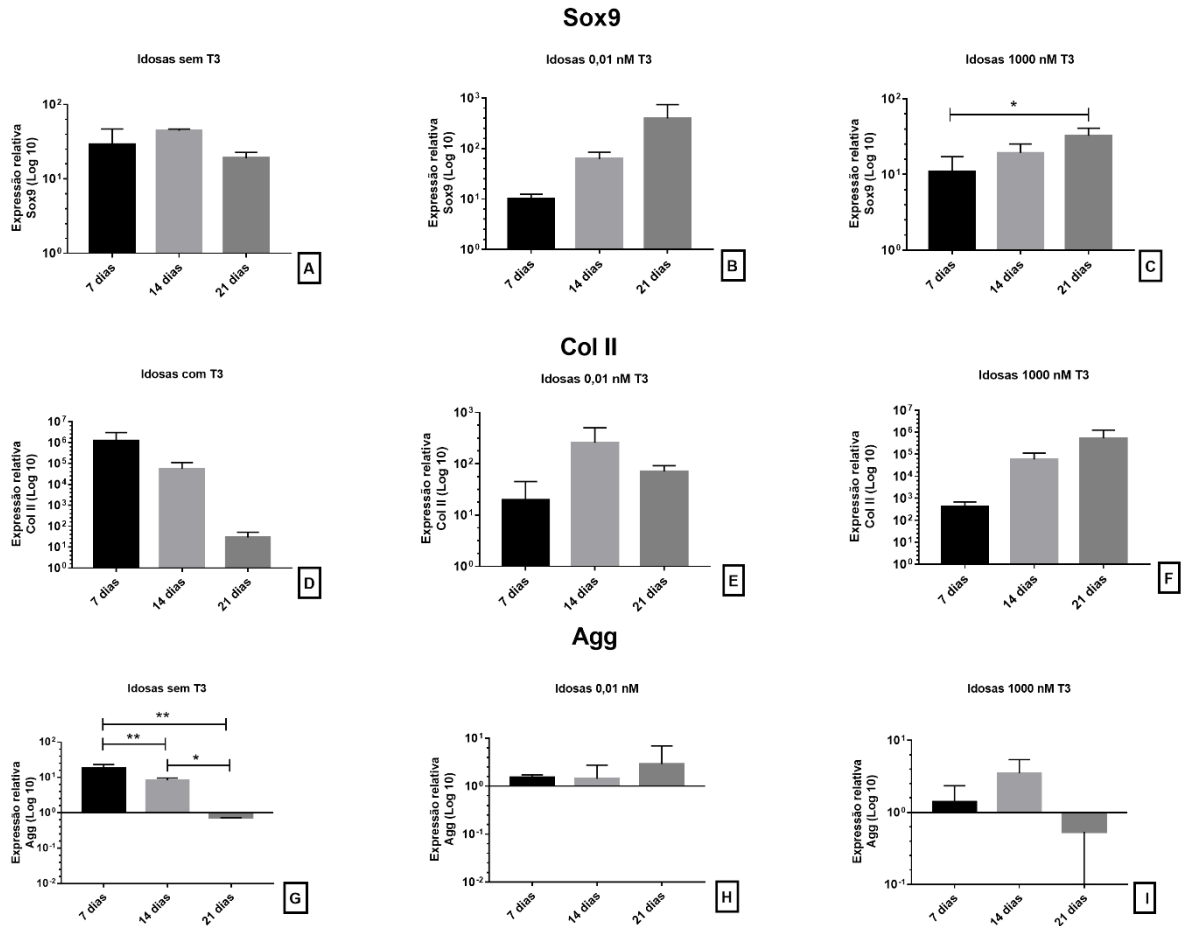


Figura 8. Expressão relativa de Sox9 (A,B,C), colágeno II (Col II) (D,E,F) e agrecano (Agg) (G,H,I) (média \pm desvio padrão) pela técnica de qPCR de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (A,D,G), CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 (B,E,H) e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3 (C,F,I) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica. Após a análise de variância (ANOVA) foi realizado o teste de Student Newman Keuls. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



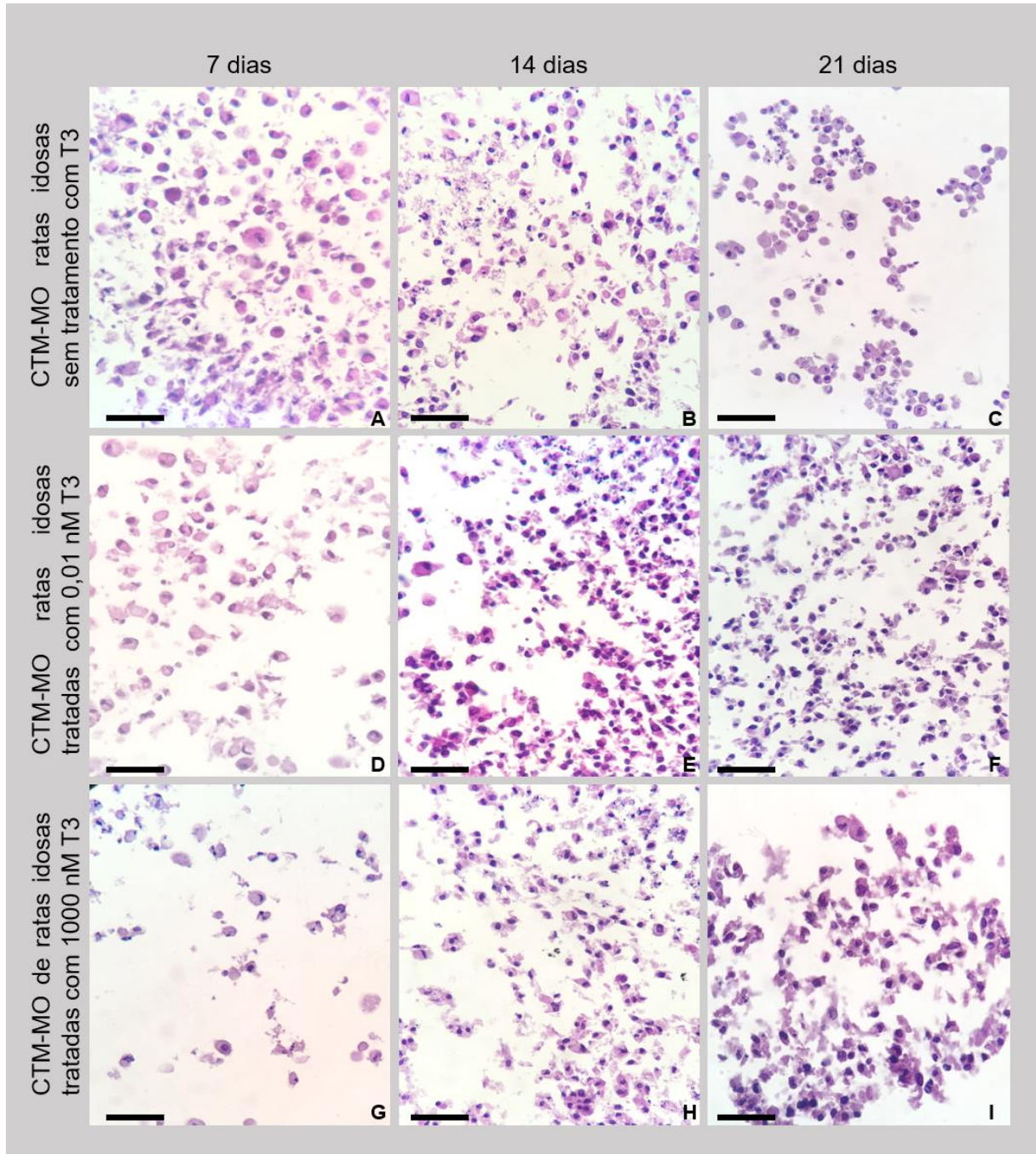
4.3.2 Análise da morfologia celular pela coloração de HE

Aos sete dias de diferenciação, os grupos CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3 apresentaram morfologia semelhante ao grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3, todavia o grupo CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 apresentava discreta quantidade de células volumosas (Figura 9A, D, G).

Aos 14 dias de diferenciação, as células dos grupos CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM de T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3 apresentaram morfologia semelhante ao grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (Figura 9B, E, H).

Aos 21 dias de diferenciação, as células dos grupos CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM de T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3 apresentaram morfologia semelhante ao grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3. Todavia, nestes grupos as células volumosas estavam presentes em moderada quantidade (Figura 9C, F, I).

Figura 9. Morfologia das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* idosas, nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (A,B,C), CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 (D,E,F) e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3 (G,H,I), aos períodos de sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de diferenciação condrogênica. Hematoxilina e eosina, Barra = 59,4 μ m.



4.3.3 Análise da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+

Durante a análise da formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ entre os grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (Figura 10A, B, C), CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM de T3 (Figura 10D, E, F) e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3 (Figura 10G, H, I) não se observou diferença significativa, ($P > 0,05$) (Figura 11).

Figura 10. Produção de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas *Wistar* nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (A,B,C), CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 (D,E,F) e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3 (G,H,I) aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de diferenciação condrogênica. Alcian-Blue-Ácido Periódico de Schiff. Barra = 59,4 µm.

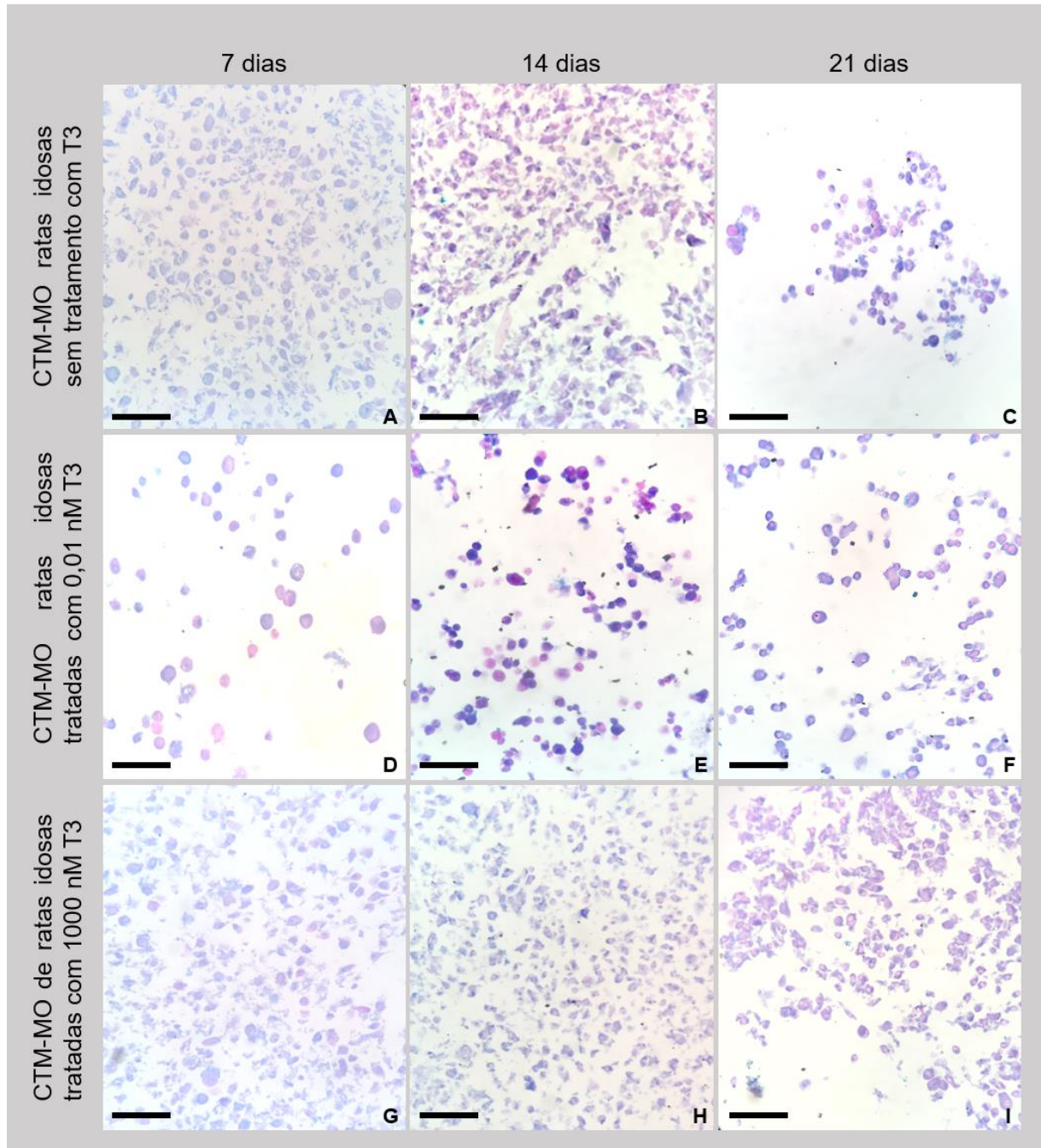
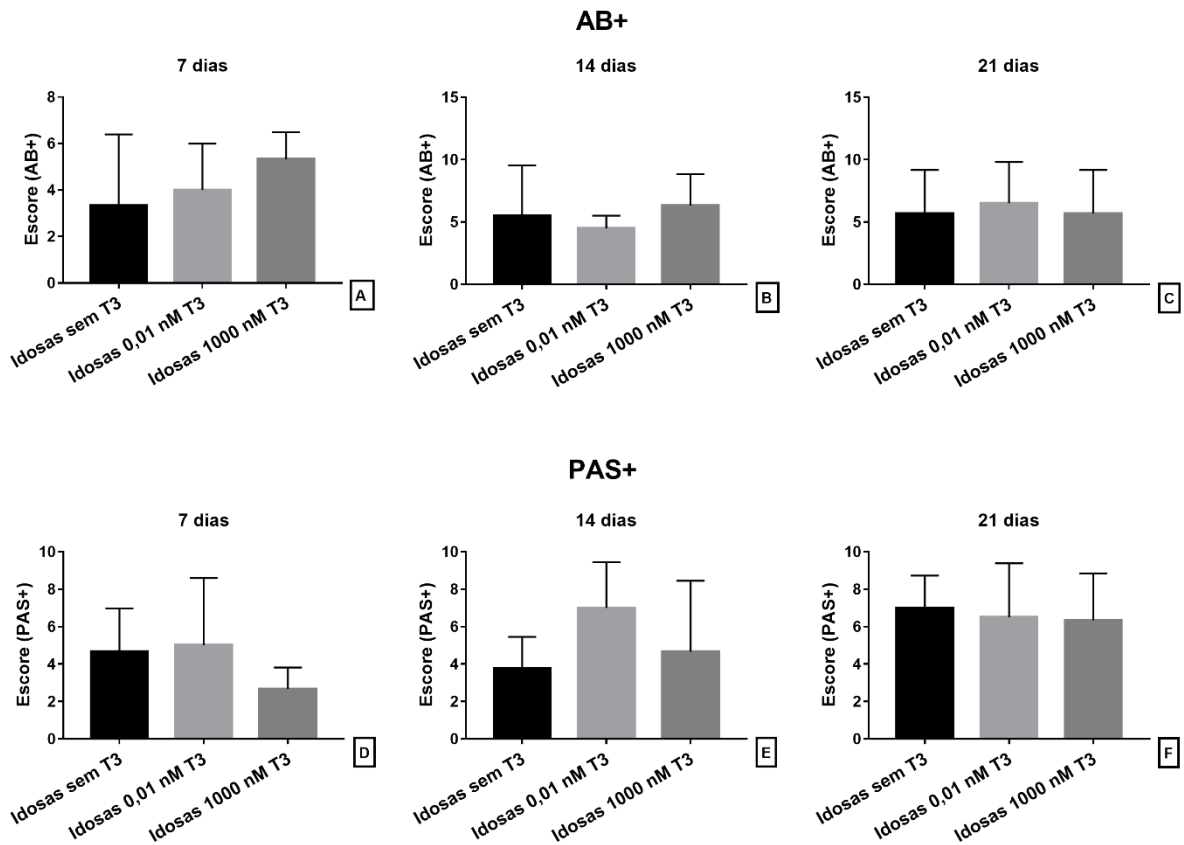


Figura 11. Gráficos dos escores (mediana e erro padrão) de produção de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas Wistar nos grupos CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3, CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM T3, aos sete (A,D), 14 (B,E) e 21 (C,F) dias de diferenciação condrogênica. Para análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do *post hoc* de Dunn.



A Tabela 1 demonstra um resumo dos principais resultados observados durante a diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas idosas tratadas ou não com T3.

Tabela 1. Expressão de Sox9, Col II, Agg e na formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ no grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (primeira coluna) em comparação com o grupo CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 e expressão de Sox9, Col II, Agg e na formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ nos grupos tratados com T3 (CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM de T3 e CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3) em comparação com o grupo CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 (segunda e terceira coluna) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica.

	CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3			CTM-MO de ratas idosas tratadas com 0,01 nM de T3			CTM-MO de ratas idosas tratadas com 1000 nM de T3		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Agg	↑	↑	---	↓	↓	---	↓	↓	---
Sox9	---	↑	---	---	---	---	---	---	---
Col II	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AB+	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PAS+	---	---	---	---	---	---	---	---	---

*(--): não houve diferença significativa; (↑) aumento da expressão comparando com CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3; (↓): diminuição da expressão comparando com CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3; CTM-M: células tronco mesenquimais da medula óssea; T3: triiodotironina; nM: nanomol; Col II: colágeno II; Agg: agregano; AB+: matriz condrogênica AB positiva; PAS+: matriz condrogênica PAS positiva.

5. DISCUSSÃO

Verificou-se neste estudo que o potencial de diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas *Wistar* idosas sem tratamento com T3 não diminuiu comparado ao CTM-MO de ratas jovens sem tratamento com T3 (Figuras 2 e 3). Esse fato está relacionado a não diminuição da expressão relativa de genes como Sox9, Col II e Agg, bem como a formação de glicosaminoglicanos. Além disso, o tratamento com T3 nas doses de 0,01 nM e 1000 nM não aumentou o potencial de diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas idosas (Figuras 7 e 8).

Os resultados acima tratados demonstram a importância de se investigar fatores envolvidos na diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas. Um desses fatores é a idade cronológica, que é um fator influenciador no potencial de diferenciação condrogênica (BYDLOWSKI *et al.*, 2009), causando diminuição desse potencial em humanos e animais idosos (ZHENG e al., 2007; ASUMDA; CHASE, 2011; PAYNE *et al.*, 2010; KANAWA *et al.*, 2013). Asumda e Chase (2011) relataram que houve diminuição da expressão de Agg em CTM-MO de ratos *Sprague Dawley* com 15 meses de idade e, conseqüentemente, houve diminuição da diferenciação condrogênica. Zheng *et al.* (2007) também verificaram que ocorre uma diminuição na diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratos *Sprague Dawley* idosos com 12 meses de idade, pois houve redução da expressão de Col II, Agg e da formação de glicosaminoglicanos, mas sem alteração na expressão de Sox9. Adicionalmente, em humanos, analisando as CTM-MO durante a diferenciação condrogênica de indivíduos idosos, houve diminuição da formação de glicosaminoglicanos (PAYNE *et al.*, 2010; KANAWA *et al.*, 2013) e da expressão de SOX9, COLII e AGG (KANAWA *et al.*, 2013).

Ao contrário, no presente estudo, não houve diminuição do potencial de diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas idosas e este potencial se manteve semelhante ao de indivíduos jovens. Este resultado é extremamente importante, pois demonstra que estes indivíduos mesmo com idade cronológica avançada mantêm a capacidade de diferenciação condrogênica das CTM-MO, ou seja, apresentam a mesma idade ontogenética. Dessa forma, as células de ratas *Wistar* idosas podem ser utilizadas para o tratamento autólogo de doenças ou defeitos no tecido cartilaginoso.

Diferentemente, nos estudos citados anteriormente, o potencial condrogênico foi diminuído em indivíduos idosos humanos e em ratos da linhagem *Sprague dawley* (PAYNE *et al.*, 2010; KANAWA *et al.*, 2013). Assim, sugere-se que a linhagem do doador e a espécie, portanto o genótipo, são fatores que podem influenciar no potencial de diferenciação condrogênico de indivíduos idosos.

Quando se avaliou a influência da T3 sobre o potencial de diferenciação condrogênico de CTM-MO de ratas idosas, verificou-se que este potencial não aumentou, inclusive ocorreu uma diminuição da expressão de Agg de forma dose e período dependentes (Figura 3). Isto não foi suficiente para diminuir a formação de matriz condrogênica e conseqüentemente não prejudicou a diferenciação condrogênica nestas células (Figuras 6 e 11). Assim, o tratamento hormonal não influenciou na diferenciação condrogênica de CTM-MO de ratas *Wistar* idosas, pois as mesmas já haviam apresentado um potencial de diferenciação semelhante ao de ratas jovens.

Corroborando com os resultados deste estudo, Elert (2017) verificou que o potencial condrogênico não aumentou em CTM-TA de ratas *Wistar* jovens tratadas com 0,01, 1,0, 100 ou 1000 nM de T3, pois diminuiu a expressão de Sox9 e não interferiu na formação de GAG e na expressão de Col II e Col X. Além disso, outro estudo verificou que 0,01 ou 1000 nM de T3 também não influenciou na diferenciação condrogênica de CTM-TA de equinos jovens, pois não alterou a formação de GAG (SPILA, 2019).

Adicionalmente, Assis e colaboradores (2018) constataram que o tratamento *in vitro* com T3 aumentou o potencial de diferenciação condrogênico em CTM-MO de ratas *Wistar* jovens de forma dose e período dependentes, pois aumentou a produção de GAG e a expressão de Sox9 e Col II. Além disso, a T3 aumentou o potencial de diferenciação osteogênica de ratas *Wistar* jovens de forma dose dependente, aumentando a síntese de Col II, a atividade da fosfatase alcalina e a formação de nódulos de mineralização (BOELONI *et al.*, 2009). Assim, é importante citar que o efeito hormonal pode variar com a idade cronológica do doador, com a fonte de obtenção das células e com o tipo de diferenciação na qual a célula é submetida.

Outros hormônios também têm sido estudados com relação ao efeito sobre a diferenciação condrogênica. Por exemplo, o uso do hormônio grelina em associação

com TGF- β aumentou de forma dose dependente a expressão de Sox9, Col II, agrecan (ACAN) e Col X de CTM-MO de ratos *Sprague Dawley* de 6 semanas de idade (FAN *et al.*, 2019). Outro exemplo de influência hormonal sobre o potencial condrogênico é o paratormônio (PTH), pois quando o mesmo é administrado nas doses de 0,1; 1 e 10 nM em CTM-MO de camundongos, aumentou a expressão de Sox9, Col2a1 e PTH1R, melhorando o potencial condrogênico, porém na dose de 1000 nM, apresentou efeito contrário (ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014). Conseqüentemente, a diferenciação condrogênica de CTM-MO estão suscetíveis aos efeitos de diferentes hormônios e em diferentes doses.

Fatores diversos foram citados como influenciadores do potencial de diferenciação condrogênica de CTM-MO, dentre esses, é importante considerar ainda mudanças genéticas e epigenéticas. Fatores de transcrição regulam a expressão gênica e têm suas atividades influenciadas de acordo com a estrutura da cromatina, precisando de um equilíbrio entre eucromatina e heterocromatina. Os fatores de transcrição estão envolvidos no potencial de auto-renovação, proliferação e diferenciação de células tronco (BOQUEST *et al.*, 2006; SQUILLARO *et al.*, 2008). A estrutura da cromatina pode ser alterada por fatores epigenéticos, que são modificações do genoma herdáveis, mas que não alteram a sequência do DNA. Então, um desequilíbrio na acetilação ou metilação da cromatina pode provocar essas mudanças epigenéticas e comprometer as características das células tronco, que no âmbito desse estudo poderiam influenciar no potencial condrogênico das CTM-MO, mas isto precisaria ser verificado em pesquisas futuras visto que não foi avaliado no presente estudo.

Importante ressaltar ainda que a resposta particular de um indivíduo aos tratamentos também pode influenciar no resultado final, fazendo-se importante citar a idiosincrasia. Por definição, idiosincrasia é a capacidade de um indivíduo ou grupo a reagir de maneira peculiar a influência de diferentes agentes externos. Essa característica pode ser observada também ao nível celular, notando que as células tronco possuem suscetibilidade a diversos fatores externos como hormônios (ASSIS *et al.*, 2018), hipóxia (LEE *et al.*, 2013), idade (ASUMDA; CHASE, 2011), fatores de crescimento (MEHLHORN *et al.*, 2007), entre outros.

Neste sentido, a idiosincrasia pode influenciar por exemplo na formação e quantificação de UFC (SETHE *et al.*, 2006). Trazendo para o contexto deste estudo,

a idade cronológica é um fator extrínseco que pode ter designação idiossincrática e nesse caso os indivíduos ratos, humanos, camundongos ou o grupo de célula CTM-MO, CTM-TA podem reagir de diferentes formas a diferenciação induzida *in vitro*, possibilitando respostas diferentes em indivíduos com as mesmas características. Isso pode explicar as diferenças de resultados encontrados na ampla literatura pesquisada em comparação a este estudo.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o potencial de diferenciação condrogênico de CTM-MO de ratas idosas sem tratamento com T3 não é alterado com a idade, pois as CTM-MO de ratas idosas apresentam expressão de Sox9 e Agg superiores em relação as CTM-MO de ratas jovens de forma período dependente e formação de glicosaminoglicanos semelhante as CTM-MO de ratas jovens.

Conclui-se também que, o tratamento hormonal com T3 não influencia no potencial de diferenciação condrogênico de CTM-MO de ratas *Wistar* idosas.

Esse estudo contribui para o uso de terapias *in vivo* utilizando CTM-MO, mesmo em indivíduos idosos, mostrando que no caso de ratas *Wistar* idosas com 12 meses, a idade cronológica e o tratamento hormonal não foram fatores limitantes no potencial condrogênico. Portanto, nessa idade, essas doadoras fornecem uma boa fonte de CTM-MO, sem necessitarem de tratamento prévio com T3, uma vez que apresentam mesma idade ontogenética que ratas *Wistar* jovens.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos até o momento dão um panorama sobre a relação da idade e uso de hormônio tireoidiano na expressão de genes da condrogênese e formação de matriz cartilaginosa em CTM-MO de ratas *Wistar* idosas. Os resultados do presente estudo, são importantes pois através deles, torna-se de conhecimento que é possível utilizar CTM-MO de ratas idosas da linhagem *Wistar* sem que haja declínio do potencial de diferenciação condrogênica, não se fazendo necessário tratamento prévio com T3, facilitando assim futuros protocolos de implantação *in vivo* dessas células em tratamento de doenças ou defeitos cartilagosos.

8. REFERÊNCIAS

- ABAD, V.; MEYERS, J. L.; WEISE, M.; GAFNI, R. I.; BARNES, K. M.; NILSSON, O.; BACHER, J. D.; BARON, J. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. **Endocrinology**, v. 143, n. 5, p. 1851-1857, 2002.
- ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. **Differentiation**, v.92, n.1-2, 2016.
- ASSIS, H. A.; ELERT, N. C.; AZEVEDO, A. L. B. P.; BRAGA, I. S.; SERAKIDES, R.; OCARINO, N. M.; GOES, A. M.; CARETA, F. P.; PANETO, G. G.; SILVA, A. M. A.; BOELONI, J. N. Dose-dependent effect of triiodothyronine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from the bone marrow of female rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 89-100, 2018.
- ASUMDA, F. Z.; CHASE, P. B. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. **BMC Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 44, 2011.
- 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.
- BARA, J. J.; RICHARDS, R. G.; ALINI, M.; STODDART, M. J. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. **Stem Cells**, v.32, n.7, p.1713-1723, 2014.
- 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.S.; DARLING, E.M. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 10, p. 2079-2097, 2012.

BERNHARD, J. C.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration? **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 56, 2016.

BIANCONE, L.; BRUNO, S.; DEREGIBUS, M. C.; TETTA, C.; CAMUSSI, G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 8, p. 3037-3042, 2012.

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.72, n.2, p. 88-97, 2009.

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.; SILVA, J.F.; CORRÊA, C.R.; BERTOLLO, C.M.; HELL, R.C.; 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, 2013a.

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; ISHIGURO, T.; OKUMURA, M.; IWANAGA, T.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. **Experimental Hematology**, v.32, n.5, p.502-509, 2004.

BOQUEST, A. C.; NOER, A.; COLLAS, P. Epigenetic programming of mesenchymal stem cells from human adipose tissue. **Stem Cell Reviews**, v. 2, n. 4, p. 319-329, 2006.

BROWN, T.D.; JOHNSTON, R.C.; SALTZMAN, C.L.; MARSH, J.L.; BUCKWALTER, J.A. Post traumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v.20, n.10, p.739–744, 2006.

BRUNO, S.; DEREGIBUS, M. C.; CAMUSSI, G. The secretome of mesenchymal stromal cells: role of extracellular vesicles in immunomodulation. **Immunology Letters**, v. 168, n. 2, p. 154-158, 2015.

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, supl.1, p.25-35, 2009.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.

CHEN, C.W.; TSAI, Y.H.; DENG, W.P.; SHIH, S.N.; FANG, C.L.; BURCH, J.G.; CHEN, W.H.; LAI, W.F. Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 2, p. 446-453, 2005.

CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X.; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, n.5, p.815-820, 2008.

CHEN, Z.; HUANG, J.; LIU, Y.; DATTILO, L. K.; HUH, S. H.; ORNITZ, D.; BEEBE, D. C. FGF signaling activates a Sox9-Sox10 pathway for the formation and branching morphogenesis of mouse ocular glands. **Development**, v.141, n.13, p.2691–2701, 2014.

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.

CHOI, K. M.; SEO, Y. K.; YOON, H. H.; SONG, K. Y.; KWON, S. Y.; LEE, H. S.; PARK, J. K. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell

proliferation and differentiation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 6, p. 586-594, 2008.

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.

COLEMAN, R.M.; CASE, N.D.; GULDBERG, R.E. Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth factors. **Biomaterials**, v.28, n.12, p.2077-2086, 2007.

COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M.; PROCKOP, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 7, p. 3213-3218, 2000.

CRUZ, I. B. M. D.; SEVERO, A. L.; AZZOLIN, V. F.; GARCIA, L. F. M.; KUHN, A.; LECH, O. Regenerative potential of the cartilaginous tissue in mesenchymal stem cells: update, limitations, and challenges. **Revista Brasileira De Ortopedia**, v.52, n.1, p.2-10, 2017.

DANISOVIC, L.; VARGA, I.; POLÁKI, S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Tissue and Cell**, v.44, n.2, p.69-73, 2012.

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 LANGE, T. How telomeres solve the end-protection problem. **Science**, v. 326, n. 5955, p. 948-952, 2009.

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.

DERFOUL, A.; PERKINS, G.L.; HALL, D.J.; TUAN, R.S. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing

expression of cartilage extracellular matrix genes. **Stem Cells**, v.24, n.6, p.1487-1495, 2006.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stem cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 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.

DUSCHER, D.; BARRERA, J.; WONG, V. W.; MAAN, Z. N.; WHITTAM, A. J.; JANUSZYK, M.; GURTNER, G. C. Stem cells in wound healing: the future of regenerative medicine? A mini-review. **Gerontology**, v. 62, n. 2, p. 216-225, 2016.

ELERT, N. C. Efeitos in vitro da triiodotironina (T3) na diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas. 2017. 76p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2017.

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

FAN, L.; CHEN, J.; TAO, Y.; HENG, B. C.; YU, J.; YANG, Z.; GE, Z. Enhancement of the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and cartilage repair by ghrelin. **Journal of Orthopaedic Research**, 2019 (*in press*).

FILARDO, G.; PERDISA, F.; ROFFI, A.; MARCACCI, M.; KON, E. Stem cells in articular cartilage regeneration. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 11, n. 1, p. 42, 2016.

FISCHER, L.; BOLAND, G.; TUAN, R. S. Wnt-3A enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 34, n. 277, p. 30870-30878, 2002.

FISCHER, L.; BOLAND, G.; TUAN, R. S. Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 84, n. 4, p. 816-831, 2002.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v.6, n.2, p.230-247, 1968.

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.

GLOUSKER, G.; TOUZOT, F.; REVY, P.; TZFATI, Y.; SAVAGE, S. A. Unraveling the pathogenesis of Hoyeraal–Hreidarsson syndrome, a complex telomere biology disorder. **British Journal Of Haematology**, v. 170, n. 4, p. 457-471, 2015.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. **Nature**, v. 337, n. 6205, p. 331, 1989.

GRONTHOS, S.; ARTHUR, A.; BARTOLD, P.M.; SHI, S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v.698, p.107-121, 2011.

GRUBER, R.; CZERWENKA, K.; WOLF, F.; HO, G.M.; WILLHEIM, M.; PETERLIK, M. Expression of the vitamin D receptor, of estrogen and thyroid hormone receptor α - and β -isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. **Bone**, v.24, n.5, p.465-473, 1999.

HARVANOVÁ, D.; TÓTHOVÁ, T.; ŠARIŠKÝ, M.; AMRICOVÁ, J.; ROSOCHA, J. Influence of carbon content on oxides' reduction during sintering of Cr-Mo-C prealloyed steel. **Powder Metallurgy Progress**, v. 11, n. 1-2, p. 114-122, 2011.

HASHIMOTO, Junko; KARIYA, Yoshinobu; MIYAZAKI, Kaoru. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). **Stem cells**, v. 24, n. 11, p. 2346-2354, 2006.

HAYFLICK, Leonard. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 37, n. 3, p. 614-636, 1965.

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.

HUBRECHT, R. C.; KIRKWOOD, J. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**. 8^a ed. John Wiley & Sons, 2010. 851p.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 567-582, 2008.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R.E.; KEENE, C.D.; ORTIZ-GONZALES, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISGERG, A.; LOW, W.C.; LARGAESPADA, D.A.; VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v.418, n.6893, p.41-49, 2002.

KANAWA, M.; IGARASHI, A.; RONALD, V. S.; HIGASHI, Y.; KURIHARA, H.; SUGIYAMA, M.; SASKIANTI, T.; PAN, H.; KATO, Y. Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2. **Cytotherapy**, v.15, n.9, p.1062-1072, 2013.

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.

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.

KIM, HYE-JOUNG; IM, GUN-IL. 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, 2009.

KOBOLAK, J.; DINNYES, A.; MEMIC, A.; KHADEMHOSEINI, A.; MOBASHERI, A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v. 99, p. 62-68, 2016.

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

KONO, T.; ROBINSON, F. W.; BLEVINS, T. L.; EZAKI, O. Evidence that translocation of the glucose transport activity is the major mechanism of insulin action on glucose transport in fat cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 18, p. 10942-10947, 1982.

KRETLOW, J. D.; JIN, Y. Q.; LIU, W.; ZHANG, W. J.; HONG, T. H.; ZHOU, G.; BAGGETT, S. L.; MIKOS, A. G.; CAO, Y, L. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. **BMC Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 60, 2008.

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.

KUSZEL, L.; TRZECIAK, T.; RICHTER, M.; CZARNY-RATAJCZAK, M. Osteoarthritis telomere shortening. **Journal of Applied Genetics**, v. 56, n. 2, p. 169-176, 2015.

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.

LEE, H. H.; CHANG, C. C.; SHIEH, M. J.; WANG, J. P.; CHEN, Y. T.; YOUNG, T. H.; HUNG, S. C. Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through PI3K/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2683, 2013.

LEE, R. H.; KIM, B.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H.; SUH, K.; BAE, Y. C.; JUNG, J. S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 14, n. 4-6, p. 311-324, 2004.

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, suppl.A, p.S69-S75, 2001.

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

LI, J.; ZHAO, Z.; LIU, J.; HUANG, N.; LONG, D.; WANG, J.; LI, X.; LIU, Y. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF- β 1/Smads pathway. **Cell Proliferation**, v. 43, n. 4, p. 333-343, 2010.

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

LIU, L.; CHEUNG, T.H.; CHARVILLE, G.W.; RANDO, T.A. Isolation of skeletal muscle stem cells by fluorescence-activated cell sorting **Nature Protocols**, v. 10, n. 10, p. 1612-1624, 2015.

LIU, X.; DRISKELL, R. R.; ENGELHARDT, J. F. Stem cells in the lung. In *Methods in enzymology*. **Academic Press**. v. 419, p. 285-321, 2006.

LIU, Y.; SNOW B.E.; HANDE, M.P.; YEUNG, D.; ERDMANN, N.J.; WAKEHAM, A.; ITIE, A.; SIDEROVSKI, D.P.; LANSDORP, P.M.; ROBINSON, M.O.; HARRINGTON L. The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. **Current Biology**, v. 10, n. 22, p. 1459-1462, 2000.

- MACKIE, E.; AHMED, Y. A.; TATARCZUCH, L.; CHEN, K. S.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 1, p. 46-62, 2008.
- MAOR, G.; HOCHBERG, Z.; SILBERMANN, M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. **Acta Endocrinologica**, v. 128, n. 1, p. 56-64, 1993.
- MARKWAY, B. D.; TAN, G-K.; BROOKE, G.; HUDSON, J. E.; COOPER-WHITE, J. J.; DORAN, M. R. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. **Cell Transplantation**, v.19, n.1, p. 29-42, 2010.
- MEHLHORN, A.T.; NIEMEYER, P.; KASCHTE, 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.
- MILJKOVIC, N. D.; COOPER, G. M.; MARRA, K. G. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.16, n.10, p.1121-1130, 2008.
- MORIKAWA, S.; MABUCHI, Y.; KUBOTA, Y.; NAGAI, Y.; NIIBE, K.; HIRATSU, E.; SUZUKI, S.; MIYAUCHI-HARA, C.; NAGOSHI, N.; SUNABORI, T.; SHIMMURA, S.; MIYAWAKI, A.; NAKAGAWA, T.; SUDA, T.; OKANO, H.; MATSUZAKI, Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 11, p. 2483-2496, 2009.
- MURPHY, J. M.; DIXON, K.; BECK, S.; FABIAN, D.; FELDMAN, A.; BARRY, F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 3, p. 704-713, 2002.
- NAKAMURA, T. M.; MORIN, G. B.; CHAPMAN, K. B.; WEINRICH, S. L.; ANDREWS, W. H.; LINGNER, J.; HARLEY, C. B.; CECH, T. R. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. **Science**, v. 277, n. 5328, p. 955-959, 1997.

NASRABADI, D.; REZAEIANI, S.; ESLAMINEJAD, M. B.; SHABANI, A. Improved Protocol for Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells-Effect of PTHrP and FGF-2 on TGF β 1/BMP2-Induced Chondrocytes Hypertrophy. **Stem Cell Reviews and Reports**, p. 1-12, 2018.

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.; BRITTBERG, M.; WENDT, D.; MARTIN, I.; MAINIL-VARLET, P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 2, p. 300-322, 2006.

NOORTA, W. A.; KRUISSELBRINK, A. B.; S. IN'T ANKERA, B. P.; KRUGER, M.; VAN BEZOOIJEN, R. L.; PAUS, R. A.; HEEMSKERK, M. H. M.; LÖWIK, C. W. G. M.; FALKENBURG, J. H. F.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E.; Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 8, p. 870-878, 2002.

OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; GOES, A.M.; SILVA, J.F.; MARUBAYASHI, U.; SERAKIDES, R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric Oxide**, v.19, n.4, p.320-325, 2008.

OKAMOTO, T.; AOYAMA, T.; NAKAYAMA, T.; NAKAMATA, T.; HOSAKA, T.; NISHIJO, K.; NAKAMURA, T.; KIYONO, T.; TOGUCHIDA, J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.295, n.2, p.354-361, 2002.

OZE, H.; HIRAO, M.; EBINA, K.; SHI, K.; KAWATO, Y.; KANESHIRO, S.; YOSHIKAWA, H.; HASHIMOTO, J. Impact of medium volume and oxygen concentration in the incubator on pericellular oxygen concentration and differentiation

of murine chondrogenic cell culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 48, n. 2, p. 123-130, 2012.

PADH, H. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. **Nutrition Reviews**, v. 49, n. 3, p. 65-70, 1991.

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.

PARK, Y.; SUGIMOTO, M.; WATRIN, A.; CHIQUET, M.; HUNZIKER, E. B. BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 6, p. 527-536, 2005.

PAYNE, K. A.; DIDIANO, D. M.; CHU, C. R. Donor sex and age influence the chondrogenic potential of human femoral bone marrow stem cells. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 5, p. 705-713, 2010.

PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. **Cell Biology**, v.33, n.1, p.2-18, 2006.

PETERKOFISKY, B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 6, p. 1135S-1140S, 1991.

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.

POTDAR, P. D.; D'SOUZA, S. B. Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and SOX 2. **Human Cell**, v. 23, n. 4, p. 152-155, 2010.

PROVOT, S.; SCHIPANI, E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 3, p. 658-665, 2005.

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.

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. **Public Library of Science One**, v.8, n.8, p.72973, 2013.

RASTEGAR, F.; SHENAQ, 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

RICHARDSON, S. M.; KALAMEGAM, G.; PUSHPARAJ, P. N.; MATTA, C.; MEMIC, A.; KHADEMHOSEINI, A.; MOBASHERI, R.; POLETTI, F. L. JUDITH A. HOYLAND, J. A.; MOBASHERI, A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. **Methods**, v. 99, p. 69-80, 2016.

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.

ROSEN, O. M. After insulin binds. **Science**, v. 237, n. 4821, p. 1452-1458, 1987.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 2002. 266p.

SANDELL, L. J.; MORRIS, N.; ROBBINS, J. R.; GOLDRING, M. B. Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. **The Journal of Cell Biology**, v. 114, n. 6, p. 1307-1319, 1991.

SCHARSTUHL, A.; SCHEWE, B.; BENZ, K.; GAISSMAIER, C.; BÜHRING, H-J.; STOOP, R. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. **Stem Cells**, v. 25, n. 12, p. 3244-3251, 2007.

SEKIYA, I.; LARSON, B. L.; VUORISTO, J. T.; REGER, R. L.; PROCKOP, D. J. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. **Cell and Tissue Research**, v. 320, n. 2, p. 269-276, 2005.

SETHE, S.; SCUTT, A.; STOLZING, A. Aging of mesenchymal stem cells. **Ageing Research Reviews**, v. 5, n. 1, p. 91-116, 2006.

SHEN, B.; WEI, A.; WHITTAKER, S.; WILLIAMS, L.A.; TAO, H.; MA, D.D.F.; DIWAN, A.D. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, n. 2, p. 406-416, 2010.

SHINTANI, N.; HUNZIKER, E. B. Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. **European Cells & Materials Journal**, v. 22, p. 302-319, 2011.

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

SIDDIQI, A.; PARSONS, M.P.; LEWIS, J.L.; MONSON, J. P.; WILLIAMS, G.R.; BURRIN, J. M. TR expression and function in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 2, p. 906-914, 2002.

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.

SOTTILE, V.; HALLEUX, C.; BASSILANA, F.; KELLER, H.; SEUWEN, K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. **Bone**, v. 30, n. 5, p. 699-704, 2002.

SPENCER, J. A.; FERRARO, F.; ROUSSAKIS, E.; KLEIN, A.; WU, J.; RUNNELS, J. M.; ZAHER, W.; MORTENSEN, L. J.; ALT, C.; TURCOTTE, R.; YUSUF, R.; CORTE, D.; VINOGRADOV, S. A.; SCADDEN, D. T.; LIN, C. P. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. **Nature**, v. 508, n. 7495, p. 269, 2014.

SPILA, D.O. Efeito da triiodotironina na diferenciação osteogênica e condrogênica de células tronco do tecido adiposo de equinos. Orientador: Rogéria Serakides. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SQUILLARO, T.; HAYEK, G.; FARINA, E.; CIPOLLARO, M.; RENIERI, A.; GALDERISI, U. A case report: bone marrow mesenchymal stem cells from a Rett syndrome patient are prone to senescence and show a lower degree of apoptosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 6, p. 1877-1885, 2008.

STONE, N.; MEISTER, A. Function of ascorbic acid in the conversion of proline to collagen hydroxyproline. **Nature**, v. 194, p. 555-557, 1962.

SUVA, D.; GARAVAGLIA, G.; MENETREY, J.; CHAPUIS, B.; HOFFMEYER, P.; BERNHEIM, L.; KINDLER, V. Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 198, n. 1, p. 110-118, 2004.

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.

TAKASHIMA, Y.; ERA, T.; NAKAO, K.; KONDO, S.; KASUGA, M.; SMITH, A. G.; NISHIKAWA, S. I. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1377-1388, 2007.

TARNOWSKI, M.; SIERON, A. AL. Adult stem cells and their ability to differentiate. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 8, p. 154-163, 2006.

THORPE, S. D.; BUCKLEY, C. T.; VINARDELL, T.; O'BRIEN, F. J.; CAMPBELL, V. A.; KELLY, D.J. The response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to dynamic compression following TGF- β 3 induced chondrogenic differentiation. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 38, n. 9, p. 2896-2909, 2010.

TOH, W. S.; LIU, H.; HENG, B. C.; RUFAlHAH, A. J.; YE, C. P.; CAO, T. Combined effects of TGF β 1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. **Growth Factors**, v. 23, n. 4, p. 313-321, 2005.

TSAI, T.-L.; MANNER, P. A.; LI, W.-J. Regulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis by glucose through protein kinase C/transforming growth factor signaling. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 2, p. 368-376, 2013.

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.

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/ β -catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 12, p. 1988-1995, 2007.

WANG, Z.H.; LI, X.L.; HE, X.J.; WU, B.J.; XU, M.; CHANG, H.M.; ZHANG, X.H.; XING, Z.; JING, X.H.; KONG, D.M.; KOU, X.H.; YANG, Y.Y. Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an in vitro model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.47, n.4, p.279-86, 2014.

WEISS, M. L.; TROYER, D. L. Stem cells in the umbilical cord. **Stem Cell Reviews**, v. 2, n. 2, p. 155-162, 2006.

WEISS, S.; HENNIG, T.; BOCK, R.; STECK, E.; RICHTER, W. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, n. 1, p. 84-93, 2010.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.

ZHANG, Y.; KUMAGAI, K.; SAITO, T. Effect of parathyroid hormone on early chondrogenic differentiation from mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v.9, n.1, p.68-74, 2014.

ZHENG, H.; MARTIN, J. A.; DUWAYRI, Y., FALCON, G.; BUCKWALTER, J. A. Impact of aging on rat bone marrow-derived stem cell chondrogenesis. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 2, p. 136-148, 2007.

ZOMER, H. D.; VIDANE, A. S.; GONÇALVES, N. N.; AMBRÓSIO, C. E. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical

perspectives. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 8, p. 125, 2015.

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.