

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

THÉO MATOS ARANTES MORAES

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DA TRIIODOTIRONINA NO POTENCIAL
CONDROGÊNICO *IN VITRO* ENTRE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
RATAS WISTAR**

ALEGRE - ES

2022

THÉO MATOS ARANTES MORAES

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DA TRIIODOTIRONINA NO POTENCIAL
CONDROGÊNICO *IN VITRO* ENTRE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
RATAS WISTAR**

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 Biociência Aplicada à Produção e Saúde Animal.

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

ALEGRE - ES

2022

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

M425c Matos Arantes Moraes, Théo, 1987-
Comparação do efeito da triiodotironina no potencial
condrogênico in vitro entre células tronco mesenquimais de
ratas Wistar / Théo Matos Arantes Moraes. - 2022.
70 f. : il.

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

1. Hormônios tireoidianos. 2. Cartilagem. 3. Células-tronco.
4. Medula óssea. 5. Tecido adiposo. I. Neves Boeloni, Jankerle.
II. Oliveira Trivilin, Leonardo. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV.
Título.

CDU: 619

THÉO MATOS ARANTES MORAES

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DA TRIIODOTIRONINA NO POTENCIAL
CONDROGÊNICO *IN VITRO* ENTRE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Biociência Aplicada à Produção e Saúde Animal.

Aprovado em 06 de junho de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profª. Drª. Jankerle Neves Boeloni
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Profª. Drª. Maria Aparecida da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Anderson Barros Archanjo
Centro Universitário São Camilo, Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Chego ao fim desta jornada e não tem como não mencionar o período histórico que a atravessou. Devo levar em consideração a realização de uma pesquisa em meio a pandemia da Covid-19. Transformada por períodos de confinamento, atividades online que antes eram presenciais e atrasos inevitáveis. Outros aprendizados vieram das aulas à distância, do isolamento imposto, do pânico e da ansiedade instaurados e das muitas vidas perdidas. Foi preciso coragem e muita resiliência para seguir em frente.

Neste contexto agradeço à Deus pelas bênçãos e por todos os privilégios que me possibilitaram continuar. Agradeço à ciência pelas vacinas e pela oportunidade de fazer ciência e contribuir para a sociedade.

Agradeço ao Pedro por todo apoio. Por estar comigo nos meus momentos mais difíceis, mas também por compartilhar o melhor da vida e ser a razão de alegrias diárias.

Agradeço à minha família e aos meus amigos por todo amor, por serem minha saudade e meu porto seguro. À minha avozinha (*in memoriam*) por continuar me iluminando. Saudade eterna, Vó Lila!

À minha orientadora Jankerle pela orientação e por todos ensinamentos. Pelo modo como enxerga a vida, pelo incentivo, carinho, paciência e acolhimento. Uma grande profissional, uma excelente mentora e uma amiga nessa jornada.

Ao meu coorientador, membros da banca e demais professores por toda contribuição e aprendizado.

Aos colegas de equipe, alunos e funcionários do Laboratório de Patologia Animal e de Cultivo Celular, por serem minha agradável casa nestes anos. Pela ajuda nas atividades, pela boa convivência e pelos momentos felizes de descontração.

Agradeço ainda à Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade e aos seus funcionários por todos serviços prestados. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre.

Charles Chaplin.

RESUMO

MORAES, THÉO MATOS ARANTES. **Comparação do efeito da triiodotironina no potencial condrogênico *in vitro* entre células tronco mesenquimais de ratas Wistar.** 2022. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2022.

Células tronco mesenquimais (CTM) são indiferenciadas e multipotentes com capacidade de diferenciação condrogênica e podem sofrer influência de diversos fatores, dentre eles o hormonal. Objetivou-se comparar o efeito da triiodotironina (T3) em diferentes concentrações e tempos, no potencial condrogênico de CTM da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas Wistar jovens. Ambas CTM foram extraídas e cultivadas *in vitro* em meio condrogênico sem T3 (Controles) e com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM) cada uma, totalizando 10 grupos. Após sete, 14 e 21 dias foram avaliadas expressão gênica de Sox9, Colágeno II (Col II) e Agrecano (Acan) utilizando-se qRT-PCR e formação de matriz condrogênica, por meio de coloração histológica Alcian blue (AB) - ácido periódico de Schiff (PAS). Em Sox9 aumentou a expressão de CTM-MO com T3 100 nM aos 7 dias e T3 1000 nM aos 14 dias, e aumentou a expressão de CTM-TA com T3 1 nM aos 14 dias; em Col II aumentou a expressão de CTM-MO com T3 0,01 nM aos 7 dias e aumentou a expressão de CTM-TA com T3 1000 nM aos 14 dias; em Acan aumentou a expressão de CTM-MO com T3 1 nM aos 14 dias e aumentou a expressão de CTM-TA com T3 1 nM aos 21 dias. Com relação à síntese de matriz condrogênica AB-PAS+, aos sete dias de diferenciação a CTM-TA foram superiores à CTM-MO no grupo controle e nas concentrações de T3 0,01 nM, 1 nM e 100 nM, permanecendo semelhante entre as CTM aos 14 e 21 dias. Conclui-se que o potencial condrogênico com síntese de matriz condrogênica da CTM-TA é precocemente superior em relação à CTM-MO aos 7 dias, tanto sem adição de T3 quanto com adição desse hormônio nas concentrações de 0,01 nM, 1 nM e 100 nM.

Palavras-chave: Condrogênese. Medula óssea. Tecido adiposo

ABSTRACT

MORAES, THÉO MATOS ARANTES. **Comparison of the effect of triiodothyronine on the *in vitro* chondrogenic potential between mesenchymal stem cells of Wistar rats.** 2022. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2022.

Mesenchymal stem cells (MSC) are undifferentiated and multipotent, capable of chondrogenic differentiation and may be influenced by several factors, including hormonal. The objective was to compare the effect of triiodothyronine (T3) at different concentrations and times, on the chondrogenic potential of MSC in bone marrow (BM-MSC) and adipose tissue (ASC) in young Wistar rats. Both MSCs were extracted and cultivated *in vitro* in chondrogenic medium without T3 (Controls) and with T3 (0.01; 1; 100 and 1000 nM) each, totaling 10 groups. After seven, 14 and 21 days, gene expression of Sox9, Collagen II (Col II) and Aggrecan (Acan) were evaluated using qRT-PCR and chondrogenic matrix formation, by histological staining Alcian blue (AB) - periodic acid of Schiff (PAS). In Sox9 it increased the expression of BM-MSC with T3 100 nM at 7 days and T3 1000 nM at 14 days, and increased the expression of ASC with T3 1 nM at 14 days; in Col II it increased the expression of BM-MSC with T3 0.01 nM at 7 days and increased the expression of ASC with T3 1000 nM at 14 days; in Acan increased the expression of BM-MSC with T3 1 nM at 14 days and increased the expression of ASC with T3 1 nM at 21 days. Regarding the synthesis of AB-PAS+ chondrogenic matrix, at seven days of differentiation, ASC were superior to BM-MSC in the control group and at concentrations of T3 0.01 nM, 1 nM and 100 nM, remaining similar between MSCs at 14 and 21 days. It is concluded that the chondrogenic potential with chondrogenic matrix synthesis of ASC is precociously superior in relation to BM-MSC at 7 days, both without the addition of T3 and with the addition of this hormone at concentrations of 0.01 nM, 1 nM and 100 nM.

Key-words: Chondrogenesis. Bone marrow. Adipose tissue

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1- Diagrama para caracterização de células tronco mesenquimais (CTM)	16
Figura 2- Expressão (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para Sox9, Colágeno II e Agrecano pela técnica de qRT-PCR em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B, C), 14 (D, E, F) e 21 (G, H, I) dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05	35
Figura 3- Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ (média ± desvio padrão) em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B), 14 (C, D) e 21 (E, F) dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05	39
Figura 4- Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete dias de diferenciação condrogênica. Alcian Blue-PAS, Barra = 96,02µm	40
Figura 5- Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos 14 dias de diferenciação condrogênica. Alcian Blue-PAS, Barra = 96,02µm	40
Figura 6- Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos 21 dias de diferenciação condrogênica. Alcian Blue-PAS, Barra = 96,02µm	41

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

AB – Alcian blue
Acan – Agrecano
ADSC – *Adipose tissue derived stem cells*
BMP – Proteína morfogenética do osso
BM-MSK – *Mesenchymal stem cells from bone marrow*
CCL3 – Ligante de quimiocina 3
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CFU-F - Unidades formadoras de colônias de fibroblastos
Col – Colágeno
CTM – Célula tronco mesenquimal
CTM-MO – Célula tronco mesenquimal da medula óssea
CTM-TA – Célula tronco mesenquimal do tecido adiposo
DMEM – *Dullbecco's Modified Eagle Medium*
FGF – Fator de crescimento fibroblástico
FGFb – Fator de crescimento fibroblástico básico
GAG – Glicosaminoglicanos
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDF-5 – Fator de crescimento/diferenciação 5
HGF – Fator de crescimento de hepatócitos
hPL – Ligado de plaqueta humana
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina 1
Ihh – *Indian hedgehog*
IL – Interleucina
IL1R2 – Receptor de interleucina 1 tipo 2
KDR – Receptor de domínio de inserção de kinase
MSC – *Mesenchymal stem cells*
Nanog - Nanog homeobox
Oct-4 - Octamer-binding transcription factor 4
PAS – Ácido periódico de Schiff
PAX3 – *Paired box 3*
PBS – Solução tampão de fosfato padrão

PCR – Reação em cadeia da polimerase
PTHrP – Peptídio relacionado ao paratormônio
qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Runx2 – *Runt-related trasnscription fator 2*
SFB – Soro fetal bovino
Shh – *Sonic hedgehog*
Sox – *SRY-Box transcription factor*
SPI1 – Spi-1 proto-oncogene
SVF – Fração vascular estromal
T3 – Triiodotironina
TGF- β – Fator de crescimento transformador β
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
Wnt – Via de sinalização da Wnt
ZNF45 – *Zinc finger 45*

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Células tronco	15
2.1.1 Células tronco mesenquimais da medula óssea	16
2.1.2 Células tronco mesenquimais do tecido adiposo	17
2.1.3 Comparação entre células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo	18
2.2 Diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> de células tronco mesenquimais.	21
2.2.1 Fatores que influenciam a diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> de células tronco mesenquimais.....	23
3 CAPÍTULO: Comparação do efeito da triiodotironina no potencial condrogênico <i>in vitro</i> entre células tronco mesenquimais de ratas Wistar	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
3.1 INTRODUÇÃO	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.2.1 Extração e cultivo das células	30
3.2.2 Teste de viabilidade celular	31
3.2.3 Diferenciação condrogênica	31
3.2.4 Histologia	32
3.2.5 RT-PCR semiquantitativo (qRT-PCR)	32
3.2.6 Análise estatística	33
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.3.1 Viabilidade celular	33
3.3.2 Expressão de transcritos gênicos Sox9, Col II e Acan	34
3.3.3 Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+	38
3.4 CONCLUSÃO	44
3.5 DECLARAÇÃO DE INTERESSES	45

3.6 RECONHECIMENTOS	45
3.7 REFERÊNCIAS	45
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
5 REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Células tronco são células indiferenciadas com elevado potencial proliferativo, capacidade de autorrenovação e amplo potencial de diferenciação, inclusive condrogênico (RODRÍGUEZ-FUENTES *et al.*, 2021), um exemplo são as células tronco mesenquimais (CTM). Para induzir a diferenciação condrogênica *in vitro* das mesmas, são utilizadas técnicas como a adição de fatores de crescimento no meio de cultivo, estimulação mecânica, uso de biomateriais ou combinação dessas técnicas (YU; HAN; KIM, 2012; LEIJTEN *et al.*, 2016). O método mais utilizado para o cultivo é o sistema de *pellets* com meio de diferenciação condrogênica enriquecido com fatores como insulina, transferrina, dexametasona, ácido selenoso, ácido ascórbico, ácido linoleico, glicose, ascorbato-2-fosfato, prolina, piruvato de sódio, além de fatores de crescimento como o TGF- β (BEANE; DARLING, 2012).

Dentre as CTM, as oriundas da medula óssea (CTM-MO) são comumente utilizadas em comparação a outros tecidos, uma vez que apresentam facilidade de isolamento, grande capacidade de expansão *in vitro* e de diferenciação (TAE *et al.*, 2006). Porém, uma desvantagem em utilizar a medula óssea como fonte de células tronco em humanos, é justificada pelo método invasivo de coleta por meio de aspiração da medula óssea (DU *et al.*, 2015). Outra desvantagem é o pequeno número de CTM presente na medula óssea, correspondendo a cerca de 0,01% a 0,0001% das células nucleadas (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). Em contrapartida, as CTM do tecido adiposo (CTM-TA) se tornam uma fonte atrativa para a terapia celular (CASTEILLA *et al.*, 2011), pois este tecido apresenta grandes quantidades de CTM correspondendo a cerca de 2% do total lipoaspirado (KINGHAM *et al.*, 2007), sem haver necessidade de se realizar procedimento invasivo, visando exclusivamente à obtenção das CTM (ANSAR *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2016).

A fim de comparar algumas fontes teciduais, pesquisadores analisaram a morfologia, fenótipo imune, frequência na formação de colônias e capacidade de diferenciação das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo. Muitos resultados são semelhantes para estas e outras fontes celulares (HAVLAS *et al.*, 2011; ADEGANI *et al.*, 2013; HEO *et al.*, 2016). Hsiao *et al.* (2012) compararam expressão de fatores parácrinos humanos em células tronco do tecido adiposo, medula óssea e tecido dérmico e seus resultados mostraram que CTM derivadas de

diferentes tecidos tem perfis parácrinos próprios, porém as CTM-TA representaram-se mais atrativas quando comparadas as CTM da medula óssea e do tecido dérmico, primeiramente porque o tecido adiposo é de fácil obtenção e possui rápida expansão *in vitro*. E em segundo lugar, as CTM-TA exibem capacidade de angiogênese *in vitro*, pois secretam VEGF-A e VEGF-D.

Adicionalmente, Li *et al.* (2015) compararam características biológicas entre CTM-MO e CTM-TA humano em condições de cultura contendo ligado de plaqueta humana (hPL) e seus resultados indicaram que as CTM-TA tinham vantagens biológicas com relação a capacidade proliferativa, proteínas secretadas (fator de crescimento fibroblástico básico, interferon- γ e fator de crescimento semelhante a insulina-1), e efeitos imunomoduladores. Enquanto as CTM-MO tiveram vantagem no potencial de diferenciação osteogênico e condrogênico e outras proteínas secretadas (fator-1 derivado do estroma e fator de crescimento de hepatócitos) (LI *et al.*, 2015). Resultados semelhantes foram apontados por um estudo com ratos, tanto do potencial de diferenciação quanto das proteínas secretadas (NAKANISHI *et al.*, 2011)

Apesar da existência de estudos comparando diferentes aspectos das CTM, algumas características permanecem pouco elucidadas. Como previamente apontado, sabe-se que a proliferação e diferenciação das CTM são influenciadas por diversos fatores, dentre eles o hormonal (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006). Na literatura consultada observou-se que a triiodotironina (T3) melhorou o potencial osteogênico de CTM-MO em ratas (BOELONI *et al.*, 2009) e condrogênico de CTM-MO em ratas (ASSIS *et al.*, 2018), não alterou a diferenciação condrogênica em CTM-TA de ratas (ELERT *et al.*, 2022) e causou alguns efeitos negativos sobre a diferenciação osteogênica de CTM-TA de ratas ovariectomizadas com osteoporose e potencial reduzido ainda que sem diminuir a formação de matriz extracelular e expressão de proteínas ósseas (BOELONI *et al.*, 2013a). Porém ainda faltam pesquisas que comparem o comportamento das CTM-MO e CTM-TA sob efeito dos hormônios tireoidianos. Assim, o presente estudo objetivou comparar o efeito da triiodotironina em diferentes concentrações e períodos no potencial de diferenciação condrogênico *in vitro* de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas Wistar jovens.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células tronco

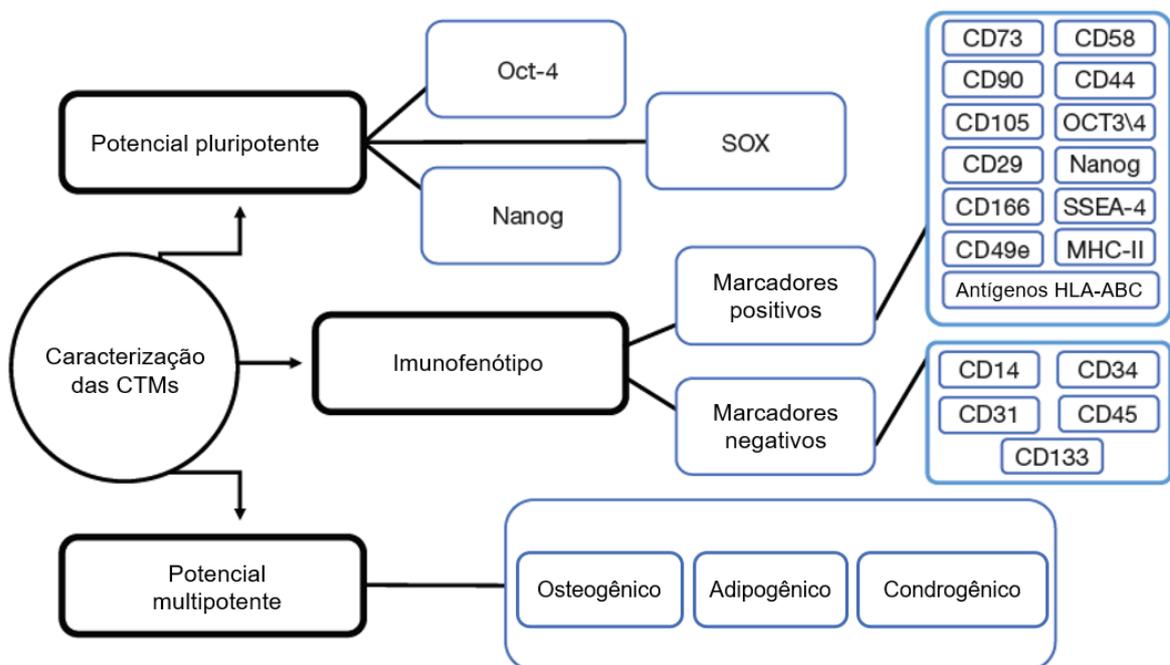
Não existe uma definição que seja amplamente aceita para o termo “célula tronco”. Esforços são constantemente feitos para definir certos caracteres que podem diferenciar as células tronco (CT) de outras células encontradas *in vivo* ou em culturas de células (BONGSO; FONG, 2009). Uma das definições aceitas pelos autores é que as CT são células não especializadas capazes de se tornar células especializadas, cada uma com novas funções celulares bem definidas. As capacidades únicas das CT as tornam fonte ideal para a regeneração de tecidos lesionados (SATIJA *et al.*, 2009).

As células tronco possuem características biológicas únicas que as tornam uma ferramenta promissora da medicina regenerativa. Dentre essas características destacam-se principalmente a capacidade de autorrenovação a longo prazo, o potencial de diferenciação em diversas linhagens, também conhecido como multipotência ou pluripotência, e sua capacidade ativa de migração para tecidos doentes (SHANTI *et al.*, 2007). Tais células são geralmente divididas em células tronco embrionárias e adultas. A utilização de células tronco embrionárias é bem mais restrita por considerações éticas, legais e religiosas em muitos países. Portanto, a pesquisa científica se foca nos estudos com células tronco adultas que são mais aceitáveis, sendo denominadas células estromais (tronco) mesenquimais – CTM (do inglês *mesenchymal stromal (stem) cells* - MSC) (HESLOP *et al.*, 2015).

As CTM podem ser facilmente obtidas de diferentes fontes teciduais, incluindo medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, placenta, pele, polpa dentária, dentre outros (DOMINICI *et al.*, 2006). As CTM foram isoladas pela primeira vez da medula óssea graças à sua capacidade de se aderir à superfície plástica e gerar unidades formadoras de colônia de fibroblastos (CFU-F) *in vitro* (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Essas células aderentes são caracterizadas de acordo com a expressão de vários antígenos de superfície. Todas CTM independente da sua fonte devem ser positivas pelo menos para CD73, CD90 e CD105; e negativas ao menos para três dos marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR. Além disso, as CTM devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006) (Figura 1). Pesquisas

realizadas com estudos genômicos em CTM forneceram evidências da expressão de marcadores pluripotentes (Oct-4, Nanog e Sox2). Esses achados esclareceram o estado indiferenciado dessas células (PATTERSON *et al.*, 2012). Além disso, se mostrou que as CTM de cordão umbilical humano expressam survivina (KESTENDJIEVA *et al.*, 2008) que também é amplamente expressa em tumores (HALASOVA *et al.*, 2013).

Figura 1 - Diagrama para caracterização de células tronco mesenquimais (CTM).



FONTE: RAJABZADEH, N.; FATHI, E.; FARAHZADI, R., 2019 (Adaptado).

2.1.1 Células tronco mesenquimais da medula óssea

A medula óssea é um dos principais sítios doadores de CTM devido a facilidade de isolamento e expansão *in vitro*. Possui capacidade de diferenciação multipotente, incluindo a condrogênica (TAE *et al.*, 2006). Devido a essa facilidade de expansão e diferenciação, tais células oriundas da medula óssea são consideradas excelentes fontes para terapia celular (RASTEGAR *et al.*, 2010). Ainda que somente uma pequena fração de CTM possa ser isolada durante a coleta correspondendo a cerca

de 0,0001 a 0,01% do total de células da medula óssea (PITTINGER *et al.*, 1999). As CTM-MO são também denominadas de células do estroma da medula óssea (BMSC), células precursoras do estroma, células tronco esqueléticas e células progenitoras adultas (CHEN *et al.*, 2008).

As células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) ocupam sítios específicos definidos como nicho endosteal e vascular (BIRBRAIR; FRENETTE, 2016). As células localizadas no nicho endosteal revestem a superfície óssea e interagem fisicamente com osteoblastos e células progenitoras tronco hematopoiéticas (HSPCs). As CTM-MO do endóstio representam fonte de osteoprogenitores e indiretamente contribuem para a osteogênese, secretando vários fatores de crescimento e citocinas (ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017). Foi demonstrado que elas aumentam a regeneração óssea (OSUGI *et al.*, 2012) e medeiam a capacidade do hormônio da paratireoide de expandir a população de osteoblastos, o que, por sua vez, facilita a expansão de HSPCs primitivas através da secreção de diversos fatores de crescimento hematopoiéticos (fator formador de colônia de granulócitos, angiopoietina e interleucina-6) (CALVI *et al.*, 2003). No nicho vascular, as CTM-MO estão associadas aos vasos sanguíneos em posição perivascular, regulando a homeostase das HSPCs por interação direta ou de forma parácrina por meio da secreção de fatores hematopoiéticos de suporte (CORSELLI *et al.*, 2013).

2.1.2 Células tronco mesenquimais do tecido adiposo

O tecido adiposo é vastamente composto, além de adipócitos maduros e imaturos, também possui células da musculatura lisa vascular, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e as células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007). Seu uso como fonte alternativa às CTM-MO foi apontado em razão das pesquisas após primeira evidência dessas células no lipoaspirado humano (ZUK *et al.*, 2001). As CTM-TA podem ser extraídas do tecido adiposo intra-abdominal ou subcutâneo (CASTEILLA *et al.*, 2011) e possuem capacidade de diferenciação multipotente, incluindo condrogênica (DAI *et al.*, 2016). Foram isoladas em diversas espécies além do ser humano (TOYODA *et al.*, 2009) como em ratos (BOELONI *et al.*, 2013b), cães e gatos (VIEIRA *et al.*, 2010;

VOGA; KOVAC; MAJDIC, 2021), suínos (ARRIGONI *et al.*, 2009) e equinos (VIDAL *et al.*, 2008; SPILA *et al.*, 2020). As CTM-TA também podem ser denominadas como células tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC), células estromais derivadas de tecido adiposo e células do processado de lipoaspirado (BUNNELL *et al.*, 2008).

As CTM-TA estão localizadas na adventícia capilar e perivascular de grandes vasos sanguíneos dentro dos tecidos adiposos e acredita-se que sejam derivadas de pericitos (CAPLAN, 2017). As CTM-TA são isoladas da fração vascular estromal (SVF) do tecido adiposo homogeneizado. Isso pode ser realizado por meio de digestão enzimática, ruptura mecânica ou métodos automatizados (ALSTRUP *et al.*, 2019). No isolamento com método enzimático utiliza-se a enzima colagenase tipo I (BEANE; DARLING, 2012). A combinação do método enzimático com o mecânico aumenta a área de contato do tecido adiposo facilitando a digestão pelas enzimas (ALSTRUP *et al.*, 2019). Primeiramente são feitos cortes no tecido adiposo e lavagem em solução salina para remoção das células sanguíneas, seguido de incubação com colagenase tipo I a 37°C e 5% CO₂ para separação da fração celular (BOELONI *et al.*, 2013b). Posteriormente as CTM-TA podem ser cultivadas e se aderir às placas ou garrafas de cultivo assim como as células-tronco da medula óssea (LEVI; LONGAKER, 2011).

2.1.3 Comparação entre células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo

Embora as CTM-MO e CTM-TA compartilhem muitas características biológicas, também existem algumas diferenças entre essas populações distintas de CTM. Por exemplo, as CTM-TA humanas são geneticamente e morfológicamente mais estáveis em uma cultura de longo prazo, exibem taxa de senescência mais baixa, mostram maior capacidade proliferativa e retêm o potencial de diferenciação por um período mais longo em cultura (IZADPANAHA *et al.*, 2006) em comparação com CTM-MO humanas. Um estudo demonstrou que as CTM-TA humanas suportam a hematopoiese tanto *in vitro* quanto *in vivo* e, inesperadamente, parecem exercer essa atividade de forma mais eficiente do que as CTM-MO humanas (DE TONI *et al.*, 2011).

As CTM-MO residem no estroma da medula óssea em quantidades relativamente pequenas. Calcula-se que elas constituam cerca de 0,001% a 0,01% do total de células nucleadas da medula (BERNARDO; LOCATELLI; FIBBE, 2009),

enquanto a quantidade de CTM-TA é aproximadamente 500 vezes maior quando isoladas de uma quantidade equivalente de tecido adiposo (HASS *et al.*, 2011). Essa diferença pode ser particularmente relevante para tornar as CTM-TA mais adequadas para aplicações clínicas devido à sua facilidade de acesso. Além disso, um número suficiente de CTM-MO pode ser mais difícil de obter a partir de uma colheita convencional de medula, particularmente nos idosos (PUISSANT *et al.*, 2005), pois o número de CTM diminui com a idade (STOLZING *et al.*, 2008). Ainda, as CTM-TA podem ser usadas clinicamente sem expansão, se colhidas de um volume suficientemente grande de lipoaspirado (YOSHIMURA; SUGA; ETO, 2009).

Foi demonstrado que os imunofenótipos entre essas CTM são mais de 90% idênticos, no entanto, algumas pequenas diferenças parecem existir. Uma proporção de CTM-TA expressa CD34 quando isoladas a fresco, embora a expressão de CD34 diminua gradualmente com passagens sucessivas podendo até não ser totalmente perdido (MITCHELL *et al.*, 2006). O marcador CD34 geralmente não é expresso por CTM-MO ou por outras fontes de CTM (MOSNA; SENSEBÉ; KRAMPERA, 2010). As CTM-TA expressam altos níveis de CD54, enquanto as CTM-MO apresentam expressão mínima desse marcador (DE UGARTE *et al.*, 2003). O contrário ocorre com a expressão de CD49f (integrina $\alpha 6$) e proteína 1 semelhante à podocalixina (PODXL) (PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011).

De fato, ainda há muito debate sobre as diferenças imunofenotípicas entre CTM-MO e CTM-TA. Da mesma forma pode se dizer que há divergência na atividade imunomoduladora entre as CTM. Na análise de proteínas secretoras verificou-se que as CTM-TA secretam quantidades maiores de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e interleucina 6 enquanto as CTM-MO secretam fator-1 α derivado do estroma em maior quantidade (NAKANISHI *et al.*, 2011). Tais discrepâncias aparentes podem em parte, ser explicadas por variáveis no meio de cultura e duração, densidade celular, número de cultura, duplicações, estágio proliferativo de células em cultura, idade do doador e vários outros fatores (HO; WAGNER; FRANKE, 2008; LINDROOS; SUURONEN; MIETTINEN, 2011; PEVSNER-FISCHER; LEVIN; ZIPORI, 2011).

A capacidade de diferenciação de CTM-MO versus CTM-TA é debatida com dados de cada lado apoiando a superioridade de um tipo de célula sobre o outro. Alguns estudos descobriram que CTM-TA exibem diferenciação adipogênica

pronunciada em comparação com CTM-MO *in vitro* (PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011). Contudo, outros não reproduziram essas diferenças na capacidade de diferenciação adipogênica ao tempo que também demonstram que as CTM-MO são mais propensas à diferenciação osteogênica do que as CTM-TA *in vitro* (NOËL *et al.*, 2008). Outros mostram que a resposta osteogênica das CTM-MO não é significativamente maior do que a das CTM-TA (PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011) podendo ser até inferior em adultos (ALVES *et al.*, 2016). As diferenças de gênero parecem influenciar a capacidade osteogênica das CTM-TA, com as CTM-TA masculinas se diferenciando mais rapidamente e mais efetivamente do que as CTM-TA femininas *in vitro*. Além disso; o potencial osteogênico das CTM-TA femininas diminui com a idade, enquanto o potencial adipogênico permanece inalterado (ZHU *et al.*, 2009; LINDROOS; SUURONEN; MIETTINEN, 2011). Foi encontrado por alguns grupos que as CTM-TA apresentam capacidade de diferenciação condrogênica diminuída em comparação com as CTM-MO *in vitro* (HUANG *et al.*, 2005; DANISOVIC *et al.*, 2007), no entanto, outros grupos não relatam diferenças no potencial condrogênico (KERN *et al.*, 2006) ou mostram que o uso de uma combinação de dose maior de fatores de crescimento específicos, como fator de crescimento transformador b2 e fator de crescimento semelhante à insulina-1, aumenta o potencial condrogênico de CTM-TA (inicialmente inferior) a um nível comparável ao das CTM-MO (KIM; GI, 2009). Também foi demonstrado que a adição de proteína morfogenética óssea-6 (BMP-6) aumenta a condrogênese de CTM-TA (ESTES; WU; GUILAK, 2006).

Coletivamente, esses dados muitas vezes conflitantes implicam que CTM de diferentes fontes podem responder de maneira distinta a diferentes estímulos, de modo que as condições ideais para a diferenciação das CTM-MO podem não ser adequadas para CTM-TA. As condições de cultura também podem afetar o potencial de diferenciação de CTM da mesma origem (LINDROOS; SUURONEN; MIETTINEN, 2011). Diferentes protocolos de isolamento e cultura usados por vários grupos podem explicar a predominância de uma determinada subpopulação de CTM com um potencial de diferenciação distinto (RADA; REIS; GOMES, 2011).

Vários estudos demonstraram que existem algumas diferenças nos perfis proteômicos e de transcrição gênica de CTM-MO e CTM-TA (IZADPANAHA *et al.*, 2006; PARK; SHIN; KIM; 2007; NOËL *et al.*, 2008). Por exemplo, Noël *et al.* (2008) investigaram a expressão de 384 genes em CTM-MO e CTM-TA e descobriram que 3,4% dos genes analisados foram expressos especificamente por apenas uma

população de CTM. Além disso, 9,7% dos genes analisados foram expressos diferencialmente entre elas. Em conjunto, esses resultados indicaram que a expressão diferencial de 13,2% dos genes foi capaz de discriminar entre as 2 populações, mas sem identificar marcadores específicos para cada população de CTM. Os genes expressos apenas em CTM-MO estavam envolvidos nas vias de sinalização e diferenciação de WNT (WNT11, WNT7B e SOX6), enquanto genes expressos exclusivamente em CTM-TA estavam envolvidos na comunicação celular (CCL3, FGF9, IL1R2 e KDR) e no controle da transcrição (PAX3, SPI1 e ZNF45). A análise proteômica realizada pelo mesmo grupo mostrou que 23% das proteínas foram expressas especificamente em uma ou outra população de CTM e que 18% das proteínas totais foram expressas diferencialmente entre CTM-MO e CTM-TA (NOËL *et al.*, 2008).

2.2 Diferenciação condrogênica *in vitro* de células tronco mesenquimais

Para induzir a diferenciação condrogênica das CTM, são utilizadas técnicas *in vitro* como a adição de fatores de crescimento ao meio de cultivo, estimulação mecânica, uso de biomateriais ou a combinação de uma ou mais técnicas (YU; HAN; KIM, 2012, LEIJTEN *et al.*, 2016).

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

Na diferenciação condrogênica *in vitro* ocorrem três estágios bem definidos. No primeiro estágio ocorre diferenciação inicial com expressão de fibromodulina, COMP, agrecan, versican e decorin, deposição inicial de glicosaminoglicanos, além da formação de colágeno I e X. No segundo estágio há expressão de colágeno II, condroaderin e produção de sulfato de condroitina. No terceiro estágio ocorre acúmulo de glicosaminoglicanos e formação de condrócitos maduros (BARRY *et al.*, 2001). Os

modelos tridimensionais de cultura celular (*pellets*) favorecem a indução da primeira fase da condrogênese que consiste em uma condensação celular, juntamente com interações entre células e entre célula e matriz extracelular (GIULIANI *et al.*, 2013).

Inicialmente, as células apresentam formato fibroblastoide e posteriormente, as células aumentam de volume, proliferam e sintetizam componentes típicos da matriz cartilaginosa como colágenos tipo I, tipo II e tipo X, proteoglicanos como agrecano e fibronectina, e glicosaminoglicanos (BARRY *et al.*, 2001, SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; GIULIANI *et al.*, 2013). Sendo o colágeno II e o agrecano os constituintes da matriz observados em maior quantidade (SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011). Por fim, as células adquirem formato arredondado semelhante ao condroblasto (GIULIANI *et al.*, 2013).

Após duas a três semanas de diferenciação, alguns marcadores da condrogênese são utilizados como colágenos II, IX, X e XI, proteoglicanos como o agrecano e glicosaminoglicanos (SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011). Os proteoglicanos são detectados por colorações como azul de toluidina ou ácido periódico de Schiff (PAS), os glicosaminoglicanos pelas colorações de Alcian blue ou safranina-O (SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011; BEANE; DARLING, 2012), e os tipos de colágeno podem ser detectados pela técnica de imunohistoquímica ou pela expressão gênica por meio de PCR (reação em cadeia da polimerase) (SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011).

Com relação a expressão gênica, a coexpressão de Sox5, Sox6 e Sox9 ocorre durante toda a condrogênese. Além disso, são capazes de ativar genes como colágeno II (Col2a1) e agrecano (KOCH *et al.*, 2000). O Sox9 especificamente é essencial para a condensação celular (DE COMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001). A expressão de Sox9 é controlada por fatores como BMP-2, BMP-4 e Sonic hedgehog (Shh) que além de induzirem, também fazem manutenção da expressão desse gene (SEMBA *et al.*, 2000). Ainda, os hormônios tireoidianos inibem o efeito do Sox9, para promover a hipertrofia dos condrócitos (OKUBO; REDDI, 2003). O colágeno II é expresso em todas as células condroprogenitoras e em altos níveis em condrócitos (CHEAH *et al.*, 1991) e sua expressão é gradativamente substituída pela de colágeno X (LEFEBVRE; BEHRINGER; DE CROMBRUGGHE, 2001). O PTHrP é expresso em altos níveis em condrócitos pré-hipertróficos e em baixos níveis em condrócitos e tem a função de inibir a transição para condrócitos

hipertróficos (HUANG *et al.*, 2000), além de aumentar a atividade transcricional de Sox9 (WATANABE; YAMADA, 1999).

O colágeno II é um dos principais constituintes da matriz cartilaginosa e por isso sua expressão é utilizada para verificar a diferenciação condrogênica de CTM (SOLCHAGA; PENICK; WELTER, 2011). As expressões de Col II e Acan foram relatadas como muito baixas para serem detectadas nos dias 3 e 14 por RT-PCR (LIU *et al.*, 2007), o que provavelmente resulta em diferentes níveis de expressão em vários momentos (ZUK *et al.*, 2002). Um aumento na expressão de Col II em CTM da medula óssea e do tecido adiposo suplementadas com TGF- β e/ou MPB foi demonstrado (ZIMMERMANN *et al.*, 2008), assim como maior aumento da expressão gênica de um (CTM-TA) em relação ao outro (CTM-MO) porém com maior síntese de colágeno II em CTM-MO (MEHLHORN *et al.*, 2006).

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

Adicionalmente, a eficiência da diferenciação das CTM depende de outros fatores como status de saúde e idade do paciente doador (BUNNELL *et al.*, 2008), visto que estudos sugeriram por exemplo que o potencial de diferenciação osteogênica é maior em CTM de ratos mais jovens quando comparados a doadores de maior idade (BOELONI *et al.*, 2013b) o que não se altera entre ratos jovens e idosos na diferenciação condrogênica (SILVA, 2019).

2.2.1 Fatores que influenciam a diferenciação condrogênica *in vitro* de células tronco mesenquimais

Além do meio de indução básico utilizado para a diferenciação condrogênica, outros fatores que influenciam ou potencializam esse processo nas CTM são frequentemente pesquisados incluindo fatores de crescimento, fatores hormonais, transcritos gênicos, estímulo mecânico, condições de hipóxia, uso de biomateriais ou a associação desses fatores (DANISOVIC; VARGA; POLAKI, 2012),

Nesse contexto, o TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 potencializam a diferenciação condrogênica das CTM (PUETZER; PETITTE; LOBOA, 2010). O TGF- β 1 aumenta a formação de matriz condrogênica e a expressão de colágeno II e agrecano em todas CTM (DANISOVIC; VARGA; POLAKI, 2012). Sendo que um estudo demonstrou que o TGF- β 2 e o TGF- β 3 foram mais efetivos que o TGF- β 1 em potencializar a diferenciação condrogênica das CTM-MO aumentando a formação de glicosaminoglicanos e colágeno II (BARRY *et al.*, 2001). Além disso, o TGF- β 1 foi utilizado como indutor para diferenciação condrogênica de CTM de ambas as fontes celulares, o que pode não ser ideal para induzir diferenciação condrogênica em CTM-TA. Por exemplo, alguns estudos relataram anteriormente que o TGF- β 1 não é tão eficiente na indução da diferenciação condrogênica de CTM-TA quanto a proteína morfogenética óssea 6 (ESTES; WU; GUILAK, 2006).

As BMP como BMP-2, BMP-4, BMP-6 e BMP-7 também são fatores importantes para a diferenciação condrogênica (SHEN *et al.*, 2010). A BMP-2 aumenta a proliferação e a formação de matriz condrogênica (SEKIYA *et al.*, 2005). A BMP-4 aumenta a formação de matriz condrogênica ao estimular a síntese de colágeno II e agrecano e diminuir a expressão de colágeno I e X (MILJKOVIC; COOPER; MARRA, 2008). A BMP-7 potencializa a diferenciação, pois aumenta a expressão de colágeno II (SHEN *et al.*, 2010). O FGF-2 também conhecido como FGF básico (FGFb) aumenta a proliferação e a diferenciação condrogênica *in vitro* de CTM-MO aumentando a formação de matriz condrogênica (SOLCHAGA *et al.*, 2009). Há ainda uma potencialização na diferenciação condrogênica quando é realizada a combinação desses fatores (SCHMITT *et al.*, 2003).

Dentre os fatores de transcrição, destaca-se o Sox9 como principal fator de diferenciação condrogênica de CTM. Sua atuação ocorre principalmente na fase inicial da condrogênese, controlando a expressão de outros genes como agrecano e colágeno II (WANG *et al.*, 2014). Além disso, a combinação de Sox9 com Sox5 e Sox6 estimula a condrogênese (PARK *et al.*, 2011) e leva à síntese de matriz extracelular, composta de colágeno II e agrecano (BEANE; DARLING, 2012). A expressão gênica

pode ser intensificada por outros fatores, como por exemplo, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) que estimula a expressão de colágeno II e Sox9 (JAGIELSKI *et al.*, 2014). A superexpressão de Wnt11 estimula a expressão de colágeno II, agregano, Sox9, Runx2 e Ihh e, em sinergismo com TGF- β , desenvolve a condrogênese (LIU *et al.*, 2014).

Sobre condições de hipóxia, também influenciam no potencial condrogênico de CTM. A baixa tensão de oxigênio (2% O₂) melhorou a diferenciação condrogênica de CTM-MO de humanos ao aumentar a síntese de GAG e proteoglicanos, colágeno II e expressão de agregano, colágeno II e Sox9 (MARKWAY *et al.*, 2010) enquanto a hipóxia (5% O₂) também causou expressão precoce de colágeno II e síntese de matriz condrogênica em CTM-TA (MERCERON *et al.*, 2010).

Fatores hormonais também são considerados importantes para a diferenciação condrogênica de CTM (KARL *et al.*, 2014). O PTH influencia a diferenciação de forma dose-dependente, podendo aumentar a expressão de Sox9, colágeno II e PTH1R em baixas concentrações ou causar o efeito contrário quando em altas concentrações (ZHANG; KUMAGAI; SAITO, 2014). A dexametasona, na dose de 1 μ M, potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-MO de bovinos por aumentar a produção de glicosaminoglicanos e a expressão de colágeno X (RANDAU *et al.*, 2013). Em humanos, a dexametasona em associação com TGF- β 3, potencializa a diferenciação condrogênica de CTM-MO, pois aumenta a produção de proteoglicanos e a expressão de agregano, colágeno II e colágeno XI (DERFOUL *et al.*, 2006).

Adicionalmente, é importante lembrar que as CTM apresentam receptores para hormônios tireoidianos e que os hormônios tireoidianos influenciam o crescimento ósseo *in vivo*, pois regulam os processos de diferenciação e maturação tanto de condrócitos da zona hipertrófica quanto da placa epifisária (ROBSON *et al.*, 2000). A triiodotironina (T3) regula a diferenciação terminal de condrócitos da placa epifisária de ratos cultivada *in vitro*, e isso é modulado em parte pela via Wnt/ β -catenina. A superexpressão de Wnt-4 ou de β -catenina promove a diferenciação terminal dos condrócitos da placa de crescimento (WANG; SHAO; BALLOCK, 2007). Em cultura de CTM-MO de humanos, a triiodotironina na concentração de 1 nM juntamente com BMP-4 estimulou a hipertrofia dessas células (KARL *et al.*, 2014). No entanto, em cultura de CTM-MO de bovinos, a T3 na concentração de 100 nM não melhorou a diferenciação, visto que não modificou a expressão de colágeno X ou produção de glicosaminoglicanos (RANDAU *et al.*, 2013).

3. CAPÍTULO

Artigo a ser submetido para a Pathology, Research and Practice (Qualis A4)

COMPARAÇÃO DO EFEITO DA TRIIODOTIRONINA NO POTENCIAL CONDROGÊNICO *IN VITRO* ENTRE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE RATAS WISTAR

Théo Matos Arantes Moraes^{ab}, Nathalia Chicon Elert^a, Higor Azevedo Assis^a, Letícia Parmanhani Romão^a, Rogéria Serakides^c, Natália de Melo Ocarino^c, Adriana Madeira Alvares da Silva^d, Leonardo Oliveira Trivilin^{ab}, Jankerle Neves Boeloni^{ab*}

^aLaboratório de Cultivo Celular, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, Espírito Santo, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, Espírito Santo, Brasil.

^cNúcleo de Células-Tronco e Terapia Celular (NCT-TCA), Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

^dDepartamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus de Maruípe, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

*Autor correspondente: Jankerle Neves Boeloni, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/Nº, Guararema, CEP: 29500-000, Alegre, ES, Brasil. E-mail: jankerle@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste artigo é comparar o efeito da triiodotironina (T3) no potencial condrogênico de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e tecido adiposo (CTM-TA) de ratas Wistar. Ambas as CTMs foram extraídas e cultivadas em meio condrogênico sem T3 (controle) e com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM). Após sete, 14 e 21 dias, foram avaliadas a expressão gênica de Sox9, Colágeno II (Col II) e Agrecano (Acan) e formação de matriz condrogênica. Em relação à expressão gênica, Sox9 aumentou em CTM-MO em sete dias (100 nM T3) e em 14 dias (1000 nM T3), e aumentou em CTM-TA em 14 dias (1 nM T3); Col II aumentou em CTM-MO em 7 dias (0,01 nM T3) e em CTM-TA em 14 dias (1000 nM T3); Acan aumentou em CTM-MO em 14 dias (1 nM T3) e em CTM-TA em 21 dias (1 nM T3). A síntese da matriz condrogênica foi maior em CTM-TA quando comparado à CTM-MO no grupo controle e nas concentrações de T3 (0,01; 1 e 100 nM) aos sete dias, permanecendo semelhante aos 14 e 21 dias. Portanto concluímos que o potencial condrogênico com síntese de matriz condrogênica de CTM-TA é prematuramente maior que o potencial condrogênico de CTM-MO, com ou sem T3.

Palavras-chave: Condrogênese. Hormônio tireoidiano. Medula óssea. Tecido adiposo

ABSTRACT

This article's goal is to compare the effect of triiodothyronine (T3) on the chondrogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC) and adipose tissue (ASC) of Wistar rats. Both MSCs were extracted and cultivated in chondrogenic medium without T3 (control) and with T3 (0.01; 1; 100 and 1000 nM). After seven, 14 and 21 days, gene expression of Sox9, Collagen II (Col II) and Aggrecan (Acan) and chondrogenic matrix formation were evaluated. Regarding gene expression, Sox9 increased in BM-MSC at seven days (100 nM T3) and at 14 days (1000 nM T3), and increased in ASC at 14 days (1 nM T3); Col II increased in BM-MSC at 7 days (0.01 nM T3) and in ASC at 14 days (1000 nM T3); Acan increased in BM-MSC at 14 days (1 nM T3) and in ASC at 21 days (1 nM T3). Chondrogenic matrix synthesis was greater in ASC when compared to BM-MSC in the control group and in T3 concentrations (0.01; 1 and 100 nM) at seven days, looking fairly similar at 14 and 21 days. Therefore we concluded that the chondrogenic potential with chondrogenic matrix synthesis of ASC is prematurely greater than the chondrogenic potential with BM-MSC, with or without T3.

Key-words: Chondrogenesis. Thyroid hormone. Bone marrow. Adipose tissue

3.1 INTRODUÇÃO

A cartilagem articular possui pobre capacidade regenerativa intrínseca. Assim, devido à limitação do transplante autólogo de condrócitos, a engenharia de tecidos baseada em células tronco mesenquimais (CTM) de diferentes fontes surgiu como alternativa para uma nova abordagem na regeneração de tecidos lesionados [1], inclusive para o tratamento de lesões ou doenças do tecido cartilaginoso [2]. Essas células têm sido amplamente utilizadas para a terapia celular, visto que são células multipotentes indiferenciadas de origem mesenquimal com capacidade de autorrenovação e potencial para se diferenciar em células adipogênicas, osteogênicas ou condrogênicas quando expostas a sinais específicos de crescimento [3].

As CTM desempenham um papel central na manutenção e regeneração dos tecidos do corpo e essas células podem ser isoladas de diferentes órgãos e tecidos do corpo [4]. As CTM da medula óssea (CTM-MO) têm sido amplamente utilizadas na engenharia de tecidos [5]. No entanto, quantidades limitadas de CTM existem na medula óssea, pois representam apenas 0,001-0,01% das células nucleadas [6]. Esse entrave levou ao aumento do interesse em CTM de outras fontes, especialmente o tecido adiposo. Células tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) existem em grande quantidade e podem ser isolados do tecido adiposo de vários locais com mínimo desconforto para os pacientes [7]. As CTM-MO compartilham características de morfologia e imunofenótipo com as CTM-TA e ambas possuem capacidade de diferenciação multilinhagem e grande potencial para aplicações regenerativas [8].

No entanto, uma questão importante que ainda precisa ser respondida e que se mantém motivo de pesquisas é qual tipo de célula é mais eficaz e adequada para as terapias celulares. Muitos estudos mostraram que as CTM-MO e CTM-TA compartilham aspectos semelhantes, incluindo as características morfológicas e a expressão de antígenos de superfície celular, mas diferenças biológicas significativas foram observadas em relação às suas taxas de proliferação e capacidades de diferenciação [9,10]. As CTM cultivadas em meio condrogênico se diferenciam em condrócitos e formam matriz condrogênica rica em colágeno e agrecano [4]. Apesar de comparações entre diferentes aspectos das CTM, algumas características como por exemplo a influência hormonal no potencial de diferenciação, permanecem pouco esclarecidas. Sabendo da existência de receptores para os hormônios tireoidianos nas CTM [11] juntamente com relatos de que a triiodotironina (T3) pode influenciar no

potencial osteogênico [12,13] ou condrogênico [14,15,16] das CTM, o presente estudo tem como objetivo comparar o efeito da triiodotironina no potencial de diferenciação condrogênico de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas Wistar jovens em diferentes concentrações e tempos, sendo esse o primeiro relato desta natureza.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Extração e cultivo das células

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), sob protocolo de número 062/2013, de acordo com os princípios éticos em experimentação animal padronizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Foram utilizadas quatro ratas Wistar com um mês de idade que foram eutanasiadas com sobredose de anestesia (pentobarbital sódico [30mg/kg] por via peritoneal).

A extração de CTM-MO e CTM-TA foi realizada de acordo com protocolos estabelecidos [13,17]. Em ambiente cirúrgico, os fêmures e tíbias (direitos e esquerdos) das ratas saudáveis foram dissecados de tecidos musculares e conectivos adjacentes e as epífises foram retiradas, de forma asséptica, para obtenção da medula óssea da diáfise. Os ossos foram colocados em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Invitrogen, CA, USA). O tecido adiposo abdominal coletado foi colocado em DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L) (Gibco, USA). Em seguida, o tecido cortado em pequenos fragmentos, foi transferido para um tubo com colagenase tipo I a 0,15% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em PBS (solução tampão de fosfato padrão) 0,15M e incubado por 60 minutos a 37°C e 5% de CO₂, agitando-o de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a colagenase foi inativada pela adição de DMEM com 10% SFB (soro fetal bovino) (LGC Biotecnologia, Brasil).

No fluxo laminar, a medula óssea foi lavada com DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L). Posteriormente, fez-se a centrifugação por 10 minutos a 1400 rpm tanto da medula óssea quanto do tecido adiposo. Após a centrifugação do tecido adiposo, obteve-se três fases: gordura, hemácias e outras células sanguíneas e precipitado

(fase estromal). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos adicionado de 10% SFB e cultivado em garrafas T75 em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As células da medula óssea também foram cultivadas em garrafas T75 contendo DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos e 10% SFB (LGC Biotecnologia, Brasil). O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana durante três (CTM-TA) a quatro (CTM-MO) semanas até atingir 80% a 90% de confluência. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de microrganismos.

3.2.2 Teste de viabilidade celular

Antes do cultivo em meio de diferenciação, as CTMs foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de Tripán. Inicialmente, as CTMs foram cultivadas em frascos T75 com DMEM e, no momento do teste, foram lavadas com PBS (0,15 M) e tripsinizadas. As células foram colhidas, centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos, ressuspendidas em meio e coradas com azul de Tripán. Células inviáveis (em azul) e células viáveis (transparentes) foram quantificadas na câmara de Neubauer.

3.2.3 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica das CTM-MO e CTM-TA foi realizada de acordo com protocolos previamente definidos [4,18]. Após cultivo em DMEM e obtenção de confluência de 80-90% das CTMs, o meio foi substituído por meio condrogênico (StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit; Gibco, EUA), e as células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% CO₂; a troca do meio foi realizada sistematicamente uma vez por semana com ou sem adição de T3 (3,3',5-triiodo-L-tironina, Sigma-Aldrich). Assim, as CTMs foram cultivadas em sistema de *pellets* em quantidade previamente padronizada (5x10⁵ células/tubo), em quatro repetições, em tubos de 15 mL (volume de 500 µL de meio por tubo) e separadas em 10 grupos: 1) CTM-MO sem T3 (Controle CTM-MO); 2) CTM-TA sem T3 (Controle CTM-TA); 3,4,5,6) CTM-MO com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM, respectivamente) e 7,8,9,10) CTM-TA com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM, respectivamente). As concentrações de T3 foram estabelecidas conforme estudos realizados por Boeloni *et al.* [12,13], sendo a dose de 0,01 nM semelhante à dose fisiológica. Ainda, foram adicionadas ao meio de cultura a cada

troca durante todos os períodos experimentais. A expressão de Sox9, colágeno II (Col II) e agrecano (Acan) foi avaliada aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação.

3.2.4 Histologia

Ao final de cada período, as células cultivadas de CTM-MO e CTM-TA em tubos de 15 mL em um sistema de *pellets*, foram lavadas com PBS 0,15 M e fixadas em formaldeído tamponado a 10% por uma hora e processadas por um método rotineiro de inclusão em parafina, adaptado de Solchaga, Penick e Welter [18]. Após processamento, as amostras foram cortadas no micrótomo e obteve-se cortes de 4 µm para cada amostra, que foram coradas conjuntamente com Alcian blue (AB) e ácido periódico de Schiff (PAS) [19,20,21] para análise da formação de matriz condrogênica (glicosaminoglicanos - GAG). A formação de matriz condrogênica foi analisada por dois observadores independentes, e os escores obtidos foram determinados por análise semiquantitativa, considerando a distribuição e intensidade da marcação para AB+ e PAS+. As comparações entre os grupos seguiram os seguintes parâmetros: distribuição [ausente = 1, focal = 2, multifocal = 3, difusa = 4] e intensidade [discreta = 2, moderada = 3, acentuada = 4]. Os parâmetros foram multiplicados entre si e foi utilizado o escore resultante (variando de 1 a 16), conforme adaptação de Braz *et al.* [22] e Trivilin *et al.* [23].

3.2.5 RT-PCR semiquantitativo (qRT-PCR)

A RT-PCR semiquantitativa foi utilizada para CTM-MO e CTM-TA em culturas de todos os grupos experimentais para avaliar a expressão de transcritos gênicos para Sox9, Col II e Acan. A extração do RNA total das células cultivadas foi realizada usando Trizol (Gibco) de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, 1 µg de RNA foi usado para a síntese de cDNA usando um kit SuperScript III Platinum Two-Step qPCR com SYBR Green (Invitrogen). As reações qRT-PCR foram realizadas usando o sistema 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems Inc.). A amplificação de qRT-PCR em uma etapa começou com transcrição reversa por 120 segundos a 50°C, seguida de PCR com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Ao final de cada corrida, os dados de fluorescência foram analisados para obter os valores do ciclo limiar (CT). A expressão gênica foi calculada

usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, no qual os valores das amostras foram calculados em média e calibrados em relação aos valores de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus* (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista dos genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR.

Gene	Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')
GAPDH	Sentido: CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA Anti-sentido: GGCATGGACTGTGGTCATGA
Sox9	Sentido: CTGAAGGGCTACGACTGGAC Anti-sentido: TACTGGTCTGCCAGCTTCCT
Colágeno II	Sentido: AGGGTACCAGGTTTCCCATC Anti-sentido: CTGCTCATCGCCGCGGTCCGA
Agrecano	Sentido: CACACGCTACACACTGGACT Anti-sentido: TCACACTGGTGGGAAGCCATC

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados usando GraphPad Software (San Diego, CA, EUA) e submetidos a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) com teste post hoc de comparação múltipla de Šídák para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) na formação de matriz condrogênica e nas expressões gênicas de Sox9, Col II e Acan entre CTM-MO e CTM-TA de cada grupo. Os dados foram apresentados como médias e desvio padrão.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Viabilidade celular

Anteriormente ao cultivo celular em meio de diferenciação condrogênico, as CTM, tanto da medula óssea quanto do tecido adiposo, apresentavam ao menos 90% de viabilidade. Dessa forma, garantiu-se que as células utilizadas para diferenciação condrogênica estavam viáveis e que não seriam um fator limitante para as próximas etapas.

Neste estudo comparou-se CTM da medula óssea e do tecido adiposo proveniente de animais da mesma espécie, idade e sexo. Além de ser um animal reconhecido como bom modelo experimental, também compartilha semelhanças na caracterização, proliferação e diferenciação de CTM com seres humanos [24]. Ratas jovens foram escolhidas pois, experimentalmente, CTM foram extraídas em maior quantidade em comparação com adultas [25,26] e fêmeas por apresentarem melhor diferenciação condrogênica em comparação a machos (dados não publicados) e maior resistência a senescência celular [24].

3.3.2 Expressão de transcritos gênicos Sox9, Col II e Acan

Com relação a expressão de Sox9, aos sete e 14 dias, tanto no grupo com 100 nM T3 quanto no grupo com 1000 nM T3, respectivamente, a expressão de Sox9 das CTM-MO foi superior à das CTM-TA ($p < 0,05$) (Figura 2 A, D). Em contrapartida, aos 14 dias, a expressão de Sox9 das CTM-TA no grupo com 1 nM T3 foi superior às CTM-MO do mesmo grupo ($p < 0,01$) (Figura 2 D). Nos demais períodos de observação e concentrações de T3, as expressões de Sox9 foram semelhantes entre CTM-MO e CTM-TA ($p > 0,05$) (Figura 2 A, D, G).

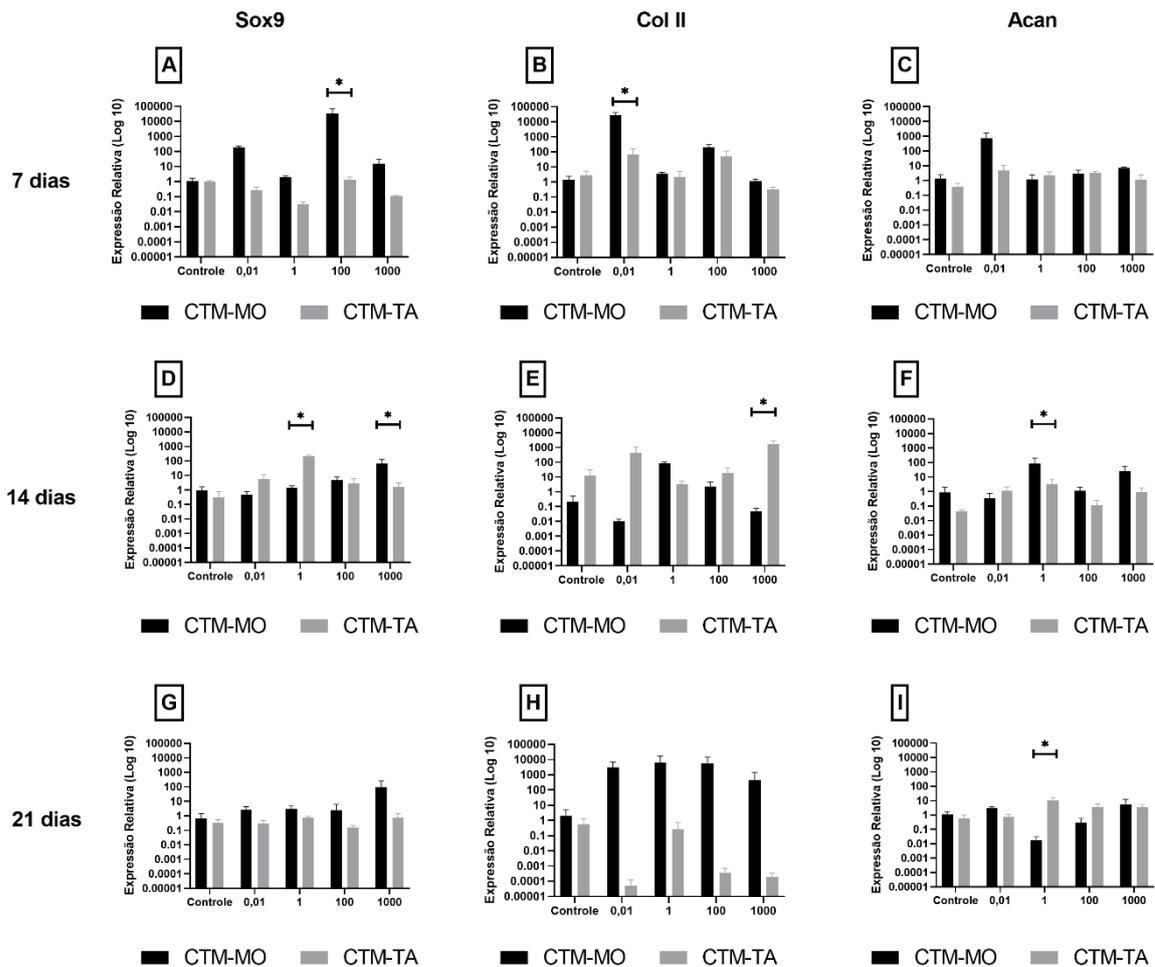


Figura 2. Expressão (média \pm desvio padrão) do transcrito gênico para Sox9, colágeno II e agrecano pela técnica de qRT-PCR em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou sem (controle) aos sete (A, B, C), 14 (D, E, F) e 21 (G, H, I) dias de diferenciação condrogênica. * $p < 0,05$.

Especificamente o gene região determinante do sexo Y-box 9 (Sox9) é o principal atuante na diferenciação condrogênica de CTM [27] sendo expresso durante toda a diferenciação [28]. Esse gene atua principalmente na fase inicial, regula a expressão de outros genes como agrecano e colágeno II [29] e não é expresso tardiamente em condrócitos hipertróficos [30]. Sob a influência de T3, a expressão de Sox9 aumentou em CTM-MO de ratos aos 21 dias de diferenciação condrogênica [15], enquanto esse hormônio diminuiu a expressão de Sox9 aos sete dias de diferenciação em CTM-TA de ratos [16]. Esses resultados podem explicar, pelo menos em parte, a maior formação de matriz pelas CTM-TA em comparação as CTM-MO aos sete dias

e sob efeito hormonal. Por exemplo, genes relacionados à condrogênese como proteína morfogenética óssea 7 (BMP-7) e Sox9 foram expressos de forma semelhante na maioria dos tipos de CTM em humanos [31].

Enquanto a expressão de Col II aos sete dias foi superior nas CTM-MO no grupo com 0,01 nM T3 ($p < 0,01$) (Figura 2 B), aos 14 dias foi superior nas CTM-TA no grupo com 1000 nM T3 ($p < 0,01$) (Figura 2 E). Nos demais períodos de observação e concentrações de T3, as expressões de Col II foram semelhantes entre CTM-MO e CTM-TA ($p > 0,05$) (Figura 2 B, E, H).

Em CTM-MO houve aumento da expressão de Col II de forma dose dependente aos sete e 14 dias de diferenciação condrogênica [15], enquanto o hormônio não alterou a expressão de Col II e X em CTM-TA em nenhum dos períodos avaliados [16]. Na presente pesquisa, verificou-se que apesar do aumento na expressão com 0,01 nM T3 de CTM-MO aos 7 dias e o aumento em CTM-TA com 1000 nM T3 aos 14 dias, aos 21 dias não houve diferença entre os grupos, corroborando ainda mais com a hipótese de que existam outros fatores ou genes que possam estar influenciando nos resultados observados. Importante salientar que a influência de T3 sobre a proliferação e diferenciação de condrócitos é descrita [32] porém nas CTM sugere-se o sítio de doação, bem como a espécie do doador e a concentração de T3 podem influenciar de diferentes maneiras na expressão gênica [33].

A expressão de Acan, por sua vez, foi superior nas CTM-MO do grupo com 1 nM T3 aos 14 dias ($p < 0,01$) (Figura 2 F), enquanto aos 21 dias, foi superior nas CTM-TA deste mesmo grupo ($p < 0,01$) (Figura 2 I). Nos demais períodos de observação e concentrações de T3, as expressões de Acan foram semelhantes entre CTM-MO e CTM-TA ($p > 0,05$) (Figura 2 C, F, I).

Com relação ao agrecano, observou-se diferença no aumento na concentração de 1 nM T3 de CTM-MO aos 14 dias e mesma concentração de CTM-TA aos 21 dias, ou seja, o efeito foi oposto em tempos de avaliação diferentes com relação a expressão de Acan. Contrariamente, a expressão de agrecano foi pouco induzida em condições de condrogênese tanto nas CTM da medula óssea quanto nas células do tecido adiposo de humanos, e por outro lado, foi completamente regulada para baixo em CTM-TA [34], sugerindo que a condrogênese *in vitro* pode ser menos eficiente em CTM-TA em comparação com CTM-MO [35]. A diferenciação condrogênica no nível do gene, determinada por qRT-PCR, mostrou que a expressão do gene condrogênico agrecano variou em CTM-MO e CTM-TA entre diferentes doadores. No geral, no

entanto, a expressão foi significativamente maior em CTM-MO sem a influência de T3 [36].

No presente estudo comparativo não houve predominância nas expressões gênicas de Sox9, Col II e Acan entre as CTM da medula óssea e do tecido adiposo (Figura 2). Isso foi observado, pois a expressão desses genes variou entre as CTM em diferentes períodos e concentrações de T3, inclusive tendo sua expressão aumentada na maioria das vezes nas CTM-MO aos 7 e 14 dias de diferenciação, porém se mantendo predominantemente semelhante aos 21 dias de diferenciação em ambas fontes. Neste contexto, mesmo esses genes tendo fundamental papel durante a diferenciação condrogênica, acredita-se que outros fatores possam ter influenciado nos resultados observados.

A despeito da variação nos mecanismos da transcrição gênica que pode ser influenciada por diferentes genes como Col II, Sox9, L-Sox5, Sox6, PTHrP, Acan e pela maneira como esses genes interagem entre si [37], a diferenciação condrogênica também pode ser impactada por fatores ambientais como a baixa tensão de oxigênio similar ao que ocorre *in vivo* que pode auxiliar na supressão da rápida hipertrofia dos condrócitos [38]. Um grande número de fatores de crescimento e hormônios têm sido implicados na regulação da biologia dos condrócitos, porém relativamente pouco se sabe sobre as vias de sinalização intracelular envolvidas [39]. Assim como a variação encontrada no nosso estudo, esta observação foi consistente com os resultados de outros autores [29,40]. Os resultados mostraram ainda que ambos os tipos de CTM são semelhantes na diferenciação celular [2,41,42], embora estudos anteriores comparando a capacidade multilinhagem de CTM isoladas de diferentes tecidos relataram o maior potencial osteogênico e condrogênico de CTM-MO em comparação com CTM-TA [34,35,36,43,44]. Baseado na análise da expressão de Col II, Mohamed-Ahmed *et al.* [36] apontaram que o melhor potencial condrogênico encontra-se nas CTM-MO, mas no caso das CTM-TA esse potencial deve ser aprimorado pela otimização de outras técnicas como modificação do meio de cultura, hipóxia, adição de fatores de crescimento, biomateriais e estruturas 3D, conforme indicado por outros autores [45,46,47].

3.3.3 Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+

Aos sete dias de diferenciação, a CTM-TA da maioria dos grupos estudados (controle; 0,01 nM; 1 nM e 100 nM T3), apresentaram formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ (escores AB 13,4; 16; 12; 16 - PAS 9,7; 9,4; 16; 10,3, respectivamente) significativamente superior em comparação aos mesmos grupos de CTM-MO (escores AB 1; 1; 1; 1 - PAS 1; 1; 1; 1, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 3 A, B; Figura 4). Aos 14 e 21 dias de diferenciação, as CTM-MO e CTM-TA de todos os grupos apresentaram formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ semelhantes entre si ($p > 0,05$) (Figura 3 C, D, E, F; Figura 5; Figura 6).

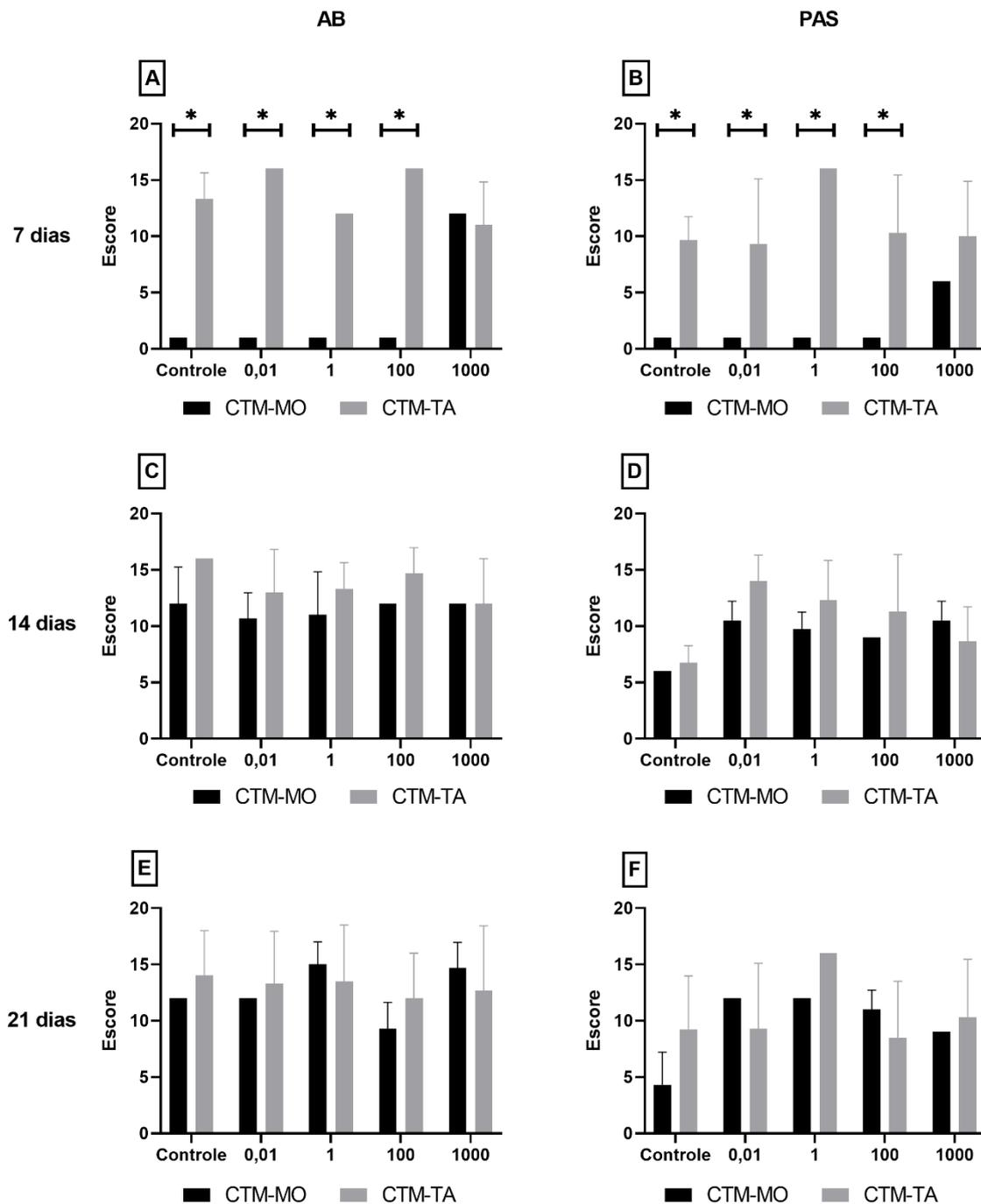


Figura 3. Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ (média \pm desvio padrão) em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete (A, B), 14 (C, D) e 21 (E, F) dias de diferenciação condrogênica. *p<0,05.

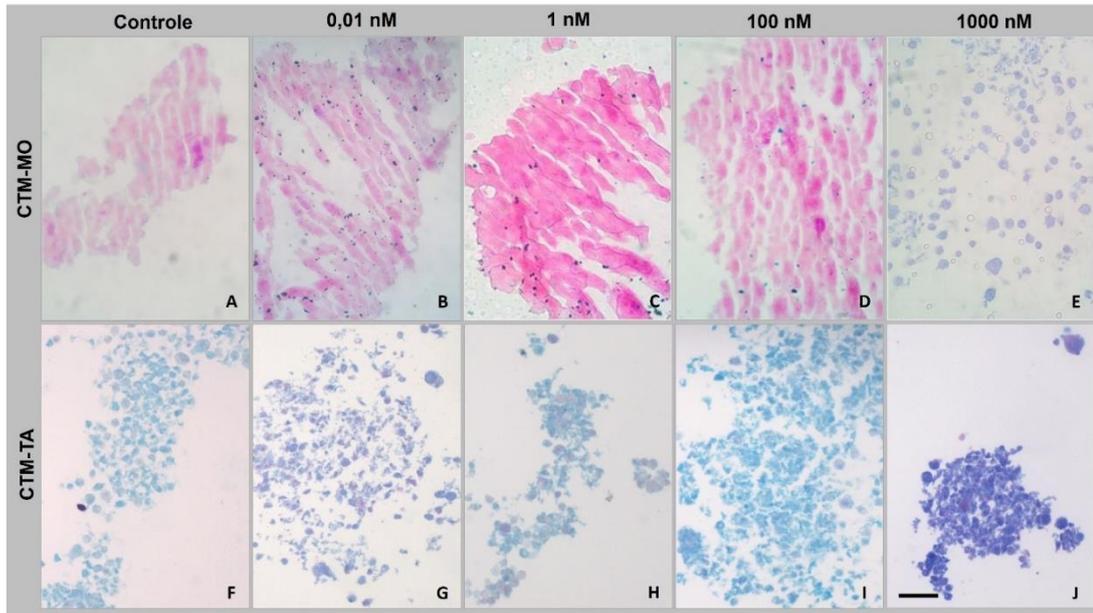


Figura 4. Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos sete dias de diferenciação condrogênica. Alcian Blue-PAS, Barra = 96,02µm. Fonte: Grupo de pesquisa “Cultivo Celular”.

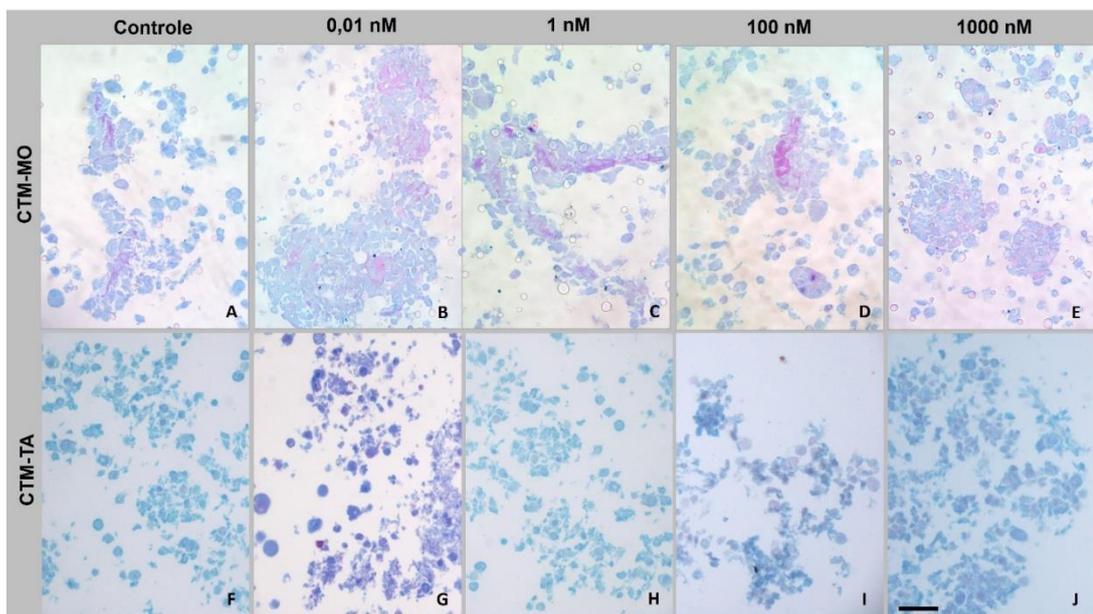


Figura 5. Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos 14 dias de diferenciação condrogênica. Alcian Blue-PAS, Barra = 96,02µm. Fonte: Grupo de pesquisa “Cultivo Celular”.

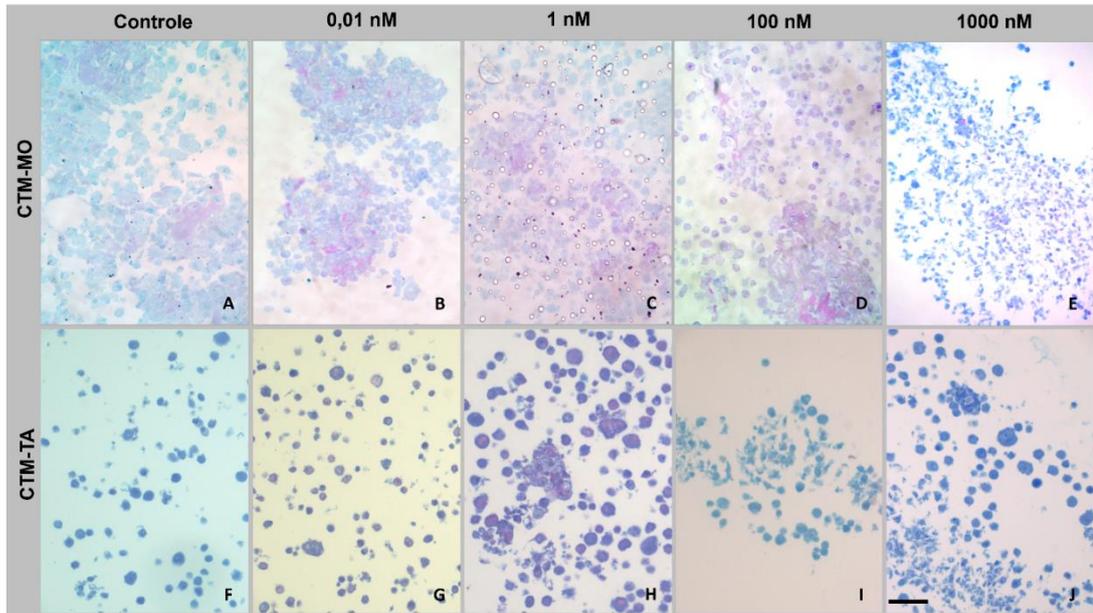


Figura 6. Formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ em cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas com triiodotironina (T3, 0,01; 1; 100 e 1000 nM) ou não (controle) aos 21 dias de diferenciação condrogênica. Alcian Blue-PAS, Barra = 96,02µm. Fonte: Grupo de pesquisa “Cultivo Celular”.

Aos sete dias de diferenciação, as CTM-TA foram superiores às CTM-MO no grupo sem adição T3 e nas concentrações de 0,01 nM, 1 nM e 100 nM T3, com relação a síntese de matriz condrogênica evidenciadas pelas colorações AB e PAS. Além disso, embora pesquisas demonstrem que a T3 tenha influenciado positivamente de maneira concentração dependente a formação de matriz condrogênica em CTM-MO de ratas [15] e não tenha interferido em CTM-TA nesta mesma espécie [16], é interessante notar que no presente estudo comparativo foi observado uma evidenciação precoce da diferenciação condrogênica nas células do tecido adiposo com e sem T3 em comparação as células da medula óssea, mas não houve uma predominância nas expressões gênicas de Sox9, Col II e Acan entre essas células. Sendo assim, outros genes que não estes avaliados assim como variações no mecanismo de transcrição e expressão gênica poderiam ter influenciado neste resultado observado e novos estudos poderiam ser realizados com o intuito de verificar essa hipótese.

Nos períodos de 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica, por sua vez, as CTM da medula óssea e do tecido adiposo de todos os grupos não tiveram diferença

na formação de matriz condrogênica. Tanto as CTM-MO quanto as CTM-TA se diferenciam em condrócitos. Ao contrário do presente estudo, pesquisa de Lofty *et al.* [41] verificou que as CTM-MO de ratos Sprague-Dawley apresentaram melhor potencial de diferenciação condrogênica em comparação as CTM-TA por produzir maior quantidade de glicosaminoglicanos (GAG). O estudo de Danisovic *et al.* [48] demonstrou que as CTM-MO de humanos apresenta esse potencial também superior às CTM-TA. Entretanto, nestes estudos foram utilizadas células de ratos de outra linhagem e também de humanos e isso pode ter influenciado nos diferentes resultados. Além disso, nos estudos citados não foram avaliadas essas comparações de potencial sob efeito dos hormônios tireoidianos como estudado na presente pesquisa, sendo o resultado inédito na literatura consultada. Por outro lado, a coloração com Alcian blue em concordância com PAS revelou presença semelhante de mucopolissacarídeos ácidos em todas as amostras analisadas aos 21 dias assim como no estudo de Danisovic *et al.* [2] ou ainda aos 28 dias de diferenciação sem grandes diferenças [36].

A Tabela 2 demonstra um resumo dos principais resultados observados durante a diferenciação condrogênica de CTM-MO e CTM-TA de ratas jovens sem triiodotironina (Controles) e com triiodotironina (concentrações de 0,01, 1, 100 e 1000 nM) aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação.

Tabela 2 - Expressão gênica de Sox9, Col II, Acan e formação de matriz condrogênica AB+ e PAS+ das CTM-MO de ratas em cada grupo (Controle, T3 0,01 nM, T3 1 nM, T3 100 nM e T3 1000 nM) e período (sete, 14 e 21 dias) em comparação à expressão dos mesmos genes e formação de matriz condrogênica das CTM-TA de ratas em cada grupo (Controle, T3 0,01 nM, T3 1 nM, T3 100 nM e T3 1000 nM) e período (também aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação condrogênica).

		CTM-MO			CTM-TA		
		7d	14d	21d	7d	14d	21d
Sox9	C	---	---	---	---	---	---
	0,01	---	---	---	---	---	---
	1	---	---	---	---	↑	---
	100	↑	---	---	---	---	---
	1000	---	↑	---	---	---	---
Col II	C	---	---	---	---	---	---
	0,01	↑	---	---	---	---	---
	1	---	---	---	---	---	---
	100	---	---	---	---	---	---

Acan	1000	---	---	---	---	↑	---
	C	---	---	---	---	---	---
	0,01	---	---	---	---	---	---
	1	---	↑	---	---	---	↑
	100	---	---	---	---	---	---
AB+PAS+	1000	---	---	---	---	---	---
	C	---	---	---	↑	---	---
	0,01	---	---	---	↑	---	---
	1	---	---	---	↑	---	---
	100	---	---	---	↑	---	---
	1000	---	---	---	---	---	---

Legenda: (---): não houve diferença significativa entre mesmo grupo; (↑) aumento de um em relação ao outro (CTM-MO ou CTM-TA) comparando as mesmas categorias (Controle, 0,01 nM, 1 nM, 100 nM e 1000 nM de T3) nos mesmos períodos - aos sete (7d), quatorze (14d) e vinte e um (21d) dias de diferenciação condrogênica; CTM-MO: células tronco mesenquimais da medula óssea; CTM-TA: células tronco mesenquimais do tecido adiposo; T3: triiodotironina; C: Controle (sem T3); nM: nanomol; Col II: colágeno II; Acan: agregcano; AB+PAS+: matriz condrogênica AB (Alcian blue) e PAS (ácido periódico de Schiff) positiva.

No estudo em questão, apesar de não ter sido avaliado a proliferação celular, é importante citar que esse também é um fator que possa ter influenciado nos resultados observados. Pesquisas demonstraram que as CTM-MO levam mais tempo, em comparação as CTM-TA, para atingir 70-80% de confluência e as CTM-TA tiveram a capacidade de formar multicamadas logo após atingir confluência [41], provavelmente devido à baixa inibição de contato [49]. A capacidade de proliferação foi mais rápida nas CTM-TA [41,50] e demonstrou-se que CTM-TA expandiu quatro vezes mais em aproximadamente duas semanas. Com base nos resultados, as CTM-TA tenderam a dobrar sua população na média de 39 horas enquanto as CTM-MO exibiram um tempo de duplicação de 49 horas [41]. Lee *et al.* [51] compararam o perfil de proliferação e expressão gênica de CTM-MO e CTM-TA em humanos e também demonstraram que ambas diferem em termos de proliferação de acordo com o meio de cultura. Um grande número de CTM é necessário para o transplante de células, de modo que a rápida proliferação de CTM-TA *ex vivo* é considerada uma fonte favorável no cenário clínico agudo, embora ainda existam problemas relacionados à tumorigênese e instabilidade [50].

Ademais, estudos demonstram que as CTM-TA se expandem mais rapidamente que as CTM-MO [2,50], essa maior expansão associada a maior proliferação inicial pode estar relacionada com a maior marcação de matriz

condrogênica aos sete dias observada nesse estudo. No entanto, as CTM-TA são semelhantes às CTM-MO em termos de morfologia e expressão de marcadores de superfície [1,52,53]. Na análise de proteínas secretoras, CTM-TA secretou quantidades significativamente maiores de fator de crescimento e citocinas inflamatórias, como fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de hepatócitos e interleucina 6, enquanto CTM-MO secretou quantidades significativamente maiores de fator-1 α derivado do estroma [50]. Os melhores resultados de cultivo foram obtidos pela técnica de cultura 3D (micromassa), que mimetiza a condição *in vivo*. Dessa forma as células ficam em contato profundo e podem influenciar umas às outras por sinalização parácrina [54]. Este efeito também é aumentado aditivamente pela suplementação de fatores de crescimento como TGF- β 1, TGF- β 3, BMP-2, BMP-6 e GDF-5 [55,56]. Alguns autores sugerem não apenas a utilização de fatores de crescimento, mas também outros fatores físicos e mecânicos, incluindo tensão de oxigênio e pressão hidrostática [57,58].

Finalmente, ao comparar diferentes fontes de CTM para medicina regenerativa e tratamento de defeitos ou doenças do tecido cartilaginoso, deve-se considerar, além da capacidade de proliferação e diferenciação das células, a simplicidade e a segurança dos procedimentos cirúrgicos. O tecido adiposo é mais abundante, mais facilmente acessível, e sua obtenção está associada a menor morbidade em comparação com a medula óssea. Neste caso, as CTM-TA de ratas Wistar jovens tiveram uma diferenciação condrogênica precoce e isso pode ser outro fator benéfico na escolha dessas células para as terapias celulares. No entanto em determinadas alterações, pode haver vantagem de se utilizar uma população de células sobre a outra [53]. A escolha da CTM na terapia regenerativa deve levar em consideração fatores como a facilidade de obtenção, espécie, idade, sexo do doador e tipo de estudo clínico ou terapia. A seleção de células adequadas e o conhecimento aprofundado de suas propriedades biológicas pertencem ao pré-requisito mais importante antes de sua aplicação clínica.

3.4 CONCLUSÃO

As expressões dos transcritos gênicos variaram entre as CTM dependendo do tempo avaliado e da concentração de hormônio acrescida ao meio. Sox9 aumentou sua expressão aos 7 e 14 dias em CTM-MO e aos 14 dias em CTM-TA com T3; Col II

aumentou sua expressão aos 7 dias em CTM-MO e aos 14 dias em CTM-TA com T3; e Acan aumentou sua expressão aos 14 dias em CTM-MO e aos 21 dias em CTM-TA com T3. Com relação à síntese de matriz condrogênica, conclui-se que o potencial condrogênico da CTM-TA é superior em relação à CTM-MO aos 7 dias, tanto sem adição de T3 quanto com adição desse hormônio nas concentrações de 0,01 nM, 1 nM e 100 nM T3, porém não é progressivo, pois são semelhantes com 14 e 21 dias de diferenciação.

3.5 DECLARAÇÃO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

3.6 RECONHECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

3.7 REFERÊNCIAS

[1] M.C. Ronziere, E. Perrier, F. Mallein-Gerin, A.M. Freyria, Chondrogenic potential of bone marrow-and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells, *Biomed. Mater. Eng.* 20 (3-4) (2010) 145-158, doi: 10.3233/BME-2010-0626.

[2] L. Danisovic, M. Bohác, R. Zamborský, L. Oravcová, Z. Provazníková, M. Csöbönyeiová, et al., Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering, *Gen. Physiol. Biophys.* 35 (2) (2016) 207-214, doi: 10.4149/gpb_2015044.

[3] R.M. Shanti, W.J. Li, L.J. Nesti, X. Wang, R.S. Tuan, Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 65 (8) (2007) 1640-1647, <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.04.008>.

- [4] O.S. Beane, E.M. Darling, Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration, *Ann. Biomed. Eng.* 40 (10) (2012) 2079-2097, <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0639-8>.
- [5] D. Marolt, M. Knezevic, G. Vunjak-Novakovic, Bone tissue engineering with human stem cells, *Stem Cell Res. Ther.* 1 (10) (2010) 1-11, <https://doi.org/10.1186/scrt10>.
- [6] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284 (5411) (1999) 143-147, doi: 10.1126/science.284.5411.14.
- [7] E. Raposio, S. Bonomini, F. Calderazzi, Isolation of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for bone repair, *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 102 (7) (2016) 909-912, <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2016.07.006>.
- [8] H. Mizuno, M. Tobita, A.C. Uysal, Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 30 (5) (2012) 804-810, <https://doi.org/10.1002/stem.1076>.
- [9] B. Puissant, C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, et al., Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells, *Br. J. Haematol.* 129 (1) (2005) 118-129, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x>.
- [10] R. Vishnubalaji, M. Al-Nbaheen, B. Kadalmani, A. Aldahmash, T. Ramesh, Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow-and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis, *Cell Tissue Res.* 347 (2) (2012) 419-427, <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1306-3>.
- [11] R. Gruber, K. Czerwenka, F. Wolf, G.M. Ho, M. Willheim, M. Peterlik, 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* 24 (5) (1999) 465-473, [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00017-4).

[12] J.N. Boeloni, N.M. Ocarino, A.B. Melo, J.F. Silva, P. Castanheira, A.M. Goes, et al., Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells, *Horm. Res.* 72 (2) (2009) 88-97, <https://doi.org/10.1159/000232161>.

[13] J.N. Boeloni, N.M. Ocarino, A.M. Goes, R. Serakides, Efeito in vitro da triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e com osteoporose, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 57 (2) (2013) 98-111, <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000200002>.

[14] A. Karl, N. Olbrich, C. Pfeifer, A. Berner, J. Zellner, R. Kujat, et al., Thyroid hormone-induced hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis is mediated by bone morphogenetic protein-4, *Tissue Eng. Part A.* 20 (1-2) (2014) 178-188, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0023>.

[15] H.A. Assis, N.C. Elert, A.L.B.P. Azevedo, I.S. Braga, R. Serakides, N.M. Ocarino, et al., Dose-dependent effect of triiodothyronine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from the bone marrow of female rats, *J. Pharm. Pharmacol.* 70 (1) (2018) 89-100, <https://doi.org/10.1111/jphp.12842>.

[16] N.C. Elert, H.A. Assis, L.P. Romão, R. Serakides, N.M. Ocarino, A.M. Goes, et al., Triiodothyronine does not influence in vitro chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells from young female rat, *Cienc. Rural* 52 (12) (2022) 1-9, <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210509>.

[17] J.N. Boeloni, N.M. Ocarino, A.M. Goes, R. Serakides, Comparative study of osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue of osteoporotic female rats, *Connect. Tissue Res.* 55 (2) (2014) 103-114, <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.860970>.

[18] L.A. Solchaga, K.J. Penick, J.F. Welter, Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks, in: M. Vemuri, L. Chase, M. Rao (Eds.), *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*, Humana Press, Totowa, 2011, pp. 253-278.

[19] A.B.M. Rabie, G.H. Tang, H. Xiong, U. Hägg, PTHrP regulates chondrocyte maturation in condylar cartilage, *J. Dent. Res.* 82 (8) (2003) 627-631, <https://doi.org/10.1177/154405910308200811>.

[20] G. Musumeci, A. Mobasher, F.M. Trovato, M.A. Szychlińska, A.C.E. Graziano, D.L. Furno, et al., Biosynthesis of collagen I, II, RUNX2 and lubricin at different time points of chondrogenic differentiation in a 3D in vitro model of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, *Acta Histochem.* 116 (8) (2014) 1407-1417, <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.09.008>.

[21] Y. Hadaegh, H. Uludag, D. Dederich, T.H. El-Bialy, The effect of low intensity pulsed ultrasound on mandibular condylar growth in young adult rats, *Bone Rep.* 15 (2021), e101122, <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2021.101122>.

[22] F. Braz, S.C. Raha, N.D.S. Rocha, E. Taga, F. De Biasi, Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos, *Acta Cir. Bras.* 18 (1) (2003) 19-24, <https://doi.org/10.1590/S0102-86502003000100005>.

[23] L.O. Trivilin, D.C. Cassiano, S.O. Mendes, A.R. Borcoi, A.B. Archanjo, E.R. Cunha, et al., Exposure to cigarette smoke alters AgNOR number and HIF-1 α expression in colorectal tubular adenocarcinoma in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 10 (3) (2017) 3822-3829.

[24] E.H. Javazon, D.C. Colter, E.J. Schwarz, D.J. Prockop, Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells, *Stem Cells* 19 (3) (2001) 219-225, <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-3-219>.

- [25] F.Z. Asumda, P.B. Chase, Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity, *BMC Cell Biol.* 12 (44) (2011) 1-11, <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-44>.
- [26] O. Katsara, L.G. Mahaira, E.G. Iliopoulou, A. Moustaki, A. Antsaklis, D. Loutradis, et al., Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dev.* 20 (9) (2011) 1549-1561, <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0280>.
- [27] A. Augello, C. De Bari, The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells, *Hum. Gene Ther.* 21 (10) (2010) 1226-1238, <https://doi.org/10.1089/hum.2010.173>.
- [28] M. Koch, J.R. Murrell, D.D. Hunter, P.F. Olson, W. Jin, D.R. Keene, et al., A novel member of the netrin family, β -netrin, shares homology with the β chain of laminin: identification, expression, and functional characterization, *J. Cell. Biol.* 151 (2) (2000) 221-234, <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.221>.
- [29] Z.H. Wang, X.L. Li, X.J. He, B.J. Wu, M. Xu, H.M. Chang, et al., Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an in vitro model, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 47 (4) (2014) 279-286, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133539>.
- [30] V. Lefebvre, B. De Crombrughe, Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation, *Matrix Biol.* 16 (9) (1998) 529-540, [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(98\)90065-8](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(98)90065-8).
- [31] J.S. Heo, Y. Choi, H.S. Kim, H.O. Kim, Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue, *Int. J. Mol. Med.* 37 (1) (2016) 115-125, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2413>.

[32] F. Burdan, J. Szumilo, A. Korobowicz, R. Farooquee, S. Patel, A. Patel, et al., Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate, *Folia Histochem. Cytobiol.* 47 (1) (2009) 5-16, doi: 10.2478/v10042-009-0007-1.

[33] P. Fernández-Pernas, J. Fafián-Labora, I. Lesende-Rodriguez, J. Mateos, A. De la Fuente, I. Fuentes, et al., 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine Increases in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells from human umbilical cord stroma through SRC2, *J. Cell. Biochem.* 117 (9) (2016) 2097-2108, <https://doi.org/10.1002/jcb.25515>.

[34] D. Noël, D. Caton, S. Roche, C. Bony, S. Lehmann, L. Casteilla, et al., Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal–stromal cells despite similar differentiation potentials, *Exp. Cell Res.* 314 (7) (2008) 1575-1584, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.12.022>.

[35] H.W. Park, J.S. Shin, C.W. Kim, Proteome of mesenchymal stem cells, *Proteomics* 7 (16) (2007) 2881-2894, <https://doi.org/10.1002/pmic.200700089>.

[36] S. Mohamed-Ahmed, I. Fristad, S.A. Lie, S. Suliman, K. Mustafa, H. Vindenes, et al., Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison, *Stem Cell Res. Ther.* 9 (168) (2018) 1-15, <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>.

[37] B. De Crombrughe, V. Lefebvre, K. Nakashima, Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (6) (2001) 721-727, [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00276-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00276-3).

[38] G. Monaco, Y.D. Ladner, A.J. El Haj, N.R. Forsyth, M. Alini, M.J. Stoddart, Mesenchymal stromal cell differentiation for generating cartilage and bone-like tissues in vitro, *Cells* 10 (8) (2021) 2165-2184, <https://doi.org/10.3390/cells10082165>.

[39] J.W. Lee, Y.H. Kim, S.H. Kim, S.H. Han, S.B. Hahn, Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications, *Yonsei Med. J.* 45 (Suppl) (2004) 41-47, <https://doi.org/10.3349/ymj.2004.45.Suppl.41>.

[40] S.T.F. Hsiao, A. Asgari, Z. Lokmic, R. Sinclair, G.J. Disting, S.Y. Lim, et al., Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue, *Stem Cells Dev.* 21 (12) (2012) 2189-2203, <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0674>.

[41] A. Lotfy, M. Salama, F. Zahran, E. Jones, A. Badawy, M. Sobh, Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study, *Int. J. Stem Cells.* 7 (2) (2014) 135-142, <https://doi.org/10.15283/ijsc.2014.7.2.135>.

[42] V. Havlas, P. Kos, P. Jendelová, P. Lesný, T. Trc, E. Sykova, Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells, *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* 78 (2) (2011) 138-144.

[43] Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita, T. Muneta, Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source, *Arthritis Rheum.* 52 (8) (2005) 2521-2529, <https://doi.org/10.1002/art.21212>.

[44] H. Afizah, Z. Yang, J.H.P. Hui, H. Ouyang, E. Lee, A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors, *Tissue Eng.* 13 (4) (2007) 659-666, <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0118>.

[45] M. Shi, Z.W. Liu, F.S. Wang, Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells, *Clin. Exp. Immunol.* 164 (1) (2011) 1-8, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x>.

[46] S. Alimperti, P. Lei, Y. Wen, J. Tian, A.M. Campbell, S.T. Andreadis, Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and

differentiation potential, *Biotechnol. Prog.* 30 (4) (2014) 974-983,
<https://doi.org/10.1002/btpr.1904>.

[47] J. Shang, H. Liu, J. Li, Y. Zhou, Roles of hypoxia during the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 9 (2) (2014) 141-147, doi: 10.2174/1574888x09666131230142459.

[48] L. Danisovic, P. Lesný, V. Havlas, P. Teyssler, Z. Syrová, M. Kopáni, et al., Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, *J. Appl. Biomed.* 5 (2007) 139-150, doi: 10.32725/jab.2007.019

[49] Y. Zhu, T. Liu, K. Song, X. Fan, X. Ma, Z. Cui, Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC, *Cell Biochem. Funct.* 26 (6) (2008) 664-675,
<https://doi.org/10.1002/cbf.1488>.

[50] C. Nakanishi, N. Nagaya, S. Ohnishi, K. Yamahara, S. Takabatake, T. Konno, et al., Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow, *Circ. J.* 75 (9) (2011) 2260-2268,
<https://doi.org/10.1253/circj.CJ-11-0246>.

[51] R.H. Lee, B. Kim, I. Choi, H. Kim, H.S. Choi, K. Suh, Y.C. Bae, J.S. Jung, Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue, *Cell. Physiol. Biochem.* 14 (4-6) (2004) 311-324,
<https://doi.org/10.1159/000080341>.

[52] S. Gronthos, D.M. Franklin, H.A. Leddy, P.G. Robey, R.W. Storms, J.M. Gimble, Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells, *J. Cell. Physiol.* 189 (1) (2001) 54-63, <https://doi.org/10.1002/jcp.1138>.

[53] M. Strioga, S. Viswanathan, A. Darinkas, O. Slaby, J. Michalek, Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells, *Stem Cells Dev.* 21 (14) (2012) 2724-2752,
<https://doi.org/10.1089/scd.2011.0722>.

[54] C.S. Mara, A.S. Duarte, A. Sartori, A.C. Luzo, S.T.O. Saad, I.B. Coimbra, Regulation of chondrogenesis by transforming growth factor- β 3 and insulin-like growth factor-1 from human mesenchymal umbilical cord blood cells, *J. Rheum.* 37 (7) (2010) 1519-1526, <https://doi.org/10.3899/jrheum.091169>.

[55] M.K. Murphy, D.J. Huey, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, TGF- β 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells, *Stem Cells* 33 (3) (2015) 762-773, <https://doi.org/10.1002/stem.1890>.

[56] M. Shademan, A. Parham, H. Dehghani, Enhancement of chondrogenic differentiation potential of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using TGF- β 3 and BMP-6, *Turk. J. Biol.* 40 (2) (2016) 360-368, <https://doi.org/10.3906/biy-1501-61>.

[57] B.D. Markway, G.K. Tan, G. Brooke, J.E. Hudson, J.J. Cooper-White, M.R. Doran, Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures, *Cell Transplant.* 19 (1) (2010) 29-42, <https://doi.org/10.3727/096368909X478560>.

[58] J.L. Puetzer, J.N. Petite, E.G. Loba, 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 Eng. Part B Rev.* 16 (4) (2010) 435-444, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0705>.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo comparou o potencial de diferenciação condrogênica de CTM-MO e CTM-TA de ratas jovens, com adição ou não de T3, como duas fontes diferentes para CTM. Essas células compartilham características morfológicas, expressão de antígenos de superfície e capacidade de diferenciação condrogênica, mas diferem discretamente na cinética de proliferação. Apesar de muitas semelhanças entre os dois tipos de células, existem diferenças que podem auxiliar na escolha do tipo celular a ser utilizada em doenças específicas. Este estudo fornece alguns esclarecimentos sobre as diferenças existentes entre CTM-MO e CTM-TA em relação às suas propriedades biológicas básicas *in vitro* sob a influência do hormônio tireoidiano T3. Usando esses dados, os pesquisadores poderão selecionar as células certas para suas pesquisas experimentais, pré-clínicas e clínicas. De acordo com esses achados, pode-se enfatizar que com a realização de novos experimentos focados principalmente na otimização de técnicas de cultura se poderá levar ao aprimoramento da diferenciação condrogênica.

5. REFERÊNCIAS

ADEGANI, F.J.; LANGROUDI, L.; AREFIAN, E.; SHAFIEE, A.; DINARVAND, P.; SOLEIMANI, M. A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. **Molecular Biology Reports**, v.40, n.5, p.3693-3703, 2013. DOI: 10.1007/s11033-012-2445-7.

AFIZAH, H.; YANG, Z.; HUI, J.H.P.; OUYANG, H.W.; LEE, E.H. A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. **Tissue Engineering**, v.13, n.4, p.659-666, 2007. DOI: 10.1089/ten.2006.0118.

ALIMPERTI, S.; LEI, P.; WEN, Y.; TIAN, J.; CAMPBELL, A.M.; ANDREADIS, S.T. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. **Biotechnology Progress**, v.30, n.4, p.974-983, 2014. DOI: 10.1002/btpr.1904.

ALSTRUP, T.; EIJKEN, M.; BOHN, A.B.; MOLLER, B.; DAMSGAARD, T.E. Isolation of adipose tissue-derived stem cells: enzymatic digestion in combination with mechanical distortion to increase adipose tissue-derived stem cell yield from human aspirated fat. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, v.48, n.1, p.e68, 2019. DOI: 10.1002/cpsc.68.

ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; BOELONI, J.N.; ROSADO, I.R.; OCARINO, N.M.; OLIVEIRA, H.P.; GÓES, A.M.; REZENDE, C.M.F. Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.1, p.21-32, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X201600130004.

ANSAR, M.M.; ESFANDIARIY, E.; MARDANI, M.; HASHEMIBENI, B.; ZARKESH-ESFAHANI, S.H.; HATEF, M; KABIRI, A. A comparative study of aggrecan synthesis between natural articular chondrocytes and differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells in 3D culture. **Advanced Biomedical Research**, v.1, n.2, p.1-7, 2012. DOI: 10.4103/2277-9175.98145.

ASADA, N.; TAKEISHI, S.; FRENETTE, P.S. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. **International Journal of Hematology**, v.106, n.1, p.45-54, 2017. DOI: 10.1007/s12185-017-2262-9.

ASSIS, H.A.; ELERT, N.C.; AZEVEDO, A.L.B.P.; BRAGA, I.S.; SERAKIDES, R.; OCARINO, N.M.; GÓES, 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. DOI: 10.1111/jphp.12842.

ASUMDA, F.Z.; CHASE, P.B. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. **BMC Cell Biology**, v.12, n.44, p.1-11, 2011. DOI: 10.1186/1471-2121-12-44.

ARRIGONI, E.; LOPA, S.; GIROLAMO, L.; STANCO D.; BRINI, A.T. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose tissue derived stem cells: from small to large animal models. **Cell and Tissue Research**, v.338, n.3, p.401-411, 2009. DOI 10.1007/s00441-009-0883-x.

AUGELLO, A.; DE BARI, C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. **Human Gene Therapy**, v.21, n.10, p.1226-1238, 2010. DOI: 10.1089/hum.2010.173.

BARRY, F.; BOYNTON, R.E.; LIU, B.; MURPHY, J.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. DOI: 10.1006/excr.2001.5278.

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. DOI: 10.1007/s10439-012-0639-8.

BERNARDO M.E.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stromal cells: a novel treatment modality for tissue repair. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1176, n.1, p.101-117, 2009. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04607.x.

BIRBRAIR, A.; FRENETTE, P.S. Niche heterogeneity in the bone marrow. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1370, n.1, p 82-96, 2016. DOI: 10.1111/nyas.13016.

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

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; MELO, A.B.; SILVA, J.F.; CASTANHEIRA, P.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Hormone Research in Paediatrics**, v.72, n.2, p.88-97, 2009. DOI: 10.1159/000232161.

BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Efeito *in vitro* da triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e com osteoporose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.57, n.2, p.98-111, 2013a. DOI: 10.1590/S0004-27302013000200002.

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 & Metabologia**, v.57, n.1, p.62-70, 2013b. DOI: 10.1590/S0004-27302013000100009.

- BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Comparative study of osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue of osteoporotic female rats. **Connective Tissue Research**, v.55, n.2, p.103-114, 2014. DOI: 10.3109/03008207.2013.860970.
- BONGSO, A.; FONG, C.Y. Human embryonic stem cells: their nature, properties, and uses. In: Baharvand, H. (eds) **Trends in Stem Cell Biology and Technology**. Humana Press. p.1-17, 2009. DOI: 10.1007/978-1-60327-905-5_1.
- BRAZ, F.; RAHA, S.C.; ROCHA, N.S.; TAGA, E.; BIASI, F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.1, p.19-24, 2003. DOI: 10.1590/S0102-86502003000100005.
- BUNNELL, B.A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. **Methods in Stem Cell Research**, v.45, n.2, p.115-120, 2008. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
- BURDAN, F.; SZUMILO, J.; KOROBOWICZ, A.; FAROOQUEE, R.; PATEL, S.; PATEL, A.; DAVE, A.; SZUMIŁO, M.; SOLECKI, M.; KLEPACZ, R.; DUDKA, J. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.47, n.1, p.5-16, 2009. DOI: 10.2478/v10042-009-0007-1.
- BYDŁOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p.25-35, 2009. DOI: 10.1590/S1516-84842009005000038.
- CALVI, L.M.; ADAMS, G.B.; WEIBRECHT, K.W.; WEBER, J.M.; OLSON, D.P.; KNIGHT, M.C.; MARTIN, R.P.; SCHIPANI, E.; DIVIETI, P.; BRINGHURST, F.R.; MILNER, L.A.; KRONENBERG, H.M.; SCADDEN, D.T. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**, v.425, n.6960, p.841-846, 2003. DOI: 10.1038/nature02040.
- CAPLAN, A.I. New MSC: MSCs as pericytes are sentinels and gatekeepers. **Journal of Orthopaedic Research**, v.35, n.6, p.1151-1159, 2017. DOI: 10.1002/jor.23560.
- CASTEILLA, L.; PLANAT-BENARD, V.; LAHARRAGUE, P.; COUSIN, B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. **World Journal of Stem Cells**, v.3, n.4, p.25-33, 2011. DOI: 10.4252/wjsc.v3.i4.25.
- CHEAH, K.S.; LAU, E.T.; AU, P.K.; TAM, P.P. Expression of the mouse alpha1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. **Development**, v.111, n.4, p.945-953, 1991. DOI: 10.1242/dev.111.4.945.
- 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. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.01.007.

CORSELLI, M.; CRISAN, M.; MURRAY, I.R.; WEST, C.C.; SCHOLLES, J.; CODREA, F.; KHAN, N.; PÉAULT, B. Identification of perivascular mesenchymal stromal/stem cells by flow cytometry. **Cytometry Part A**, v.83A, n.8, p.714-720, 2013. DOI: 10.1002/cyto.a.22313.

DAI, R.; WANG, Z.; SAMANIPOUR, R.; KOO, K.; KIM, K. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Stem Cells International**, v.2016, p.1-19, 2016. DOI: 10.1155/2016/6737345.

DE TONI, F.; POGGIO, S.; YOUCEF, A.B.; COUSIN, B.; PFLUMIO, F.; BOURIN, P.; CASTEILLA, L.; LAHARRAGUE, P. Human adipose-derived stromal cells efficiently support hematopoiesis in vitro and in vivo: a key step for therapeutic studies. **Stem Cells and Development**, v.20, n.12, p.2127-2138, 2011. DOI: 10.1089/scd.2011.0044.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy Position Statement, Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006. DOI: 10.1080/14653240600855905.

DANISOVIC, L.; LESNY, P.; HAVLAS, V.; TEYSSLER, P.; SYROVA, Z.; KOPANI, M.; FUJERIKOVA, G.; TRC, T.; SYKOVA E.; JENDELOVA, P. Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Applied Biomedicine**, v.5, p.139-150, 2007. DOI: 10.32725/jab.2007.019.

DANISOVIC, L.; VARGA, I.; POLAKI, S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Tissue and Cell**, v.44, n.2, p.69-73, 2012. DOI: 10.1016/j.tice.2011.11.005.

DANISOVIC, L.; BOHAC, M.; ZAMBORSKY, R.; ORAVCOVA, L.; PROVAZNIKOVA, Z.; CSOBONYEIOVA, M; VARGA, I. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering. **General Physiology and Biophysics**, v.35, n.2, p.207-214, 2016. DOI: 10.4149/gpb_2015044.

DE CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V.; NAKASHIMA, K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, n.6, p.721-727, 2001. DOI: 10.1016/S0955-0674(00)00276-3.

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. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0415.

DE UGARTE, D.A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P.A.; ELBARBARY, A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H.; FRASER, J.K. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and

bone marrow. **Immunology Letters**, v.89, n.2-3, p.267-270, 2003. DOI: 10.1016/S0165-2478(03)00108-1.

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.1-8, 2015. DOI: 10.1155/2016/3573846.

ELERT, N.C.; ASSIS, H.A.; ROMÃO, L.P.; SERAKIDES, R.; OCARINO, N.M.; GOES, A.M.; CARETA, F.P.; PANETO, G.G.; SILVA, A.M.A.; BOELONI, J.N. Triiodothyronine does not influence in vitro chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells from young female rat. **Ciência Rural**, v.52, n.12, p.1-9, 2022. DOI: 10.1590/0103-8478cr20210509.

ESTES, B.T, WU, A.W.; GUILAK, F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. **Arthritis & Rheumatism**, v.54, n.4, p.1222-1232, 2006. DOI: 10.1002/art.21779.

FERNÁNDEZ-PERNAS, P.; FAFIAN-LABORA, J.; LESENDE-RODRIGUEZ, I.; MATEOS, J.; DE LA FUENTE, A.; FUENTES, I.; DE TORO SANTOS, J.; BLANCO GARCÍA, F.; ARUFE, M.C. 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine increases in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells from human umbilical cord stroma through SRC2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.117, n.9, p.2097-2108, 2016. DOI: 10.1002/jcb.25515.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v.3, n.4, p.393-403, 1970. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.

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.1-11, 2013. DOI: 10.1155/2013/312501.

GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D.M.; LEDDY, H.A.; ROBEY, P.G.; STORMS, R.W.; GIMBLE, J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.189, n.1, p.54-63, 2001. DOI: 10.1002/jcp.1138.

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. DOI: 10.1016/S8756-3282(99)00017-4.

HALASOVA, E.; ADAMKOV, M.; MATAKOVA, T.; VYBOHOVA, D.; ANTOSOVA, M.; JANICKOVA, M.; SINGLIAR, A.; DOBROTA, D.; JAKUSOVA, V. Expression of Ki-67,

Bcl-2, survivin and p53 proteins in patients with pulmonary carcinoma. In: **Respiratory Regulation - The Molecular Approach**. Springer, 2013. p.15-21.

HASS, R.; KASPER, C.; BÖHM, S.; JACOBS, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, v.9, n.12, p.1-14, 2011. DOI: 10.1186/1478-811X-9-12.

HAVLAS, V.; KOS, P.; JENDELOVA, P.; LESNÝ, P.; TRC, T.; SYKOVA, E. Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells. **Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca**, v.78, n.2, p.138-144, 2011.

HEO, J.S.; CHOI, Y.; KIM, H.S.; KIM, H.O. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. **International Journal of Molecular Medicine**, v.37, n.1, p.115-125, 2016. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2413.

HESLOP, J.A.; HAMMOND, T.G.; SANTERAMO, I.; TORT PIELLA, A.; HOPP, I.; ZHOU, J.; BATY, R.; GRAZIANO, E.I.; MARCO, B.P.; CARON, A.; SKOLD, P.; ANDREWS, P.W.; BAXTER, M.A.; HAY, D.C.; HAMDAM, J.; SHARPE, M.E.; PATEL, S.; JONES, D.R.; REINHA, J.; DANEN, E.H.J.; BEM-DAVID, U.; STACEY, G.; BJORQUIST, P.; PINER, J.; MILLS, J.; ROWE, C.; PELLEGRINI, G.; SETHU, S.; ANTOINE, D.J.; CROSS, M.J.; MURRAY, P.; WILLIAMS, D.P.; KITTINGHAM, N.R.; GOLDRING, C.E.P.; PARK, B.K. Concise review: workshop review: understanding and assessing the risks of stem cell-based therapies. **Stem Cells Translational Medicine**, v.4, n.4, p.389-400, 2015. DOI: 10.5966/sctm.2014-0110.

HSIAO, S.T.F.; ASGARI, A.; LOKMIC, Z.; SINCLAIR, R.; DUSTING, G.J.; LOM, S.Y.; DILLEY, R.J. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. **Stem Cells and Development**, v.21, n.12, p.2189-2203, 2012. DOI: 10.1089/scd.2011.0674.

HO, A.D.; WAGNER, W.; FRANKE, W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. **Cytotherapy**, v.10, n.4, p.320-330, 2008. DOI: 10.1080/14653240802217011.

HUANG, J.I.; KAZMI, N.; DURBHAKULA, M.M.; HERING, T.M.; YOO, J.U.; JOHNSTONE, B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. **Journal of Orthopaedic Research**, v.23, n.6, p.1383-1389, 2005. DOI: 10.1016/j.orthres.2005.03.018.

HUANG, W.; ZHOU, X.; LEFEBVRE, V.; DE CROMBRUGGHE, B. Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, n.11, p.4149-4158, 2000. DOI: 10.1128/MCB.20.11.4149-4158.2000.

- IZADPANA, R.; TRYGG, C.; PATEL, B.; KRIEDT, C.; DUFOUR, J.; GIMBLE, J.M.; BUNNELL, B.A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.99, n.5, p.1285–1297, 2006. DOI: 10.1002/jcb.20904.
- JAGIELSKI, M.; WOLF, J.; MARZAHN, U.; VÖLKER, A.; LEMKE, M.; MEIER, C.; ERTEL, W.; GODKIN, O.; ARENS, S.; SCHULZE-TANZIL, G. The influence of IL-10 and TNF α on chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional cultures. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.9, p.15821-1544, 2014. DOI: 10.3390/ijms150915821.
- 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. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0023.
- KATSARA, O.; MAHAIRA, L.G.; ILIOPOULOU, E.G.; MOUSTAKI, A.; ANTSAKLIS, A.; LOUTRADIS, D.; STEFANIDIS, K.; BAXEVANIS, C.N.; PAPAMICHAIL, M.; PEREZ, S.A. Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v.20, n.9, p.1549-1561, 2011. DOI: 10.1089/scd.2010.0280.
- KESTENDJIEVA, S.; KYURKCHIEV, D.; TSVETKOVA, G.; MEHANDJIEV, T.; DIMITROV, A.; NIKOLOV, A.; KYURKCHIEV, S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. **Cell Biology International**, v.32, n.7, p.724-732, 2008. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.02.002.
- KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v.24, n.5, p.1294-1301, 2006. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342.
- KIM, H.J.; IM, G.I. Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: greater doses of growth factor are necessary. **Journal of Orthopaedic Research**, v.27, n.5, p.612-619, 2009. DOI: 10.1002/jor.20766.
- KINGHAM, P.J.; KALBERMATTEN, D.F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S.J.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, v.207, n.2, p.267-274, 2007. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.06.029.
- KOCH, M.; MURRELL, J.R.; HUNTER, D.D.; OLSON, P.F.; JIN, W.; KEENE, D.R.; BRUNKEN, W.J.; BURGESSON, R.E. A novel member of the netrin family, β -netrin, shares homology with the β chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. **The Journal of Cell Biology**, v.151, n.2, p.221-234, 2000. DOI: 10.1083/jcb.151.2.221.

KOHLI, N.; WRIGHT, K.T.; SAMMONS, R.L.; JEYS, L.; SNOW, M.; JOHNSON, W.E.B. An *in vitro* comparison of the incorporation, growth, and chondrogenic potential of human bone marrow versus adipose tissue mesenchymal stem cells in clinically relevant cell scaffolds used for cartilage repair. **Cartilage**, v.6, n.4, p.252-263, 2015. DOI: 10.1177/1947603515589650.

LEE, J.W.; KIM, Y.H.; KIM, S.H.; HAN, S.H.; HAHN, S.B. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. **Yonsei Medical Journal**, v.45, n.Suppl. p.41-47, 2004a. DOI: 10.3349/ymj.2004.45.Suppl.41.

LEE, R.H.; KIM, B.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H.S.; 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, 2004b. DOI: 10.1159/000080341.

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, n.1, p.69-75, 2001. DOI: 10.1053/joca.2001.0447.

LEFEBVRE, V.; DE CROMBRUGGHE, B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. **Matrix Biology**, v.16, n.9, p.529-540, 1998. DOI: 10.1016/S0945-053X(98)90065-8.

LEIJTEN, J.; MOREIRA TEIXEIRA, L.S.; BOLANDER, J.; JI, W.; VANSPAUNEN, B.; LAMMERTYN, J.; SCHROOTEN, J.; LUYTEN, F.P. Bioinspired seeding of biomaterials using three dimensional microtissues induces chondrogenic stem cell differentiation and cartilage formation under growth factor free conditions. **Scientific Reports**, v.6, n.1, p.1-12, 2016. DOI: 10.1038/srep36011.

LEVI, B.; LONGAKER, M.T. Concise review: adipose derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. **Stem Cells**, v.29, n.4, p.576-582, 2011. DOI: 10.1002/stem.612.

LI, C.Y.; WU, X.Y.; TONG, J.B.; YANG, X.X.; ZHAO, J.L.; ZHENG, Q.F.; ZHAO, G.B.; MA, Z.J. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. **Stem Cell Research & Therapy**, v.6, n.1, p.1-13, 2015. DOI: 10.1186/s13287-015-0066-5.

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.7, n.2, p.269-291, 2011. DOI: 10.1007/s12015-010-9193-7.

LIU, S.; ZHANG, E.; YANG, M.; LU, L. Overexpression of Wnt11 promotes chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in synergism with TGF- β . **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.390, n.1, p.123-131, 2014. DOI: 10.1007/s11010-014-1963-0.

LIU, T.M.; MARTINA, M.; HUTMACHER, D.W.; HUI, J.H.P.; LEE, E.H.; LIM, B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow-and

adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. **Stem Cells**, v.25, n.3, p.750-760, 2007. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0394.

LOTFY, A.; SALAMA, M.; ZAHRAN, F.; JONES, E.; BADAWEY, A.; SOBH, M. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. **International Journal of Stem Cells**, v.7, n.2, p.135-142, 2014. DOI: 10.15283/ijsc.2014.7.2.135.

MARA, C.S.; DUARTE, A.S.S.; SARTORI, A.; LUZO, A.C.; SAAD, S.T.O.; COIMBRA, I.B. Regulation of chondrogenesis by transforming growth factor- β 3 and insulin-like growth factor-1 from human mesenchymal umbilical cord blood cells. **The Journal of Rheumatology**, v.37, n.7, p.1519-1526, 2010. DOI: 10.3899/jrheum.091169.

MAROLT, D.; KNEZEVIC, M.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bone tissue engineering with human stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v.1, n.10, p.1-11, 2010. DOI: 10.1186/scrt10.

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. DOI: 10.3727/096368909X478560.

MEHLHORN, A.T.; NIEMEYER, P.; KAISER, S.; FINKENZELLER, G.; STARK, G.B.; SÜDKAMP, N.P.; SCHMAL, H. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. **Tissue Engineering**, v.12, n.10, p.2853-2862, 2006. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2853.

MERCERON, C.; VINATIER, C.; PORTRON, S.; MASSON, M.; AMIAUD, J.; GUIGAND, L.; CHÉREL, Y.; WEISS, P.; GUICHEUX, J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.298, n.2, p.355-364, 2010. DOI: 10.1152/ajpcell.00398.2009.

MITCHELL, J.B.; MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; FLOYD, Z.E.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; STORMS, R.W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J.M. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. **Stem Cells**, v.24, n.2, p.376-385, 2006. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0234.

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. DOI: 10.1016/j.joca.2008.03.003.

MIZUNO, H.; TOBITA, M.; UYSAL, A.C. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. **Stem Cells**, v.30, n.5, p.804-810, 2012. DOI: 10.1002/stem.1076.

MOHAMED-AHMED, S.; FRISTAD, I.; LIE, S.A.; SULIMAN, S.; MUSTAFA, K.; VINDENES, H.; IDRIS, S.B. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. **Stem Cell Research & Therapy**, v.9, n.1, p.1-15, 2018. DOI: 10.1186/s13287-018-0914-1.

MOSNA, F.; SENSEBÉ, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. **Stem Cells and Development**, v.19, n.10, p.1449-1470, 2010. DOI: 10.1089/scd.2010.0140.

MURPHY, M.K.; HUEY, D.J.; HU, J.C.; ATHANASIOU, K.A. TGF- β 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. **Stem Cells**, v.33, n.3, p.762-773, 2015. DOI: 10.1002/stem.1890.

NAKANISHI, C.; NAGAYA, N.; OHNISHI, S.; YAMAHARA, K.; TAKABATAKE, S.; KONNO, T.; HAYASHI, K.; KAWASHIRI, M.; TSUBOKAWA, T.; YAMAGISHI, M. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. **Circulation Journal**, v.75, n.9, p.2260-2268, 2011. DOI: 10.1253/circj.CJ-11-0246.

NOËL, D.; CATON, D.; ROCHE, S.; BONY, C.; LEHMANN, S.; CASTEILLA, L.; JORGENSEN, C.; COUSIN, B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal–stromal cells despite similar differentiation potentials. **Experimental Cell Research**, v.314, n.7, p.1575-1584, 2008. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.12.022.

OKUBO, Y.; REDDI, A.H. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.306, n.1, p.186-190, 2003. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)00912-4.

OSUGI, M.; KATAGIRI, W.; YOSHIMI, R.; INUKAI, T.; HIBI, H.; UEDA, M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. **Tissue Engineering Part A**, v.18, n.13-14, p.1479-1489, 2012. DOI: 10.1089/ten.tea.2011.0325.

PACHÓN-PEÑA, G.; YU, G.; TUCKER, A.; WU, X.; VENDRELL, J.; BUNNELL, B.A.; GIMBLE, J.M. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. **Journal of Cellular Physiology**, v.226, n.3, p.843-851, 2011. DOI: 10.1002/jcp.22408.

PAGANI, S.; BORSARI, V.; VERONESI, F.; FERRARI, A.; CEPOLLARO, S.; TORRICELLI, P.; FILARDO, G.; FINI, M. Increased chondrogenic potential of mesenchymal cells from adipose tissue versus bone marrow-derived cells in osteoarthritic in vitro models. **Journal of Cellular Physiology**, v.232, n.6, p.1478-1488, 2017. DOI: 10.1002/jcp.25651.

PARK, H.W.; SHIN, J.S.; KIM, C.W. Proteome of mesenchymal stem cells. **Proteomics**, v.7, n.16, p.2881-2894, 2007. DOI: 10.1002/pmic.200700089.

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. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.043.

PATTERSON, M.; CHAN, D.N.; HA, I.; CASE, D.; CUI, Y.; HANDEL, B.V.; MIKKOLA, H.K.A.; LOWRY, W.E. Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. **Cell Research**, v.22, n.1, p.178-193, 2012. DOI: 10.1038/cr.2011.133.

PEVSNER-FISCHER, M.; LEVIN, S.; ZIPORI, D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.7, n.3, p.560-568, 2011. DOI: 10.1007/s12015-011-9229-7.

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. DOI: 10.1126/science.284.5411.14.

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: Reviews**, v.16, n.4, p.435-444, 2010. DOI: 10.1089/ten.teb.2009.0705.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOUSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; ABBAL, M.; LAHARRAGUE, P.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; BLANCHER, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, v.129, n.1, p.118-129, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.

RADA, T.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.7, n.1, p.64-76, 2011. DOI: 10.1007/s12015-010-9147-0.

RANDAU, T.M.; SCHILDBERG, F.A.; ALINI, M.; WIMMER, M.D.; HADDOUTI, E.M.; GRAVIUS, S.; ITO, K.; STODDART, M.J. The effect of dexamethasone and triiodothyronine on terminal differentiation of primary bovine chondrocytes and chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells. **Plos One**, v.8, n.8, p.e72973, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0072973.

RAJABZADEH, N.; FATHI, E.; FARAHZADI, R. Stem cell-based regenerative medicine. **Stem Cell Investigation**, v.6, n.18, p.1-11, 2019. DOI: 10.21037/sci.2019.06.04.

RAPOSIO, E.; BONOMINI, S.; CALDERAZZI, F. Isolation of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for bone repair. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v.102, n.7, p.909-912, 2016. DOI: 10.1016/j.otsr.2016.07.006.

RASTEGAR, F.; SHENAQ, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.Q.; HE, B.C.; CHEN, L.; ZUO, G.W.; LUO, 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. DOI: 10.4252/wjsc.v2.i4.67.

ROBSON, H.; SIEBLER, T.; STEVENS, D.A.; SHALET, S.M.; WILLIAMS, G.R. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. **Endocrinology**, v.141, n.10, p.3887-3897, 2000. DOI: 10.1210/endo.141.10.7733.

RODRÍGUEZ-FUENTES, D.E.; FERNÁNDEZ-GARZA, L.E.; SAMIA-MEZA, J.A.; BARRERA-BARRERA, S.A.; CAPLAN, A.I.; BARRERA-SALDAÑA, H.A. Mesenchymal stem cells current clinical applications: a systematic review. **Archives of Medical Research**, v.52, n.1, p.93-101, 2021. DOI: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006.

RONZIERE, M.C.; PERRIER, E.; MALLEIN-GERIN, F.; FREYRIA, A.M. Chondrogenic potential of bone marrow-and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. **Bio-medical Materials and Engineering**, v.20, n.3-4, p.145-158, 2010. DOI: 10.3233/BME-2010-0626.

SAKAGUCHI, Y.; SEKIYA, I.; YAGISHITA, K.; MUNETA, T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. **Arthritis & Rheumatism**, v.52, n.8, p.2521-2529, 2005. DOI: doi.org/10.1002/art.21212.

SATIJA, N.K.; SINGH, V.K.; VERMA, Y.K.; GUPTA, P.; SHARMA, S.; AFRIN, F.; SHARMA, M.; SHARMA, P.; TRIPATHI, R.P.; GURUDUTTA, G.U. Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, n.11-12, p.4385-4402, 2009. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00857.x.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells- basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells**, v.25, n.4, p.818-827, 2007. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0589.

SCHMITT, B.; RINGE, J.; HÄUPL, T.; NOTTER, M.; MANZ, R.; BURMESTER, G.R.; SITTINGER, M.; KAPS, C. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. **Differentiation**, v.71, n.9-10, p.567-577, 2003. DOI: 10.1111/j.1432-0436.2003.07109003.x.

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. DOI: 10.1007/s00441-004-1075-3.

SEMBA, I.; NONAKA, K.; TAKAHASHI, I.; TAKAHASHI, K.; DASHNER, R.; SHUM, L.; NUCKOLLS, G.H.; SLAVKIN, H.C. Positionally-dependent chondrogenesis induced by BMP4 is co-regulated by sox9 and msx2. **Developmental Dynamics**, v.217, n.4, p.401-414, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(200004)217:4<401::AID-DVDY7>3.0.CO;2-D.

SHANG, J.; LIU, H.; LI, J.; ZHOU, Y. Roles of hypoxia during the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v.9, n.2, p.141-147, 2014. DOI: 10.2174/1574888x09666131230142459.

SHANTI, R.M.; LI, W.J.; NESTI, L.J.; WANG, X.; TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, n.8, p.1640-1647, 2007. DOI: 10.1016/j.joms.2007.04.008.

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. DOI: 10.1002/jcb.22412.

SHI, M.; LIU, Z.W.; WANG, F.S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.164, n.1, p.1-8, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x.

SILVA, I.C. Células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas Wistar idosas não diminuem o potencial de diferenciação condrogênico sob efeito da triiodotironina. Orientador: Jankerle Neves Boeloni. 2019. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

SOLCHAGA, L.A.; PENICK, K.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I.; WELTER, J.F. Fibroblast growth factor-2 enhances proliferation and delays loss of chondrogenic potential in human adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v.16, n.3, p.1009-1019, 2009. DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0100.

SOLCHAGA, L.A.; PENICK, K.; WELTER, J.F. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. In: **Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications**. Humana Press, 2011. p.253-278.

SPILA, D.O.; MARANHÃO, R.P.A.; OCARINO, N.M.; DE LIMA, J.T.B.; MELO, F.G.; BOELONI, J.N.; SERAKIDES, R. Triiodothyronine has no enhancement effect on the osteogenic or chondrogenic differentiation of equine adipose tissue stem cells. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.86, p.102895, 2020. DOI: 10.1016/j.jevs.2019.102895.

STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem Cells and Development**, v.21, n.14, p.2724-2752, 2012. DOI: 10.1089/scd.2011.0722.

- STOLZING, A.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; SCUTT, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.129, n.3, p.163-173, 2008. DOI: 10.1016/j.mad.2007.12.002.
- TAE, S.K.; LEE, S.H.; PARK, J.S.; IM, G.I. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomedical Materials**, v.1, n.2, p.63-71, 2006. DOI: 10.1088/1748-6041/1/2/003.
- TOYODA, M.; MATSUBARA, Y.; LIN, K.; SUGIMACHI, K.; FURUE, M. Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues. **Cell Biochemistry and Function**, v.27, n.7, p.440-447, 2009. DOI: 10.1002/cbf.1591.
- TRIVILIN, L.O.; CASSIANO, D.C.; MENDES, S.O.; BORÇOI, A.R.; ARCHANJO, A.B.; CUNHA, E.R.; PULIDO, J.Z.; BOELONI, J.N.; CONFORTI, A.M.A.S. Exposure to cigarette smoke alters AgNOR number and HIF-1alpha expression in colorectal tubular adenocarcinoma in rats. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.10, n.3, p.3822-3829, 2017.
- 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. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.07.037.
- VIDAL, M.A.; ROBINSON, S.O.; LOPEZ, M.J.; PAULSEN, D.B.; BORKHSENIUS, O.; JOHNSON, J.R.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Surgery**, v.37, n.8, p.713-724, 2008. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2008.00462.x.
- VOGA, M.; KOVAC, V.; MAJDIC, G. Comparison of canine and feline adipose-derived mesenchymal stem cells/medicinal signaling cells with regard to cell surface marker expression, viability, proliferation, and differentiation potential. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, n.610240, p.1-13, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2020.610240.
- VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B.E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v.19, n.3, p.279-289, 2010. DOI: 10.3727/096368909X481764.
- VISHNUBALAJI, R.; AL-NBAHEEN, M.; KADALMANI, B.; ALDAHMAH, A.; RAMESH, T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow-and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. **Cell and Tissue Research**, v.347, n.2, p.419-427, 2012. DOI: 10.1007/s00441-011-1306-3.
- 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. DOI: 10.1359/jbmr.070806.

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.279-286, 2014. DOI: 10.1590/1414-431X20133539.

WATANABE, H.; YAMADA, Y. Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. **Nature Genetics**, v.21, n.2, p.225-229, 1999. DOI: 10.1038/6016.

YOSHIMURA, K.; SUGA, H.; ETO, H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. **Regenerative Medicine**, v.4, n.2, p.265-273, 2009. DOI: 10.2217/17460751.4.2.265.

YU, D.A.; HAN, J.; KIM, B.S. Stimulation of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **International Journal Of Stem Cells**, v.5, n.1, p.16-22, 2012. DOI: 10.15283/ijsc.2012.5.1.16.

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.68, p.1-7, 2014. DOI: 10.1186/s13018-014-0068-5.

ZHOU, Q.; LI, B.; ZHAO, J.; PAN, W.; XU, J.; CHEN, S. IGF-I induces adipose derived mesenchymal cell chondrogenic differentiation in vitro and enhances chondrogenesis in vivo. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v.52, n.3, p.356-354, 2016. DOI: 10.1007/s11626-015-9969-9.

ZHU, Y.; LIU, T.; SONG, K.; FAN, X.; MA, X.; CUI, Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell Biochemistry and Function**, v.26, n.6, p.664-675, 2008. DOI: 10.1002/cbf.1488.

ZHU, M.; KOHAN, E.; BRADLEY, J.; HEDRICK, M.; BENHAIM, P.; ZUK, P. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.3, n.4, p.290-301, 2009. DOI: 10.1002/term.165.

ZIMMERMANN, P.; BOEUF, S.; DICKHUT, A.; BOEHMER, S.; OLEK, S.; RICHTER, W. Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. **Arthritis & Rheumatism**, v.58, n.9, p.2743-2753, 2008. DOI: 10.1002/art.23736.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-228, 2001. DOI: 10.1089/107632701300062859.

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. DOI: 10.1091/mbc.e02-02-0105.