



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Gustavo Paris Claudino

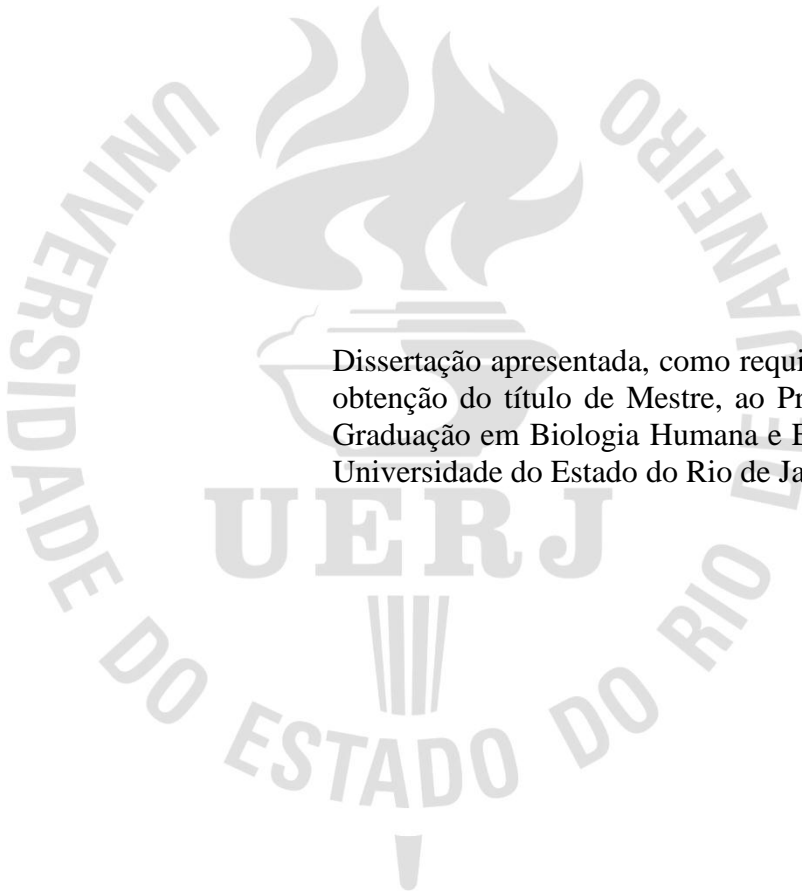
**Caracterização das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana  
de pacientes com osteoartrite purificadas por adesão diferencial**

Rio de Janeiro

2019

Gustavo Paris Claudino

**Caracterização das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana de pacientes com osteoartrite purificadas por adesão diferencial**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Alves Thole

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C615 Claudino, Gustavo Paris.  
Caracterização das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana de  
pacientes com osteoartrite purificadas por adesão diferencial / Gustavo Paris  
Claudino. – 2019.

83f.

Orientadora: Alessandra Alves Thole.

Mestrado (Dissertação) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto  
de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e  
Experimental.

1. Células-tronco - Teses. 2. Células-Tronco Mesenquimais. 3. Osteoartrite. I.  
Thole, Alessandra Alves. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto  
de Biologia Humana e Experimental. III. Título.

CDU 616.72

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB/7 – 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Gustavo Paris Claudino

**Caracterização das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana de pacientes com osteoartrite purificadas por adesão diferencial**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de maio de 2019.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alessandra Alves Thole (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Simone Nunes de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. Romulo Galvani

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

## **DEDICATÓRIA**

Dedico o presente trabalho em homenagem póstuma aos meus avós. Que do céu façam suas bênçãos chover.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Gisele e Sérgio, pelo amor, carinho e ajuda imensurável;

À minha namorada Ana, pela paciência, compreensão e companheirismo;

Ao meu orientador Dr. Alex Balduino, pelos puxões de orelha, conversas e todo conhecimento passado para mim;

À minha orientadora, Dra. Alessandra Thole, pela paciência e confiança depositados em mim.

À Dra. Laís de Carvalho, coordenadora do Laboratório de Pesquisa em Células-tronco, e equipe pela recepção simpática, acolhimento e conversas agradáveis;

Às professoras Dra. Simone de Carvalho e Dra. Erika Cortez pela prontidão e disponibilidade em avaliar o presente trabalho com tamanha boa-vontade. Obrigado!

Aos membros do LPCT, pelos aprendizados e discussões semanais engrandecedoras.

À Dra Verônica Morandi e M.Sc. Francisco Vardiero, pela colaboração e acolhimento no LabAngio durante os experimentos de tubulogênese;

À Dra Adriana Bonomo e Dr. Rômulo Galvani, pela colaboração e acolhimento durante os longos experimentos de citometria, principalmente durante as citometrias de guerrilha;

À todos os membros dos laboratórios de colaboração, aonde todos foram mais do que gentis provendo todo o auxílio e boa companhia necessários. Obrigado pela hospitalidade!

À minha amiga Papata, por servir de exemplo de bom-humor, disposição e coragem em nunca deixar se abalar. Desejo ter metade dessa energia!

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

## RESUMO

CLAUDINO, Gustavo Paris. *Caracterização das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana de pacientes com osteoartrite purificadas por adesão diferencial*. 2019. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Células-tronco mesenquimais (CTM) de medula óssea apresentam grande potencial terapêutico devido a sua multipotencialidade e propriedades imunoreguladoras e anti-apoptóticas. Entretanto, a heterogeneidade marcante presente na população denominada como CTM, uma vez que são isoladas e identificadas por sua capacidade de adesão ao plástico, aliada à ausência de marcadores precisos para caracterizá-las, dificulta a purificação das células multipotentes. Como a célula mais indiferenciada resguarda maior potencial proliferativo e de diferenciação, o presente estudo propõe um protocolo de isolamento de CTM de medula óssea adesão-dependente, com cultivo do sobrenadante normalmente descartado após 3 dias, identificadas como CTM de adesão lenta (CTM-AL). Os resultados demonstraram que as CTM-AL apresentaram maiores colônias primárias, além de maior frequência e tamanho de colônias secundárias que a população de CTM isolada pelo método padrão-ouro, de adesão rápida (CTM-AR). Além disso, quando diferenciadas nas linhagens adipogênica e osteogênica, as CTM-AL demonstraram maior capacidade de diferenciação adipogênica que as CTM-AR, enquanto mantiveram a mesma capacidade de diferenciação osteogênica. Na caracterização por citometria, as células de ambas as populações apresentaram, majoritariamente, o fenótipo  $CD45^-/CD31^-/CD73^+/CD90^+/CD29^+/CD44^+$ . As CTM-AR apresentaram maior frequência de células  $CD45^+$ ,  $HLA^+$  e  $CD184^+$ , enquanto as CTM-AL mostraram-se enriquecida em células  $CD24^+$ ,  $CD49d^+$  e  $CD146^+$ . Além da frequência, a intensidade de fluorescência de células  $CD146^+$  também foi maior em CTM-AL. Ademais,  $\alpha$ -actina de músculo liso foi detectada nas células de ambas as populações. Como a presença de  $CD146$  e  $\alpha$ -actina de músculo liso está fortemente correlacionada com a posição anatômica perivascular, aonde CTM indiferenciadas se localizam, seu papel na formação e desenvolvimento de vasos endoteliais foi avaliado. Células endoteliais da microvasculatura humana (HMEC)-GFP<sup>+</sup> foram co-cultivadas em matrigel com CTM-AR ou CTM-AL PKH26red<sup>+</sup> (5:1), por 72 horas. Durante todo o experimento, observamos CTM-AR e CTM-AL adjacentes aos túbulos formados, de maneira abluminal. Em ambos os co-cultivos houve uma ação inibitória da formação de vasos durante 72 horas. Dessa forma, as CTM-AL referem-se à população com maior capacidade proliferativa, menor grau de contaminação celular ( $CD45^+/HLA^+$ ) e enriquecida em células  $CD146^+$ . Além disso, as CTM-AL são capazes de organizar e estabilizar rede tubular endotelial, mostrando perfil semelhante a pericito. Assim, utilizando o protocolo aqui proposto, purificamos uma população de CTM com perfil perivascular, mais indiferenciadas. Futuras investigações determinarão o potencial terapêutico e a identificação do fenótipo preciso das CTM multipotentes.

Palavras chaves: Célula-tronco mesenquimal. Purificação. Adesão. Perivascular. CD146

## ABSTRACT

CLAUDINO, Gustavo Paris. *Mesenchymal stem cell purification and characterization from osteoarthritic*. 2019. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) have been thoroughly explored due to its therapeutic effects as multipotent, immunosuppressing and anti-apoptotic cells. However, since MSC are isolated and identified from marrow cells using plastic adhesion and precise cell markers are absent, marked heterogeneity persists in the so-called MSC population. Therefore, progenitors and differentiated cells are mixed in MSC population, hampering true multipotent MSC isolation and characterization. The present study proposes an adhesion-based protocol to isolate bone marrow MSC by culturing the commonly discarded supernatant after 3 days culture, named here as late-adhesion MSC (MSC-LA). MSC-LA formed larger primary colonies, in addition to larger secondary colonies and frequency than the standard isolation protocol (MSC-RA). Besides, MSC-LA displayed clearly more adipogenic capacity while maintaining equal osteogenic potential as MSC-RA. In cytometry characterization, most cells presented the CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> phenotype for both populations. While MSC-RA showed greater CD45<sup>+</sup>, HLA<sup>+</sup> and CD184<sup>+</sup> cells, MSC-LA displayed enhanced purity in CD24<sup>+</sup>, CD49d<sup>+</sup> and CD146<sup>+</sup> cells. Also, CD146<sup>+</sup> MSC-LA cells also had higher median fluorescent intensity. Moreover, smooth muscle  $\alpha$ -actin was present in cells from both populations. Since CD146<sup>+</sup> and smooth muscle  $\alpha$ -actin<sup>+</sup> are highly correlated to perivascular cells, which are enriched for undifferentiated MSC, we sought to define their role in vessel formation and development. Human microvascular endothelial cells-GFP<sup>+</sup> were co-cultivated in matrigel with MSC-AR or MSC-AL PKH26red<sup>+</sup> (5:1), for 72hours. Throughout the whole experiment, both MSCs were observed surrounding vessels at the abluminal side in tight proximity to endothelial cells. Both MSC populations induced anti-angiogenic effects during 72 hours. Therefore, a higher proliferation potential, less CD45<sup>+</sup> and HLA<sup>+</sup> contamination while enriched for CD146<sup>+</sup> cells was seen in the MSC-LA group. As noted, MSC-LA is capable of regulating and stabilizing the endothelial vessels. Thus, MSC-LA correlates to a perivascular MSC population, which presents more undifferentiated characteristics, confirming enhanced purity obtained by the adhesion-based protocol. Future work will determine the therapeutic potential and precise phenotype for primitive MSC.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Purification. Perivascular. Adhesion. CD146.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
1.1 <b>Osteoartrite</b> .....	12
1.1.1 <u>Processo Patológico</u> .....	13
1.1.2 <u>Tratamentos</u> .....	14
1.2 <b>Células-tronco</b> .....	15
1.2.1 <u>Classificação das células-tronco</u> .....	16
1.2.2 <u>Mecanismos de Repressão da Diferenciação das Células-Tronco</u> .....	16
1.3 <b>Célula-tronco Adulta</b> .....	18
1.4 <b>Células Progenitoras versus Células-tronco</b> .....	18
1.5 <b>Células-tronco Mesenquimais: Histórico e Definição</b> .....	19
1.5.1 <u>Heterogeneidade das Células-tronco Mesenquimais</u> .....	20
1.5.2 <u>Células-tronco Mesenquimais e Pericitos</u> .....	21
1.6 <b>Medula Óssea</b> .....	23
1.7 <b>Nicho celular</b> .....	26
1.7.1 <u>Nicho Hematopoiético e as Células-tronco Mesenquimais</u> .....	27
<b>2 OBJETIVO</b> .....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 <b>Obtenção das Amostras</b> .....	30
3.2 <b>Processamento das Amostra</b> .....	30
3.3 <b>Ensaio de Eficiência de Formação de Colônia Primária</b> .....	31
3.3.1 <u>Unidade de Formação de Colônia - Adesão Rápida (CFU-AR)</u> .....	31
3.3.2 <u>Unidade de Formação de Colônia - Adesão Lenta (CFU-AL)</u> .....	32
3.4 <b>Ensaio de Formação de Colônia Secundária</b> .....	33
3.5 <b>Análise da Capacidade Proliferativa de CFU-AR e CFU-AL Primária e Secundária</b> .....	34
3.6 <b>Diferenciação das CTM nas Linhagens Osteogênica e Adipogênica</b> .....	34
3.6.1 <u>Diferenciação Osteogênica In Vitro</u> .....	34
3.6.2 <u>Diferenciação Adipogênica In Vitro</u> .....	35
3.7 <b>Caracterização Imunofenotípica das CTMs por Citometria de Fluxo</b> .....	35

3.8	<b>Imunocitoquímica das CTM.....</b>	36
3.9	<b>Ensaio de Tubulogênese com Células Endoteliais HMEC, CTM-AR e CTM-AL.....</b>	37
3.9.1	<u>Transfecção das Células Endoteliais da linhagem HMEC com vetor-proteína verde fluorescente (HMEC-GFP<sup>+</sup>).....</u>	37
3.9.2	<u>Marcação Fluorescente Intravital de CTM-AR e CTM-AL com Intercalador Lipídico PKH26red (CTM-PKH26red<sup>+</sup>).....</u>	38
3.10	<b>Análises Estatísticas.....</b>	38
4.	<b>RESULTADOS.....</b>	39
4.1	<b>Ensaio de Eficiência de Formação de Colônia Primária.....</b>	39
4.1.1	<u>Quantificação Celular das Colônias Primárias.....</u>	40
4.2	<b>Eficiência na Formação de Colônia Secundária.....</b>	41
4.2.1	<u>Quantificação Celular das Colônias Secundárias.....</u>	42
4.3	<b>Diferenciação nas Linhagens Osteogênica e Adipogênica.....</b>	43
4.4	<b>Caracterização fenotípica das subpopulações de Células-Tronco Mesenquimais de Adesão Rápida (AR) e Adesão Lenta (AL).....</b>	45
4.5	<b>Avaliação da Mediana de Intensidade de Fluorescência das CTMs CD146<sup>+</sup> ...</b>	48
4.6	<b>Citometria das Subpopulações “Pequenas” e “Grandes”.....</b>	49
4.7	<b>CTM-AR e CTM-AL são positivas para <math>\alpha</math>-actina de musculo liso.....</b>	52
4.8	<b>Ensaio de Tubulogênese utilizando célula endotelial HMEC-GFP<sup>+</sup> e CTM-PKH26red<sup>+</sup>.....</b>	54
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	60
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	69
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	70
	<b>ANEXO A – Imagem descritiva da definição de estruturas tubulares da tubulogênese.....</b>	81
	<b>ANEXO B – Comitê de Ética.....</b>	82
	<b>ANEXO C – Submissão de Artigo.....</b>	83

## INTRODUÇÃO

Doenças músculo-esqueléticas são distúrbios que afetam o sistema locomotor, gerando impactos econômicos e sociais diretos e indiretos. A perda de qualidade de vida se estabelece pela demanda de um tratamento contínuo, posto que são majoritariamente doenças crônicas, seguida pela queda de produtividade profissional, social e demais aspectos da vida dos indivíduos afetados.

Mais de 30% da população americana e europeia apresentam algum grau de doença músculo-esquelética, as quais lideram em anos de vida saudável perdidos entre todas as doenças (PERRUCCIO, A. V. et al. 2018). Na Europa, por exemplo, 60% dos indivíduos que apresentam invalidez foram decorrentes de doenças músculoesqueléticas, com perda laboral equivalente a 2% do PIB da união europeia (BEVAN, S. 2015). No Brasil, de acordo com o Anuário Estatístico da Previdência Social, doenças músculoesqueléticas representam 20% (650.000) das aposentadorias por invalidez, o que equivale a um gasto de R\$888 milhões anuais (BRASIL, Estatístico da Previdência Social/Ministério da Fazenda. 2017).

Dentre as doenças músculoesqueléticas mais debilitantes, a artrite e dores nas costas e/ou pescoço lideram como principal causa de invalidez no trabalho em países desenvolvidos (PERRUCCIO, A. V. et al. 2018; MARCH, L. et al. 2014). A osteoartrite é uma das principais doenças músculo-esqueléticas, afetando 4,7% da população mundial (MARCH, L. et al. 2014). É uma doença crônica, não letal, caracterizada pela dor e pela restrição de movimento das articulações, dificultando a realização de atividades cotidianas. Causada pela deterioração da cartilagem que reveste as extremidades ósseas das articulações, a osteoartrite também afeta o tecido ósseo adjacente (subcondral), atingindo principalmente coluna, joelho, mãos e quadril. Sabe-se que sua causa é multifatorial e o desencadeamento da doença decorre de inflamação branda, porém continuada, que evolui em degeneração da articulação acometida (GLYN-JONES, S. et al .2015). Não há cura para a osteoartrite, ou seja, as alterações teciduais não são completamente revertidas. Dessa maneira, os tratamentos empregados têm como objetivo melhorar a qualidade de vida do paciente, aliviando os sintomas. Geralmente envolvem mudança do estilo de vida do paciente e uso de analgésicos e anti-inflamatórios, podendo evoluir para intervenções cirúrgicas e substituição da articulação por prótese sintética. Entretanto, estes tratamentos não lidam eficientemente com os primórdios da doença e sua evolução.

Uma das intervenções cirúrgicas mais empregadas no tratamento de osteoartrite, dado seu caráter menos invasivo, é a microfratura por artroscopia. Nesse procedimento, pequenos furos são feitos no osso subcondral permitindo a migração de células da medula óssea e sangue para o sítio de lesão. Como entre estas células existem células-tronco mesenquimais condrogênicas, as células do próprio paciente formam uma nova fibrocartilagem sobre a cartilagem degradada. Embora a fibrocartilagem formada apresente grande melhora para o paciente, a mesma não possui a biomecânica adequada da cartilagem hialina (KREUZ, P.C. et al 2006; WHITE, J.L. et al. 2018 BOTHE, F. et al. 2019).

Atualmente, devido à alarmante frequência de casos e à falta de tratamentos que revertam a osteoartrite, pesquisas envolvendo regeneração tecidual se pronunciam como de suma importância para a qualidade de vida de pacientes osteoartíticos e para a sociedade como um todo. Assim, a terapia celular aliada à bioengenharia de tecidos são poderosas ferramentas para substituir o tecido lesado por um novo tecido funcional. Dentre os possíveis candidatos celulares, as células-tronco apresentam grande potencial de utilização em ampla gama de degenerações, graças à sua capacidade proliferativa e de diferenciação em diversos tecidos (WHITE, J.L. et al 2018; MO, M. et al. 2016; LIU, L et al .2018; LAW, L. et al 2018; BOTHE, F. et al. 2019).

Em especial, as células-tronco mesenquimais tornaram-se de grande interesse por serem encontradas no indivíduo/tecido adulto, serem de fácil obtenção e capazes de diferenciar-se em cartilagem, osso e tecido adiposo. Diversos estudos sugerem a utilização destas para diferentes tipos de doença, uma vez que secretam moléculas anti-inflamatorias, antiapoptóticas e imunomodulatórias, melhorando o quadro do tecido lesionado (LAW, L. et al 2018; LU, S. et al. 2017; ZHAO, Q.;REN, H.;HAN, Z. 2016; ; HONGYAN, T. et al. 2016; LEIBACHER, J.;HENSCHLER, R. 2016). Contudo, a população atualmente chamada de células-tronco mesenquimais ainda se apresenta altamente heterogênea, contendo células totalmente diferenciadas, progenitoras e células-tronco. Tal heterogeneidade celular dificulta a identificação das células que realmente geram efeitos regeneradores daquelas que não apresentam benefício terapêutico. Além disso, podem causar prejuízo ao paciente caso não se diferenciem no tecido adequado, gerando diferenciação indesejada (MORAVCIKOVA, E. et al 2018; KURIYAN A.E. et al. 2017; BOTHE, F. et al. 2019; WHITE, J.L. et al. 2018; DOULEH, D.;FRANK, R.M. 2018; CHU, C.R. et al. 2018; KREUZ, P.C. 2006). Considerando este cenário, é de grande interesse isolar e caracterizar a população de células-tronco mais indiferenciadas possível, uma vez que elas possuem maior capacidade de diferenciação no tecido desejado.

Portanto, o presente trabalho visou isolar e identificar uma população homogênea de células-tronco mesenquimais indiferenciadas, que apresente potencial terapêutico, provenientes da medula óssea de pacientes osteoarthríticos. Servindo de base para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos que governam a migração, proliferação e diferenciação dessas células em fibrocartilagem na terapia por microfratura, os efeitos da osteoartrite sobre as células-tronco mesenquimais e nos aproximarmos do fenótipo das células-tronco mesenquimais *in situ*.

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Osteoartrite

A Osteoartrite é uma doença crônica extremamente relevante no contexto social-econômico por ser altamente frequente na população, causar grande debilitação aos pacientes acometidos, demandar tratamento contínuo e ser uma das principais causas de aposentadoria por invalidez (PERRUCCIO, A. V. et al. 2018). A doença é caracterizada pela diminuição do espaço intra-articular, comprometendo a articulação devido a alterações bioquímicas, metabólicas e fisiológicas que ocorrem na cartilagem hialina e no osso subcondral. Acomete indivíduos de todas as idades, tendo maior prevalência entre os indivíduos com mais de 55 anos, principalmente em mulheres (SUNDÉN, A. et al. 2018). Apesar de ser uma doença não-letal, a osteoartrite diminui acentuadamente a qualidade de vida dos pacientes ao causar dor debilitante e restrição de movimento, impedindo-os de realizar atividades físicas cotidianas como subir escadas, abaixar e caminhar. Nos Estados Unidos, mais de 19% da população acima de 45 anos apresenta alterações radiográficas compatíveis com a osteoartrite, porém nem todos irão desenvolver os sintomas (VARELA-EIRIN et al. 2018). Devido ao aumento da expectativa de vida, estima-se que em 2040 o número de pacientes sintomáticos chegue a 25,9% (78,4 milhões), sendo que em 44% destes (34,6 milhões), a doença se desenvolverá a ponto de limitar suas atividades (HOOTMAN, J.M. et al. 2016).

Apesar de afetar majoritariamente idosos, tal patologia não tem relação apenas com o envelhecimento, tendo sua incidência aumentada em relação a fatores como obesidade, sexo, hereditariedade, inflamação sistêmica (MARTEL-PELLETIER, J. et al. 2016), alta densidade mineral óssea (NEVITT, M.C. et al. 2010) e diabetes (LOUATI, K. et al. 2015). A obesidade não somente danifica a articulação pelo aumento de carga sobre a mesma e consequente desgaste físico, mas também favorece o surgimento da doença devido ao perfil inflamatório sistêmico (THIJSSSEN, E. et al. 2015). Outro possível fator desencadeador da osteoartrite é o trauma agudo ou crônico. Enquanto o trauma agudo envolve dano instantâneo ao tecido decorrente de algum acidente, o trauma crônico corresponde a uma atividade repetitiva que excede a capacidade da articulação em se proteger/regenerar. Em atividades de trabalho e esportes de alto impacto específicos, o uso e consequente desgaste das articulações pode causar o desenvolvimento de osteoartrite precoce.

### 1.1.1 Processo Patológico

O processo patológico pode ser iniciado a partir de diversos fatores, individualmente ou em conjunto, que ao causar alteração na articulação desencadeia o processo degenerativo. Conseqüentemente, instala-se um processo inflamatório brando, porém contínuo, que é chave para a deterioração da articulação acometida e desenvolvimento dos sintomas. O mecanismo responsável pelo desenvolvimento da osteoartrite ainda não foi completamente elucidado. Evidências apontam que a doença deve ser encarada de forma sistêmica, uma vez que é influenciada por mediadores sistêmicos da inflamação, inflamação advinda do envelhecimento, imunidade inata e inflamação branda decorrente da síndrome metabólica (MOBASHERI, A.; HENROTIN, Y. 2015).

A diminuição do espaço articular devido a deterioração da cartilagem que reveste as extremidades ósseas das articulações é a principal característica da osteoartrite. Com o dano e instalação do processo inflamatório tecidual, inicialmente os condrócitos exibem alta atividade de síntese, demonstrando estarem engajados no reparo do dano tecidual. Entretanto, a progressão e persistência da inflamação causa degeneração da matriz pericelular que envolve os condrócitos, que agora completamente expostos ao ambiente inflamatório, têm seu comportamento e fenótipo alterados. A complexidade da doença se dá em parte pela presença de condrócitos com diferentes perfis coexistindo na cartilagem. Por exemplo, alguns condrócitos se tornam senescentes, alterando as moléculas por ele secretadas, desregulando sua função, enquanto outros assumem irreversivelmente características semelhantes a fibroblastos (VARELA-EIRIN, M. et al. 2018). Além disso, a degradação da cartilagem ocasiona o contato direto entre as extremidades ósseas e, com a biomecânica alterada, as forças exercidas recaem sobre área de contato menor, de modo a induzir o remodelamento ósseo. O remodelamento se manifesta aumentando a porosidade óssea e afinando a placa subcondral. Assim, desenvolve-se esclerose óssea subcondral com formação osteofitária e aumento da secreção de líquido sinovial pela parede da cápsula sinovial, levando a formação de edema (LOESER, R.F.; COLLINS, J.A.; DIEKMAN, B.O. 2016). Esse inchaço inibe a ativação completa dos músculos que conectam os dois ossos da articulação por meio de reflexo espinhal (inibição artrogênica) que, combinado com a diminuição do uso dos músculos do membro, acarretam no enfraquecimento muscular (NEOGI, T. et al. 2009). Dessa forma, não só os ossos, mas também a cápsula articular, a membrana sinovial, os ligamentos, tendões e a musculatura peri-articular sofrem alterações teciduais. Como estes

tecidos são ricos em vasos sanguíneos e terminações nervosas, ao contrário da cartilagem, o surgimento da dor pode começar somente com o quadro já bastante avançado.

### 1.1.2 Tratamentos

Não há cura para a osteoartrite, de modo que uma vez desenvolvida, as alterações são irreversíveis. Dessa forma, o tratamento tem como objetivo a melhoria da qualidade de vida do paciente, aumentando a mobilidade da articulação e diminuindo a dor. Os principais tratamentos envolvem a mudança do estilo de vida do paciente, com redução de peso e implementação de atividades físicas, concomitante a administração de anti-inflamatórios e analgésicos. Em último estágio, quando a limitação funcional e a dor tornam-se debilitantes, o paciente é indicado à cirurgia de prótese (artroplastia), na qual a articulação é total ou parcialmente substituída por peças sintéticas integradas ao osso do paciente. Estes são os tratamentos convencionalmente oferecidos e mais bem estabelecidos para tratar a osteoartrite, porém tais métodos não lidam eficientemente com a doença e sua progressão em sua fase inicial. Ademais, a artroplastia, além de apresentar riscos para uma população idosa com frequentes comorbidades, ainda necessita da realização de revisões cirúrgicas a cada 5-10 anos devido ao desgaste do material sintético (GLYN-JONES, S. et al .2015). Dessa maneira, outros métodos vêm sendo explorados, como o desenvolvimento de fármacos específicos, uso da terapia celular e bioengenharia tecidual.

Diversas estratégias têm sido exploradas em busca do reparo localizado da cartilagem, tanto visando o transplante autólogo (do próprio paciente) de regiões saudáveis de cartilagem, quanto estimulando de maneira exógena a regeneração da cartilagem degenerada (WHITE, J. L. et al. 2018; XU, L. et al. 2017; BOTHE, F. et al. 2019). A mosaicoplastia e o enxerto osteocondral são exemplos de técnicas que empregam o transplante autólogo, nas quais segmentos (*plugs*) de cartilagem saudável e osso subcondral são transplantados de regiões saudáveis para a zona danificada. Tais procedimentos são custosos tecnicamente, demandando experiência do cirurgião e áreas de cartilagem saudável no próprio paciente.

A técnica de microfratura é a mais amplamente utilizada em pacientes com menos de 65 anos, e se aproveita do conceito de transplante autólogo ao induzir a geração de nova cartilagem no sítio danificado através de células osteogênicas e condrogênicas. Múltiplos furos de pequeno calibre são feitos no osso subcondral, permitindo acesso das células da

medula óssea e do sangue à cápsula articular, formando um coágulo na região da cartilagem degenerada. Durante os meses seguintes, o coágulo servirá como base para formação de um novo tecido fibrocartilaginoso pelas células-tronco mesenquimais presentes na medula do próprio paciente. Ainda que não formem cartilagem hialina e sim fibrocartilagem, que possui propriedades biomecânicas inferiores, estas células podem ser manipuladas e sua diferenciação final controlada para geração de tecido adequado. (GLYN-JONES, S. et al .2015; STEADMAN, J.R. et al. 2003).

Devido às limitações apresentadas em cada procedimento, técnicas de terapia celular e engenharia tecidual buscam desenvolver novos métodos de restauração tecidual, que resultem em cartilagem com propriedades biomecânicas e integração tecidual similar à cartilagem hialina. Desde 1980, têm-se explorado o implante de condrócitos autólogos, no qual uma amostra de cartilagem saudável é coletada via artroscopia, os condrócitos são dissociados do tecido, expandidos em cultura e reimplantados no paciente semanas depois. Contudo, mesmo sendo extensivamente pesquisada, ainda não está claro se tal técnica, com altos custos e exigências de qualidade, superam os resultados da microfratura. (GAO, L et al. 2017; BRITTBERG, M. 2018). Com o avanço das pesquisas, células-tronco mesenquimais, células-tronco pluripotentes, o uso de fatores de crescimento, indutores de diferenciação e indutores de manutenção de fenótipo condrogênico vêm sendo considerados como possíveis tratamentos. Assim, a pesquisa utilizando células-tronco mesenquimais provenientes de pacientes osteoartrosicos torna-se essencial para a compreensão dos fatores que induzem a regeneração em tecido fibrocartilaginoso, desenvolvimento de protocolos autólogos que permitam explorar o potencial dessas células e melhor compreensão da osteoartrite.

## 1.2 Células-tronco

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas capazes de auto renovação, gerando pelo menos uma célula idêntica à célula-mãe, e capazes de se diferenciar, originando pelo menos um tipo celular especializado. Essas características são fundamentais para o desenvolvimento e crescimento do indivíduo, tanto na fase embrionária quanto na fase adulta, ao realizar a manutenção dos tecidos especializados durante toda sua vida (TETTEH, P. W.; FARIN, H. F.; CLEVERS, H. 2015). Ao longo das inúmeras proliferações celulares durante o processo de formação de um indivíduo, ocorre um decréscimo no potencial de diferenciação

das células-filhas através de orquestrada sinalização intra e extracelular, direcionando seu desenvolvimento (SEITA, J.; WEISSMAN, IL. 2010). Assim, as células-filhas se tornam mais comprometidas a cada divisão, perdendo diversidade em sua capacidade de diferenciação. Dessa forma, as células-tronco demonstram obedecer uma estrutura hierárquica de diferenciação em relação ao grau de parentesco com a célula primogênita, detentora de maior potencialidade, perdendo a amplitude de sua pluripotencialidade durante o desenvolvimento e consequente processo de especialização celular.

### 1.2.1 Classificação das células- tronco

Em relação a sua capacidade de diferenciação, as células-tronco são classificadas em: *totipotentes*, formam tanto o indivíduo completo como os anexos embrionários, possuindo o maior potencial de diferenciação possível; *pluripotentes*, capazes de gerar todos os tipos celulares constituintes de um indivíduo mas não os anexos embrionários, como são as células-tronco embrionárias; *multipotentes*, que possuem capacidade de diferenciação em alguns tipos celulares, geralmente limitados ao folheto embrionário de origem, como nas células-tronco adultas; *oligopotentes* e *unipotentes*, as quais possuem capacidade de diferenciação altamente limitada, em poucos ou um só tipo celular (HIMA, B.A.; SRILATHA B. 2011).

Ainda não houve descrição detalhada do processo de surgimento das células-tronco constituintes do tecido adulto, porém credita-se ao microambiente especializado no qual estas células estão inseridas, principalmente aos estímulos polarizadores da matriz e às interações célula-célula na diferenciação dos folhetos embrionários, a limitação do potencial de diferenciação como consequência da especialização celular (GILBER, S. F. 2000). Além disso, células multipotentes não se restringem somente às células-tronco, pois as células progenitoras também podem ser multipotentes.

### 1.2.2 Mecanismos de Repressão da Diferenciação das Células-tronco

A importância da manutenção do estado indiferenciado das células-tronco fica evidente uma vez que a regeneração tecidual é tão limitada quanto à capacidade proliferativa de seus diferentes constituintes celulares. Sem que houvesse alguma forma de manutenção do

estado indiferenciado da célula-tronco, a mesma também seria conduzida à diferenciação. Consequentemente, prejudicaria a homeostase tecidual condenando células totalmente diferenciadas, unidades efectoras da função tecidual e restritas em potencial proliferativo, ao envelhecimento e senescência. Assim, mecanismos de repressão da diferenciação de células-tronco, sejam eles intrínsecos ou extrínsecos, permitem sua função reconstitutiva no tecido adulto (DOMEN, J.; GANDY, K. 2017).

As células-tronco ocupam regiões específicas do tecido no qual as células que as circundam fornecem suporte para a sua manutenção, que em conjunto com a matriz extracelular e fatores presentes, compõem seu nicho. Seja por interações justácrinas ou parácrinas, o nicho forma um conjunto de condições (ambiente) propício para as células-tronco, protegendo-as de compostos tóxicos e regulando precisamente sua alternância entre quiescência e proliferação (SCADDEN, D. T. 2014).

Dentre os mecanismos extrínsecos, a influência do nicho sobre a célula-tronco pode ditar sua competência. Mesmo em situações de divisão celular simétrica, a orientação do eixo mitótico no momento da replicação pode inserir a célula-filha em nicho diferente de onde se encontra a célula-mãe. Uma vez inserida em novo nicho, este pode induzir a diferenciação ainda que a célula-filha seja idêntica à célula-mãe (TAMPLIN, O. J. et al. 2015). Intrinsecamente, a célula-tronco é capaz de manter seu estado indiferenciado ao realizar divisões celulares assimétricas, segregando fatores intracelulares e intranucleares que promovem a diferenciação. (REN. F, et al. 2015).

Outra maneira de manter o estado indiferenciado é através do controle de fatores de transcrição específicos das células-tronco, prevenindo a diferenciação prematura dessas células durante vários estágios do desenvolvimento. Por exemplo, quando qualquer um dos genes ETV1, ETV5, FOXP1, GATA6, HMGA2, SIM2 ou SOX11 tem sua tradução reprimida em células-tronco mesenquimais (CTM), sua capacidade de autorrenovação também é diminuída (KUBO, H. et al. 2009). Além disso, o equilíbrio entre a expressão de genes indutores de diferenciação relativos às diferentes linhagens pode suprimir a especialização através de uma inibição mútua. As CTM expressam genes reguladores da diferenciação relativos a diferentes linhagens simultaneamente (KUBO, H. et al. 2009; FREEMAN, B. T.; JUNG, J. P.; OGLE, B. M. 2015). Esse fenômeno de comprometimento simultâneo às múltiplas linhagens delimita a amplitude de diferenciação celular das células-tronco, sem comprometê-las a uma única linhagem específica (DELORME, B. et al. 2009).

Modificações epigenéticas que remodelam a cromatina e recrutam repressores transcricionais, também contribuem para a repressão dos genes envolvidos na diferenciação

celular. Por exemplo, células-tronco hematopoiéticas (CTH) e CTM de indivíduos idosos apresentam mais metilações nos promotores de genes referentes à diferenciação do que em indivíduos jovens (CAKOUROS, D.; GRONTHOS, S. 2019).

### 1.3 Célula-tronco Adulta

A célula-tronco adulta é uma rara célula indiferenciada presente em tecido diferenciado, capaz de se autorrenovar e diferenciar em variados tipos celulares constituintes do tecido, durante toda a vida do organismo (BIANCO, P. et al. 2013). Assim, mais restritas que as células-tronco embrionárias pluripotentes, as células-tronco adultas são comumente multipotentes, e apresentam alta, porém limitada capacidade de autorrenovação. CTH murinas, por exemplo, suportam até 6 transplantes sequenciais antes de perder seu potencial de repopulação do compartimento hematopoiético, que envolve tanto a capacidade de diferenciação ordenada quanto de autorrenovação das células (WILSON, A. et al 2008).

Ao contrário da alta proliferação que ocorre para a formação dos tecidos na fase de desenvolvimento embrionário, na fase adulta somente a manutenção do tecido é necessária, portanto, há menor demanda proliferativa das célula-tronco adultas. Assim, as células-tronco adultas se mantêm quiescentes a maior parte do tempo prevenindo tanto a exaustão celular quanto o acúmulo de mutações gênicas por erros de replicação (CHEN, K.G. et al. 2017).

### 1.4 Células Progenitoras versus Células-tronco

A distinção entre células-tronco adultas e progenitoras é complexa, sem que haja um teste simples determinante. Células-tronco podem ser distinguidas de células progenitoras pela sua habilidade de contribuir com a manutenção tecidual por um longo período, em relação a curta capacidade do progenitor. Progenitores são células parcialmente especializadas, comprometidas com sua linhagem tecidual ou folheto embrionário, possuem capacidade replicativa limitada e expressão muito baixa ou ausente de telomerase (RAUNER, G. et al. 2018). Células-tronco são definidas pelas suas propriedades funcionais, o que se

torna um problema já que essas características necessitam de manipulação para serem avaliadas, que por sua vez, podem levar a alteração das propriedades celulares (BARA, J. J. et al. 2014; YANG, Y.-H.K., et al. 2018; VON BAHR, L. et al. 2012). A discriminação mais rigorosa é observada através da autorrenovação *in vivo*, levando a manutenção do fenótipo celular por toda vida do indivíduo. Por exemplo, a capacidade de reconstituição e manutenção de um tecido frente uma lesão.

Para avaliação *in vitro*, normalmente as células são cultivadas e expostas à mitógenos, avaliando o potencial de autorrenovação através de uma cultura secundária da população proveniente de uma única célula. Células individualizadas da cultura primária, caso de fato tronco, seriam capazes de se proliferar gerando células similares a originalmente cultivada. Entretanto, a avaliação *in vitro* é mais complicada já que com o cultivo prolongado pode-se identificar transformações celulares, que alteram a cinética de crescimento, dependência de fatores de crescimento, adesão celular e expressão gênica (BARA, J. J. et al. 2014; YANG, Y.-H.K., et al. 2018; VON BAHR, L. et al. 2012). Dada a semelhança entre as duas entidades e a consequente dificuldade de purificá-las, algumas populações denominadas células-tronco adultas compreendem também células progenitoras contaminantes, caso muito evidente no isolamento da população denominada células-tronco mesenquimais.

### 1.5 Células-tronco Mesenquimais: Histórico e Definição

As células-tronco mesenquimais (CTM) surgiram a partir das pesquisas de Friedenstein e colaboradores (1987) sobre os componentes celulares da medula óssea, ao isolar uma população de progenitores multipotentes *in vitro*, através do plaqueamento de medula total em baixa densidade de células. Eles observaram a presença de uma população escassa de células com morfologia fibroblastóide com alta capacidade de proliferação, ao ponto de uma única célula formar uma colônia. Ao transplantar as células aderentes em porquinhos da índia, observaram a formação de ossículo quimérico, no qual as células formadoras do osso cortical, trabecular e estroma medular eram originárias do doador, enquanto as células hematopoiéticas que colonizavam o estroma do ossículo, capazes de gerar células sanguíneas diferenciadas, provinham do receptor. Assim, uma população celular isolada através do plaqueamento de medula total em baixa densidade de células, deu origem à

células-filhas com potencial de reconstituição idêntico ao da célula-mãe, permitindo identificar a presença de célula verdadeiramente tronco não-hematopoiéticas na medula óssea. Tal avanço promoveu o entendimento de que, como essas células resguardavam alta capacidade proliferativa e multipotencialidade, assim como observado na linhagem hematopoiética, poderiam também ser utilizadas em transplantes (FRIEDENSTEIN, A.J. et al. 1987).

### 1.5.1 Heterogeneidade dos Células-tronco Mesenquimais

Buscando caracterizar a população celular tronco identificada por Friedenstein, a expressão de proteínas superficiais virou alvo de pesquisa como possível método de purificação dessas células. Seja por seleção positiva ou negativa através, por exemplo, da exclusão de células hematopoiéticas e endoteliais, inconsistências entre grupos de pesquisa que utilizavam diferentes marcadores começaram a surgir. A ausência de consenso quanto às características fenotípicas que definem as CTM acarretou no desenvolvimento e utilização de diferentes protocolos entre pesquisadores (CORDEIRO-SPINETTI et al. 2014). Visando unificar os requerimentos necessários para definir uma célula como CTM, a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu um padrão a ser usado como controle de qualidade na identificação de possíveis CTM, diminuindo a variabilidade e aumentando a transparência entre grupos de pesquisa. Os critérios mínimos definidos e utilizados até hoje são: capacidade de adesão ao plástico de cultura, expressão de CD105, CD73 e CD90, serem negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA I, e possuírem capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (DOMINICI, M. et al. 2006).

Apesar de nortear os pesquisadores, os critérios estabelecidos já foram apresentados com ressalvas quanto à abrangência dos mesmos: fibroblastos de brônquios pulmonares cumprem todos os critérios apesar de serem células totalmente diferenciadas, inclusive os de multipotência avaliados pela diferenciação *in vitro* (DOMINICI, M. et al. 2006). Assim, duas observações podem ser feitas quanto aos critérios mínimos apresentados. Primeiro, a combinação de marcadores moleculares é pouco restritiva, já que células totalmente diferenciadas podem ser identificadas como progenitores multipotentes. Segundo, os ensaios

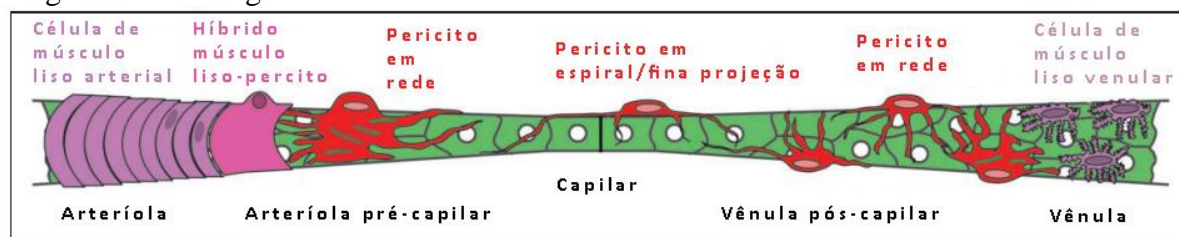
de diferenciação *in vitro* não são restritivas o suficiente para avaliar o multipotencial intrínseco de cada célula, tanto devido aos potentes indutores e glicocorticoides utilizados que podem induzir uma reprogramação celular, quanto por não avaliar a função da célula efetora adequadamente (BIANCO, P. et al. 2013). Assim, a heterogeneidade celular dos componentes estromais da medula dificulta a definição da contribuição de cada componente à regulação do microambiente medular e potencial terapêutico, devido à dificuldade técnica de isolar uma população de células purificada e em mesmo estágio de comprometimento.

### 1.5.2 Células-tronco Mesenquimais e Pericitos

Desde a descoberta das CTM, sua localização e função *in situ* foi alvo de grandes discussões. Uma vez que essas células foram identificadas *in vitro*, pesquisadores empenharam-se em investigar quais células possuíam características semelhantes às aquelas identificadas como CTM na medula óssea, e qual seu papel na manutenção do tecido. Como as CTM não eram exclusivas da medula óssea, sendo isoladas de diversos outros tecidos, da Silva Meirelles (2006) observou que o ponto em comum de todos os tecidos em que havia CTM era a presença de vasculatura e que, portanto, as CTM deveriam residir nessas estruturas.

Os pericitos são células perivasculares que compõe a estrutura de vasos sanguíneos, regulando sua contratilidade, estabilidade e integridade. Ademais, compõem a vasculatura em todos os seus níveis de complexidade, de capilares a grandes artérias, sempre adjacentes às células endoteliais. Inseridos na membrana basal do endotélio, estão presentes na região entre a túnica íntima e média em grandes vasos, e estão diretamente sobre as células endoteliais em pequenos vasos, estendendo longos processos celulares sobre estes (DIAZ-FLORES, L. et al. 2009; PILL, K et al. 2015). Porém, sua morfologia é variável dependendo da estrutura vascular na qual se encontra, como demonstrado na figura 1. Em arteríolas, os pericitos assumem morfologia fibroblastóide com poucos processos celulares, enquanto que em capilares assumem forma quase arredondada com alguns poucos processos celulares sobre o endotélio, já nas vênulas pós-capilares, os pericitos apresentam-se achatados com muitos processos celulares (SUKRITI, N. 2011).

Figura 1 – Heterogeneidade de Pericitos



Legenda: Representação ilustrativa de complexo capilar demonstrando as múltiplas morfologias possíveis dos pericitos, com diferentes superfícies de contato com o endotélio.

Fonte: Adaptado de ATTWELL, D. et al. 2016.

Em 1992, Brighton e colaboradores sugeriram que pericitos eram possíveis progenitores de osteoblastos, já que esses assumiram morfologia e comportamento *in vitro* semelhante ao descrito para as CTM, dando origem a colônias com capacidade de mineralização. No mesmo ano, Diaz-Flores e colaboradores (1992) demonstraram a participação dos pericitos na geração de cartilagem e osso em modelo de reparo, traçando um paralelo entre esses e as CTM. Em 2007, SACCHETTI e colaboradores, ao isolarem progenitores (CD146<sup>+</sup>) capazes de formar osso quimérico e manutenção dessa mesma população *in vivo*, demonstraram pela primeira vez o potencial de autorrenovação de uma população purificada de CTM. Buscando sua localização no ossículo, observaram que as CTM ocupavam a região subendotelial dos vasos, organizando os sinusóides, necessários para desenvolvimento da hematopoiese. Por fim, apontam que os progenitores CD146<sup>+</sup> presentes na região subendotelial têm sua quiescência induzida pela interação direta com as células endoteliais, demonstrando a correspondência entre os pericitos e as CTM (RASINI, V. et al. 2013; ESTEVES, C.L.; DONADEU, F.X. 2017; PARK, J.-H. et al. 2016; MO, M. et al. 2016; RUSSELL, K.C. et al. 2010; MANGIALARDI, G.; CORDARO, A.; MADEDDU, P. 2016). Dessa forma, com a adição de estudos utilizando marcadores celulares e estudo de função, observou-se que as CTM expressam marcadores de células perivasculares, como  $\alpha$ -actina de músculo liso, NG2 e PDGFR-b. Ademais, quando em cultura junto a células endoteliais, atuam diretamente na organização e remodelamento de estruturas vasculares (JAIN, R. K. 2003). Assim, as similaridades entre as CTM e as células perivasculares, em especial os pericitos, foram delineadas e, por fim, aceita a existência de uma célula que abranja ambas as identidades celulares (CAPLAN, A. I. 2008).

Os pericitos são considerados células perivasculares que não possuem uma linhagem específica, e são recrutados da parede de vasos sanguíneos pelos tecidos que o envolvem em situações de desenvolvimento e regeneração tecidual (ATTWELL, D. et al. 2016). Sob

condições fisiológicas, os pericitos se mantêm quiescentes na região perivascular, auxiliando a estabilização vascular. Sob estresse ou injúria, essas células passam por mudanças funcionais e fenotípicas, que desencadeiam migração, proliferação e diferenciação celular. (ESTEVEZ, C.L.; DONADEU, F.X. 2017; BIRBRAIR, A. 2017; BODNAR, R.J. et al. 2016). Portanto, participam ativamente da manutenção da homeostase tecidual, integrando a resposta imune e o reparo tecidual.

Em relação à origem dos pericitos, ainda que possuam perfil de expressão similar ao longo de toda vasculatura, já está estabelecido que essas células possuem diversas origens embrionárias, provindo tanto da crista neural quanto do mesoderma. Assim, a partir do ponto de vista da biologia do desenvolvimento, um mesmo vaso pode apresentar mosaiquismo quanto à origem das células perivasculares. (DIAS MOURA PRAZERES, P.H.D.M. et al. 2017; AHMED et al. 2017; MAJESKY, M. W. 2007 e 2011).

Dessa forma, com o desenvolvimento das técnicas apropriadas e alinhamento do conhecimento acerca dos dois conceitos celulares, as verdadeiras CTM e pericitos, correspondem a mesma célula estudada sob óticas diferentes. Cabe ainda uma ressalva: nem todas as células comumente referidas como CTM podem ser relacionadas aos pericitos, uma vez que se trata de população heterogênea.

Apesar de todos os tecidos vascularizados, em princípio, possuírem CTM perivasculares, a medula óssea é o tecido mais amplamente descrito para a presença dessas células, sendo descrita como a primeira fonte de isolamento das CTMs. A medula óssea abriga diversos tipos de vasos que influenciam as células perivasculares, tendo-se identificado diversos perfis diferentes de CTMs neste mesmo tecido.

## 1.6 Medula Óssea

A medula óssea está localizada anatomicamente no interior dos ossos longos e chatos, ocupando o espaço entre as trabéculas ósseas. Sua função primária é o abrigo e regulação do processo de formação celular sanguíneo, a hematopoiese, por toda vida adulta. A medula óssea pode ser classificada em medula óssea vermelha, com hematopoiese ativa e extremamente celularizada, ou amarela, rica em adipócitos que preenchem o espaço intertrabecular, com celularidade diminuída e hematopoiese diminuída ou ausente (SAKAMOTO, A. et al. 2018; CRAFT, C.S. et al. 2018). Após o nascimento, todos os ossos longos e chatos estão ocupados com medula óssea vermelha, porém com o avanço da idade há

conversão para medula óssea amarela, começando pelos membros. Durante a primeira década de vida, o volume de medula óssea vermelha total cai para 70%, depois para 50% aos 25-30 anos, e permanece relativamente constante até os 70 anos, quando sofre nova diminuição (HARTSOCK, R.J.; SMITH, E.B.; PETTY, C.S. 1965). Na fase adulta, somente os fêmures e ossos do esqueleto axial, que incluem vértebras, esterno, costelas e ossos da pélvis, permanecem com hematopoiese ativa. Mesmo em ossos contendo medula óssea ativa, as epífises e metáfises são ocupadas por medula óssea vermelha, enquanto a diáfise é normalmente ocupada por adipócitos. Caso haja aumento da demanda sanguínea, como por exemplo, em pacientes que apresentem caso de hemorragia, tabagismo, diabetes ou obesidade, a medula óssea amarela ainda retém potencial hematopoiético capaz de restabelecer a produção sanguínea, convertendo-se à medula óssea vermelha, processo chamado de reconversão da medula (AKMAN, B. et al. 2019; ARSLAN, G.; OZMEN, E.; SOYTURK, M. 2015).

O compartimento hematopoiético é altamente vascularizado, com plexos capilares medulares e periosteais interligados. Uma veia central percorre o osso de maneira longitudinal com sinusóides distribuídos radialmente, permitindo fácil acesso das células à circulação. Os sinusóides são uma extensão da microvasculatura que drena para a veia central, com parede vascular consistindo de endotélio espaçado, membrana basal descontínua e cobertura incompleta pelas células adventícias. Suas células endoteliais também são especializadas, induzindo a migração e adesão de progenitores sanguíneos de maneira mais potente que outros endotélios. Devido a sua histologia única, os sinusóides permitem uma passagem seletiva das células para a circulação (HASSANSHAHI, M. et al. 2019; ACAR, M. et al. 2015; S. INOUE, S. e OSMOND, D.G. 2001).

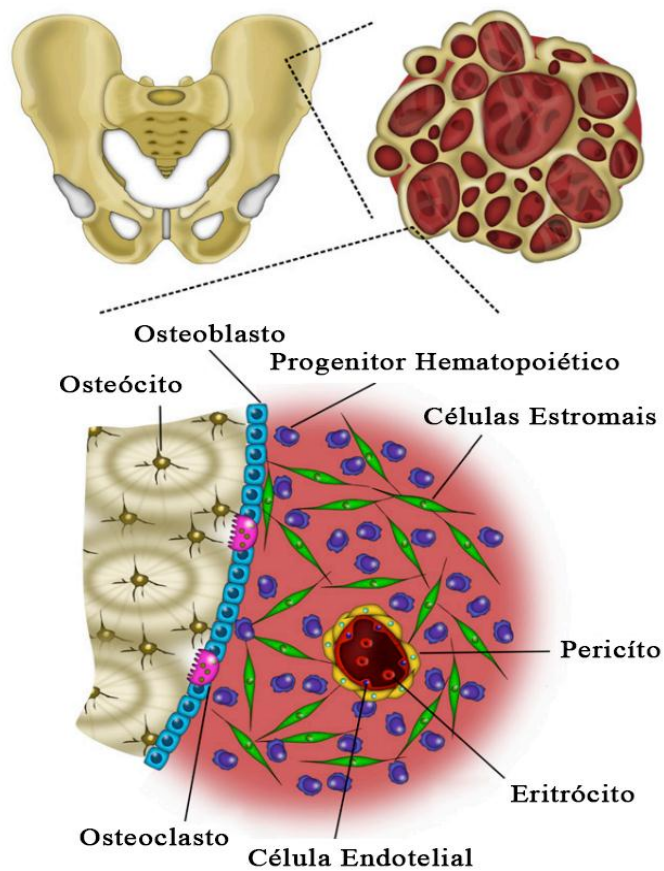
Como a hematopoiese é um processo de proliferação e especificação celular, células em diferentes níveis de diferenciação estão presentes na medula, simultaneamente. Células-tronco hematopoiéticas, que são responsáveis por gerar todos os tipos celulares presentes no sangue, dão origem às células progenitoras, responsáveis pela expansão da população de uma linhagem. Essas, por sua vez, originam células totalmente diferenciadas que realizam função específica ao seu tipo celular. Numa visão histológica, a medula óssea demonstra uma organização radial da distribuição de células hematopoiéticas. As células-tronco ocupam a região da superfície interna do osso (endóstio/subendóstio), enquanto células progenitoras e diferenciadas vão progressivamente ocupando a medula em direção à região central, conforme avançam na especialização celular (CORDEIRO-SPINETTI, E.; TAICHMAN, R. S.; BALDUINO, A 2014).

Assim, duas populações compõem a medula óssea: células constituintes da hematopoiese e células que dão suporte ao processo de produção sanguínea. A segunda, chamada de fração estromal, é um tecido conectivo composto por células reticulares estromais semelhantes aos fibroblastos, células endoteliais, células perivasculares/adventícias, adipócitos, osteoblastos, nervos simpáticos, células de Schwann não mielinizadoras e células-tronco mesenquimais (CTM) em diferentes graus de comprometimento (CALVI, L. M.; LINK, D. C. 2015).

O estroma não fornece somente o suporte físico para o desenvolvimento da hematopoiese, como também regula precisamente esse processo através da secreção de fatores, interações célula-célula e produção de matriz extracelular. Entre as citocinas reguladoras da maturação hematopoiética estão os fatores estimuladores de colônia específicos para cada linhagem sanguínea, que estimulam a proliferação e diferenciação dos progenitores comprometidos. Outros sinalizadores celulares produzidos pela fração estromal como a trombopoetina, eritropoietina e interleucinas também guiam a maturação dos progenitores. De forma ambígua, células hematopoiéticas apresentam perfis distintos de receptores para fatores de crescimento e de maturação, conforme seu grau de diferenciação. Ademais, uma das competências da matriz extracelular é a retenção de fatores de crescimento produzidos pelo estroma, formando gradientes internos específicos. Assim, essas zonas específicas, ricas em fatores de progressão da maturação hematopoiética, são reconhecidas pelos progenitores. Dessa maneira, compõem o microambiente medular, evidenciado pela diferenciação de linhagens hematopoiéticas distintas de forma segregada, em diferentes regiões do microambiente (KUMAR, R.; GODAVARTHY, P.S.; KRAUSE, D. S 2008).

Além disso, uma das principais funções do estroma é sua atuação como nicho regulatório das células-tronco hematopoiéticas. Como essas células são geradas durante a embriogênese, sua população está limitada à capacidade de autorrenovação das mesmas, propriedade a qual deve ser precisamente balanceada entre os nichos de quiescência e proliferação, a fim de preservá-la por toda vida do indivíduo adulto. A regulação entre o estroma e as células hematopoiéticas é de extrema importância, uma vez que seu desequilíbrio pode levar a disfunção hematopoiética, acarretando em síndromes mielodisplásicas (HOGGATT, J.; KFOURY, Y.; SCADDEN, D. T. 2016).

Figura 2 – Anatomia e Organização Celular da Medula Óssea



Legenda: Ilustração representativa da anatomia e organização celular da medula óssea, evidenciando as células constituintes do estroma e seus nichos.

Fonte: HOCH, A.I. e LEACH, K. 2014.

## 1.7 Nicho Celular

Em 1978, Schofield traçou um paralelo entre o conceito de nicho ecológico e as interações entre a célula-tronco e as células que lhe oferecem suporte direto, dando origem ao conceito de nicho celular. O autor propôs que células-tronco se localizam em ambientes específicos que as regulam, em oposição à regulação celular exclusivamente intrínseca, e que, por isso, permaneceriam num estado indiferenciado, capaz de autorrenovar. Portanto, a seleção da célula-tronco seria orquestrada pelo nicho de suporte, de modo que uma célula-filha capaz de ocupar o nicho se tornaria célula-tronco. Além disso, a coerção ao estado quiescente exercida pelo nicho não só permite que a célula-tronco seja mantida por toda vida

do indivíduo, como também a poupa do acúmulo de danos genéticos provenientes de erros de duplicação. Assim, o nicho limita a replicação das células-tronco, além de selecionar qual fenótipo está apto a ocupá-lo, inibindo, por exemplo, a instalação de células mutantes que podem corromper a fisiologia tecidual (SCADDEN, D. T. 2014).

Por outro lado, a força de seleção exercida pelo nicho também é capaz de agir negativamente para o indivíduo. Utilizando o sistema hematopoiético como exemplo, estudos envolvendo modificações na  $\beta$ -catenina de osteoblastos, células de suporte para as CTH, estão correlacionados com o surgimento de leucemia mielóide aguda. Alterações moleculares na  $\beta$ -catenina foram detectadas em 38% dos pacientes portadores de leucemia mielóide. Alguns dos pacientes leucêmicos que passaram por transplante de medula com doador aparentado apresentaram novamente leucemia, dessa vez, originada a partir das células do doador saudável, revelando a influência do nicho na regulação da célula-tronco (KODE, A. et al. 2014). Esses dados indicam que alterações nas células constituintes do nicho podem modular a célula-tronco a qual dão suporte ou selecionar a entrada de células-tronco com fenótipos específicos, favorecendo a expansão de um determinado clone que domina a população.

Como o nicho é uma entidade dinâmica, a comunicação ocorre de forma cruzada entre as células constituintes do nicho e as quais o nicho oferece suporte. Essa comunicação permite também que uma célula alterada se abrigue no nicho saudável e induza modificação do mesmo. Novamente, na leucemia mielóide aguda, outro mecanismo desencadeador dessa desordem são as próprias células-tronco leucêmicas, que induzem a diminuição da expressão de uma quimiocina (CXCL-12) nas células osteoprogenitoras constituintes do nicho. Uma vez que essa quimiocina é de extrema importância para a quimiotaxia e retenção das CTH saudáveis, enquanto as CTH leucêmicas são pouco dependentes dessa sinalização, a modulação do nicho pela CTH leucêmica favorece seu estabelecimento sobre as saudáveis (SCADDEN, D. T. 2014).

### 1.7.1 Nicho Hematopoiético e as Células-tronco Mesenquimais

No corpo humano, um dos tecidos que apresenta maior demanda celular é o hematopoiético, com produção aproximada de  $10^9$  hemácias e  $10^8$  leucócitos por hora (KIERSZENBAUM, A. L. e KIERSZENBAUM, L.L.T. 2016 p181). Uma pequena população de células-tronco, aproximadamente 11.000, é responsável pela manutenção dessa

produção durante toda a vida, o que demanda um equilíbrio controlado entre autorrenovação e diferenciação (HOGGATT, J.; KFOURY, Y.; SCADDEN, D. T. 2016).

Muito se investiga quanto à participação *in situ* das CTM no suporte a esses processos, já que os componentes da medula óssea secretam diversos fatores reguladores da hematopoiese. Além de originar todos os componentes da medula óssea, com exceção do endotélio vascular e do tecido hematopoiético, as CTM ainda possuem participação direta na regulação das CTH. O modelo mais utilizado na busca pela identificação dos agentes reguladores da hematopoiese é o de transplante de medula óssea, através do qual identificou-se a preferência de localização das CTH próxima à microvasculatura abundante em CXCL-12. Tanto a localização perivascular quanto a expressão de CXCL-12 são características das CTM, indicando uma relação regulatória direta entre as duas células (PINHO, S.; FRENETTE, P.S. 2019).

Na medula óssea, as CTH ocupam principalmente a região periférica próxima ao endóstio, rica em arteríolas (PINHO, S.; FRENETTE, P.S. 2019). A região endosteal pode ser subdividida em duas localizações para os progenitores estromais: podem ser constituintes do endóstio, como células *bone lining*, ou localizadas de maneira perivascular nos sinusóides e arteríolas. Um estudo demonstrou que CTH quiescentes residem especificamente na proximidade de arteríolas, enquanto CTH com ciclo celular ativo nos sinusóides, propondo nichos com distintas influências sobre as CTH (KUNISAKI, Y. et al. 2013). A classificação dos pericitos nessas duas estruturas vasculares, arteriolar e sinusoidal, é distinta. Pericitos sinusoidais são mais numerosos, apresentam mais processos celulares em sua forma e expressam baixos níveis de nestina, enquanto os pericitos arteriulares apresentam morfologia característica fibroblastóide. Além disso, pericitos arteriulares expressam NG2 e não expressam LepR, enquanto pericitos sinusoidais apresentam LepR e não expressam NG2. A depleção dos pericitos NG2<sup>+</sup> leva a entrada das CTH no ciclo celular e diminui sua capacidade de repopulação a longo prazo (KUNISAKI, Y. et al. 2013; PINHO, S.; FRENETTE, P.S. 2019). Porém, ainda há debate sobre onde precisamente estão localizadas as CTH, e se há, de fato, nichos anatomicamente exclusivos que induzam a quiescência ou proliferação.

## 2. OBJETIVO

Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais da medula óssea de pacientes osteoartríticos, de forma a selecionar população indiferenciada detentora de potencial terapêutico. Visa-se, assim, a utilização segura e eficaz de uma população uniformemente funcional na terapia celular.

### Objetivos Específicos:

- a) Isolar e Purificar as células-tronco mesenquimais obtidas de pacientes osteoartríticos submetidos à artroplastia total de quadril;
- b) Avaliar a capacidade proliferativa e formadora de colônias das células-tronco mesenquimais de adesão rápida (CTM-AR) e adesão lenta (CTM-AL);
- c) Analisar a diferenciação das CTM nas linhagens Osteogênica e Adipogênica;
- d) Imunofenotipar as CTM-AR e CTM-AL;
- e) Avaliar o potencial das CTM-AR e CTM-AL no desenvolvimento, organização e manutenção de vasos sanguíneos;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das Amostras

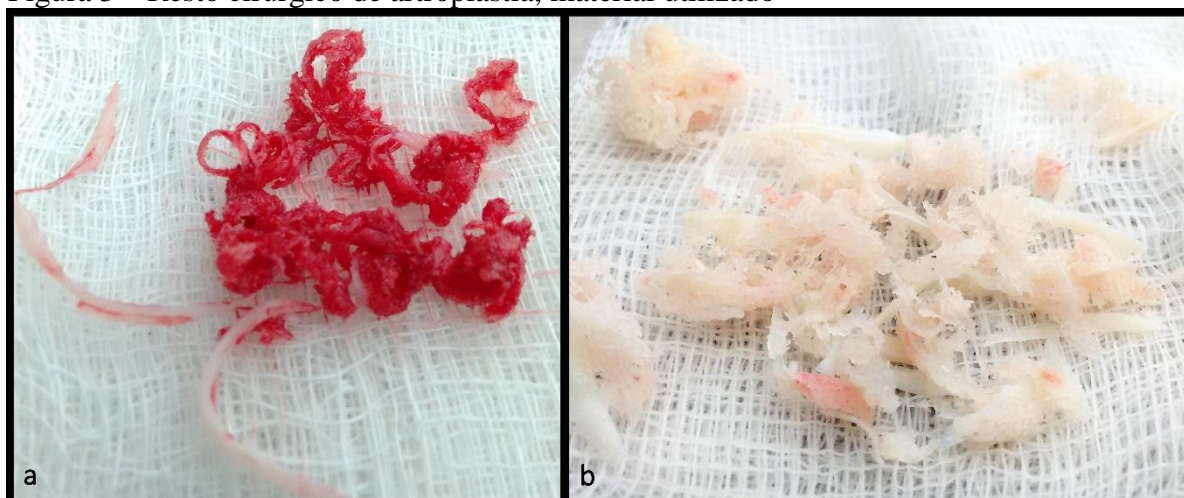
Células-tronco mesenquimais de medula óssea foram obtidas a partir do escavado acetabular da pelve de 24 pacientes submetidos à artroplastia total primária de quadril. As amostras utilizadas nesse estudo foram coletadas de pacientes entre 39 a 78 anos (média  $59,52 \pm 9,2$ ), sendo 14 homens e 10 mulheres, que apresentaram sorologia negativa para hepatite B, C e HIV, assim como ausência de comorbidades que comprometessem a fisiologia e estrutura da medula óssea. O uso do material biológico normalmente destinado ao descarte foi obtido com consentimento do paciente, e de acordo com as exigências previstas pelo Comitê de Ética do Hospital Federal dos Servidores Estaduais do Rio de Janeiro, assim como o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Veiga de Almeida, aprovado sob o título “OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS A PARTIR DOS TECIDOS ÓSSEO, MUSCULAR, TENDÍNEO, CARTILAGINOSO E ADIPOSEO DO JOELHO E QUADRIL” (58021216.7.1001.5291). As amostras foram coletadas em tubos cônicos de 50 mL contendo IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco Medium*), acondicionadas em invólucro de três embalagens (vedado, impermeável e resistente), como regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA. RDC 20/2014), contendo dispositivo de fechamento e gelo durante o transporte. As amostras foram mantidas a 4°C, em geladeira, até seu processamento no dia seguinte.

#### 3.2 Processamento das Amostras

A amostra de escavado acetabular, rico em medula e espículas ósseas, foi suspensa em tampão fosfato (PBS, Sigma-Aldrich), e o isolamento das células ocorreu através de dissociação mecânica, agitando manualmente o conteúdo do tubo. Após agitação, a separação das espículas ósseas ocorre através de curta decantação, permitindo que o sobrenadante, contendo as células, seja coletado e transferido para um novo tubo. Este processo foi repetido até o acúmulo de 200 mL de solução, garantindo a perda da coloração avermelhada das

espículas ósseas. A figura 3 ilustra a amostra recém-coletada e após isolamento das células. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 751g por 5 minutos e, cuidadosamente, a gordura superficial da suspensão celular foi retirada. As células foram ressuspensas, quantificadas em câmara de Neubauer utilizando líquido de Turk, incubadas em meio IMDM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocel-Embriolife) e 1% de antibióticos (10,000 UI/mL penicilina e 10,000 mg/mL streptomina, GIBCO Life) em garrafas de cultura 175 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa de 37°C, 5% CO<sup>2</sup>.

Figura 3 – Resto cirúrgico de artroplastia, material utilizado



Legenda: Imagens comparativas do raspado acetabular fresco (a) em comparação com a amostra após processamento (b), tendo-se obtido as células totais da medula óssea.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

### 3.3 Ensaio de Eficiência de Formação de Colônias Primárias

#### 3.3.1 Unidade de Formação de Colônia - Adesão Rápida (CFU-AR)

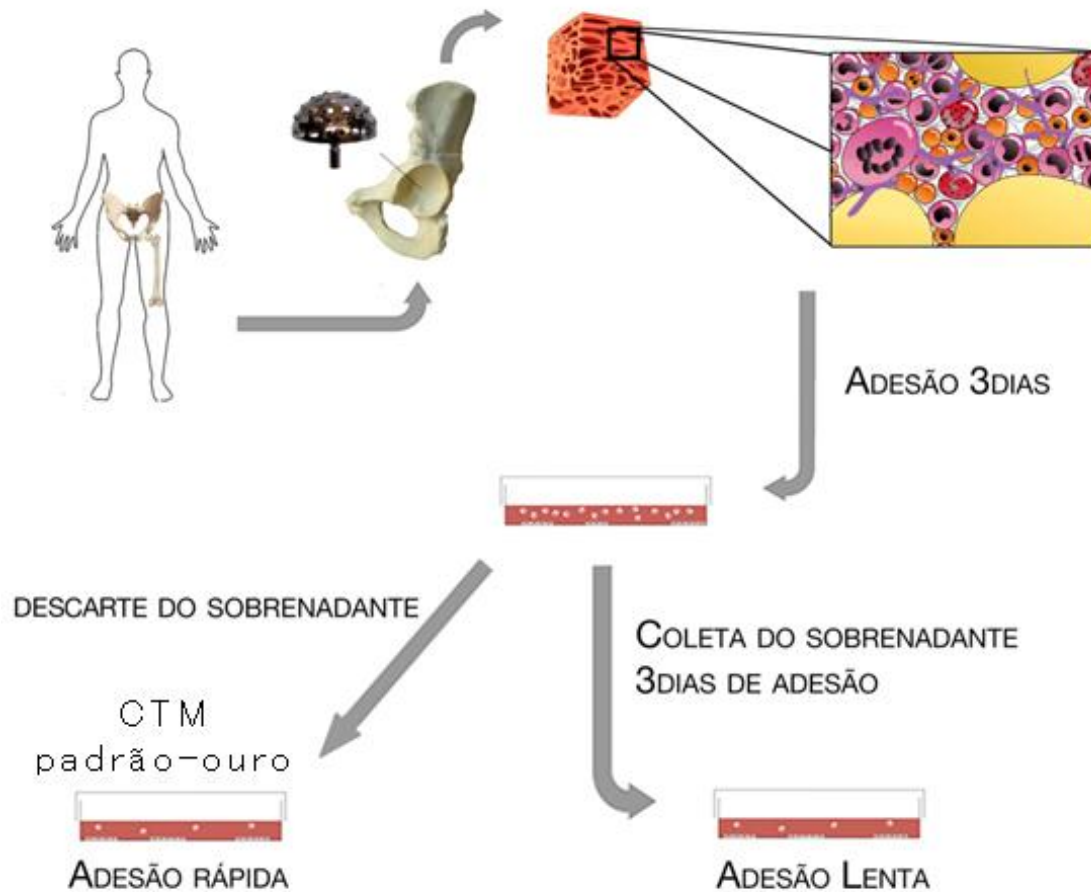
Entre 5.000 e 30.000 células nucleadas/cm<sup>2</sup> isoladas da medula óssea (n=24) foram incubadas, dando início à cultura celular em IMDM suplementado com 10% SFB e 1% antibióticos. De acordo com o protocolo padrão estabelecido por Friedenstein e colaboradores (1970), as células totais da medula óssea isoladas permaneceram em cultura a 37°C, 5% CO<sup>2</sup> por 3 dias, quando seu sobrenadante foi retirado e a cultura cuidadosamente lavada com PBS para remoção das células não aderidas residuais. As células aderidas nesse período formaram

a população denominada Células-tronco Mesenquimais de Adesão Rápida (CTM-AR), sendo aquelas capazes de formar colônia ao final do experimento chamadas de Unidade Formadora de Colônia de Adesão Rápida (CFU-AR). As células aderentes foram mantidas em cultura por 14 dias, havendo troca de meio a cada 3 ou 4 dias. No 14º dia, com as colônias já desenvolvidas, a placa foi fixada em formaldeído 4% em PBS por 10 minutos, lavada e corada com cristal violeta 1% (Sigma-Aldrich), por 10 minutos. Posteriormente, a placa foi lavada com água tridestilada e as colônias presentes contadas. Grupos celulares com mais de 50 células foram considerados colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada paciente.

### 3.3.2 Unidade de Formação de Colônia - Adesão Lenta (CFU-AL)

Utilizando a mesma amostra que CFU-AR, porém seguindo nosso protocolo modificado, entre 5.000 e 30.000 células nucleadas/cm<sup>2</sup> da medula óssea (n=24) foram cultivadas. As células permaneceram em cultura por 3 dias e, em oposição ao protocolo padrão-ouro (CTM-AR), as células aderidas foram desprezadas e somente o sobrenadante foi utilizado, iniciando nova cultura. Após novos 3 dias, a cultura do sobrenadante foi lavada com PBS para remoção das células não-aderidas. Para essa população celular denominou-se Células-tronco Mesenquimais de Adesão Lenta (CTM-AL), sendo aquelas capazes de formar colônia ao final do experimento chamadas de Unidade Formadora de Colônia de Adesão Lenta (CFU-AL). As células aderentes foram mantidas em cultura por 14 dias a partir do momento de sua adesão, havendo troca de meio a cada 3 ou 4 dias. No 14º dia, com as colônias já desenvolvidas, a placa foi fixada em formaldeído 4% em PBS por 10 minutos, lavada e corada com cristal violeta 1%, por 10 minutos. Posteriormente, a placa foi lavada com água tridestilada e as colônias presentes contadas. Grupos celulares com mais de 50 células foram considerados colônias. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada paciente.

Figura 4 – Protocolo de isolamento adesão-dependente para CTM-AR e CTM-AL



Legenda: Protocolo proposto de isolamento das CTM-AL ilustrando também o método padrão-ouro de isolamento de CTM (CTM-AR). Células são obtidas a partir da mesma cultura.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

### 3.4 Ensaio de Formação de Colônia Secundária

Utilizando as células do ensaio de formação de colônia primário, CFU-AR e CFU-AL foram tripsinizadas, contadas e deram início ao ensaio de formação de colônia secundário. A cultura foi incubada por 14 dias. Após esse período, as colônias formadas foram fixadas e coradas. Grupos celulares contendo mais de 50 células foram considerados colônias.

### 3.5 Análise da Capacidade Proliferativa de CFU-AR e CFU-AL Primária e Secundária

Para análise da capacidade proliferativa das CFU-AR e CFU-AL, ao invés de fixadas, algumas replicatas dos ensaios de formação de colônia primário e secundário foram tripsinizadas e suas células contadas em câmara de Neubauer. Para que se estabelecesse a relação entre células e colônia, células totais presentes no cultivo foram quantificadas e divididas pela média de colônias formadas nas outras replicatas do mesmo paciente.

### 3.6 Diferenciação das CTM nas Linhagens Osteogênica e Adipogênica

Seguindo o protocolo desenvolvido,  $50-80 \times 10^4/\text{cm}^2$  células totais da medula óssea foram expandidas por 4 a 6 semanas. Para avaliar o potencial de diferenciação osteogênico e adipogênico,  $2 \times 10^4$  células-tronco mesenquimais em segunda passagem foram incubadas em meio indutor osteogênico ou adipogênico por 7, 14 e 21 dias em placas de 24 poços (GIMBLE, J.M. et al. 2008). O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias. Ao término do tempo experimental, as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4%.

#### 3.6.1 Diferenciação Osteogênica In Vitro

Na diferenciação osteogênica, CTM foram cultivadas em meio indutor IMDM 10% SFB na presença de  $1 \mu\text{M}$  dexametasona,  $0.5 \mu\text{M}$  ácido ascórbico e  $10 \text{ mM}$   $\beta$ -glicerofosfato, como descrito na literatura (COOK, D., & GENEVER, P 2013). Após fixadas, o corante Alizarina vermelha foi utilizado para revelar os depósitos de cálcio presentes, indicando capacidade de mineralização de matriz.

### 3.6.2 Diferenciação Adipogênica In Vitro

Na diferenciação adipogênica, CTM foram cultivadas em IMDM 10% SFB na presença de 10  $\mu$ M insulina, 1  $\mu$ M dexametasona e 0.5 mM isobutilmetilxantina, como descrito na literatura (COOK, D., & GENEVER, P 2013).. A diferenciação foi identificada através do corante *oil red O*, que cora as gotículas lipídicas intracelulares.

### 3.7 Caracterização Imunofenotípica das CTM por Citometria de Fluxo

CTM-AR e CTM-AL primárias expandidas foram enzimaticamente solubilizadas por 2 minutos em solução tampão 0,05% tripsina, 0,02% EDTA, homogeneizadas e imediatamente inativadas com igual volume de meio contendo 10% SFB, evitando a exposição das células à tripsina por tempo prolongado. As suspensões celulares foram centrifugadas a 751 g por 5 minutos, a 4°C. A suspensão foi lavada duas vezes com PBS contendo 1% de plasma humano (O<sup>-</sup>, HEMORIO), centrifugada novamente e saturada com PBS contendo 5% de plasma humano por 15 minutos. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os seguintes anticorpos monoclonais:

Tabela 1 - Descrição dos anticorpos utilizados para citometria e imunocitoquímica

Anticorpo (anti-)	Fluorocromo	Clone	Marca	Cat num#
CD 3	PE-CY7	SK7 (or Leu-4)	BD	341101
CD 5	PE-CY5	UCHT2	BD	555354
CD 10	PE-CY5	HI10a	BD	561676
CD 14	PE	M $\phi$ P9	BD	562691
CD 15	FITC	HI98	BD	560997
CD 29	APC	MAR4	BD	561794
CD 31	ALEXA 488	M89D3	BD	558068
CD 33	PE	WM53	eBioscience	12-0338-73
CD 34	PE	4H11	eBioscience	12-0349-42
CD 38	PE	HIT2	BD	555460
CD 41a	PE-CY5	HIP8	BD	559768
CD 44	PE	G44-26 (or C26)	BD	555479
CD 45	APC-CY7	2D1	BD	561863
CD 49d	PE-CY5	9F10	BD	559880
CD 51/61	FITC	23C6	eBioscience	11-0519-42
CD 54	PE-CY5	HA58	BD	555512

CD 56	ALEXA 488	B159	BD	561905
CD 66	PE	CLB-gran/10, IH4Fc	PeliCluster	m1693
CD 73	FITC	AD2	BD	561254
CD 79a	APC	HM47	BD	551134
CD 90	APC	eBio5E10	eBioscience	17-0909-73
CD 114	PE	LMM741	BD	554538
CD 133/1	APC	AC133	MACS BIOTEC	130-090-826
CD 146	FITC	P1H12	BD	560846
CD 146	PE	P1H12	BD	550315
CD 184	APC	12G5	BD	555976
$\alpha$ -actina de musc. liso	-	1A4 (asm-1)	Thermo	MA5-11547
Secondary Antibody	Alexa 555	anti-Rabbit IgG (H+L)	Thermo	A-21428
Faloidina	ALEXA 488		Thermo	A12379
hCCR7	APC	Clone # 150503	ReDsystems	FAB197A
HLA -DR -DP -DQ	FITC	Tu39	BD	555558
VEGF R2/KDR	APC	Clone # 89106	ReDsystems	FAB357A

Após incubação com anticorpos fluorescentes, as células foram lavadas duas vezes em PBS contendo 1% de plasma humano, e a citometria foi realizada em FACSCanto II (BD Biosciences, *FACSDiva software V8.01*) sem que as células fossem fixadas. Para correção da sobreposição de fluorescência em painéis com múltiplos fluorocromos, controles de fluorescência menos um (FMO) e marcações com anticorpos únicos foram utilizados, analisando os resultados no programa FLOWJO, versão X (FLOWJO, LLC). A leitura das amostras em citômetro foi realizada na FIOCRUZ, no Laboratório de Pesquisas em Timo, em colaboração com o professor Romulo Galvani.

### 3.8 Imunocitoquímica das CTM

CTM-AR e CTM-AL ( $5 \times 10^4$ ), em segunda passagem, foram cultivadas sobre lamínulas em placa de 24 poços por 3 dias e, então, fixadas com paraformaldeído 4%. As células foram permeabilizadas usando triton 0,1%, por 10 minutos. A lamínula foi lavada com PBS e as células saturadas com PBS contendo 5% de plasma humano por 20 minutos. Após saturação, as células foram marcadas com uma solução de Faloidina-AlexaFluor 488 (Thermo Scientific, 6.6 $\mu$ M) por 30 minutos em câmara escura, seguido de 3 lavagens utilizando PBS contendo 1% de plasma humano. Posteriormente, as células foram marcadas para  $\alpha$ -actina de musculo liso (IgG anti-human, 1A4 - asm-1) e anticorpo secundário fluorescente (Thermo Life, A21428, IgG anti-rabbit) utilizando o mesmo protocolo. Por fim, meio de montagem

contendo DAPI foi adicionado e as células analisadas em microscópio confocal de fluorescência (LSM 510 Meta), utilizando o programa de aquisição *ZEN Blue*. Células endoteliais humanas da linhagem de microvasculatura dermal HMEC-1, em passagem 30, foram utilizadas como controle negativo seguindo o mesmo protocolo.

### 3.9 Ensaio de Tubulogênese com Células Endoteliais HMEC, CTM-AR e CTM-AL

Placas de cultura de 96 poços tiveram sua superfície revestida com Matrigel reduzido em fatores de crescimento (CORNING, Matrigel Matrix, Cat. No. 354230) formando um filme de matriz extracelular que permitisse a cultura 3D. 30.000 HMEC-GFP<sup>+</sup> e 6.000 CTM-PKH26red<sup>+</sup> em meio EGM-2 contendo 2% de SFB, foram adicionadas sobre o matrigel, incubadas e imagens foram obtidas após 24 horas, 48 horas e 72 horas (n=4). A quantidade de estruturas tubulares, tamanho total dos túbulos, ramificações, tamanho total das ramificações, complexidade da rede formada (bifurcações e área de rede) e localização das células foram avaliadas. As definições são: segmentos – túbulos que formam rede; ramificações – túbulos que não formam redes; estruturas tubulares – segmentos+ramificações, ilustrados no Anexo I. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência EVOS® FL (*ThermoFisher Scientific*) e analisadas no programa Image J, utilizando o pacote Angiogenesis Analyser for Image J (NIH, Gilles Carpentier Angiogenesis Analyser 2012. ImageJ). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Biologia da Célula Endotelial e da Angiogênese (LabAngio/UERJ) com colaboração da Professora Dra. Verônica Morandi, que forneceu gentilmente as células HMEC-1. Para este experimento, as células foram cultivadas e manipuladas conforme descrito a seguir.

#### 3.9.1 Transfecção das Células Endoteliais da linhagem HMEC com vetor-proteína verde fluorescente (HMEC-GFP<sup>+</sup>)

Células endoteliais humanas da linhagem de microvasculatura dermal (HMEC, passagem #27-#35) foram transfectadas visando à expressão de proteína fluorescente verde (GFP, Green Fluorescent Protein). Para tal,  $2 \times 10^6$  de HMEC foram expandidas até 80% de

confluência em garrafa revestida com gelatina (2%), utilizando meio EGM-2 contendo 5% de SFB (Endothelial Cell Growth Medium-2, Lonza). Após tripsinização, as células foram centrifugadas à 90g por 10 minutos e utilizou-se o kit *Amaya 4D-Nucleofector* (Lonza, Cat. No. V4XP-5012) de acordo com as instruções do fornecedor. Foram eletroporadas no Sistema 4D-Nucleofector, programação CA-167, 100uL de solução final contendo células e 5uL de pmaxGFP<sup>TM</sup> Vector (1 µg/µl em 10 mM Tris, pH 8.0). Meio EGM-2 contendo 2% de SFB foi adicionado e as células foram incubadas por 24 horas, quando tiveram sua fluorescência confirmada em microscópio de fluorescência EVOS® FL (*ThermoFisher Scientific*), antes de serem utilizadas no ensaio de tubulogênese.

### 3.9.2 Marcação Fluorescente Intravital de CTM-AR e CTM-AL com Intercalador Lipídico PKH26red (CTM-PKH26red<sup>+</sup>)

5x10<sup>5</sup> CTM-AR e CTM-AL foram expandidas, tripsinizadas e centrifugadas a 400g, por 10 minutos. Utilizou-se o kit *PKH26red Cell Linker* (Sigma, Cat. No. PKH26GL) de acordo com as instruções do fornecedor para marcação fluorescente, e as células foram utilizadas imediatamente no ensaio de tubulogênese.

### 3.10 **Análises Estatísticas**

Para análise dos dados obtidos foi utilizado teste *t-Student* bicaudal assumindo variâncias distintas, com 95% de confiança ( $p < 0.05$ ,  $\alpha = 0.05$ ), comparando a população de Adesão Rápida (AR) com a população de Adesão Lenta (AL). Somente nos resultados de tubulogênese foi utilizado o teste anova (*two-way*) com pós-teste de Tukey, admitindo 95% de confiança ( $p < 0.05$ ,  $\alpha = 0.05$ ) como estatisticamente significativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram comparados individualmente para cada paciente. Os dados são apresentados em média e desvio padrão.

## 4. RESULTADOS

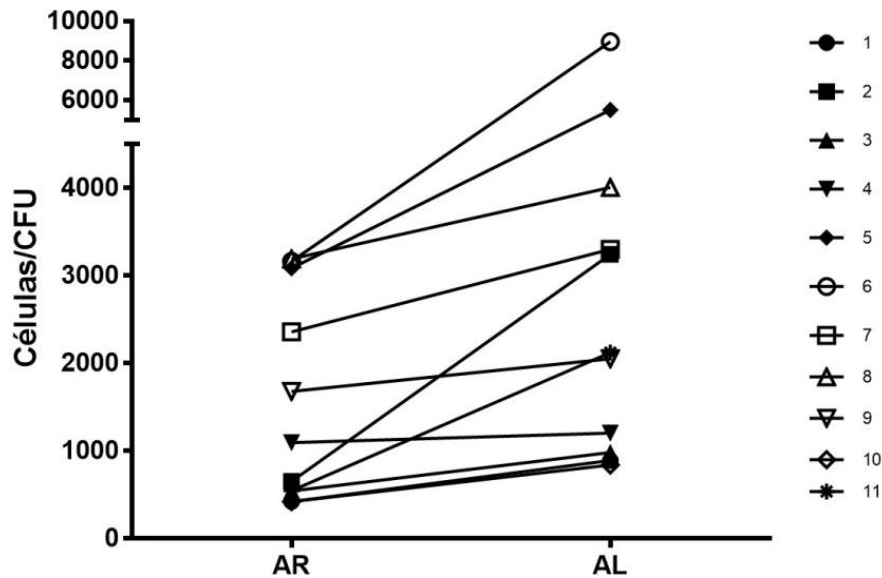
### 4.1 Ensaio de Eficiência de Formação de Colônia Primária

Para avaliar a presença e frequência de progenitores mesenquimais, amostras do escavado acetabular de 24 pacientes foram utilizadas nos ensaios de eficiência de formação de colônia primária, cultivando a medula total em densidade clonal. A baixíssima densidade celular, 5.000 células nucleadas/cm<sup>2</sup>, permite amplo espaçamento entre as células aderentes, garantindo a proliferação e formação de colônia celular individualizadas.

A figura 5 apresenta a frequência de colônias formadas nas populações CTM-AR e CTM-AL por milhão de células nucleadas da medula óssea, em cada paciente. Unidades formadoras de colônia-AL (CFU-AL) estavam presentes e foram capazes de gerar colônias em todos os pacientes, apresentando frequência aproximadamente 3 vezes menor em relação às CFU-AR. Obtivemos, em média, 308,19 ±282 CFU-AR a cada 10<sup>6</sup> de células nucleadas da medula óssea, portanto 1 CFU-AR a cada 8.346 ±7147 células nucleadas. A frequência de CFU-AL foi de 96,61 ±108 a cada 10<sup>6</sup> células nucleadas da medula óssea, logo, 1 CFU-AL a cada 38.298 ±48372 células nucleadas da medula. Assim, CFU-AL apresenta consistência em seu isolamento, representando uma população com adesão tardia, com frequência aproximadamente 3 vezes menor que as CFU-AR.



Figura 6 – Quantificação da Média de Células por Colônia Primária



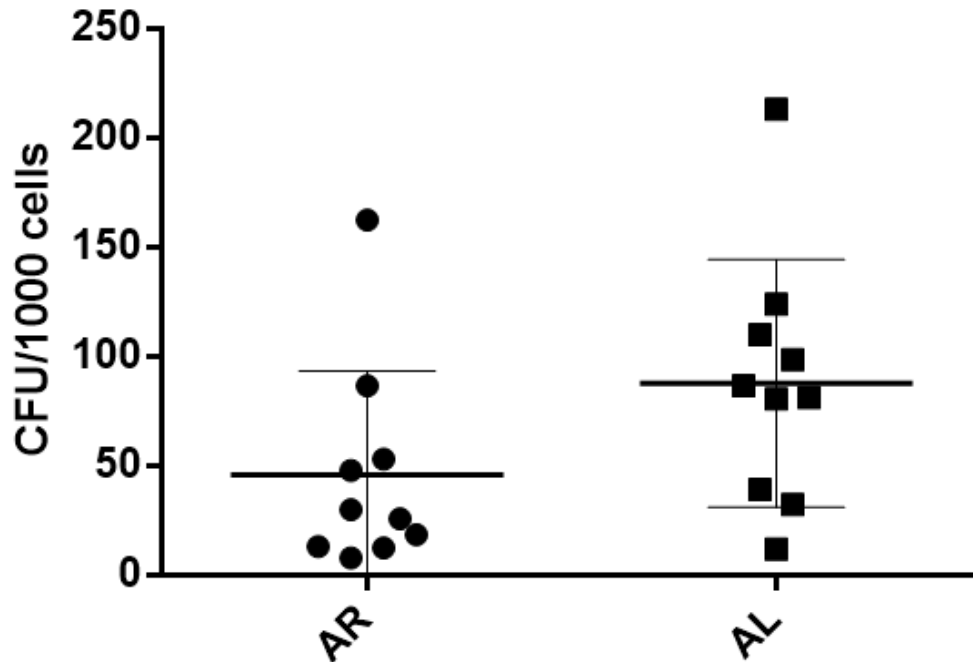
Legenda: Gráfico comparativo da média de células por colônia primária em CFU-AR (esquerda) e CFU-AL (direita). Pontos interligados indicam mesmo paciente.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

#### 4.2 Eficiência na Formação de Colônia Secundária

Para testar seu potencial de auto renovação *in vitro*, avaliamos se as células-filhas geradas a partir das CFU-AR e CFU-AL primárias preservam sua capacidade proliferativa de gerar colônia. Dessa forma, podemos estimar que a população que sofre uma ‘exaustão proliferativa’ e é capaz de formar novas colônias refere-se às células mais indiferenciadas. A figura 7 apresenta a frequência de colônias secundárias formadas em cada paciente, sendo a primeira coluna referente às CFU-AR e a segunda às CFU-AL. A população CFU-AL apresentou maior frequência de CFU secundárias em todos os pacientes. Em média, CFU-AR apresentou  $69,14 \pm 47,58$  CFU secundárias a cada 1000 CFU primárias, enquanto a população CFU-AL praticamente o dobro,  $123,4 \pm 68,20$  CFU secundárias a cada 1000 CFU-primárias.

Figura 7 – Ensaio de Eficiência de Formação de Colônia Primária



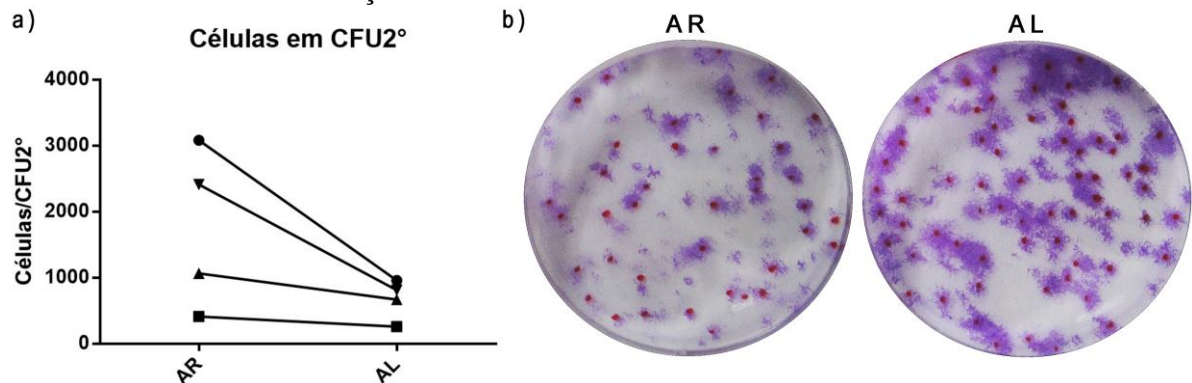
Legenda: No término do primeiro ensaio de formação de colônia, as células foram contadas e reutilizadas em novo ensaio de formação de colônia (secundário). Gráfico comparativo da frequência de colônias secundárias formadas em AR e AL. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DPM ( $p=0.0005$ ).

Fonte: PARIS, G.C., 2019

#### 4.2.1 Quantificação celular das colônias secundárias

Da mesma forma, avaliamos o total de células por colônia secundária. Dessa vez, porém, a população CFU-AR secundária apresentou maior número de células por colônia ( $1741,75 \pm 1220,162$ ) do que CFU-AL secundária ( $673,5 \pm 302,176$ ), como demonstrado na figura 8. Contraditoriamente, quando comparadas macroscopicamente, as colônias em CFU-AL secundária possuem maior tamanho que CFU-AR secundária. Observa-se, também, entre as colônias formadas, evidenciadas com pontos vermelhos, grupos celulares com quantidade insuficiente para serem caracterizados como colônias (figura 8 b).

Figura 8 – Quantificação da Média de Células por Colônia Secundária e Foto Ilustrativa do Ensaio de Formação de Colônia Secundária



Legenda: a) Gráfico da média de células por colônia secundária, quantificando as células totais e dividindo pela média de colônias obtidas nas replicatas. b) Foto representativa das colônias secundárias formadas em placa de 6 poços (direita).

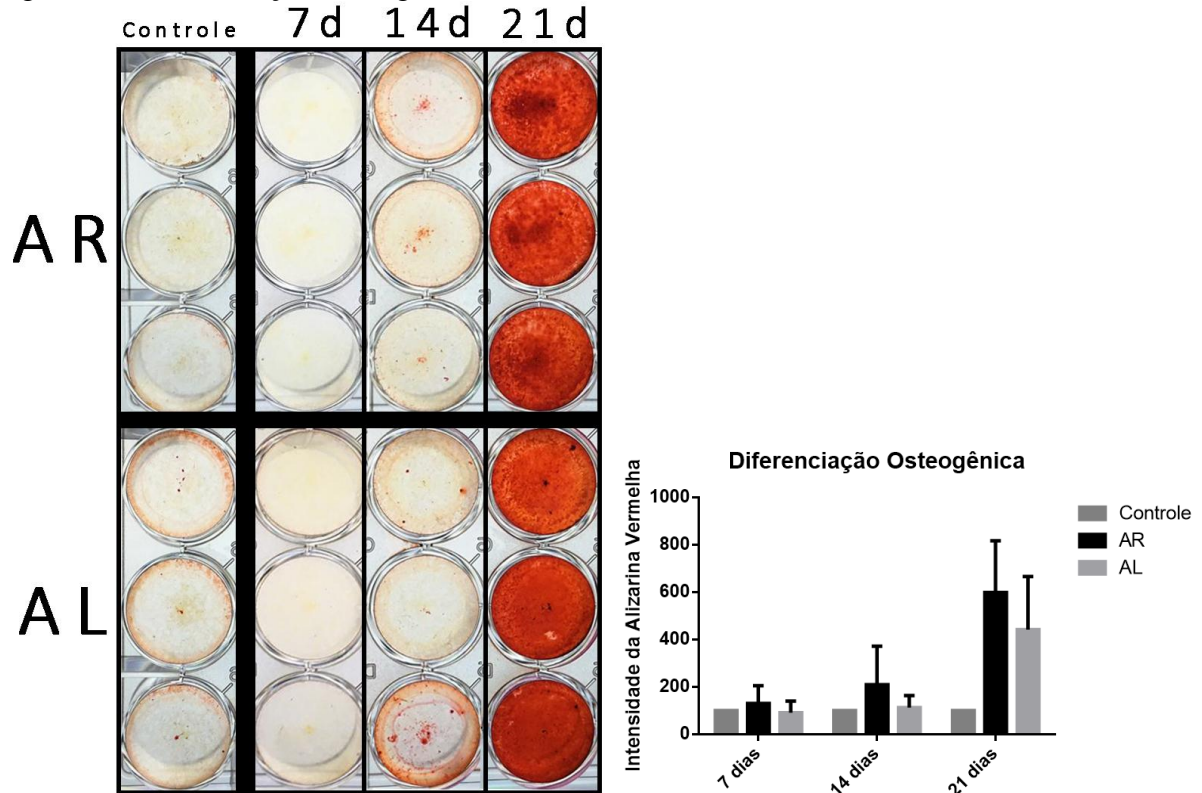
Fonte: PARIS, G.C., 2019

#### 4.3 Diferenciação nas Linhagens Osteogênica e Adipogênica

Buscando validar sua multipotencialidade e comparar sua capacidade de diferenciação, CTM expandidas foram cultivadas em meio indutor de diferenciação osteogênica e adipogênica por 21 dias. Ambas populações apresentaram características de células totalmente diferenciadas após os 21 dias.

Na diferenciação osteogênica (figura 9, representativa de 5 pacientes), comparando as populações AR e AL, não houve deposição evidente de matriz rica em cálcio presente no cultivo em 7 dias. Com 14 dias, apesar de semelhantes, AR apresentou leve coloração no centro do poço, região de maior densidade celular, indicando o progresso da diferenciação osteogênica. Com 21 dias, toda área apresentou forte coloração dos depósitos de cálcio em ambas as populações, entretanto, AR apresentou marcação levemente mais forte no centro do poço em relação a AL.

Figura 9 – Diferenciação Osteogênica das CTM-AR e CTM-AL

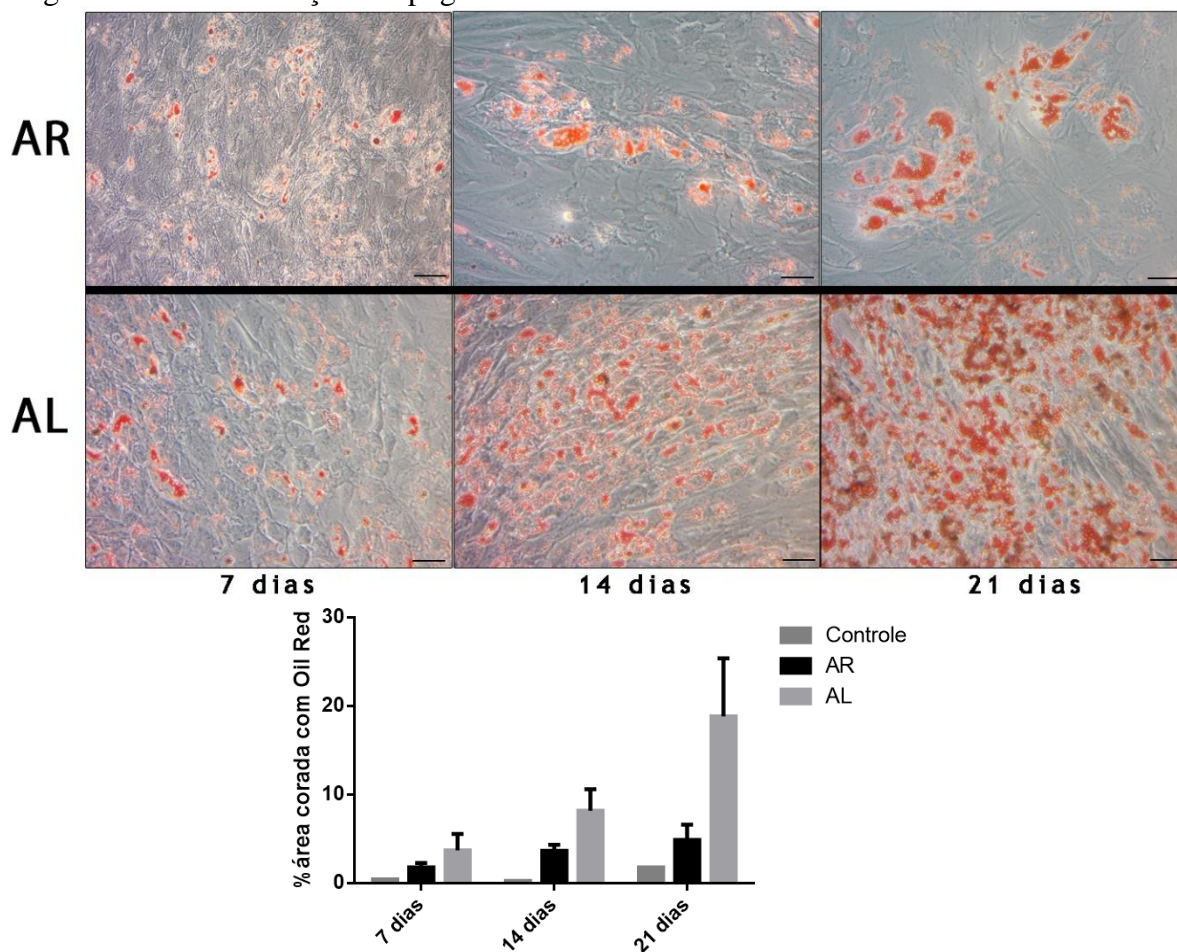


Legenda:  $5 \times 10^4$  CTM AR ou AL foram cultivadas em meio indutor osteogênico 10% SFB, em placa de 24 poços, por 7, 14 e 21 dias e coradas com alizarina vermelha. Imagens dos poços são mostrados à esquerda e a quantificação de intensidade da Alizarina Vermelha à direita.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

No ensaio de diferenciação adipogênica (figura 10), ambas populações apresentaram mudança de morfologia e presença de gotículas lipídicas intracelulares características, após 21 dias. Inicialmente, ambas possuíam equivalente baixa frequência de células com gotículas intracelulares visíveis após 7 dias de indução. Com 14 e 21 dias, gotículas maiores foram formadas e as CTM-AL demonstraram claramente maior frequência de células contendo gotículas lipídicas em relação às CTM-AR.

Figura 10 – Diferenciação Adipogênica das CTM-AR e CTM-AL



Legenda:  $5 \times 10^4$  CTM AR ou AL foram cultivadas em meio indutor adipogênico 10% SFB, em placa de 24 poços, por 7, 14 e 21 dias e coradas com oil red O. Acima as imagens de microscopia ótica, barra de calibração indica 100  $\mu\text{m}$ . Abaixo, quantificação da área corada com Oil Red para os diferentes grupos celulares.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

#### 4.4 Caracterização imunofenotípica das subpopulações de Células-tronco Mesenquimais de Adesão Rápida (AR) e Adesão Lenta (AL)

Com o objetivo de caracterizar o perfil fenotípico de ambas populações, visando prospectiva purificação, diversos marcadores celulares foram testados em citometria. Seguindo o protocolo proposto, CTM AR e AL primárias obtidas de 6 pacientes foram isoladas, cultivadas e analisadas, sem fixação.

Primeiramente, investigamos o possível grau de contaminação de células hematopoiéticas ou endoteliais utilizando os marcadores CD45 e CD31/CD34, respectivamente. Enquanto células CD45<sup>+</sup> apresentaram uma frequência média de ~5% das

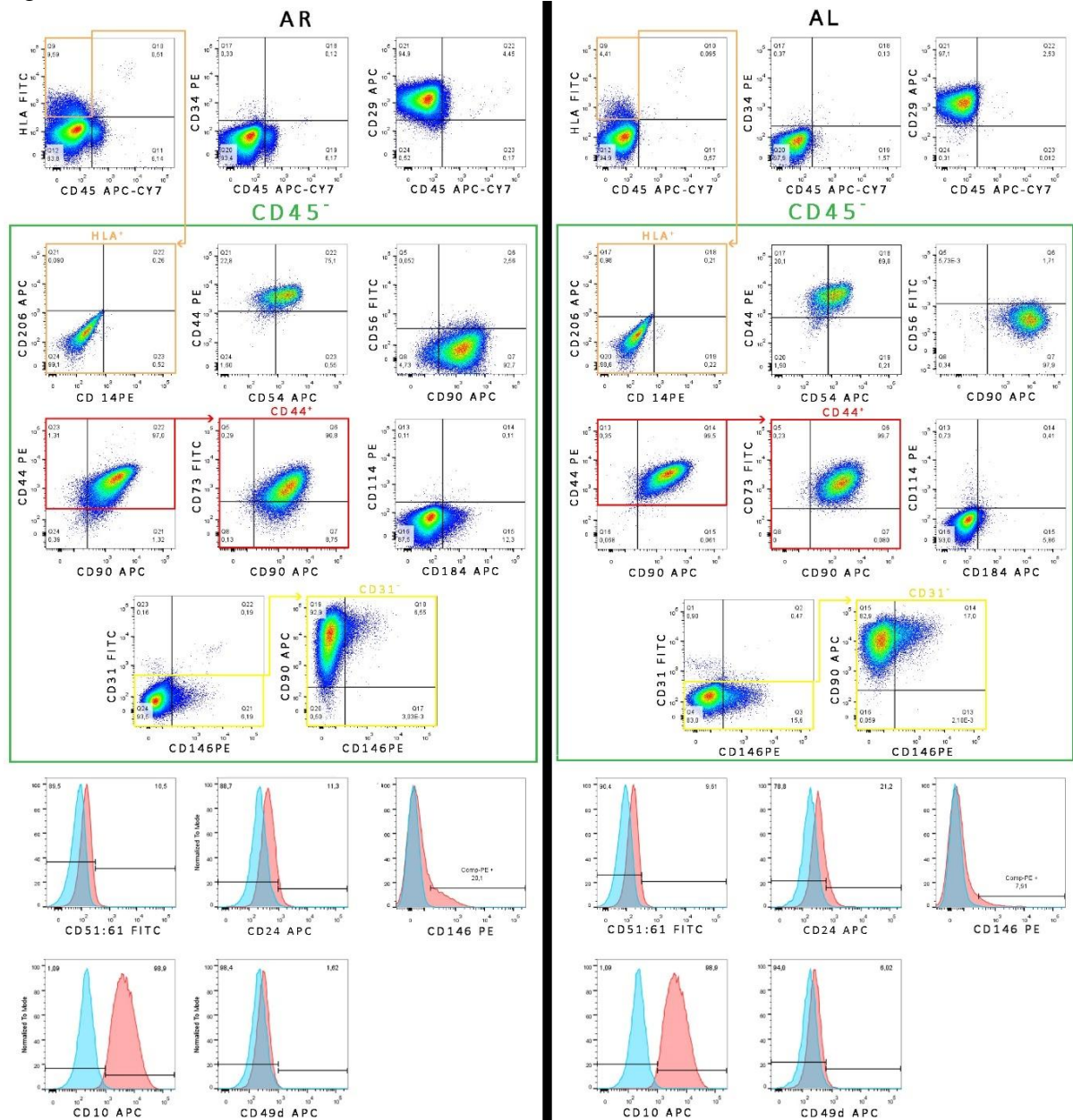
CTM-AR, tal contaminação celular correspondeu a <2% nas CTM-AL (figura 11 e 12). Além disso, células CD31<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup> representaram contaminação insignificante, <1,5% do total de células analisadas, em ambos os grupos. Excluindo-se a subpopulação CD45<sup>+</sup>, quase a totalidade das células (~90%) apresentou positividade concomitante para o perfil CD44<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup> (caixa vermelha), além da população CD45<sup>-</sup> também ser majoritariamente CD29<sup>+</sup> (<90%). Células CD54<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> correspondem a grande parte de ambas as populações (~70%), assim como CD10 que, individualmente, identificou >98% das células.

Dentre os marcadores diferencialmente expressos, a caracterização utilizando CD146<sup>+</sup> demonstrou a presença de células CD146<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> (caixa amarela) tanto em AR (~7,5%), quanto em AL (~12,5%), em todos os pacientes. Entretanto, apresentou discordância de resultados entre os pacientes. Enquanto a maioria das amostras apresentou aproximadamente o dobro da frequência de células CD146<sup>+</sup> em AL do que em AR (n=4/6), alguns apresentaram frequência maior ou igual em AR (n=2/6), como representado na figura 11 comparando as análises em painel (caixa amarela) e histogramas (CD146 PE). Dentre as marcações individualizadas diferencialmente expressas, CD24 identificou 11% de CTM-AR e 21% CTM-AL, enquanto CD49d foi exclusivamente positivo para CTM-AL, identificando ~7% das células.

De forma oposta, células CD184<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> estão enriquecidas na população CTM-AR (~12%), apresentando o dobro da frequência de células positivas em relação à CTM-AL (~6%). Similarmente, HLA-DR-DP-DQ mostrou-se positivo para 10% das CTM-AR e somente 4% em CTM-AL, sendo as células HLA<sup>+</sup> também CD90<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD206<sup>-</sup>/CD14<sup>-</sup> (caixa laranja). Além disso, ambas populações mostraram-se parcialmente positivas para CD51:61(10%).

Tanto as CTM-AR como as CTM-AL não apresentaram expressão dos marcadores CD14, CD206, CD56 e CD114 (figura 11), assim como CD3, CD5, CD15, CD33, CD38, CD66, CD79a e CD133 (não mostrado).

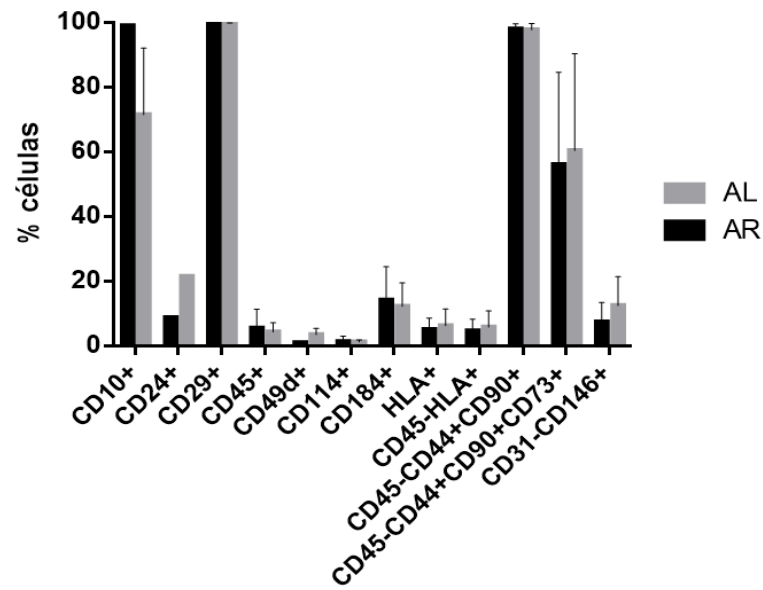
Figura 11 – Citometria de CTM-AR e CTM-AL Primárias



Legenda: CTM-AR (esquerda) e CTM-AL (direita) expandidas em IMDM 10% SFB por 4-6 semanas, foram caracterizadas por citometria de fluxo (n=6). Subpopulações celulares CD45<sup>-</sup> (caixa verde), CD44<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup> (caixa vermelha), CD146<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> (caixa amarela) e HLA<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD206<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> (caixa laranja) encontram-se destacadas. Marcadores individuais são apresentados nos histogramas. Linha azul = controle negativo, linha vermelha = anticorpo descrito na legenda.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

Figura 12 – Mediana da Intensidade de Fluorescência das CTM-AR e CTM-AL CD146<sup>+</sup>  
AR x AL



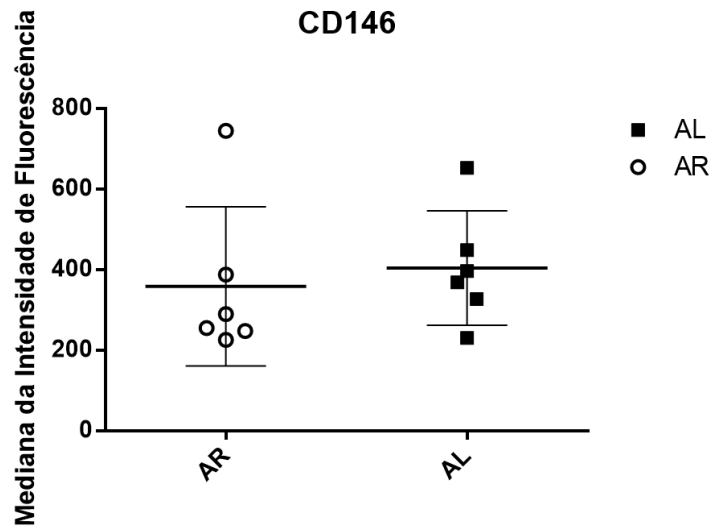
Legenda: Quantificação da caracterização do fenótipo celular via citometria para as populações AR e AL. Barra preta = AR e barra cinza = AL. Resultados apresentados como média ± DPM.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

#### 4.5 Avaliação da Mediana de Intensidade de Fluorescência das CTM CD146<sup>+</sup>

Quando quantificada a expressão de CD146 pelas duas populações celulares, CTM-AL apresentaram maior mediana de intensidade de fluorescência comparadas às CTM-AR na maioria dos pacientes (figura 13).

Figura 13 – Mediana da Intensidade de Fluorescência das CTM-AR e CTM-AL CD146<sup>+</sup>



Legenda: Gráfico comparativo entre a mediana da intensidade de fluorescência das CTM-AR (círculo) e CTM-AL (quadrado) CD146<sup>+</sup>.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

#### 4.6 Citometria das Subpopulações “Pequenas” e “Grandes”

Aprofundando nossa análise, observamos dentro de cada população (CTM-AR e CTM-AL), 2 subgrupos celulares discerníveis com base no tamanho das células. Assim, separamos esses 2 grupos internos em células “Grandes” e “Pequenas”, em referência ao tamanho celular diverso detectado pelo FSC (*Foward Scatter Signal*), e investigamos seu fenótipo separadamente.

De maneira geral, os dois grupos apresentaram marcação semelhante tanto em CTM-AR quanto em CTM-AL para CD10, CD29, CD31, CD44, CD90, CD73, HLA, CD51:61, e CD54, porém alguns marcadores se destacaram na análise comparativa (figura 14). Células CD45<sup>+</sup> estão exclusivamente inseridas nas células de menor tamanho, tanto em AR quanto AL. Da mesma forma, as células CD45<sup>-</sup>/CD184<sup>+</sup> apresentam-se muito enriquecidas no grupo de menor tamanho, tanto em CTM-AR (77% vs. 5%;) quanto em CTM-AL (20% vs. 3%). Um pouco mais equilibrado, porém também preferencialmente enriquecido nas células “pequenas”, a presença de CD24 identificou 15% deste subgrupo contra 11% das “Grandes” em CTM-AR, enquanto marcou 46% nas “Pequenas” contra 15% nas “Grandes” em CTM-AL, demonstrando ser um promissor marcador para purificação dessa população. De maneira contrária, as células CD146<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup> encontram-se enriquecidas na população de células Grandes. Enquanto as células HLA<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD49d<sup>+</sup>, CD51:61<sup>+</sup> e CD54<sup>+</sup> encontram-se equilibradamente distribuídas entre “Pequenas” e “Grandes”.

Figura 14 – Citometria das Células de Diferentes Tamanhos em CTM-AR e CTM-AL

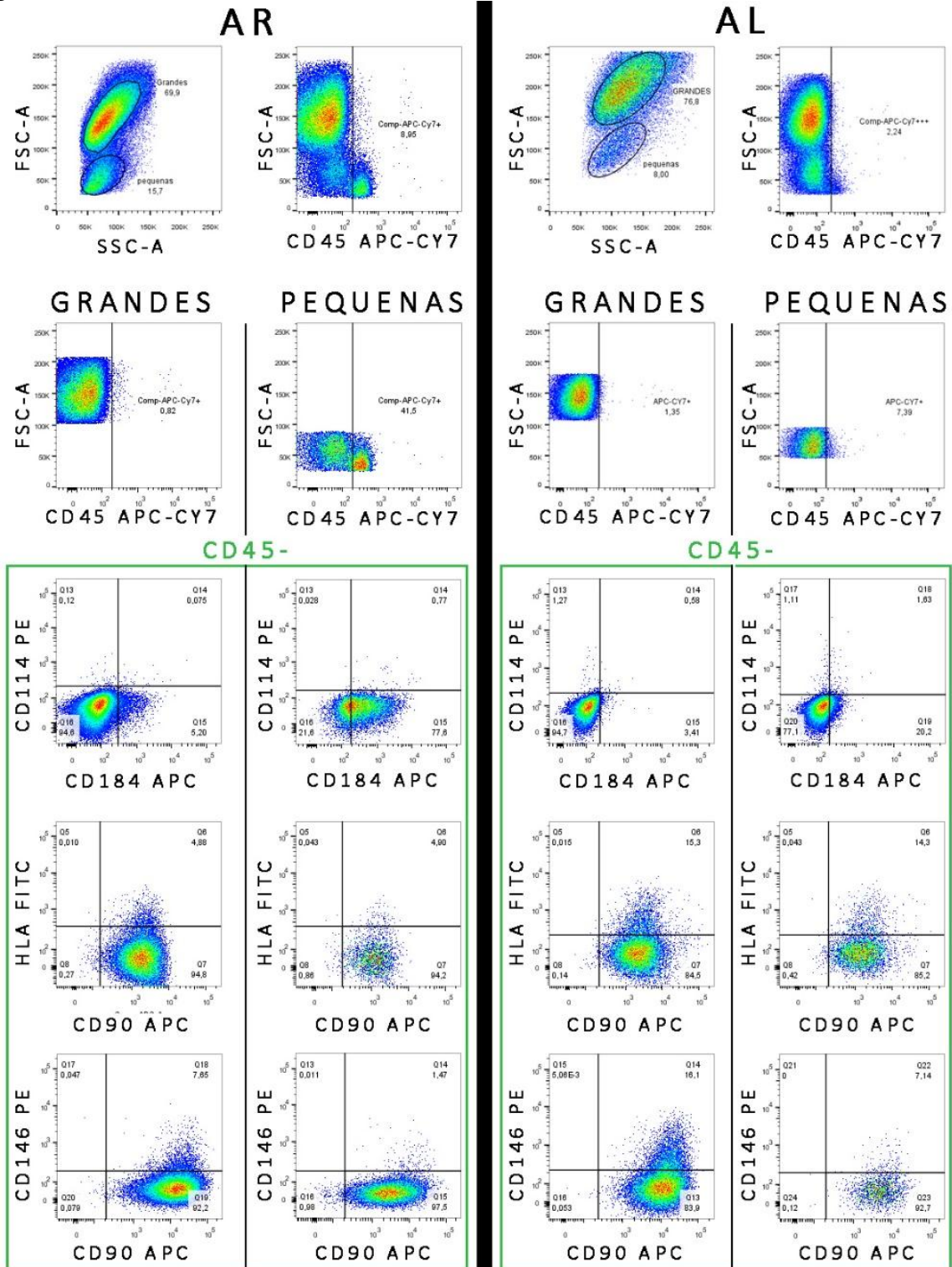
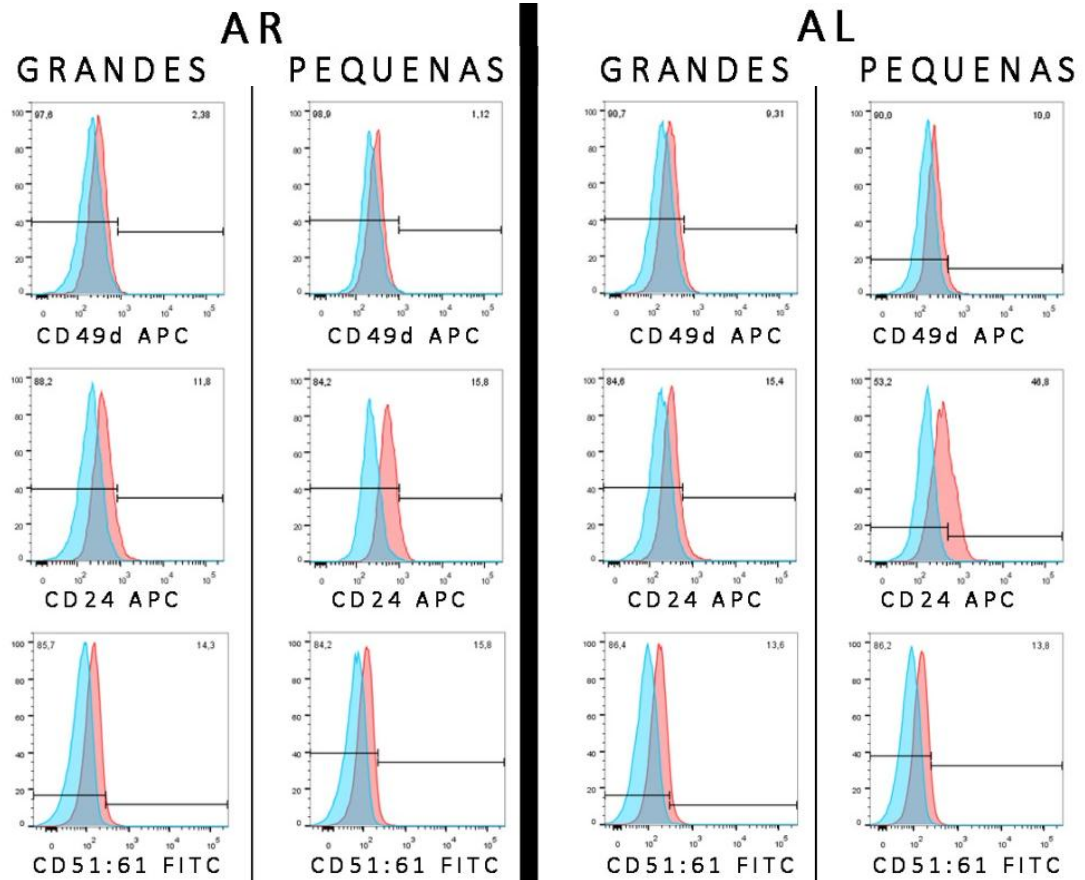


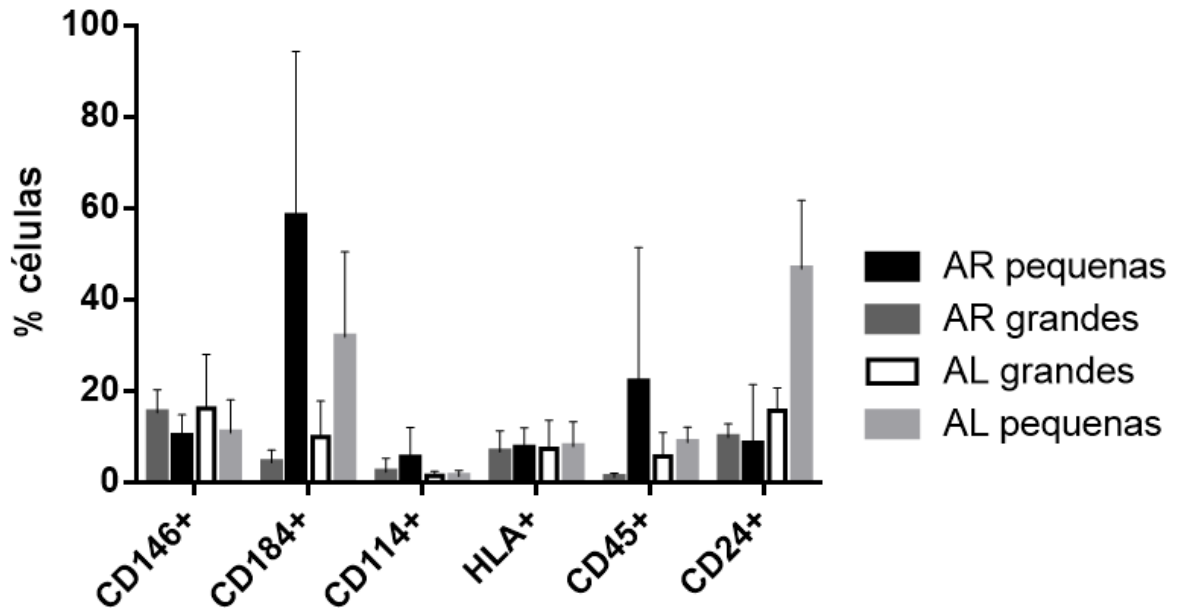
Figura 14 (Continuação) – Citometria das Células de Diferentes Tamanhos em CTM-AR e CTM-AL



Legenda Figura 14: CTM-AR (esquerda) e CTM-AL (direita) foram subdivididas de acordo com o tamanho celular em “GRANDES” e “PEQUENAS”, sendo analisadas individualmente. Subpopulação celular CD45<sup>-</sup> encontra-se destacada (caixa verde). Células CD146<sup>+</sup> encontram-se enriquecidas na subpopulação grande, enquanto células CD45<sup>+</sup>, CD184<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> e CD24<sup>+</sup> na subpopulação pequena. Linha azul = controle negativo, linha vermelha = anticorpo descrito na legenda.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

Figura 15 – Quantificação Fenotípica das Células Grandes e Pequenas em AR e AL



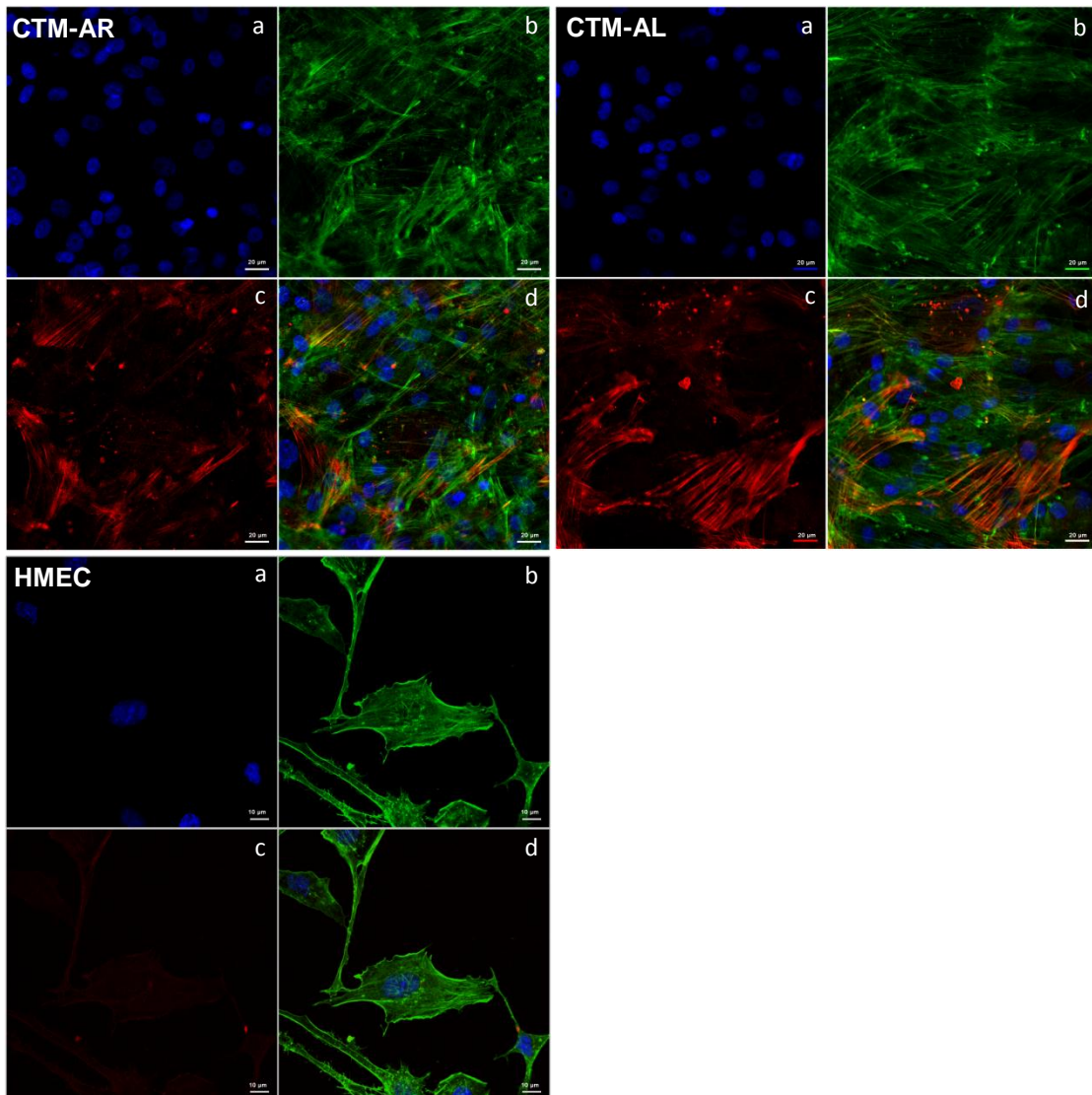
Legenda: Quantificação da caracterização do fenótipo celular para as populações AR e AL, pequenas vs. grandes. Resultados apresentados como média  $\pm$  DPM.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

#### 4.7 CTM-AR e CTM-AL são positivas para $\alpha$ -actina de músculo liso

Dando continuidade a caracterização das subpopulações, como as CTM se mostraram CD146<sup>+</sup>, investigou-se a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso por meio de imunocitoquímica. CTM expandidas e posteriormente cultivadas em lamínulas tiveram suas estruturas intracelulares evidenciadas, com o núcleo em azul, citoesqueleto de actina em verde e  $\alpha$ -actina de músculo liso em vermelho. Imagens representativas são ilustradas na figura 16, evidenciando a presença de fibras de  $\alpha$ -actina de músculo liso em determinadas células de ambas as populações, CTM-AR e CTM-AL. Células da linhagem HMEC-1 foram utilizadas como controle negativo.

Figura 16 – Imunocitoquímica das CTM-AR, CTM-AL e HMEC



Legenda: CTM-AR e CTM-AL apresentam células positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso (barra de calibração 20 $\mu\text{m}$ ). HMEC foi utilizada como controle negativo (barra de calibração 10 $\mu\text{m}$ ). Imagens das estruturas intracelulares marcadas com imunofluorescência destacam o núcleo (**a**, azul), filamentos de actina (**b**, verde) e filamentos de  $\alpha$ -actina de músculo liso (**c**, vermelho) individualmente. Figura **d** apresenta simultaneamente a fluorescência das diferentes estruturas intracelulares.

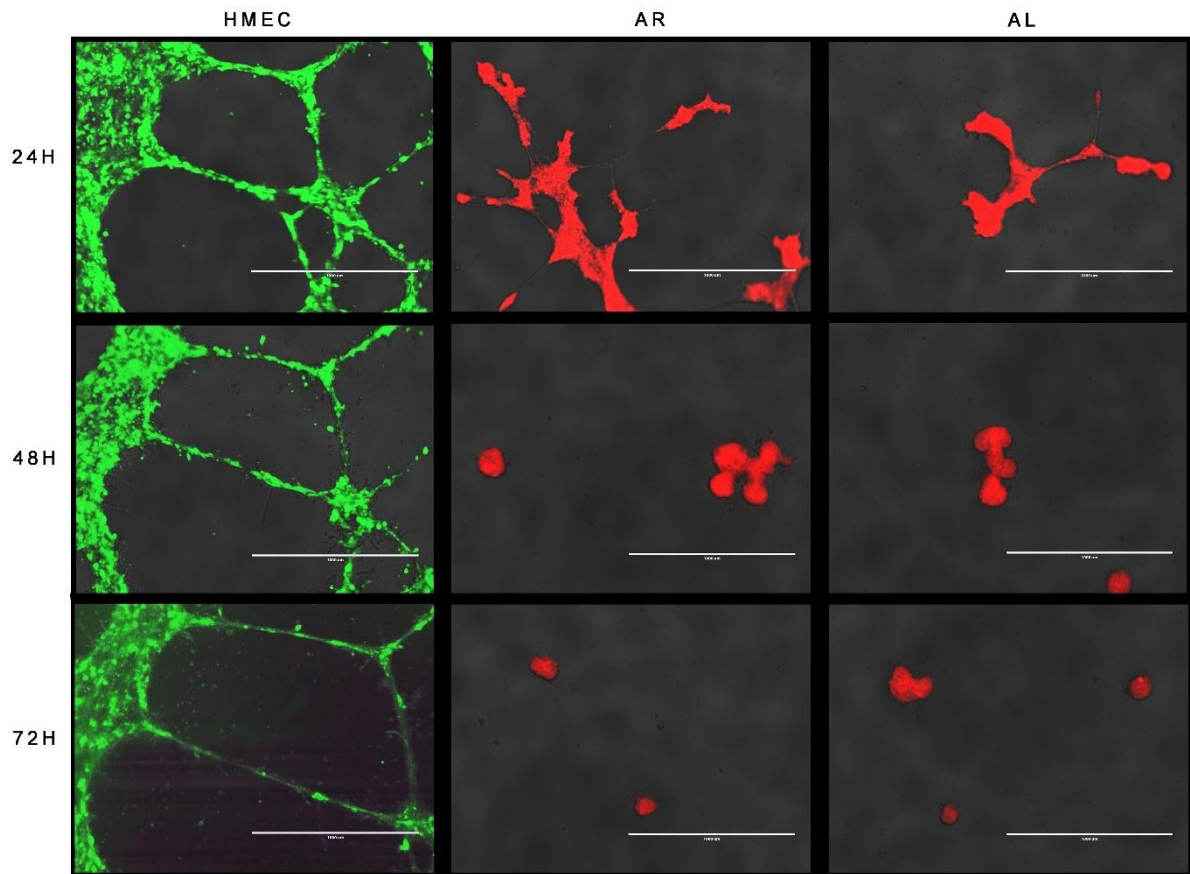
Fonte: PARIS, G.C., 2019

#### 4.8 Ensaio de Tubulogênese utilizando célula endotelial HMEC-GFP<sup>+</sup> e CTM-PKH26red<sup>+</sup>

Buscando identificar a atuação morfofuncional e o papel das CTM no desenvolvimento, organização e manutenção dos vasos, utilizamos o ensaio de tubulogênese *in vitro* para mimetizar o processo vasculogênico/angiogênico. Para tal, CTM-PKH26red<sup>+</sup> e HMEC-GFP<sup>+</sup> em proporção 1:5, respectivamente, foram co-cultivadas em matrigel. Após 24, 48 e 72 horas, a malha de túbulos formada foi avaliada em diversos parâmetros que correlacionam tanto à interconectividade/complexidade quanto à extensão/comprimento da rede formada.

Quando cultivadas sozinhas ou em co-cultivo com as CTM, as HMEC foram capazes de formar estruturas tubulares com morfologia endotelial característica e alta complexidade de malha, evidenciado pela alta interconectividade das estruturas. Em contrapartida, tanto CTM-AR quanto CTM-AL, quando cultivadas sozinhas não formaram estruturas tubulares, dando origem a esferoides ou massas amórficas de células (figura 17). Nota-se também, a perda gradual da fluorescência devido à atividade celular ao longo do tempo. Assim, 3 grupos foram analisados: **HMEC** (HMEC-GFP<sup>+</sup>), **HMEC+AR** (HMEC-GFP<sup>+</sup> e CTM-AR-PKH26red<sup>+</sup>) e **HMEC+AL** (HMEC-GFP<sup>+</sup> e CTM-AL-PKH26red<sup>+</sup>).

Figura 17 – Ensaio Tubulogênico das HMEC-GFP<sup>+</sup>, CTM-AR-PKH26red<sup>+</sup> e CTM-AL-PKH26red<sup>+</sup>



Legenda: Cultivo individual de HMEC-GFP<sup>+</sup> ou CTM-AR-PKH26red<sup>+</sup> ou CTM-AL-PKH26red<sup>+</sup> em matrigel por 24, 48 e 72 horas. HMEC demonstra capacidade tubulogênica mantida ao longo de 72 horas (coluna HMEC), enquanto CTM-AR e CTM-AL não são capazes de formar túbulos (colunas AR e AL). Nota-se a perda gradual da fluorescência devido à atividade celular. Barra de calibração 1000µm.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

Após as primeiras 24 horas, o co-cultivo HMEC+AR desenvolveu uma malha tubular reduzida e menos complexa em relação à HMEC. Observou-se menor quantidade e comprimento total de estruturas tubulares, de segmentos, de bifurcações e quantidade de redes formadas. Somente nos parâmetros de quantidade e comprimento das ramificações, que estima a formação de novos túbulos, o grupo HMEC-AR se igualou aos outros dois (HMEC e HMEC+AL). Já o grupo HMEC+AL, apesar de demonstrar redução, não apresentou diferença estatisticamente significativa no comprimento da malha tubular desenvolvida, mas a sua complexidade foi menor que HMEC, evidenciado pela menor quantidade de segmentos e redes formadas. Comparando a formação tubular dos grupos HMEC+AR e HMEC+AL, somente os parâmetros de quantidade de bifurcações e de segmentos apresentaram diferença estatisticamente significativa. Portanto, a presença das CTM induziu *déficit* na complexidade

da malha tubular formada pelos co-cultivos em 24 horas, sendo esta diminuição ainda mais intensa em HMEC-AR do que em HMEC-AL.

Com 48 horas de ensaio, HMEC apresentou aumento significativo na quantidade de segmentos e redes formadas, sem que houvesse aumento no comprimento total das estruturas quando comparada a 24 horas. Logo, sugere uma reorganização da malha tubular com aumento de complexidade e interconectividade sem haver aumento da extensão. De forma semelhante, após 48 horas o grupo HMEC+AR aumentou sua quantidade de segmentos, redes formadas e bifurcações ( $p=0.07$ ) em relação ao tempo de 24 horas, porém, tais parâmetros permaneceram inferiores à HMEC. Logo, HMECAR apresentou semelhante reorganização da malha tubular aumentando sua complexidade, porém ainda inferior à HMEC em complexidade e comprimento após 48 horas.

Já no grupo HMEC-AL, a quantidade e comprimento total das estruturas tubulares, quantidade de segmentos e bifurcações reduziram acentuadamente, enquanto o comprimento dos segmentos e quantidade de redes não apresentaram diferença estatística. Todos os parâmetros supracitados apresentaram inferioridade significativa quando comparados à HMEC. Ademais, o comprimento e quantidade das ramificações diminuíram significativamente em relação ao tempo de 24 horas. Além disso, excluindo-se os parâmetros de comprimento, todos foram menores na malha formada por HMEC-AL em relação à HMEC-AR.

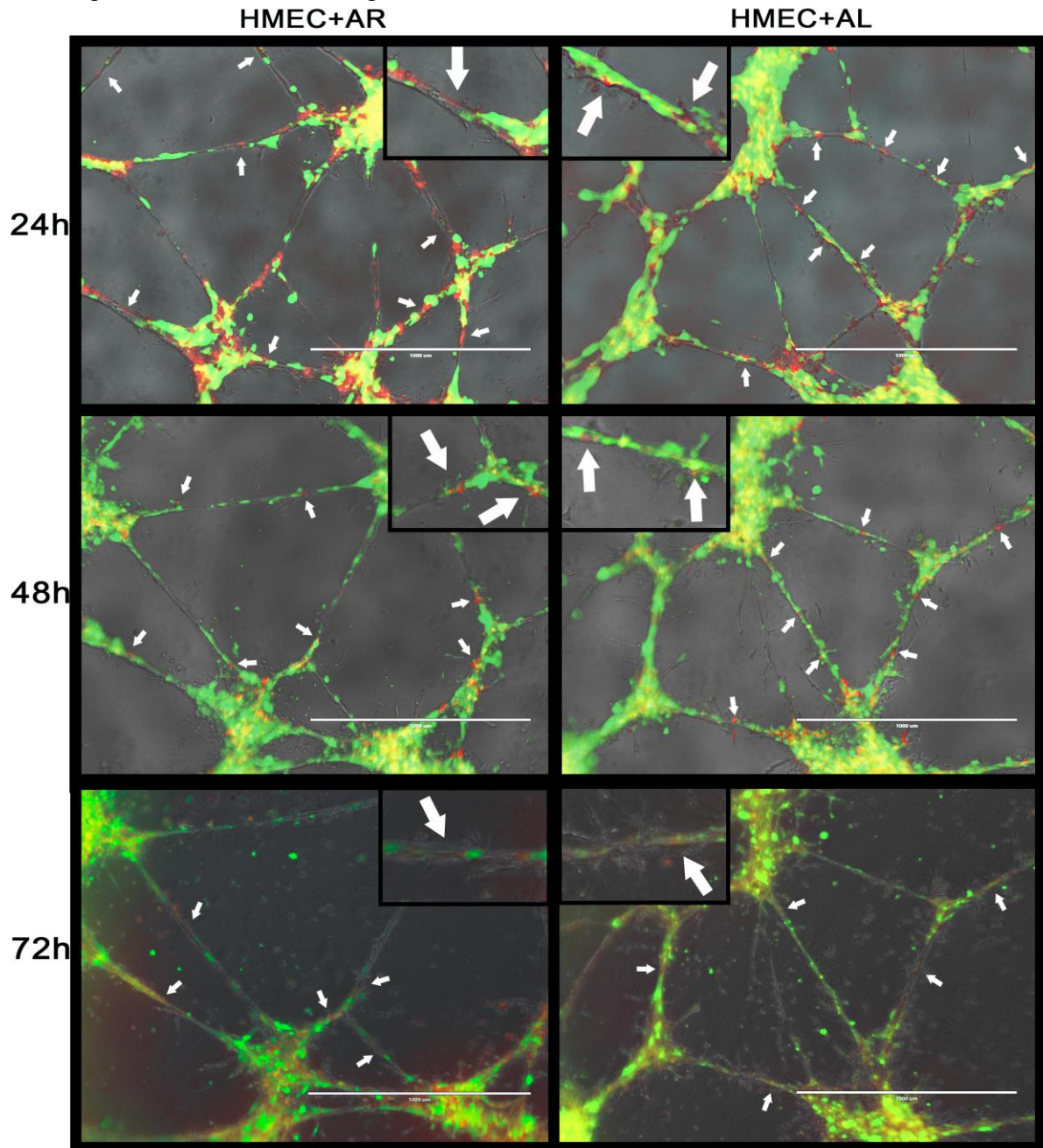
Assim, observou-se uma redução generalizada da malha tubular e complexidade de HMEC-AL em 48 horas, incluindo a inibição de angiogênese evidenciado pela redução geral das ramificações, desenvolvendo comportamento contrário aos outros 2 grupos. Enquanto HMEC e HMEC-AR aumentaram a complexidade/interconectividade de sua malha, HMEC-AL reduziu sua complexidade, buscando interações com maior eficiência, uma vez que o número de bifurcações caiu pela metade e o de redes formadas não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com 24 horas.

Após 72 horas, não houve alterações significativas em HMEC. No grupo HMEC-AR, observamos a manutenção nos parâmetros de comprimento total das estruturas tubulares e dos segmentos, enquanto as quantidades de estruturas tubulares totais, segmentos, bifurcações e redes formadas diminuíram significativamente. Todos os quesitos apresentaram inferioridade em relação à HMEC, com exceção dos parâmetros de ramificação. Já HMEC-AL mantiveram quase todos os seus parâmetros inalterados, significativamente inferiores à HMEC, com exceção, assim como HMEC-AR, da quantidade e comprimento das ramificações. Ademais,

não houve diferença estatisticamente significativa entre HMEC-AR e HMEC-AL em nenhum parâmetro após 72 horas.

Em relação à posição morfofuncional, CTM-AR e CTM-AL apresentaram células PKH26red<sup>+</sup> adjacentes aos túbulos pela face abluminal, com morfologia fibroblastóide, em quase todos os túbulos formados (figura 18, setas e inserções). Visualmente, a frequência de células morfofuncionalmente perivasculares foi equivalente entre as populações CTM-AR e CTM-AL em todo o experimento. Uma fração das células não se incorporou aos túbulos, constituindo monocamada junto à algumas células endoteliais.

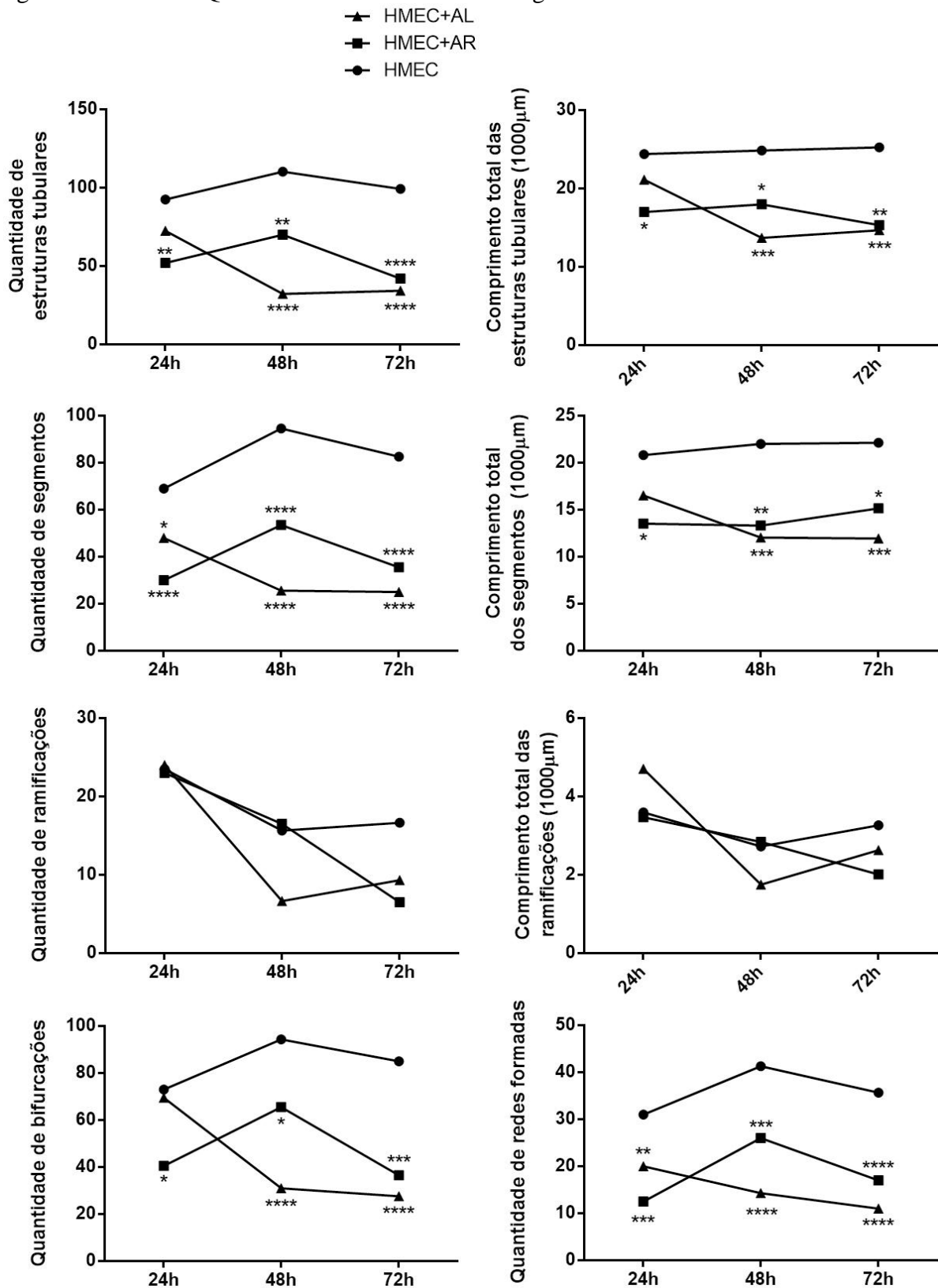
Figura 18 – Ensaio Tubulogênico com HMEC+AR e HMEC+AL Fluorescentes



Legenda: Co-cultivo de HMEC+CTM-AR ou HMEC+CTM-AL em matrigel por 24, 48, 72 horas. HMEC-GFP<sup>+</sup> (verde), CTM-PKH26red<sup>+</sup> (vermelho). CTM PKH26red<sup>+</sup> na extensão do túbulo formado por HMEC-GFP<sup>+</sup> são evidenciadas nas inserções correspondentes. Barra de calibração 1000μm.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

Figura 19 – Análise Quantitativa dos Ensaio Tubulogênicos



Legenda: Análise dos túbulos formados nos co-cultivos HMEC+AR e HMEC+AL por *ImageJ*. Relevância estatística: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ , \*\*\*\* -  $p < 0.0001$ ,  $\alpha$  - diferença significativa com o tempo anterior.  $\beta$  - diferença estatística com 24h.

Fonte: PARIS, G.C., 2019

## 5. DISCUSSÃO

A população celular comumente denominada célula-tronco mesenquimal, estromal ou esquelética, pode ser obtida de diversas fontes teciduais e, atualmente, refere-se a um conjunto de células altamente heterogêneo, contando com células totalmente diferenciadas, progenitoras e tronco (MORAVCIKOVA, E. et al 2018; MCLEOD, C.; MAUCK, R. 2017; RENNERFELDT, D.A., et al. 2019; KIM, H.-K., et al. 2018; YANG, ZX et al. 2013; RUSSELL, K. C. *et al.* 2010; PARK, J.-H. et al. 2016; MO, M. et al. 2016; ESTEVES, C.L.;DONADEU, F.X. 2017; BECKER, A.D.;RIET, I.V. 2016; SAMSONRAJ, R.M. et al. 2017). Atualmente, a técnica padrão-ouro para isolamento de CTM continua sendo baseada na adesão celular ao plástico por 3 dias e subsequente descarte do sobrenadante, devido a sua facilidade, baixo custo e alto rendimento celular. A capacidade de adesão ao plástico é um dos parâmetros de identificação das CTM *in vitro*, segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI M. et al. 2006; RASINI, V. et al. 2013). Além disso, tal capacidade ainda é utilizada como importante ferramenta para mensurar quantidade e potencial proliferativo de células-tronco em determinada população, através do ensaio de formação de colônia (CHAN, C.K.F. et al. 2018; LI, H. et al. 2016; YANG, ZX et al. 2013; SAMSONRAJ, R.M. et al. 2017; MCLEOD, C.; MAUCK, R. 2017; RENNERFELDT, D.A., et al. 2019). Portanto, como diversas células compartilham da capacidade de adesão ao plástico, compreende-se a alta contaminação por células indesejadas dentre as denominadas CTM.

O protocolo de isolamento por adesão desenvolvido em 1970 por Friedenstein e colaboradores, sofreu algumas adaptações ao longo do tempo, com alguns grupos permitindo a adesão celular ao plástico por tempos inferiores, chegando a apenas 24 horas (CUI, J. et al. 2018). Outros grupos, porém, identificaram a presença de células remanescentes no sobrenadante após protocolo padrão-ouro.

Em humanos, Wan e colaboradores (2005), ao isolar progenitores de restos cirúrgicos provenientes de artroplastia total, replaquearam o sobrenadante após 7 dias de cultura, repetindo o processo a cada 3 dias. Os autores se atêm a caracterizar as células não aderentes como progenitores estromais ao avaliando a capacidade de diferenciarem *in vitro* e originarem osso *in vivo*. Concluíram que ambas as populações possuíam proliferação semelhante e que, portanto, a população não aderente representaria somente uma fonte complementar de progenitores estromais.

Di Maggio e colaboradores (2012) também identificam uma população não aderente após 3 dias de cultivo, com maior potencial proliferativo. Porém, essa população é estritamente dependente de suplementação do meio com FGF-2, que é capaz de regular seletivamente a capacidade de adesão de CFU, estimular sua proliferação no sobrenadante e aumentar o tamanho de seus telômeros (BAKSH, D.; DAVIES, J. E.; ZANDSTRA, P. W 2003).

Assim, nesse trabalho, desenvolvemos um protocolo de resgate das CTM ainda presentes no sobrenadante descartado após 3 dias (CTM-AL), a fim de explorar o grau de comprometimento e caracterizar essa população de maneira comparativa ao isolamento clássico (CTM-AR), quando proveniente de pacientes osteoartríticos.

A partir da aplicação do protocolo de isolamento proposto, obtivemos acréscimo de 1/3 na frequência de CTM utilizando a mesma quantidade de amostra de medula óssea. Além disso, as CFU-AL apresentam maior potencial proliferativo, tendo, em média, 2 vezes mais células por colônia em comparação com as CFU-AR. A utilização de pacientes de variadas idades, hábitos e condições de vida, além de diferenças anatômicas que geram amostras contemplando microambientes medulares diversos, podem ter contribuído para a alta variabilidade nas amostras.

Em cultura, a análise do potencial proliferativo nos permite inferir o nível de diferenciação e comprometimento entre as duas populações: quanto mais células similares à célula-mãe determinado progenitor é capaz de gerar, menor seu grau de comprometimento (BIANCO, P. et al. 2013). A baixíssima concentração de células nucleadas da medula no início do cultivo, de apenas 5000 células nucleadas/cm<sup>2</sup>, representa uma frequência média de 0,6 CFU/cm<sup>2</sup>, o que conserva espaço entre as colônias futuramente formadas, permitindo assumir que uma única célula seja responsável pela formação da colônia e, portanto, as células-filhas sejam clonogênicas. Entretanto, ainda que os devidos cuidados sejam tomados, probabilisticamente não podemos descartar um cenário no qual uma colônia seja originada pela contribuição de duas ou mais células. Assim, para a quantificação de células progenitoras numa amostra individual, o método de CFU pode adicionar um viés à análise. Contudo, o ensaio de formação de colônia continua sendo uma excelente ferramenta para a identificação de células-tronco/progenitoras e, principalmente, para a comparação entre duas populações, uma vez que ambas estarão submetidas a mesma probabilidade de erro (RENNERFELDT, D.A., et al. 2019; MCLEOD, C.; MAUCK, R. 2017; RUSSELL, K. C. et al. 2010).

De maneira semelhante, o ensaio de formação de colônia secundária visa a exaustão proliferativa prévia desses progenitores como forma de avaliar a extensão da sua capacidade

de autorrenovação. Logo, células progenitoras indiferenciadas apresentam maior frequência de CFU-secundária (CFU2°) entre suas células-filhas. Como observado, a população CFU2°-AL apresentou maior frequência em relação à CFU2°-AR, demonstrando capacidade de manutenção de sua autorrenovação. Em contrapartida, quando quantificadas as células totais do poço e dividindo-se o valor obtido pela média de colônias geradas nas outras replicatas, CFU 2°-AR demonstrou ter média de células por colônia superior à CFU 2°-AL. Entretanto, como observado na figura 8, as colônias formadas por CFU 2°AL tem aparência claramente maior, enquanto o tamanho das células (figura 14) e o espaçamento entre elas é igual em CTM-AR e CTM-AL.

Acreditamos que haja uma contaminação de células com baixa capacidade de proliferação, insuficiente para formar uma colônia, porém, que contribui e desvia as quantificações quando levamos em consideração todas as células presentes no cultivo. A quantificação de células por colônia primária não sofre tamanha discrepância, uma vez que células totalmente diferenciadas (estromais e CD45<sup>+</sup>) com proliferação mínima, constituem majoritariamente a contaminação celular. Justamente por isso, após a expansão celular durante o ensaio de CFU primária, as células totalmente diferenciadas agora correspondem a um baixíssimo percentual do conjunto de células contaminantes que, agora, são formadas por células-filhas progenitoras com baixíssimo potencial proliferativo (não formadoras de colônia). Como a frequência de CFU2° é maior em AL do que em AR, a contaminação inicial de células não formadoras de colônia é maior em CFU2°-AR, desviando a média de células por colônia formada.

Além da capacidade de formação de colônia, CTM-AR e CTM-AL apresentaram também multipotencialidade e fenótipo condizente com os marcadores celulares já descritos para CTM (DOMINICI M et al. 2006; RASINI, V. et al. 2013). Tanto CTM-AR quanto CTM-AL foram capazes de diferenciar nas linhagens osteogênica e adipogênica. Na diferenciação osteogênica com 14 dias, CTM-AR apresentou marcação levemente mais forte que prosseguiu até o final de 21 dias. Ambas as populações de CTM foram capazes de gerar matriz mineralizada em toda área do poço com 21 dias de indução osteogênica. Tal comportamento aponta para uma capacidade de diferenciação semelhante, porém de início mais lento em CTM-AL, possivelmente, demandando mais tempo para que suas células saiam de seu estado indiferenciado. De maneira mais evidente, a diferenciação adipogênica aponta para as CTM-AL como detentoras da maior capacidade de diferenciação, com a grande maioria das células acumulando gotículas lipídicas em seu citoplasma ao final de 21 dias. Enquanto as CTM-AR apresentam reduzida capacidade de diferenciação adipogênica, uma

vez que somente uma fração das células desenvolveu fenótipo contendo gotículas lipídicas intracelulares. Portanto, as CTM-AR apresentam menor multipotencialidade que as CTM-AL, sugerindo maior comprometimento com a linhagem osteogênica em detrimento da adipogênica. Dessa forma, as CTM-AL apresentam potencial regenerativo ao serem altamente proliferativas e multipotentes. Experimentos futuros de diferenciação condrogênica estenderão nosso entendimento sobre as CTM de pacientes com osteoartrose e seu nível de comprometimento celular entre as diferentes linhagens celulares.

Na cultura 2D, a interação física entre as células progenitoras e o substrato, normalmente material plástico, exerce estímulos indutores de diferenciação nas células progenitoras, podendo alterar seu nível de comprometimento e, conseqüentemente, seu potencial proliferativo. A rigidez da matriz na qual as CTM se encontram induz a diferenciação em tipos celulares específicos (ENGLER, A. J. et al. 2006). De acordo com diferentes grupos de pesquisa, o cultivo de CTM por prolongadas passagens causa um envelhecimento *in vitro*, dado pelo encurtamento dos telômeros ao proliferarem, e comprometimento com a linhagem osteogênica com indução da expressão de genes como sialoproteína óssea e osteocalcina (PETER, S. et al. 2012; BANFI, A. et al. 2002). Além disso, mesmo quando expandidas moderadamente (3 passagens), as CTM apresentam alterações em seus marcadores superficiais, diminuindo sua multipotencialidade e, até mesmo, seu efeito terapêutico (VON BAHR, L. et al. 2012; YANG, Y.-H.K., et al. 2018; BARA, J. J. et al. 2014). Dessa forma, para a conservação do fenótipo, mantivemos a manipulação ao mínimo possível, realizando todas as análises de citometria com CTM primárias, a fim de identificar o perfil mais próximo possível de seu imunofenótipo *in situ*.

De maneira geral, tanto CTM-AR quanto CTM-AL apresentaram perfil CD90<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>/CD10<sup>+</sup>/CD54<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>, enquadrando-se no fenótipo descrito para as CTM (DOMINICI M et al. 2006; RASINI, V. et al.2013; SAMSONRAJ, R.M. et al. 2017; MO, M. et al. 2016). Além disso, tanto CTM-AR quanto CTM-AL apresentaram parte das células positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso. Diversos grupos apresentaram possíveis marcadores para as CTM, porém ainda não há um marcador único que diferencie progenitores de CTM, o que impede a caracterização adequada e, conseqüentemente, a avaliação do potencial terapêutico das subpopulações de forma isolada. Com nosso protocolo de isolamento, conseguimos separar duas populações de CTM que expressam diferencialmente os marcadores CD146, CD49d, CD184, CD45, CD24 e HLA. Células CD184<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> e HLA<sup>+</sup> foram mais frequentes em CTM-AR, enquanto as células CD146<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> e CD49d<sup>+</sup> foram mais frequentes em CTM-AL.

O aprofundamento da análise do tamanho celular permitiu selecionar de forma ainda mais pura as células-alvo, uma vez que ambas subpopulações “Grandes” e “Pequenas” expressam perfil condizente com CTM. Dessa forma, esmiuçamos ainda mais o perfil das CTM e sua heterogeneidade. Os marcadores diferencialmente expressos entre CTM-AR e CTM-AL, com exceção de HLA, CD54 e CD49d, apresentam-se preferencialmente expressos por células de um único tamanho celular. Células CD24<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> e CD184<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> estão preferencialmente inseridas na população “Pequenas”, enquanto células CD146<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> encontram-se enriquecidas na população “Grande”, tanto em CTM-AR quanto em CTM-AL.

Alguns autores descrevem o tamanho celular como um parâmetro relacionado ao perfil de CTM indiferenciada. Células de tamanho pequeno geram mais CFU-F clonais, se autorrenovam mais rapidamente, possuem telômeros maiores e são mais frequentes em amostras de medula óssea de pacientes jovens. Amostras de pacientes idosos apresentam, majoritariamente, células de tamanho grande e poucas CTM pequenas, porém, estas preservam suas características demonstrando fenótipo semelhante às CTM pequenas encontradas em amostras de pacientes jovens (BLOCK, T.J. et al 2017; SMITH, J.R. et al. 2004).

A análise apresentada está em concordância com outros grupos que também encontraram células HLA<sup>+</sup>, grande frequência de células CD54<sup>+</sup> e aproximadamente 30% de células CD24<sup>+</sup>, os quais alteram sua frequência de acordo com o tempo em cultura (MORAVCIKOVA, E. et al 2018; BATTULA, V.L. 2009)

CD49d é a integrina  $\alpha$ 4, receptora de fibronectina e ICAM, molécula presente em endotélio vascular, atuando na adesão intercelular e transmigração das células. Quando CD49d é bloqueado em ensaio de tubulogênese, as CTM não são mais capazes de assumir posição perivascular *in vitro* (RUSTER, B. et al. 2006). Dessa forma as CTM CD49d<sup>+</sup> apresentam potencial terapêutico promissor ao interagirem diretamente com as células endoteliais.

A população de células pequenas CD45<sup>-</sup> apresentou parte das células CD184<sup>+</sup>. Alguns grupos descreveram que o recrutamento de CTM para o sítio de remodelamento ósseo ocorre através da sinalização via SDF1-CXCR4 (CD184), atraindo CTM presentes na circulação (OTSURU, S. et al. 2008). Além disso, a indução da expressão de CD184 pelas CTM melhora a migração das mesmas, aumentando a regeneração tecidual em modelo de lesão (ZHANG, D. et al 2008; MA, H.-C 2014). Com nossa análise detalhada, essa população foi identificada permitindo, futuramente, a seleção precisa para que seu potencial terapêutico seja avaliado.

Ademais, além da maior frequência de células CD146<sup>+</sup>, a mediana de intensidade de fluorescência também foi maior nas CTM-AL, indicando maior expressão desta molécula. Alguns autores reportaram a alta intensidade de fluorescência de CD146 associada às células com caráter indiferenciado (RUSSEL, K. C et al. 2010).

Em dois estudos independentes, Crisan et al. (2008) e Sacchetti et al. (2007) identificaram extensivamente que as células CD146<sup>+</sup> presentes na região perivascular geram ossículos inteiros com suporte a hematopoiese, dando origem a células de mesmo fenótipo, as quais também eram capazes de formar ossículo secundário completo. Assim, cumprindo os parâmetros mais exigentes de classificação de uma célula como tronco, que são: sua contribuição à formação do tecido, manutenção da homeostase e a geração de prole com fenótipo igual à célula-mãe, capaz de formação de ossículo funcional *de novo*, pôde-se afirmar a presença de células verdadeiramente tronco. Como essas células apresentaram localização histológica e marcadores que se sobrepõem àqueles descritos para as células perivasculares, identificou-se que as CTM tenham o pericito como seu correspondente *in vivo* (DA SILVA MEIRELLES, L. 2006; WANG, Y. 2019; CAPLAN, A. I. 2017; ESTEVES, C. L., DONADEU, F.X. 2018).

No geral, CTM CD146<sup>+</sup> estão enriquecidas na população CTM-AL, que também são positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso. Portanto, a população CTM-AL isolada no presente trabalho é enriquecida em pericitos/células perivasculares, incluindo a CTM baseada em sua localização *in situ*.

Ademais, na nossa análise, células CD146<sup>+</sup> encontram-se enriquecidas na população de maior tamanho. Sabe-se que CD146 marca células perivasculares, porém nem toda célula perivascular é uma CTM (CAPLAN, A. I. 2018). Assim, é possível que células CD146<sup>+</sup> pequenas sejam as que, de fato, detêm características de CTM indiferenciadas, e portanto, contribuam para regeneração. Experimentos futuros isolando as subpopulações de células CD146<sup>+</sup> permitirão averiguar seu potencial regenerativo e terapêutico.

O replaqueamento do sobrenadante e o tempo em cultura necessário para a adesão da população CTM-AL coincide com o período necessário para a adesão de pericitos murinos (GHARAIBEH, B. et al. 2008). Dellavalle et al. (2011) confirmaram a identidade dessa população como CTM/pericitos através de camundongos transgênicos, identificando a participação na homeostase celular e regeneração de lesão. Dessa forma, buscamos entender o papel morfofuncional exercido pelas CTM quando co-cultivadas com células endoteliais em ensaio tubulogênico.

A formação vascular é um processo dinâmico e complexo dependente de interações celulares justácrinas e parácrinas, além do remodelamento da matriz extracelular (MOHAMMADI, E. et al. 2015). Durante a angiogênese, túbulos nascentes ou em desenvolvimento são formados por células endoteliais proliferativas e migratórias, com membrana basal imatura. Essa fase marca a formação de vaso primitivo, seguida de recrutamento de pericitos via FGF-2 e PDGF que, com o remodelamento da membrana basal, formam o vaso maduro (KUTCHER, M.E.; HERMAN, I.M. 2009). Uma das funções características dos pericitos, também compartilhada pelas células de músculo liso, é a inibição da proliferação endotelial, seja pelo contato justácrino ou parácrino. Além disso, os pericitos também são responsáveis pela contratilidade e estabilização da permeabilidade vascular. Dessa forma, a incorporação de pericitos constitui uma fase crucial da angiogênese, na qual as células endoteliais saem de um estado proliferativo e migratório para um endotélio quiescente (KUTCHER, M.E.; HERMAN, I.M. 2009).

Nossos resultados demonstraram que ambas as populações de CTM foram potentes inibidoras do desenvolvimento endotelial. Ficou evidenciada a capacidade das CTM-AR e CTM-AL apresentarem a morfologia e localização similar a pericitos/células perivasculares ao ocuparem a região abluminal adjacente ao túbulo e reduzirem a malha tubular formada. Dessa forma, algumas células isoladas tanto em CTM-AR quanto em CTM-AL da medula óssea conseguem se integrar ao túbulo, estabilizando a estrutura formada pelas células endoteliais. Contudo, o processo que orienta a inibição parece ocorrer sob mecânicas diferentes entre as população AR e a AL. Inicialmente, HMEC+AR e HMEC+AL demonstraram redução da malha tubular formada em 24 horas, em relação à HMEC sozinha, sendo a inibição mais acentuada em HMEC+AR. Com 48 horas, HMEC e HMEC+AR sofreram uma mudança conformacional, aumentando a complexidade da malha tubular, enquanto HMEC+AL agiu de forma totalmente contrária, levando à redução contundente em extensão e complexidade, o que se manteve em 72 horas. Dessa forma, apesar da inibição inicial, HMEC+AR permitiu uma reorganização tubular semelhante à HMEC, envolvendo a formação de novos túbulos, enquanto em HMEC+AL apresentou somente efeito inibidor, buscando a interconectividade mais eficiente. Durante a formação dos vasos, células endoteliais recrutam progenitores mesenquimais e induzem sua diferenciação em célula perivasculares via TGF- $\beta$  e interação célula-célula (HIRSCHI, K.K. 2003). Assim, as CTM-AL demonstram um efeito limitante inicial brando, porém progressivo, o que sugere a maturação progressiva dos túbulos ao se especializarem, por indução do endotélio, em pericitos.

Curiosamente, a quantidade e comprimento das ramificações não apresentou diferença entre grupos, somente de 24 horas para 48 horas em CTM-AL. Assim, podemos inferir que as atividades das CTM-AL interferiram com o processo de angiogênese, inibindo-o. Tal ação ocorre, possivelmente, através da formação de túbulos mais sofisticados, contendo população perivascular capaz de envolver o túbulo na face abluminal e regular sua atividade de maneira justácrina.

Apesar dos efeitos pro-angiogênicos descritos para as CTM de medula óssea sobre algumas células endoteliais, em especial células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC), observamos acentuada inibição da formação tubular quando comparadas com HMEC sozinha em qualquer tempo. HUVEC são constituintes de vaso de grosso calibre (veia de cordão umbilical), e possuem alta sensibilidade à citocinas (TAN, P. et al. 2004). Desse modo, optamos pelas células da linhagem HMEC, por apresentarem características morfológicas e moleculares da rede microvascular adulta, sabendo da maior associação entre pericitos e estruturas microvasculares, especialmente arteríolas e sinusóides (ACAR, M. et al. 2015; PINHO, S.; FRENETTE, P.S. 2019; KUNISAKI, Y. et al. 2013; HASSANSHAHI, M. et al. 2019; S. INOUE, S. e OSMOND, D.G. 2001). Além disso, existe uma grande variação das moléculas secretadas e suas concentrações pelas CTM, de acordo com seu tecido de origem, grau de heterogeneidade, e principalmente, tempo em cultura. (MEIRELLES, L. da S. 2009).

Outros autores também observaram efeito anti-angiogênico. Otsu e colaboradores (2009), utilizando células endoteliais de microvasculatura pulmonar em co-cultivo 3D, descreveram a inibição da tubulogênese pela CTM de maneira dose-dependente. Observaram que CTM migraram para os túbulos, intercalaram com as células endoteliais, estabeleceram junção comunicante e aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio, levando à apoptose das células endoteliais e degeneração tubular. Lee e colaboradores (2013), demonstraram que exossomos derivados de CTM carregam micro-RNA16, inibidor de VEGF. Menge e colaboradores (2012) demonstraram potente efeito estabilizador das CTM sobre as células endoteliais, inibindo sua proliferação e reduzindo a malha de tubos formada de maneira justácrina-dependente. Tal caráter inibitório também foi observado *in vivo* através da inserção de *plug* de matrigel dorsal e transplante de CTM por via intravenosa. Curiosamente, quando CTM e células endoteliais foram cultivadas sem contato direto, as CTM promoveram aumento da rede vascular via sinalização trófica. Além disso, Yamamoto e colaboradores (2013), utilizando CTM PDGFR- $\alpha$ + e HUVEC em sistema de microfluído 3D, demonstraram

a diminuição da formação inicial de ramificações e redução da extensão total da rede vascular comparado à HMEC sozinha.

Portanto, ainda que o isolamento em HMEC+AL não seja perfeito, o isolamento proposto possibilita cultivar seletivamente uma população enriquecida em células perivasculares que demonstram maior potencial proliferativo e multipotencial. Dessa forma, permite progredirmos na identificação das verdadeiras células-tronco presentes na população de 'CTM' e otimizar os protocolos terapêuticos com subpopulações de fenótipo definido. Maiores investigações são necessárias para definir a relação direta entre as populações CTM-AR e CTM-AL *in vitro* para, posteriormente, compreendermos o mecanismo regulatório e sua localização específica na medula óssea. Assim, a técnica de adesão diferencial se apresenta como uma ferramenta de purificação celular fácil que pode ser utilizada em diversos processos terapêuticos.

## CONCLUSÃO

O objetivo do presente trabalho em purificar progenitores estromais da medula óssea foi alcançado. A população CTM-AL isolada apresentou maior potencial regenerativo ao serem multipotentes e altamente proliferativas, características passadas adiante para sua prole, quando comparadas com as CTM-AR isoladas pelo protocolo padrão-ouro que descarta o sobrenadante após 3 dias. Além disso, a população CTM-AL é enriquecida em células CD146<sup>+</sup> e capaz de regular o desenvolvimento endotelial ao assumirem a função de pericito, remetendo à localização anatômica das CTM indiferenciadas. Assim, através de simples técnica de isolamento baseada na adesão diferencial em meio básico com suplementação padrão, uma população de CTM é purificada, apresentando menos contaminantes celulares, especialmente células CD45<sup>+</sup> e HLA<sup>+</sup>. Por fim, a caracterização de CTM minimamente manipuladas permitiu identificar subpopulações diversas, inclusive em relação ao tamanho celular, as quais agora podem ter seu potencial explorado.

A presença de células indiferenciadas em pacientes osteoartrosicos reforça a possibilidade do uso de células autólogas na terapia celular. Contudo, o potencial condrogênico destas ainda não foi explorado. Experimentos futuros que avaliem a capacidade de formação tecidual *in vivo*, como o ensaio de 'limb bud', esclarecerão o potencial regenerativo dessa subpopulação. Além disso, esmiuçar a capacidade de regulação do endotélio, através de tubulogênese por mais tempo em meio menos complexo, assim como explorar a regulação proliferativa via interações célula-células do endotélio e CTM-AL (integrinas e conexinas) fornecerão evidências da capacidade dessa população em desenvolver endotélio maduro.

## REFERÊNCIAS

- ACAR, M. KOCHERLAKOTA, K. S., MURPHY, M. M., PEYER, J. G., OGURO, H., INRA, C. N., ... Morrison, S. J. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*, 526(7571), 126–130. 2015 doi:10.1038/nature15250
- AHMED, T. A., & EL-BADRI, N. Pericytes: The Role of Multipotent Stem Cells in Vascular Maintenance and Regenerative Medicine. *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 1*, 69–86. (2017) doi:10.1007/5584\_2017\_138
- SAKAMOTO A., OTSUKI B., OKAMOTO T., GOTO T., YOSHIMURA T., MATSUDA, S.. Diffuse Appearance of Red Bone Marrow on MRI Mimics Cancer Metastasis and Might be Associated with Heavy Smoking *The Open Orthopaedics Journal* 1874-3250/18 2018
- ARSLAN, G; OZMEN, E.;SOYTURK, M Efficacy of chemical shift MRI for differentiating diffuse red bone marrow reconversion and hematological malignancies. *Burcu AKMAN1 Pol J Radiol*, 2015; 80: 300-304. DOI: 10.12659/PJR.894118
- ATTWELL, D., MISHRA, A., HALL, C. N., O'FARRELL, F. M., & DALKARA, T.. What is a pericyte? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(2), 451–455 (2015).doi:10.1177/0271678x15610340
- BAKSH, D.; DAVIES, J. E.; ZANDSTRA, P. W. Adult human bone marrow–derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Experimental Hematology*, v. 31, n. 8, p. 723–732, ago. 2003.
- BANFI, A. BIANCHI G, NOTARO R, LUZZATTO L, CANCEDDA R, QUARTO R. Replicative Aging and Gene Expression in Long-Term Cultures of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Tissue Engineering*, v. 8, n. 6, p. 901–910, dez. 2002.
- BARA, J. J., RICHARDS, R. G., ALINI, M., & STODDART, M. J. Concise Review: Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Change Phenotype Following In Vitro Culture: Implications for Basic Research and the Clinic. *STEM CELLS*, 32(7), 1713–1723. (2014). doi:10.1002/stem.1649
- BARBOUR KE, HELMICK CG, BORING M, BRADY TJ. Vital Signs: Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation—United States, 2013–2015. *Morb Mortal Wkly Rep* 2017;66:246–253 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6609e1>
- BATTULA VL, TREML S, BAREISS PM, GIESEKE F, ROELOFS H, DE ZWART P, MÜLLER I, SCHEWE B, SKUTELLA T, FIBBE WE, KANZ L, BÜHRING HJ. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica.*; 94:173–184 2009. doi: 10.3324/haematol.13740.
- BECKER, A. D., & RIET, I. V. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Journal of Stem Cells*, 8(3), 73. (2016). doi:10.4252/wjsc.v8.i3.73
- BEVAN S. Economic impact of musculoskeletal disorders (MSDs) on work in Europe. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2015;29:356–73.
- BIANCO, P. CAO X, FRENETTE PS, MAO JJ, ROBEY PG, SIMMONS PJ, WANG CY. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature Medicine*, v. 19, n. 1, p. 35–42, 7 jan. 2013.

- BIRBRAIR, A., BORGES, I. DA T., GILSON SENA, I. F., ALMEIDA, G. G., DA SILVA MEIRELLES, L., GONÇALVES, R., ... DELBONO, O. How Plastic Are Pericytes? *Stem Cells and Development*, (2017). 26(14), 1013–1019. doi:10.1089/scd.2017.0044
- BLOCK, T. J., MARINKOVIC, M., TRAN, O. N., GONZALEZ, A. O., MARSHALL, A., DEAN, D. D., & CHEN, X. D. Restoring the quantity and quality of elderly human mesenchymal stem cells for autologous cell-based therapies. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 239, 2017. doi:10.1186/s13287-017-0688-x
- BODNAR, R. J., SATISH, L., YATES, C. C., & WELLS, A. *Pericytes: A newly recognized player in wound healing*. *Wound Repair and Regeneration*, (2016) 24(2), 204–214. doi:10.1111/wrr.12415
- BOTHE, F.; DEUBEL, A.-K.; HESSE, E.; LOTZ, B.; GROLL, J.; WERNER, C.; RICHTER, W.; HAGMANN, S. Treatment of Focal Cartilage Defects in Minipigs with Zonal Chondrocyte/Mesenchymal Progenitor Cell Constructs. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 653.
- BRIGHTON, C.T. LORICH DG, KUPCHA R, REILLY TM, JONES AR, WOODBURY RA 2ND.. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res.*;(275):287-99. Feb 1992
- BRITTBERG, MATS - Clinical articular cartilage repair—an up to date review. 2018 *Ann Joint* 2018;3:94 doi: 10.21037/aoj.2018.11.09
- CAKOUROS DIMITRIOS, GRONTHOS STAN. Epigenetic Regulation of Bone Marrow Stem Cell Aging: Revealing Epigenetic Signatures associated with Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cell Aging[J]. *Aging and disease*, 2019, 10(1): 174-189
- CALVI, L. M.; LINK, D. C. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood*, v. 126, n. 22, p. 2443–2451, 14 out. 2015.
- CAPLAN, A. I All MSCs Are Pericytes? *Cell Stem Cell*, 3(3), 229–230. (2008) doi:10.1016/j.stem.2008.08.008
- CAPLAN, A. I. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *Journal of Orthopaedic Research*, 35(6), 1151–1159. (2017) doi:10.1002/jor.23560
- CHAN, C.K., GULATI, G.S., SINHA, R., TOMPKINS, J.V., LOPEZ, M., CARTER, A.C., RANSOM, R.C., REINISCH, A., WEARDA, T., MURPHY, M., et al. Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell* 175, 43–56. (2018).
- CHEN, K. G., JOHNSON, K. R., MCKAY, R. D. G., & ROBEY, P. G. Concise Review: Conceptualizing Paralogous Stem-Cell Niches and Unfolding Bone Marrow Progenitor Cell Identities. *STEM CELLS*, 36(1), 11–21. (2017). doi:10.1002/stem.2711
- CHU, C. R., FORTIER, L. A., WILLIAMS, A., PAYNE, K. A., MCCARREL, T. M., BOWERS, M. E., & JARAMILLO, D. Minimally Manipulated Bone Marrow Concentrate Compared with Microfracture Treatment of Full-Thickness Chondral Defects. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 100(2), 138–146. (2018). doi:10.2106/jbjs.17.00132
- COOK, D., & GENEVER, P. Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 213–229 (2013). doi:10.1007/978-94-007-6621-1\_12
- CORDEIRO-SPINETTI E, DE MELLO W, TRINDADE LS, TAUB DD, TAICHMAN RS, BALDUINO A. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 2, 27 mar. 2014.

- CORDEIRO-SPINETTI, E.; TAICHMAN, R. S.; BALDUINO, A. The Bone Marrow Endosteal Niche: How Far from the Surface? *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 116, n. 1, p. 6–11, 11 nov. 2014.
- CRAFT, C. S., LI, Z., MACDOUGALD, O. A., & SCHELLER, E. L. Molecular Differences Between Subtypes of Bone Marrow Adipocytes. *Current Molecular Biology Reports*, 4(1), 16–23 (2018). doi:10.1007/s40610-018-0087-9
- CUI, J., CHEN, G., PERRY, A. S., & ABDI, S. Transient Cell-to-Cell Signaling before Mitosis in Cultures of human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Stem Cells and Development*. (2018). doi:10.1089/scd.2018.0165
- DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 11, p. 2204–2213, 9 maio 2006.
- DELORME, B RINGE J, PONTIKOGLOU C, GAILLARD J, LANGONNÉ A, SENSEBÉ L, NOËL D, JORGENSEN C, HÄUPL T, CHARBORD P. Specific Lineage-Priming of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provides the Molecular Framework for Their Plasticity. *STEM CELLS*, v. 27, n. 5, p. 1142–1151, 12 fev. 2009.
- DI MAGGIO, N. MEHRKENS A, PAPADIMITROPOULOS A, SCHAEREN S, HEBERER M, BANFI A, MARTIN I. Fibroblast Growth Factor-2 Maintains a Niche-Dependent Population of Self-Renewing Highly Potent Non-adherent Mesenchymal Progenitors Through FGFR2c. *STEM CELLS*, v. 30, n. 7, p. 1455–1464, 18 jun. 2012.
- DIAS MOURA PRAZERES, P. H., SENA, I. F. G., BORGES, I. DA T., DE AZEVEDO, P. O., ANDREOTTI, J. P., DE PAIVA, A. E., ... BIRBRAIR, A. Pericytes are heterogeneous in their origin within the same tissue. *Developmental Biology*, 427(1), 6–11. (2017). .doi:10.1016/j.ydbio.2017.05.001
- DIAZ-FLORES, L. GUTIÉRREZ R, MADRID JF, VARELA H, VALLADARES F, ACOSTA E, MARTÍN-VASALLO P, DÍAZ-FLORES L JR. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol.*;24(7):909-69. Jul 2009
- DIAZ-FLORES. L. GUTIERREZ R, LOPEZ-ALONSO A, GONZALEZ R, VARELA H.. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*. 1992 Feb;(275):280-6.
- DOMEN, J., & GANDY, K. Physiology of Stem Cells. *Heart Failure*, 711–725. doi:10.1007/978-1-4471-4219-5\_30 (2017).
- DOMINICI, M., LE BLANC. K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, DJ., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* , Volume 8 , Issue 4 , 315 – 317 (2006)
- DOULEH, D., & FRANK, R. M. Marrow Stimulation: Microfracture, Drilling, and Abrasion. *Operative Techniques in Sports Medicine* (2018).doi:10.1053/j.otsm.2018.06.004
- E. THIJSSSEN, A. VAN CAAM, P.M. VAN DER KRAAN Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis *Rheumatology* (Oxford), 54 (4), pp. 588-600 (2015)
- ENGLER, A. J. SEN S, SWEENEY HL, DISCHER DE.. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 677–689, ago. 2006.

- ESTEVEES, C. L., & DONADEU, F. X.. Pericytes in Veterinary Species: Prospective Isolation, Characterization and Tissue Regeneration Potential. *Pericyte Biology - Novel Concepts*, 67–77(2018). doi:10.1007/978-3-030-02601-1\_6
- FREEMAN, B. T.; JUNG, J. P.; OGLE, B. M. Single-Cell RNA-Seq of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reveals Unique Profiles of Lineage Priming. *PLOS ONE*, v. 10, n. 9, p. e0136199, 9 set. 2015.
- FRIEDENSTEIN, A.J. et al. Bone Marrow Osteogenic Stem Cells: In Vitro Cultivation and Transplantation in Diffusion Chambers *Cell Tissue Kinet* 20 (3), 263-272. 5 1987.
- 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 Tissue Kinet.*;3(4):393-403. Oct 1970
- FRIEDENSTEIN, A.J; PIATETZKY-SHAPIRO, I.I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*16(3):381-90. 1966 Dec
- GAO, L., ORTH, P., CUCCHIARINI, M., & MADRY, H. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis: A Systematic Review of the Clinical Evidence. *The American Journal of Sports Medicine*, 036354651774057. (2017). doi:10.1177/0363546517740575
- GHARAIBEH, B. et al. Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique *Nature Protocols* 3, 1501 - 1509 Sept 2008
- GILBER, S. F. Developmental Biology, 6th edition. Swarthmore College Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. ISBN-10: 0-87893-243-7).
- GLYN-JONES, S., PALMER, A. J. R., AGRICOLA, R., PRICE, A. J., VINCENT, T. L., WEINANS, H., & CARR, A. J. Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), 376–387. (2015). doi:10.1016/s0140-6736(14)60802-3
- GIMBLE JM, GUILAK F, NUTTALL ME, SATHISHKUMAR S, VIDAL M, BUNNELL BA. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother.* 2008 Jun;35(3):228-238. doi: 10.1159/000124281.
- HARTSOCK RJ, SMITH EB, PETTY CS. Normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest. a study made from 177 cases of sudden death examined by necropsy. *Am J Clin Pathol.* (1965) Apr;43:326-31 DOI: 10.1093/ajcp/43.4.326
- HASSANSHAHI, M., HASSANSHAHI, A., KHABBAZI, S., SU, Y.-W., & XIAN, C. J. Bone marrow sinusoidal endothelium as a facilitator/regulator of cell egress from the bone marrow. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 137, 43–56 (2019). .doi:10.1016/j.critrevonc.2019.01.024
- HIRSCHI, K. K. Gap Junction Communication Mediates Transforming Growth Factor-Activation and Endothelial-Induced Mural Cell Differentiation. *Circulation Research*, 93(5), 429–437. (2003). doi:10.1161/01.res.0000091259.84556.d5
- Hoch, A. I., & Leach, J. K. (2014). *Concise Review: Optimizing Expansion of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Clinical Applications. STEM CELLS Translational Medicine*, 3(5), 643–652.doi:10.5966/sctm.2013-0196
- HOGGATT, J.; KFOURY, Y.; SCADDEN, D. T. Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 11, n. 1, p. 555–581, 23 maio 2016.

- HONGYAN TAO, ZHIBO HAN, ZHONG CHAO HAN, AND ZONGJIN LI, “Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications,” *Stem Cells International*, vol. 2016, Article ID 1314709, 11 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1314709>.
- HOOTMAN JM, HELMICK CG, BARBOUR KE, THEIS KA, BORING MA. Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation among US adults, 2015-2040. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(7):1582–1587. doi: 10.1002/art.39692. PubMed PMID: 27015600.
- HOOTMAN, J. M., HELMICK, C. G., BARBOUR, K. E., THEIS, K. A., & BORING, M. A. Updated Projected Prevalence of Self-Reported Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation Among US Adults, 2015-2040. *Arthritis & Rheumatology*, 68(7), 1582–1587. (2016). doi:10.1002/art.39692
- HU-C.M., XIAO-L. S., HAO-Z. R., XIAN-W. Y., YI-T. D. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 to acute failing liver improves liver regeneration *World J Gastroenterol.* Oct 28, 2014; 20(40): 14884-14894 doi: 10.3748/wjg.v20.i40.14884
- JAKOBSEN, R. B., SHAHDADFAR, A., REINHOLT, F. P., & BRINCHMANN, J. E. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18(10), 1407–1416 (2009).doi:10.1007/s00167-009-1017-4
- KEMP JL, MACDONALD D, COLLINS NJ, HATTON AL, CROSSLEY KM. Hip arthroscopy in the setting of hip osteoarthritis: systematic review of outcomes and progression to hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2014;473(3):1055–1073. doi:10.1007/s11999-014-3943-9
- KIERSZENBAUM, A. L.; KIERSZENBAUM, L.L.T. Histology and cell biology : an introduction to pathology. 4° Ed. Pg 181–210. 2016
- KIM, D., LEE, J., & JOHNSON, A. L. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins during hen ovarian follicle development. *General and Comparative Endocrinology*, 232, 25–31. (2016). doi:10.1016/j.ygcen.2015.11.017
- KIM, H.-K., LEE, S.-G., LEE, S.-W., OH, B. J., KIM, J. H., KIM, J. A., ... JOE, Y. A. A subset of paracrine factors as efficient biomarkers for predicting vascular regenerative efficacy of mesenchymal stromal/stem cells. *STEM CELLS.* (2018). doi:10.1002/stem.2920
- KODE A, MANAVALAN JS, MOSIALOU I, BHAGAT G, RATHINAM CV, LUO N, ..., KOUSTENI S. Leukaemogenesis induced by an activating  $\beta$ -catenin mutation in osteoblasts. *Nature*, v. 506, n. 7487, p. 240–244, 15 jan. 2014.
- KREUZ, P. C., STEINWACHS, M. R., ERGGELET, C., KRAUSE, S. J., KONRAD, G., UHL, M., & SÜDKAMP, N. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(11), 1119–1125 (2006)..doi:10.1016/j.joca.2006.05.003
- KUBO H, SHIMIZU M, TAYA Y, KAWAMOTO T, MICHIDA M, KANEKO E, IGARASHI A, NISHIMURA M, SEGOSHI K, SHIMAZU Y, TSUJI K, AOBA T, KATO Y. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes to Cells*, v. 14, n. 3, p. 407–424, mar. 2009.

- KUMAR, R., GODAVARTHY, P.S., KRAUSE, D. S. The bone marrow microenvironment in health and disease at a glance. *Journal of Cell Science* 2018 131: jcs201707 doi: 10.1242/jcs.201707 Fevereiro 2018
- KUNISAKI Y, BRUNS I, SCHEIERMANN C, AHMED J, PINHO S, ZHANG D, MIZOGUCHI T, WEI Q, LUCAS D, ITO K, MAR JC, BERGMAN A, FRENETTE PS. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, v. 502, n. 7473, p. 637–643, 9 out. 2013.
- KURIYAN AE, ALBINI TA, TOWNSEND JH, et al. Vision loss after intravitreal injection of autologous “stem cells” for AMD. *N Engl J Med*. 2017;376:1047–53.
- KUTCHER ME, HERMAN IM. The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res*. 2009;77:235–46
- LAW, L., HUNT, C. L., VAN WIJNEN, A. J., NASSR, A., LARSON, A. N., ELDRIGE, J. S., ... QU, W. Office-Based Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Treatment of Musculoskeletal Disease: A Systematic Review of Recent Human Studies. *Pain Medicine*. (2018). doi:10.1093/pm/pny256
- LEE, J.-K., PARK, S.-R., JUNG, B.-K., JEON, Y.-K., LEE, Y.-S., KIM, M.-K., ... KIM, C.-W. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(12), e84256. . (2013). doi:10.1371/journal.pone.0084256
- LEIBACHER, J., & HENSCHLER, R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1) (2016)..doi:10.1186/s13287-015-0271-2
- LIANGPENG LI, XIONGWEN CHEN, WEI ERIC WANG, AND CHUNYU ZENG, “How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart?,” *Stem Cells International*, vol. 2016, Article ID 9682757, 14 pages, 2016. doi.org/10.1155/2016/9682757.
- LIU, Y., ZHOU, G., & CAO, Y. Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering—Our Experience and Future Directions. *Engineering*, 3(1), 28–35. (2017). doi:10.1016/j.eng.2017.01.010
- LOESER, R. F., COLLINS, J. A., & DIEKMAN, B. O.. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(7), 412–420. (2016) doi:10.1038/nrrheum.2016.65)
- LOUATI, K., VIDAL, C., BERENBAUM, F., & SELLAM, J. Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. *RMD Open*, 1(1), e000077–e000077. (2015). doi:10.1136/rmdopen-2015-000077
- LU, S., GE, M., ZHENG, Y., LI, J., FENG, X., FENG, S., ... HAN, Z. CD106 is a novel mediator of bone marrow mesenchymal stem cells via NF-κB in the bone marrow failure of acquired aplastic anemia. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1). (2017). doi:10.1186/s13287-017-0620-4
- MARCH, L; SMITH, EU; HOY, DG; CROSS, MJ; SANCHEZ-RIERA, L; BLYTH, F; BUCHBINDER, R; VOS, T; WOOLF, AD «Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders.». Best practice & research. *Clinical rheumatology*. 28 (3): 353–66. PMID 25481420. (junho de 2014). doi:10.1016/j.berh.2014.08.002

- MARTEL-PELLETIER, J., BARR, A. J., CICUTTINI, F. M., CONAGHAN, P. G., COOPER, C., GOLDRING, M. B., PELLETIER, J.-P. *Osteoarthritis*. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16072. (2016). doi:10.1038/nrdp.2016.72
- MATTAR, P., & BIEBACK, K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in Immunology*, 6. (2015). doi:10.3389/fimmu.2015.00560
- MCLEOD, C., & MAUCK, R. On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis. *European Cells and Materials*, 34, 217–231. (2017). doi:10.22203/ecm.v034a14
- MEIRELLES LDA S, FONTES AM, COVAS DT, CAPLAN AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20:419–27
- MEISSNER, A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nature Biotechnology*, v. 28, n. 10, p. 1079–1088, out. 2010.
- MENGE, T., GERBER, M., WATAHA, K., REID, W., GUHA, S., COX, C. S., ... PATI, S. Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Endothelial Proliferation and Angiogenesis via Cell–Cell Contact Through Modulation of the VE-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Stem Cells and Development*, 22(1), 148–157. (2013). doi:10.1089/scd.2012.0165
- MO, M., WANG, S., ZHOU, Y., LI, H., & WU, Y. Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(17), 3311–3321. (2016). doi:10.1007/s00018-016-2229-7
- MOBASHERI, A., & HENROTIN, Y. Biomarkers of (osteo)arthritis. *Biomarkers*, 20(8), 513–518. (2015). doi:10.3109/1354750x.2016.1140930
- MOHAMMADI, E., NASSIRI, S. M., RAHBARGHAZI, R., SIAVASHI, V., & ARAGHI, A. Endothelial juxtaposition of distinct adult stem cells activates angiogenesis signaling molecules in endothelial cells. *Cell and Tissue Research*, 362(3), 597–609. (2015). doi:10.1007/s00441-015-2228-2
- MORAVCIKOVA, E., MEYER, E. M., CORSELLI, M., DONNENBERG, V. S., & DONNENBERG, A. D.. Proteomic Profiling of Native Unpassaged and Culture-Expanded Mesenchymal Stromal Cells (MSC). *Cytometry Part A*. (2018)doi:10.1002/cyto.a
- NEOGI T, FELSON D, NIU J, LYNCH J, NEVITT M, GUERMAZI A, et al. Cartilage loss occurs in the same subregions as subchondral bone attrition: a within-knee subregion-matched approach from the Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*. 2009;61:1539-44.
- NEVITT, M. C., ZHANG, Y., JAVAID, M. K., NEOGI, T., CURTIS, J. R., NIU, J., ... FELSON, D. T. High systemic bone mineral density increases the risk of incident knee OA and joint space narrowing, but not radiographic progression of existing knee OA: the MOST study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(01), 163–168. (2010).doi:10.1136/ard.2008.099531
- Gilles Carpentier. NIH, [1] Contribution: Angiogenesis Analyzer. ImageJ News, 5 October 2012.
- OTSU, K., DAS, S., HOUSER, S. D., QUADRI, S. K., BHATTACHARYA, S., & BHATTACHARYA, J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*, 113(18), 4197–4205. (2008). doi:10.1182/blood-2008-09-176198

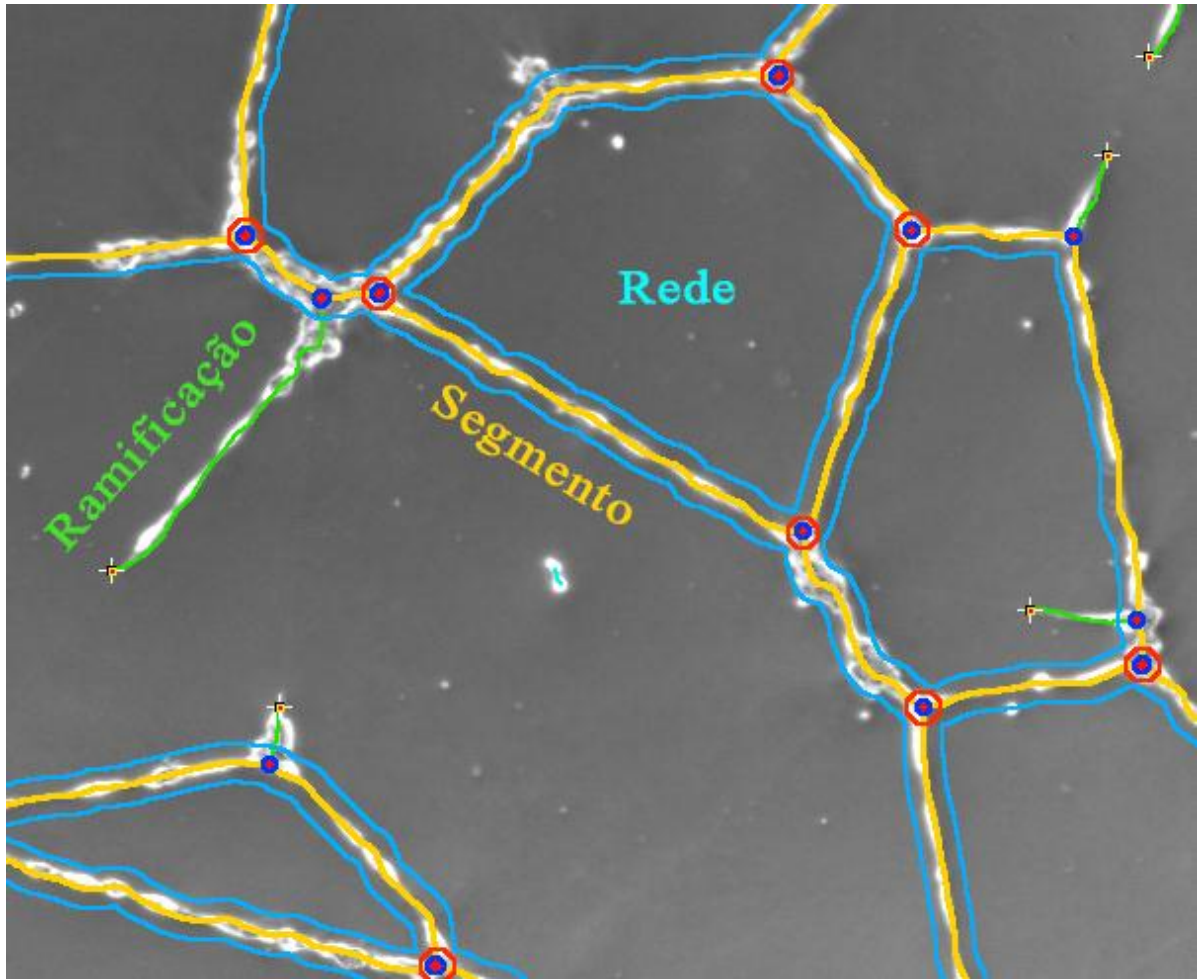
- OTSURU S, TAMAI K, YAMAZAKI T, YOSHIKAWA H, KANEDA Y. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* 2008; 26:223–34.
- OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A.J Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.*;136:42-60. 1988
- PARK, J.-H., KIM, K.-J., RHIE, J. W., & OH, I.-H. Characterization of adipose tissue mesenchymal stromal cell subsets with distinct plastic adherence. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(1), 39–46. (2016). doi:10.1007/s13770-015-0027-1
- PERRUCCIO, A. V., YIP, C., POWER, J. D., CANIZARES, M., & BADLEY, E. M. Discordance between population impact of musculoskeletal disorders and scientific interest: a bibliometric study. *Arthritis Care & Research*. (2018). doi:10.1002/acr.23583
- PETER S, SCUTT AM, WRIGHT PC, BIGGS CA. Comparative study of in vitro expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnology Letters*, v. 35, n. 3, p. 463–469, 18 nov. 2012.
- PILL, K., HOFMANN, S., REDL, H., & HOLNTHONER, W. Vascularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparison. *Cell Regeneration*, 4(1), 4:8. (2015). doi:10.1186/s13619-015-0025-8
- PINHO, S., & FRENETTE, P. S. *Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.doi:10.1038/s41580-019-0103-9. (2019).
- POLTAVTSEVA, R. A., POLTAVTSEV, A. V., LUTSENKO, G. V., & SVIRSHCHEVSKAYA, E. V. Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy. *Cell and Tissue Research*. (2018). doi:10.1007/s00441-018-2961-4
- RASINI, V., DOMINICI, M., KLUBA, T., SIEGEL, G., LUSENTI, G., NORTHOFF, H., HORWITZ E.M., SCHÄFER, R. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. *Cytotherapy*, 15(3), 292–306. (2013). doi:10.1016/j.jcyt.2012.11.009
- RAUNER, G., KUDINOV, T., GILAD, S., HORNING, G., & BARASH, I. High Expression of CD200 and CD200R1 Distinguishes Stem and Progenitor Cell Populations within Mammary Repopulating Units. *Stem Cell Reports*, 11(1), 288–302. . (2018)doi:10.1016/j.stemcr.2018.05.013
- REN, F., WANG, K., ZHANG, T., JIANG, J., NICE, E. C., & HUANG, C. New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(8), 1518–1526. (2015) doi:10.1016/j.bbagen.2015.02.017
- RENNERFELDT DA, RAMINHOS JS, LEFF SM, MANNING P, VAN VLIET KJ. Emergent heterogeneity in putative mesenchymal stem cell colonies: Single-cell time lapsed analysis. *PLoS ONE* 14(4): e0213452. (2019) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213452
- RUSSELL KC, PHINNEY DG, LACEY MR, BARRILLEAUX BL, MEYERTHOLEN KE, O'CONNOR KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28, 788–798 (2010) PMID: 20127798 DOI: 10.1002/stem.312Russell
- RUSTER, B., GOTTIG, S., LUDWIG, R. J., BISTRAN, R., MULLER, S., SEIFRIED, E., ... HENSCHLER, R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108(12), 3938–3944. (2006). doi:10.1182/blood-2006-05-025098

- S. INOUE, S.; OSMOND, D.G. Basement Membrane of Mouse Bone Marrow Sinusoids Shows Distinctive Structure and Proteoglycan Composition: A High Resolution Ultrastructural Study *THE ANATOMICAL RECORD* 264:294–304 (2001)
- SACCHETTI B, FUNARI A, MICHIZENZI S, DI CESARE S, PIERSANTI S, SAGGIO I, TAGLIAFICO E, FERRARI S, ROBEY PG, RIMINUCCI M, BIANCO P.. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*, v. 131, n. 2, p. 324–336, out. 2007.
- SAMSONRAJ, R. M., RAGHUNATH, M., NURCOMBE, V., HUI, J. H., VAN WIJNEN, A. J., & COOL, S. M. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *STEM CELLS Translational Medicine*, 6(12), 2173–2185. (2017). doi:10.1002/sctm.17-0129
- SCADDEN, D. T. Nice Neighborhood: Emerging Concepts of the Stem Cell Niche. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 41–50, mar. 2014.
- SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*;4(1-2):7-25. 1978
- SECRETARIA DE PREVIDÊNCIA, EMPRESA DE TECNOLOGIA E INFORMAÇÕES DA PREVIDÊNCIA (Brasil). Estatístico da Previdência Social/Ministério da Fazenda – Ano 1 (2017) – Brasília ISSN 0104-8139
- SEITA, J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, v. 2, n. 6, p. 640–653, 1 abr. 2010.
- SMITH JR, POCHAMPALLY R, PERRY A et al. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *STEM CELLS* 2004;22:823–831.
- STEADMAN, J. R., BRIGGS, K. K., RODRIGO, J. J., KOCHER, M. S., GILL, T. J., & RODKEY, W. G. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 19(5), 477–484. (2003). doi:10.1053/jars.2003.50112
- SUKRITI, N. (ed.), *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 686, Springer 2011
- SUNDÉN, A., LIDENGREN, K., ROOS, E. M., LOHMANDER, L. S., & EKVALL HANSSON, E. Hip complaints differ across age and sex: a population-based reference data for the Hip disability and Osteoarthritis Outcome Score (HOOS). *Health and Quality of Life Outcomes*, 16(1). (2018). doi:10.1186/s12955-018-1022-8
- TAMPLIN OJ, DURAND EM, CARR LA, CHILDS SJ, HAGEDORN EJ, LI P, YZAGUIRRE AD, SPECK NA, ZON LI. Hematopoietic Stem Cell Arrival Triggers Dynamic Remodeling of the Perivascular Niche. *Cell*, v. 160, n. 1-2, p. 241–252, jan. 2015.
- TAN, P. ., CHAN, C., XUE, S. ., DONG, R., ANANTHESAYANAN, B., MANUNTA, M., ... GEORGE, A. J. .. Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells. *Atherosclerosis*, 173(2), 171–183. (2004)doi:10.1016/j.atherosclerosis.2003.12.011
- TETTEH, P. W.; FARIN, H. F.; CLEVERS, H. Plasticity within stem cell hierarchies in mammalian epithelia. *Trends in Cell Biology*, v. 25, n. 2, p. 100–108, fev. 2015.

- VARELA-EIRIN, M., LOUREIRO, J., FONSECA, E., CORROCHANO, S., CAEIRO, J. R., COLLADO, M., & MAYAN, M. D. Cartilage regeneration and ageing: Targeting cellular plasticity in osteoarthritis. *Ageing Research Reviews*, 42, 56–71. (2018). doi:10.1016/j.arr.2017.12.006
- VON BAHR L, SUNDBERG B, LÖNNIES L, SANDER B, KARBACH H, HÄGGLUND H, LJUNGMAN P, GUSTAFSSON B, KARLSSON H, LE BLANC K, et al. Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:557–564.
- WAN C, HE Q, MCCAIGUE M, MARSH D, LI G. Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs). *Journal of Orthopaedic Research*, v. 24, n. 1, p. 21–28, 2005.
- WANG, Y., XU, J., CHANG, L., MEYERS, C. A., ZHANG, L., BRODERICK, K., ... JAMES, A. W. Relative contributions of adipose-resident CD146+ pericytes and CD34+ adventitial progenitor cells in bone tissue engineering. *Npj Regenerative Medicine*, 4(1). (2019). doi:10.1038/s41536-018-0063-2
- WHITE, J. L., WALKER, N. J., HU, J. C., BORJESSON, D. L., & ATHANASIOU, K. A. A Comparison of Bone Marrow and Cord Blood Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Self-Assembly. *Tissue Engineering Part A*, 24(15-16), 1262–1272. (2018). doi:10.1089/ten.tea.2017.0424
- WILSON A, LAURENTI E, OSER G, VAN DER WATH RC, BLANCO-BOSE W, JAWORSKI M, OFFNER S, DUNANT CF, ESHKIND L, BOCKAMP E, LIÓ P, MACDONALD HR, TRUMPP A. Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell*, v. 135, n. 6, p. 1118–1129, dez. 2008.
- XU, L., WU, Y., LIU, Y., ZHOU, Y., YE, Z., & TAN, W.-S. Non-contact Coculture Reveals a Comprehensive Response of Chondrocytes Induced by Mesenchymal Stem Cells Through Trophic Secretion. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(1), 37–48. (2017). doi:10.1007/s13770-017-0084-8
- YAMAMOTO, K., TANIMURA, K., MABUCHI, Y., MATSUZAKI, Y., CHUNG, S., KAMM, R. D., ... SUDO, R. The Stabilization Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Formation of Microvascular Networks in a Microfluidic Device. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 8(2), 114–128. (2013). doi:10.1299/jbse.8.114
- YANG ZX, HAN ZB, JI YR, WANG YW, LIANG L, et al. CD106 Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells with Unique Immunomodulatory Properties. *PLOS ONE* 8(3): e59354. (2013) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059354>
- YANG, Y.-H. K., OGANDO, C. R., WANG SEE, C., CHANG, T.-Y., & BARABINO, G. A. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1) (2018).doi:10.1186/s13287-018-0876-3
- ZHANG, D., FAN, G.-C., ZHOU, X., ZHAO, T., PASHA, Z., XU, M., ... WANG, Y. Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(2), 281–292. (2008). doi:10.1016/j.yjmcc.2007.11.010
- ZHANG, Y., HUSCH, J. F. A., & VAN DEN BEUCKEN, J. J. J. P. Intraoperative Construct Preparation: A Practical Route for Cell-Based Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. (2018). doi:10.1089/ten.teb.2018.0010



ZHAO, Q., REN, H., & HAN, Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 2(1), 3–20. (2016). doi:10.1016/j.jocit.2014.12.001

ANEXO A – Imagem descritiva da definição de estruturas tubulares da tubulogênese



Fonte: Gilles Carpentier Research Website (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ> acessado em 30 de setembro de 2018)

## ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
<p><b>Título da Pesquisa:</b> OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS A PARTIR DOS TECIDOS ÓSSEO, MUSCULAR, TENDÍNEO, CARTILAGINOSO E ADIPOSE DO JOELHO E QUADRIL</p> <p><b>Pesquisador Responsável:</b> Alex Balduino de Souza</p> <p><b>Área Temática:</b></p> <p><b>Versão:</b> 2</p> <p><b>CAAE:</b> 58021216.7.1001.5291</p> <p><b>Submetido em:</b> 30/09/2016</p> <p><b>Instituição Proponente:</b> ANTARES EDUCACIONAL S.A.</p> <p><b>Situação da Versão do Projeto:</b> Aprovado</p> <p><b>Localização atual da Versão do Projeto:</b> Pesquisador Responsável</p> <p><b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio</p>	 <p>Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_783501</p>

## ANEXO C – Submissão de Artigo

**STCR-D-19-00116 - Acknowledgement of Receipt**

**Stem Cell Reviews and Reports**  
**Primitive Mesenchymal Stem Cell Subset Isolation by Differential Adhesion**  
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Primitive Mesenchymal Stem Cell Subset Isolation by Differential Adhesion
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Gustavo Claudino Paris, UERJ RIO DE JANEIRO, RIO DE JANEIRO BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	UERJ
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Gustavo Claudino Paris,
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Gustavo Claudino Paris, Alessandra Alves Thole LAÍS DE CARVALHO
Order of Authors Secondary Information:	