



## Artigo de Atualização

# Potencial regenerativo do tecido cartilaginoso por células-tronco mesenquimais: atualização, limitações e desafios<sup>☆</sup>



Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>a,b</sup>, Antônio Lourenço Severo<sup>c</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>b</sup>, Luiz Filipe Machado Garcia<sup>b</sup>, André Kuhn<sup>c</sup> e Osvandré Lech<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório de Biogenômica, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>c</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Hospital São Vicente de Paulo, Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Passo Fundo, RS, Brasil

## INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

### Histórico do artigo:

Recebido em 12 de fevereiro de 2016

Aceito em 15 de fevereiro de 2016

On-line em 18 de julho de 2016

### Palavras-chave:

Células-tronco

Tecido cartilaginoso

Potencial regenerativo

## R E S U M O

Os avanços nos estudos com células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas tornou a terapia regenerativa tecidual uma ferramenta promissora em diversas áreas da medicina. Na ortopedia, um dos principais desafios tem sido a regeneração do tecido cartilaginoso, sobretudo em diartroses. Na indução de CTMs, além da citodiferenciação, o contexto microambiental do tecido a ser regenerado, bem como uma disposição espacial adequada, são fatores de extrema importância. Além disso, sabe-se que a diferenciação das CTMs é basicamente determinada por mecanismos como proliferação celular (mitose), interações bioquímico-moleculares, movimento, adesão celular e apoptose. Apesar de o uso de CTMs para a regeneração da cartilagem estar ainda em âmbito de pesquisa, existem questões importantes a serem resolvidas para tornar essa terapêutica eficaz e segura. Sabe-se, por exemplo, que a expansão de condrócitos em cultura, necessária para aumentar o número de células, pode produzir fibrocartilagem, e não cartilagem hialina. No entanto, os últimos resultados são promissores. Em 2014, foi publicado o primeiro ensaio clínico fase I/II para avaliar a eficácia e a segurança da injeção intra-articular de CTMs na regeneração de cartilagem femorotibial e houve uma diminuição das áreas lesadas. Uma questão a ser explorada é o quanto modificações no próprio ambiente inflamatório articular poderiam induzir a diferenciação de CTMs já alocadas naquela região. Tal incógnita parte do princípio de estudos que sugerem que a supressão da inflamação articular aumentaria, potencialmente, a eficiência da regeneração tecidual. Considerando a complexidade dos eventos relacionados à condrogênese e ao reparo da cartilagem, conclui-se que o caminho ainda é longo, são necessárias pesquisas complementares.

© 2016 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<sup>☆</sup> Trabalho desenvolvido no Instituto de Ortopedia e Traumatologia de Passo Fundo, Passo Fundo, e pelo Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mails: [lech@lech.med.br](mailto:lech@lech.med.br), [ensino@iotsr.com.br](mailto:ensino@iotsr.com.br) (O. Lech).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2016.02.007>

0102-3616/© 2016 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Regenerative potential of the cartilaginous tissue in mesenchymal stem cells: update, limitations, and challenges

### A B S T R A C T

**Keywords:**  
Stem cells  
Cartilaginous tissue  
Regenerative potential

Advances in the studies with adult mesenchymal stem cells (MSCs) have turned the tissue regenerative therapy into a promising tool in many areas of medicine. In orthopedics, one of the main challenges has been the regeneration of cartilage tissue, mainly in diarthroses. In the induction of the MSCs, in addition to cytodifferentiation, the microenvironmental context of the tissue to be regenerated and an appropriate spatial arrangement are extremely important factors. Furthermore, it is known that MSCs differentiation is fundamentally determined by mechanisms such as cell proliferation (mitosis), biochemical-molecular interactions, movement, cell adhesion, and apoptosis. Although the use of MSCs for the cartilage regeneration remains at a research level, there are important questions to be resolved in order to make this therapy efficient and safe. It is known, for instance, that the expansion of chondrocytes in cultivation, needed to increase the number of cells, could end up producing fibrocartilage instead of hyaline cartilage. However, the latest results are promising. In 2014, the first stage I/II clinical trial to evaluate the efficacy and safety of the intra-articular injection of MSCs in femorotibial cartilage regeneration was published, indicating a decrease in injured areas. One issue to be explored is how many modifications in the articulate inflammatory environment could induce differentiation of MSCs already allocated in that region. Such issue arose from studies that suggested that the suppression of the inflammation may increase the efficiency of tissue regeneration. Considering the complexity of the events related to the chondrogenesis and cartilage repair, it can be concluded that the road ahead is still long, and that further studies are needed.

© 2016 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introdução

O corpo humano se origina basicamente de células-tronco embrionárias, ectoderme, mesoderme e endoderme. É a partir desses três folhetos que os 230 tipos de células encontrados no organismo se diferenciam. No organismo diferenciado, muitos tecidos mantêm linhagens de células-tronco adultas que funcionam na reposição e regeneração tecidual, são as mais abundantes as de origem mesodérmica, chamadas células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs são encontradas em diversos locais do corpo, como a medula óssea vermelha, folículos capilares, músculo, cordão umbilical, polpa dentária, tecido adiposo, ósseo e cartilaginoso, entre outros.<sup>1</sup> Com os avanços do conhecimento sobre CTMs adultas, o uso clínico para fins de regeneração tecidual se tornou bastante atrativo. Porém, conhecer e manipular CTMs de modo eficaz e seguro é ainda um grande desafio, principalmente quando se trata de tecidos que têm difícil regeneração, como é o caso da cartilagem.

Nesse contexto, a presente revisão tem como objetivo fazer uma atualização sobre os principais processos relacionados com a morfodiferenciação e seu potencial papel na regeneração do tecido cartilaginoso. Para tanto, as informações aqui contidas foram baseadas em artigos científicos de revistas indexadas nas bases do Pubmed-Medline e Scielo.

## O tecido cartilaginoso e os desafios para a regeneração

Em termos estruturais, a cartilagem articular é rica em matriz extracelular, na qual se encontram distribuídos condrocitos isolados ou em grupos clonais organizados em pequenas colônias celulares.<sup>2</sup> Os condrocitos são responsáveis pela secreção dos componentes da matriz cartilaginosa, como colágeno, glicoproteínas e proteoglicanas. A nutrição do tecido cartilaginoso ocorre via capilares contidos no pericôndrio, um tecido conjuntivo que envolve a cartilagem e que tem CTMs adultas chamadas condroblastos.

Entretanto, como as cartilagens que revestem os ossos das articulações móveis não têm pericôndrio, a sua nutrição é feita pelo líquido sinovial presente nas cavidades articulares. O líquido sinovial representa um ultrafiltrado de plasma que atravessa a membrana sinovial, na qual recebe mucopolissacarídeos que contêm ácido hialurônico e uma pequena quantidade de proteínas de alto peso molecular. Assim, mesmo com uma grande quantidade de proteínas colágenas, a pequena quantidade de componentes celulares no tecido cartilaginoso dificulta sua regeneração e faz com que lesões articulares repetitivas tenham uma maior tendência à cronificação.<sup>3</sup>

Para que se possa entender o papel das CTMs na regeneração do tecido adulto é importante lembrar que o organismo humano é formado por células que apresentam

diferenciação e função distintas.<sup>4</sup> Convém salientar que a regeneração tecidual não está somente centrada na indução da CTM indiferenciada em uma célula diferenciada. Cada tipo de tecido tem uma matriz extracelular com papel fundamental na homeostase corporal. Assim, o contexto microambiental (matriz extracelular) do tecido a ser regenerado precisa ser levado em consideração.

Cinco mecanismos causais são cruciais para que ocorra a diferenciação celular em tecidos e órgãos corporais, assim como no próprio processo de regeneração tecidual. Esses são: proliferação celular (mitose), interações bioquímico-moleculares, movimento, adesão celular e apoptose. Como esses mecanismos são de grande relevância para a manipulação de CTMs com a perspectiva de desenvolvimento de técnicas de regeneração do tecido cartilaginoso, serão o foco principal desta revisão.

### Proliferação e senescência celular

Para se entender com maior profundidade a biologia das CTMs é preciso compreender alguns mecanismos associados ao seu ciclo celular. Como já conhecido, as células eucarióticas se dividem por mitose, considerada a fase final do ciclo, no qual as duas células-filhas formadas exercerão suas respectivas funções metabólicas.

No entanto, a divisão mitótica não é um processo ilimitado. A maioria das células especializadas, à medida que se dividem, perde a sua capacidade proliferativa. Algumas células que não irão mais se dividir permanecem constantemente na fase *gap1* (G1) da mitose, como é o caso da vasta maioria dos condrócitos. Novos condrócitos são formados a partir dos condroblastos do pericôndrio e é por esse mecanismo que o tecido cartilaginoso se renova, ainda que lentamente se comparado, por exemplo, com o tecido ósseo. Por outro lado, existem células especializadas adultas que fazem o ciclo celular completo até que perdem a capacidade de se proliferar, por um processo denominado senescência replicativa ou envelhecimento celular (fig. 1).

O envelhecimento celular é desencadeado por mudanças que ocorrem na região terminal do cromossomo conhecida como telômero, que é constituído por uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) simples-fita (ao contrário da estrutura dupla-fita presente no restante do material genético). O DNA telomérico é formado pela sequência de seis nucleotídeos – timina, timina, adenina, guanina, guanina, guanina (TTAGGG) – a qual se repete milhares de vezes. Essa região cromossômica é sintetizada pela enzima transcriptase reversa (sintetiza DNA e tem como molde uma molécula de ácido ribonucleico [RNA]) chamada telomerase.

Na divisão celular ocorre sempre um pequeno encurtamento telomérico. Em células embrionárias, o telômero é reconstituído pela ação da telomerase. Nas células especializadas o gene da enzima telomerase é silenciado e, portanto, quando ocorre encurtamento telomérico não existe a possibilidade de reconstituição do telômero. Com o passar das divisões (aproximadamente 50-80 mitoses) o telômero fica muito curto, passa a inibir a mitose e constitui assim a chamada senescência celular ou limite de Hayflick.

Ao contrário das células especializadas, as CTMs apresentam o gene da enzima telomerase ativo e, portanto, dentro

do organismo essas células não apresentam envelhecimento celular acentuado. Entretanto, a taxa de proliferação das CTMs é extremamente baixa e, por isso, o número dessas células nos tecidos corporais é bastante limitado, é um grande desafio a ser contornado na terapia regenerativa.

Alguns estudos sugeriram que a indução da proliferação de CTMs *in vitro* pode ser feita via exposição a moléculas de espécies reativas de oxigênio (EROs), como é o caso do peróxido de hidrogênio. A investigação feita por Bornes et al.<sup>5</sup> mostrou que a condrogênese *in vitro* induzida em CTMs da medula óssea de ovinos aumentou a proliferação e a diferenciação celular. Entretanto, parece que, apesar do aumento da expansão celular, as células passam a apresentar importantes danos no DNA, que indica instabilidade cromossômica.<sup>6</sup> O estudo de Machado et al.<sup>6</sup> corrobora a investigação conduzida por Brand et al.<sup>7</sup> que sugeriu que a exposição *in vitro* ao estresse oxidativo induziu a senescência celular de condrócitos.

Por outro lado, o estudo de Machado et al.<sup>6</sup> mostrou reversão de indicadores de senescência replicativa de CTMs de lipoaspirados humanos por meio da suplementação do meio de cultura com extrato hidroalcoólico de guaraná (*Paullinia cupana*). A semente de guaraná usada para a produção do extrato é uma planta rica em cafeína, teofilina, teobromina e catequinas.

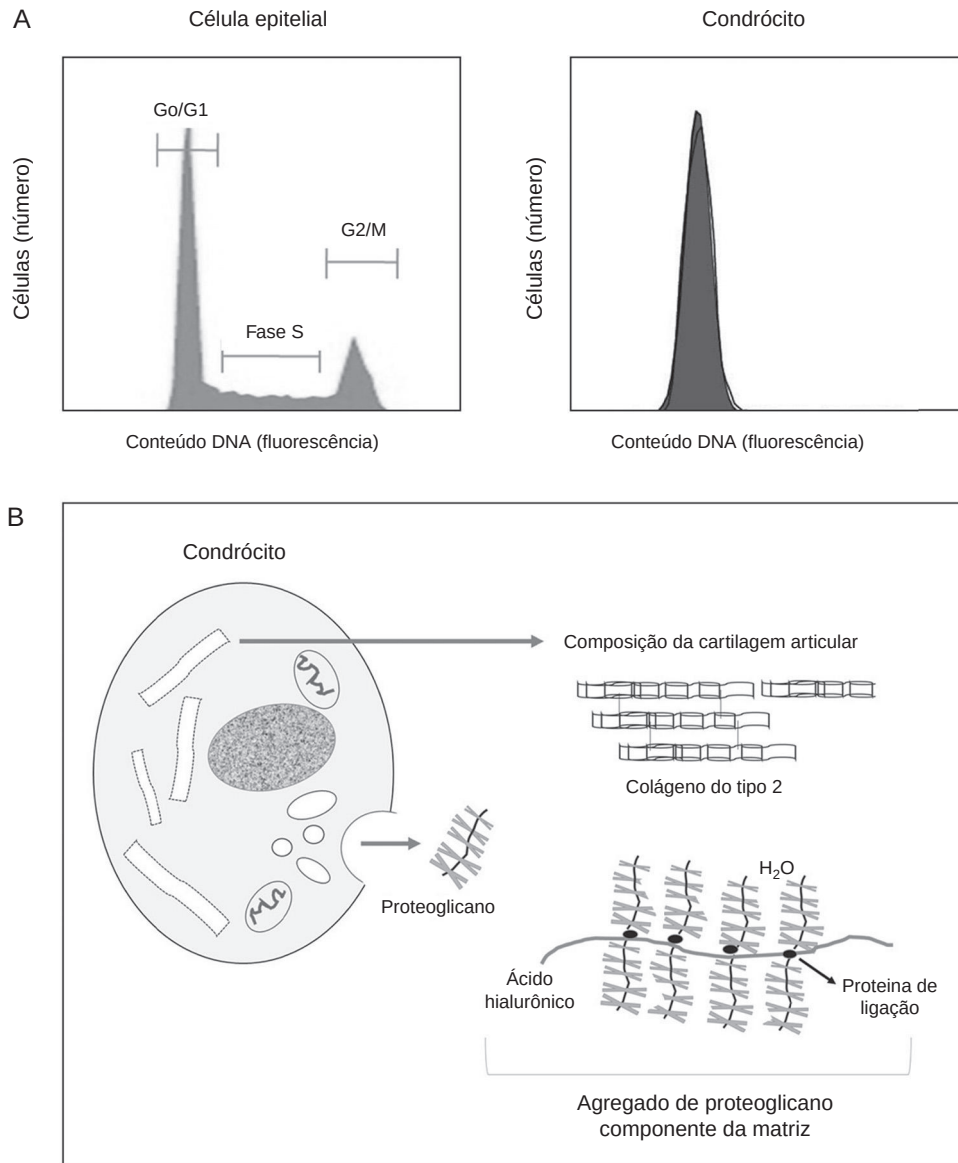
Outro resultado bastante surpreendente foi descrito por Sadeghiet et al.,<sup>8</sup> que investigaram o efeito da suplementação com estrogênio na condrogênese induzida em CTMs oriundas do tecido adiposo. Foi observado que a presença de estrogênio teve efeitos negativos no processo de condrogênese via inibição na expressão do gene do colágeno 2 e redução na expressão do gene da proteína agrecan.

### Diferenciação celular

A partir do zigoto, todas as células corporais e tecidos são formados, em um processo de regulação transcricional altamente controlado. Em geral, o DNA do gene eucariótico tem uma sequência inicial de nucleotídeos conhecida como região promotora. É nela que moléculas sinalizadoras se ligam, permitem ou não a transcrição e determinam a quantidade de RNA transcrito. Essa modulação é conhecida como **regulação gênica**, um mecanismo pelo qual cada tipo de célula é formado via produção de diferentes formas e quantidades de proteínas. Existem moléculas endógenas, como hormônios e fatores de transcrição, que podem regular diferencialmente os genes. Da mesma forma, moléculas oriundas da dieta, como o resveratrol (presente na uva), induzem a produção de sirtuínas, proteínas que aumentam o tempo de vida celular.

Em condições *in vitro* a indução da diferenciação de CTMs na presença de determinadas moléculas já é bastante conhecida. Entretanto, quando as CTMs são colocadas no órgão lesionado, nem sempre é possível saber se as condições microambientais vão favorecer a indução da diferenciação (mesmo quando os agentes indutores são concomitantemente inseridos com as células).

Outras moléculas reguladoras da manutenção do estado indiferenciado das CTMs que garantem a sua pluripotencialidade e autorrenovação foram identificadas. Esse é o caso da Oct-4, Nanog e Sox-2, encontradas tanto em humanos



**Figura 1 – Comparação entre o ciclo celular de uma célula epitelial e o de um condrócito avaliado por citometria de fluxo. (A) Em um tecido epitelial serão encontradas células nas fases G0/G1, S e G2/M, enquanto que no tecido cartilaginoso os condrócitos estarão na sua extensa maioria na fase G1. Somente os condroblastos oriundos do pericôndrio apresentarão ciclo celular completo. (B) O condrócitos, uma vez que seja formado, geralmente está agrupado em cerca de oito células que secretam constantemente a matriz extracelular, composta principalmente por colágeno do tipo 2, proteoglicano e ácido hialurônico.**

quanto em camundongos.<sup>9</sup> Quando essa proteína deixa de ser expressa indica que a célula entrou no processo de diferenciação.<sup>10</sup>

Para induzir a diferenciação condrogênica as CTMs são cultivadas sem a presença de soro fetal ou adulto (de origem animal ou humana), que geralmente é usado para nutrir as células, e sob exposição ao fator de crescimento b3.<sup>11</sup> Assim, as células desenvolvem uma multicamada com matriz extracelular rica em proteoglicanas. Em culturas de 10 a 14 dias, as células passam a produzir colágeno do tipo 2, característico da cartilagem articular. Além disso, apresentam marcadores de superfície positivos para condrócitos e lacunas celulares típicas visíveis à microscopia ótica. Os condrócitos

permanecem viáveis até cerca de 90 dias após o início da diferenciação.<sup>12</sup>

A indução da condrogênese é feita por meio do uso de diversas moléculas indutoras, especialmente pela suplementação do meio de cultivo com TFN- $\beta$ 3, IGF-1, BMP-2 e BMP-6. A confirmação da indução da condrodiferenciação é feita pela identificação de marcadores como colágeno 2, Sox-9 e agregam via análise da expressão de genes por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) quantitativa em tempo real.

Além da regulação diferencial da expressão gênica, a **metilação** é uma modificação epigenética que geralmente ocorre na região promotora dos genes que devem ser

silenciados. Esse processo é mediado pelas enzimas DNA-metilases (DNMTs). Genes também podem ser silenciados via processo de acetilação, que impede que as histonas fiquem relaxadas assim que o DNA fique exposto à regulação transcricional.<sup>13</sup>

### Adesão e movimento celular e a produção de moldes (scaffolds)

Ao longo da embriogênese, as células, além do processo de diferenciação, necessitam migrar ou crescer em direção a um local específico e ali permanecerem para o desempenho de suas funções. Eventos de adesão e movimento celular, que ocorrem por sinalizações químicas e espaciais, são de vital importância por unir células individuais em um formato tridimensional, tal como nos tecidos e órgãos corporais.

Os mecanismos de adesão celular são altamente regulados ao longo da morfogênese tecidual. A fosforilação reversível por meio da proteína quinase C (PKC) é um evento chave na adesão e migração celular durante a condrogênese.<sup>14</sup>

A adesão e o movimento celular também estão relacionados com a constituição arquitetônica dos tecidos e órgãos. Estudos *in vitro* mostram que as CTMs respondem ao formato do seu ambiente e *in vivo* células também são induzidas à diferenciação pelas características topográficas do tecido em que estão dispostas. Tais evidências impulsionaram a área de engenharia de tecidos que combina terapia celular com o uso de biomateriais (moldes, também conhecidos pela palavra inglesa *scaffold*). Essa área envolve o uso de materiais compatíveis e biodegradáveis que atuam como matriz para o crescimento celular. Os *scaffolds* nada mais são que suportes nos quais as células são cultivadas para construir um tecido *in vitro*.

A estrutura do *scaffold*, além de fornecer sustentação mecânica e orientação espacial para o crescimento e a diferenciação celular, deve permitir o transporte de nutrientes, metabólitos, fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias importantes para as células e para a matriz extracelular. Os *scaffolds* podem ser produzidos a partir de moléculas naturais ou sintéticas. Entre os biomateriais naturais encontram-se o colágeno, o ácido hialurônico, a hidroxiapatita e os glicosaminoglicanos.<sup>15</sup>

A produção de *scaffolds* por *eletrospinning* produz moldes formados por fibras que conseguem mimetizar fisicamente uma matriz extracelular natural. Essa condição cria um microambiente adequado para a diferenciação celular e tecidual. A criação das fibras de diferentes diâmetros por *eletrospinning* é feita a partir do uso de soluções poliméricas aplicadas a um campo magnético. O poliácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) é um polímero que tem sido amplamente usado na produção de *scaffolds* por *electrospinning*, porque é biodegradável, bioabsorvível e biocompatível. O uso de *scaffolds* à base de PLGA já foi aprovado para seres humanos pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA). Investigações mostraram que esse biomaterial consegue induzir o crescimento de diferentes tipos de células, como fibroblastos, osteoblastos e condrócitos.<sup>16</sup>

Outra tecnologia derivada do *electrospinning* é o *bio-electrospinning*, que usa o processamento de suspensões

celulares que são submetidas a um campo elétrico de alta intensidade e induzidas a passar por uma agulha fina, o que gera pequenas gotículas que contêm as células. Assim, o *scaffold* é construído já com as células integradas. Essa técnica permite uma distribuição homogênea das CTMs no molde e, portanto, um maior potencial regenerativo.<sup>15</sup> Se considerarmos a capacidade regenerativa limitada do tecido cartilaginoso, a mescla de biomateriais e células-tronco parece ser a opção mais promissora, ainda que haja necessidade de estudos complementares de eficácia e segurança.

### Apoptose e inflamação na degeneração e regeneração da cartilagem

Células têm a capacidade de autorregular não só a taxa de proliferação e diferenciação, mas também a sua morte em muitas situações, a partir de um evento conhecido como apoptose ou morte celular programada. Ao contrário da necrose e da autofagia, a apoptose é um mecanismo altamente coordenado e que não causa processo inflamatório específico.<sup>17</sup> Entretanto, evidências mostram que processos inflamatórios crônicos induzem a desorganização da matriz extracelular e apoptose dos condrócitos, o que leva, consequentemente à destruição da cartilagem. Isso ocorre em muitas doenças degenerativas, como a artrite reumatoide e a osteoartrite.<sup>18</sup>

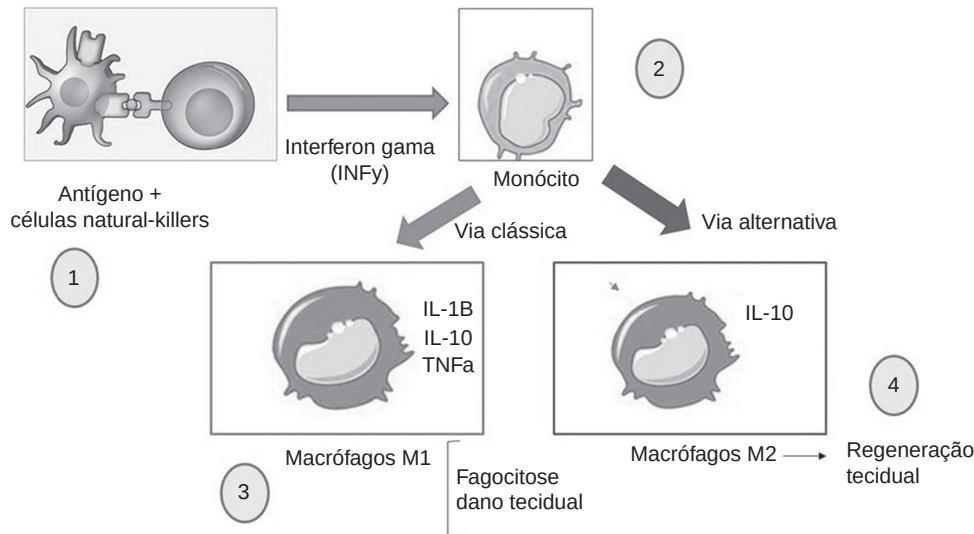
Sabe-se que os monócitos/macrófagos são componentes essenciais do sistema imune inato e têm uma grande variedade de funções. Eles controlam o início e a resolução da inflamação por meio da fagocitose, liberação de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação do sistema imune adquirido. Sob circunstâncias normais, monócitos circulam na corrente sanguínea por curto período antes de entrar espontaneamente em apoptose. A presença de fatores estimulatórios inibe a apoptose dos monócitos, que se diferenciam em macrófagos, os quais podem viver por um longo período nos tecidos.<sup>19,20</sup>

Os macrófagos produzem muitas substâncias relevantes à resposta imunológica e que coordenam o processo de inflamação (citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e a citocina anti-inflamatória IL-10). Além disso, produzem fatores que são críticos no combate a microrganismos, como os metabólitos do oxigênio e óxido nítrico, fatores que promovem o reparo tecidual, como o fator de crescimento de fibroblasto, entre outros.<sup>21</sup> Hoje são reconhecidos dois tipos de ativação dos macrófagos na resposta inflamatória: a “ativação clássica” e a “ativação alternativa” (fig. 2).

Nesse processo, quando ocorre um aumento da ativação dos macrófagos M1 em relação aos macrófagos M2, haverá um reparo tecidual deficiente com destruição continuada em tecidos com baixa capacidade regenerativa, como no caso da cartilagem.

Na osteoartrite, a ocorrência de inflamação intra-articular com sinovite indica que o líquido sinovial pode ser a origem das citocinas inflamatórias e das enzimas proteolíticas. Durante a sinovite, ocorre liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e a TNF $\alpha$ , e tais moléculas têm um efeito inibitório na produção de colágeno 2 e agrecan pelos condrócitos. Além disso, essas citocinas inflamatórias induzem a liberação de metaloproteinases e de agrecanases





**Figura 2 – Macrófagos ativados pela via clássica participam como indutores da inflamação e são denominados M1. Esses macrófagos produzem níveis elevados de IL-2 e baixos níveis de IL-10. Estudos também têm mostrado que a ativação de macrófagos depende do estímulo de citocinas inflamatórias produzidas por linfócitos auxiliares ou células NK, em especial o interferon gama (INF $\gamma$ ). Os macrófagos ativados que têm atividade microbiana e tumoricida são caracterizados por secretar grandes quantidades de citocinas e mediadores pró-inflamatórios. Nessa resposta inflamatória esses macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , e também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, bem como intermediários reativos, como o óxido nítrico. Logo após o processo de fagocitose os macrófagos morrem por morte celular programada, conhecida como apoptose. A “ativação alternativa” envolve o estímulo de macrófagos por moléculas como as interleucinas IL-4 e IL-13 que leva ao aumento nos níveis de citocina anti-inflamatória IL-10 e que induz o reparo tecidual (resposta anti-inflamatória). No organismo a resposta imunológica pró-inflamatória geralmente é seguida pela resposta imunológica anti-inflamatória. Ela é importante para que haja reparo tecidual após uma infecção microbiana ou uma injúria física. O desbalanço entre as duas respostas pode gerar doenças crônicas, como a osteoartrite.**

que degradam a matriz, o que resulta na destruição da cartilagem. Outras moléculas também podem estar envolvidas na apoptose dos condrócitos, tais como M IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , por meio do aumento da liberação de óxido nítrico, e a prostaglandina E2 (PGE2).<sup>18</sup>

Ainda que existam CTMs nos tecidos articulares, na membrana sinovial, no tendão e na cartilagem articular, a indução dessas células para regenerar o tecido cartilaginoso ainda não foi totalmente elucidada. Sabe-se que o processo de condrogênese é desencadeado por fatores como proteínas morfogenéticas do osso (BMPS) e fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$ . Esses fatores agem sobre genes, como o fator de transcrição SRY-box 9 (Sox9), que é essencial para a diferenciação dos condrócitos. O Sox9 controla a transcrição de genes que sintetizam moléculas da matriz extracelular, como o colágeno do tipo 2 e o agregan, ao mesmo tempo em que também suprimem a formação de condrócitos hipertróficos.

Processos inflamatórios crônicos parecem influenciar negativamente a diferenciação das CTMs em condrócitos. No caso, a citocina IL1 $\beta$  e o TNF $\alpha$  têm efeito supressor da condrogênese. Isso porque essas citocinas inibem a expressão do gene Sox9 via supressão da expressão da molécula TFG- $\beta$  (um importante fator de iniciação na diferenciação dos condrócitos) e o aumento na expressão da molécula Smad7 (inibitória da condrogênese). A citocina inflamatória IL-17, que

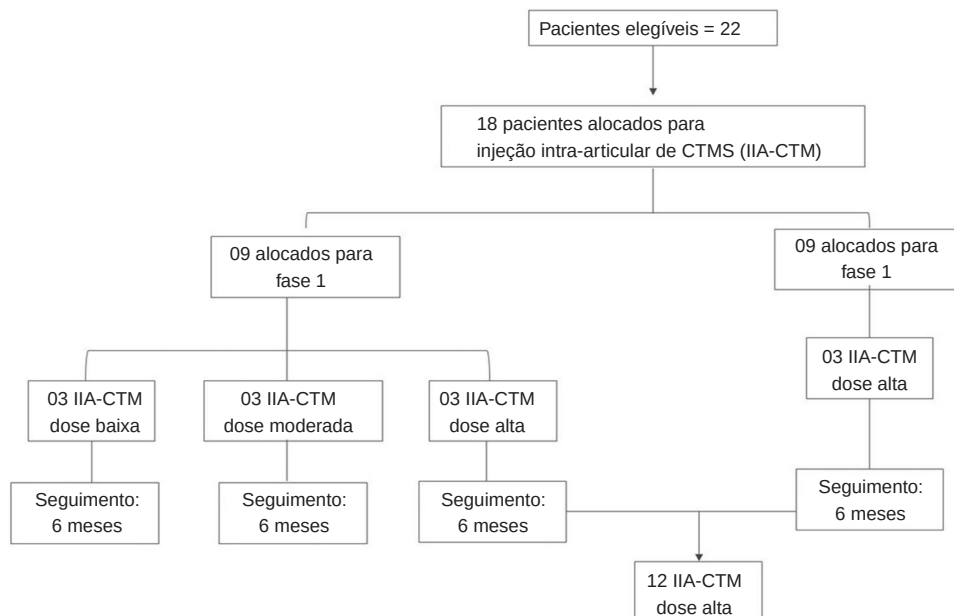
é uma molécula-chave em processos de inflamação crônica, também tem a capacidade de suprimir a condrogênese. Essa molécula suprime a fosforilação da proteína Sox9 e impede a ação regenerativa dela.<sup>22</sup>

Portanto, se considerarmos o conjunto das evidências sobre o importante papel da inflamação crônica no processo regenerativo da cartilagem, fica claro que em um ambiente inflamatório com níveis elevados de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-17 as CTMs poderão não responder adequadamente à terapia regenerativa. Isso porque essas células poderão ser induzidas à apoptose antes mesmo de se diferenciar em condrócitos.

### Aplicações clínicas de células-tronco na regeneração do tecido cartilaginoso

Muitos estudos pré-clínicos e clínicos que envolvem potencial regeneração da cartilagem com CTMs são conduzidos para diversas doenças, incluindo a osteoartrite. Apesar de o uso de CTMs para a regeneração da cartilagem estar ainda em nível de pesquisa, existem questões importantes a serem resolvidas para tornar essa terapêutica eficaz e segura.

A implantação de condrócitos de uma região do corpo para a região lesionada tem como desvantagem a necessidade de dois procedimentos cirúrgicos. A necessidade de expansão dos condrócitos em cultura para aumentar o número de células a



**Figura 3 – Delineamento experimental geral do estudo conduzido por Jo et al.<sup>33</sup> (2014) que avaliou, por meio de um ensaio clínico (Fase I/II), o efeito da injeção intra-articular de joelho na regeneração da cartilagem de pacientes com osteoartrite. As CTMs foram obtidas a partir de lipos aspirado abdominal, cultivadas em laboratório e introduzidas na articulação após três semanas. Dose baixa =  $1 \times 10^7$ ; dose moderada =  $5 \times 10^7$ ; dose alta =  $1 \times 10^8$  células em solução salina. Os pacientes foram descontinuados em relação à terapia farmacológica, com exceção da administração de cetoprofeno.**

ser implantada também é outro grande problema, pois tais células podem se desdiferenciar e produzir fibrocartilagem, e não cartilagem hialina.<sup>23-26</sup>

Na tentativa de minimizar esses problemas, alguns autores começaram a pesquisar o efeito da injeção intra-articular de CTMs no tratamento da osteoartrite. Esse procedimento aparentemente traz muitas vantagens, já que poderia evitar o manejo cirúrgico em muitos casos.<sup>27-32</sup> Entretanto, somente em 2014 foi publicado por Jo et al.<sup>33</sup> o primeiro ensaio clínico fase I/II para avaliar a eficácia e a segurança da injeção intra-articular de joelho na regeneração da cartilagem articular por meio de análises clínicas, radiológicas, artroscópicas e histológicas (fig. 3).

As CTMs injetadas foram obtidas de lipossucção da gordura abdominal subcutânea e as CTMs obtidas foram testadas quanto a sua viabilidade, sua pureza (com avaliação dos marcadores CD31, CD34, CD45), sua identidade (com avaliação dos marcadores CD73, CD90), esterilidade e não contaminação com endotoxinas ou micoplasmas.

Os procedimentos para a injeção intra-articular foram feitos na posição supina e com anestesia espinhal depois de três semanas em que foi feita a lipossucção. Um exame artroscópico padrão foi feito no joelho e as lesões da cartilagem articular foram medidas com uma sonda artroscópica calibrada e graduada de acordo com a classificação de lesões da cartilagem da *International Cartilage Repair Society* (ICRS). As CTMs diluídas em solução salina foram injetadas sem que fosse feito debri, sinovectomia ou meniscotomia durante o procedimento. Não foram relatados efeitos adversos graves e a qualidade da condição do joelho avaliada por meio do *Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index* (Womac)

melhorou significativamente nos pacientes que receberam alta concentração de CTMs intra-articular. O tamanho do defeito da cartilagem diminuiu nos côndilos medial femoral e tibial e também nos grupos que receberam doses altas de CTMs. Assim, os autores concluíram que a injeção intra-articular de  $1 \times 10^8$  células melhorou a função do joelho com osteoartrite e a dor no joelho sem causar efeitos adversos via redução dos defeitos da cartilagem pela regeneração de tecido similar à cartilagem hialina.

## Considerações finais

Apesar de os resultados de Jo et al.<sup>33</sup> serem animadores, Kondo et al.,<sup>18</sup> na sua revisão sobre o tema, salientam que resultados de estudos adicionais que envolvem vários protocolos são necessários para realmente se comprovar a eficácia e a segurança desse procedimento. Além disso, esses últimos autores comentam que são feitas outras investigações voltadas para a melhoria da eficiência da diferenciação de CTMs em condrócitos por meio da análise da suplementação do meio de cultura com várias moléculas regulatórias, como incluindo TGF- $\beta$ 1-3; BMP-2, -4, -6, -7; FGF-2, IGF-1 etc. Além desses, alguns compostos, como a dexametasona e o ATP, já mostraram ação positiva sobre a condrogênese.

Outra questão importante diz respeito às condições microambientais inflamatórias do local em que vão ser injetadas as CTMs. Evidências mostram que as CTMs têm efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios. Entretanto, uma supressão da inflamação articular poderia potencialmente aumentar a eficiência da regeneração tecidual.

Nesse caso, o que está em aberto e precisa ser explorado em estudos futuros são o quanto modificações no próprio ambiente inflamatório articular poderiam induzir a diferenciação de CTMs já alocadas naquela região. A resposta a esse questionamento poderia conduzir ao desenvolvimento de técnicas regenerativas associadas às técnicas cirúrgicas já bem estabelecidas, sem necessidade de transplante de CTMs de outras partes do corpo. Porém, se considerarmos a complexidade dos eventos relacionados à condrogênese e ao reparo da cartilagem, o caminho ainda é longo e se faz necessária uma grande quantidade de pesquisas complementares.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004;8(3):301-16.
- Amorin B, Valim VS, Lemos NE, Moraes Júnior L, Silva AMP, Silva MAL, et al. Mesenchymal stem cells – Characterization, cultivation, immunological properties, and clinical applications. *Rev HCPA Fac Med Univ Fed Rio Gd do Sul*. 2012;32(1):71-81.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. New York: Garland Publishing; 1994. p. 971-84. The extracellular matrix of animals.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44(4):215-30.
- Bornes TD, Jomha NM, Sierra AM, Adesida AB. Hypoxic culture of bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells differentially enhances in vitro chondrogenesis within cell-seeded collagen and hyaluronic acid porous scaffolds. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(84):1-17.
- Machado AK, Cadoná FC, Azzolin VF, Dornelles EB, Barbisan F, Ribeiro EE, et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Res Int*. 2015;67:426-33.
- Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, Graf B, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res*. 2011;29(7):1114-20.
- Sadeghi F, Esfandiari E, Hashemibeni B, Atef F, Salehi H, Shabani F. The effect of estrogen on the expression of cartilage-specific genes in the chondrogenesis process of adipose-derived stem cells. *Adv Biomed Res*. 2015;4:43.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2005;280(26):24731-7.
- Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem*. 2006;281(44):33554-65.
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 1998;4(4):415-28.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
- Tamburini BA, Tyler JK. Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Mol Cell Biol*. 2005;25(12):4903-13.
- Matta C, Mobasheri A. Regulation of chondrogenesis by protein kinase C: emerging new roles in calcium signalling. *Cell Signal*. 2014;26(5):979-1000.
- Garg T, Goyal AK. Biomaterial-based scaffolds – Current status and future directions. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11(5):767-89.
- Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka JT. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials*. 2003;24(8):1487-97.
- Sorrentino G, Comel A, Mantovani F, Del Sal G. Regulation of mitochondrial apoptosis by Pin1 in cancer and neurodegeneration. *Mitochondrion*. 2014;19 Pt A:88-96.
- Kondo M, Yamaoka K, Tanaka Y. Acquiring chondrocyte phenotype from human mesenchymal stem cells under inflammatory conditions. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):21270-85.
- Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev*. 1996;76(4):927-47.
- Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000;407(6805):784-8.
- Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, et al. Sistema imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(4):434-61.
- Morisset S, Frisbie DD, Robbins PD, Nixon AJ, McIlwraith CW. IL-1ra/IGF-1 gene therapy modulates repair of microfractured chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;462:221-8.
- von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. 1977;267(5611):531-2.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-95.
- Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(10):2105-12.
- Vanlauwe J, Saris DB, Victor J, Almqvist KF, Bellemans J, Luyten FP. Five-year outcome of characterized chondrocyte implantation versus microfracture for symptomatic cartilage defects of the knee: early treatment matters. *Am J Sports Med*. 2011;39(12):2566-74.
- Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(12):3464-74.
- Lee KB, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects – A porcine model. *Stem Cells*. 2007;25(11):2964-71.
- Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician*. 2008;11(3):343-53.
- Mokbel AN, El Tookhy OS, Shamaa AA, Rashed LA, Sabry D, El Sayed AM. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:259.
- Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M, Shahram F, Nikbin B. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis.



- Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis.* 2011;14(2):211-5.
32. Emadedin M, Aghdami N, Taghiyar L, Fazeli R, Moghadasali R, Jahangir S, et al. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch Iran Med.* 2012;15(7):422-8.
33. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells.* 2014;32(5):1254-66.