



MARIANA FRESCHI BOMBINI

**CONDROGÊNESE A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO
DO LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO ESTIMULADO
COM TGF- β 3 EM *MICROMASS***

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARIANA FRESCHI BOMBINI

**CONDROGÊNESE A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO
DO LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO ESTIMULADO
COM TGF- β 3 EM *MICROMASS***

Orientador: Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

Tese de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de
Campinas para obtenção de título de Mestra em Clínica
Médica, área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA
FRESCHI BOMBINI E ORIENTADA PELO PROF. DR.
IBSEN BELLINI COIMBRA..

Assinatura do Orientador

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B639c Bombini, Mariana Freschi, 1984-
Condrogênese a partir de células-tronco do líquido
amniótico humano estimulado com TGF- β 3 em
micromass / Mariana Freschi Bombini. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2012.

Orientador : Ibsen Bellini Coimbra.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cartilagem. 2. Condrogênese. 3. Líquido
amniótico. 4. Células-tronco. 5. *Micromass* (Sistema de
cultura de células). I. Coimbra, Ibsen Bellini, 1959-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Chondrogenesis differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid with TGF- β 3 in *micromass* culture system.

Palavras-chave em inglês:

Cartilage

Chondrogenesis

Amniotic fluid

Stem cells

Micromass (Cell culture system)

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Ibsen Bellini Coimbra [Orientador]

Manoel Barros Bértolo

Márcia Uchoa de Rezende

Data da defesa: 30-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Mariana Freschi Bombini

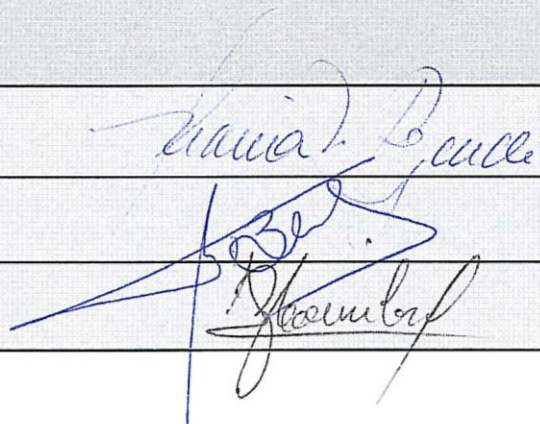
Orientador: Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

Membros:

1. Profa. Dra. Márcia Uchoa de Rezende

2. Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo

3. Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra



Handwritten signatures in blue ink. The top signature is 'Márcia Uchoa de Rezende'. The middle signature is 'Manoel Barros Bértolo'. The bottom signature is 'Ibsen Bellini Coimbra'.

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2012

DEDICATÓRIA

À melhor pessoa que eu conheço no mundo, e tenho privilégio de chamar de mãe!
Por tudo o que ela fez e faz por mim. Obrigada por dedicar-se sempre a
fazer-me feliz e realizada de uma maneira incondicional, dedico todos
os melhores momentos da minha vida a você! Amo você!!

AGRADECIMIENTOS

Primeiramente a Deus, que proporcionou caminhos e garantiu que as melhores decisões fossem alcançadas, por ser guardião fiel de meus pensamentos, por garantir que a minha consciência seja minha aliada e seja orientada com princípios de amor, fé e cerceada por pensamentos positivos. Obrigada por todos os desejos atendidos e por todos os ensinamentos.

Minha mãe, meu alicerce, meu referencial de bondade e alegria. A você agradeço não somente a conquista do mestrado, mas também por me garantir ferramentas para desejar ir mais longe.

Meu pai, que sempre se orgulhou de cada mínima conquista minha, quero que fique documentado aqui meu agradecimento e que de onde você estiver, saiba que tudo isso você tem parte.

Dr Ibsen obrigada por todas as contribuições no meu projeto e em minha vida. Obrigada pela chance de conhecer um tema importante de apelo mundial, agradeço por me tornar uma profissional.

Tatiana Nogueira Magalhães, amiga que se tornou irmã. Obrigada por todos os conselhos, por todos os desabafos, por todo o crescimento que isso causou em mim, obrigada por me fazer ver sob um novo e fortalecedor ponto de vista. Obrigada por todas as rizadas, obrigada por todos os momentos que fizeram de você minha amiga e irmã.

Renata Bastos, amiga que se tornou irmã, obrigada por me tornar mais capaz de reavaliar, por me ouvir, por estar aqui todos os dias, obrigada pela oportunidade de conviver com você, foi um presente!

Tatiana Mirabetti Ozahata, convivemos pouco mais o suficiente para ser fundamental na minha vida. Obrigada por me fazer sempre continuar. Amiga, presente!

Mariana Luchini, amiga querida obrigada por se orgulhar sempre de mim.

André Neves, obrigada pela convivência e por acreditar que as coisas sempre dão certo quando se tem determinação.

Cristiane Sampaio de Mara, nossa convivência em laboratório foi pequena mas fundamental para aprender desde cultura de célula até protocolos e posturas, obrigada.

Angélica Sartori, nossa convivência em laboratório foi pequena, mas foi importante para eu te reconhecer como uma referência positiva em minha vida.

Carolina Coli Zuliani, obrigada por todos os ensinamentos em laboratórios, pela companhia, pela torcida nos resultados e pelo sorriso. Foi ótimo.

Ana Helena Macedo Pereira, você é um doce de pessoa, sempre pronta a colaborar, obrigada por toda a ajuda e por ter encontrado você!

Ana Paula Dalla Costa, obrigada por toda ajuda sempre. Nosso convívio foi pequeno mais marcante. Adorei!!

Jessica Toscaro, adorei conviver com você no laboratório, obrigada por todo incentivo!

Renan Lazarin, foi um presente conviver com você, adorei muito, você é especial!!

Dr. Kleber Cursino de Andrade, muito obrigada por ser disposto e sempre pronto a ajudar, obrigada pela fundamental contribuição com os líquidos amnióticos, foi por causa da sua solicitude a pesquisa se tornou possível.

A todas as enfermeiras da ecografia do CAISM, meu muito mais que obrigada!!
Gratidão eterna! Vocês foram amores.

As amigas, que mesmo de longe foram importantes.

Aos laboratório que ofereceram equipamentos e aos colegas que ajudaram.

A família sempre!

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

RESUMO

A utilização de células-tronco mesenquimais (CTM) para a reconstrução da cartilagem articular é uma promissora alternativa terapêutica, devido à vulnerabilidade do tecido a lesões e processo degenerativo irreversível.

O objetivo deste estudo foi investigar o potencial condrogênico de CTM de líquido amniótico humano (CTM-LA) em sistema de cultura de *micromass* (alta densidade celular) com TGF- β 3 por 21 dias.

Métodos: 53 líquido amnióticos (LA) foram obtidos de mulheres submetidas à amniocentese durante o segundo trimestre de gravidez. A indicação da amniocentese foi feita pela obstetrícia, conforme protocolo específico do serviço de medicina fetal da UNICAMP. Foram selecionadas células-tronco mesenquimais, caracterizadas por citometria de fluxo. Estas células foram expandidas para obter um número populacional para o desenvolvimento do *micromass*. O *micromass* foi realizado em placa de cultura de 96 poços com fundo em “v”, em cada poço foram pipetados 10 μ l contendo 5x10⁵ CTM-LA e meio para diferenciação condrogênica contendo TGF- β 3. Esta condição se manteve por 21 dias, e então, o potencial condrogênico foi avaliado pela presença da proteína do colágeno II pela técnica de western blotting, também foi avaliada a expressão gênica do Sox-9, colágeno II e agrecano pela técnica da PCR em tempo real (qRT-PCR). Comparamos CTM-LA em monocamada a CTM-LA submetidas ao sistema de cultura de *micromass* e como controle positivo utilizamos a cartilagem adulta humana.

Resultados: Confirmamos o potencial condrogênico pela diferenciação das CTM-LA em condrócitos através da expressão dos genes SOX-9, colágeno tipo II e agrecano, bem como a proteína do colágeno II. A expressão de SOX-9 em *micromass* foi significativamente maior do que na cartilagem adulta.

Conclusão: A condrogênese foi desenvolvida a partir da combinação de uma fonte de célula tronco recém descrita proveniente do líquido amniótico humano com o sistema de cultura de *micromass*. Esta fonte apresentou alto potencial condrogênico e dessa forma, fortes evidências para aplicações clínicas. Os resultados são promissores e sugerem a possibilidade de investimentos em bancos de líquido amniótico.

Palavras-chave: cartilagem, potencial condrogênico, células-tronco de líquido amniótico humano, sistema *micromass*.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: The use of mesenchymal stem cells (MSC) for reconstruction of articular cartilage, leads to a promising therapeutic alternative, due to the tissue vulnerability to injuries and irreversible degenerative process.

The aim of this study was to investigate the chondrogenic potential of MSC from human amniotic fluid in *Micromass* system (high-density cell culture) with TGF- β 3 for 21 days.

Methodology: The amniotic fluid was obtained from 53 pregnant women. The *micromass* was performed using MSC that was cultured in monolayer and chondrocytes from adult human normal cartilage as control groups. After 21 days, the chondrogenic potential was determined by metabolic products released from the cell, such as SOX-9, type II collagen and aggrecan. This study was approved by the ethics committee.

Results: The proteic production of type II collagen was observed by Western Blotting. The genetic expression of SOX-9 was analyzed by PCR in real time, and this was found to be significantly higher than in adult cartilage. The same procedure was used to determinate the genetic expression of aggrecan and type II collagen, verifying positive result for both.

Conclusion: Chondrogenesis was developed from the unique combination of the newly discovered source of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid with *micromass*, and it demonstrated a satisfactory expression.

Thus, this source is extremely viable for clinical applications, and the results suggest the possibility of investments in human amniotic fluid banks.

Key words: chondrogenic, amniotic fluid, *micromass*

LISTA DE ABREVEATURA

LISTA DE ABREVIATURA

ACI Implante autólogo de condrócitos

CFU Fibroblasto formadores de colônia

CTM Célula tronco mesenquimal

CAISM Centro de Atendimento Integrado à Saúde da Mulher

CMLA Célula mesenquimal de líquido amniótico

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar

COMP Proteína oligomérica da matriz cartilaginosa

DMEM Dulbecco's modified Eagle's médium

DNase Desoxiribonuclease

ERK sinal extracelular regulado por quinase

GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – do ingles

Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HIF-1 α Fator induzido por hipoxia 1 α

HC Hormônio de crescimento

HMG Grupo de alta mobilidade

IGF-1 Insulin-like growth factor 1 – do Ingles

Fator de crescimento semelhante à Insulina – 1

ITS 1+ Insulin-transferrin-selenium

LA Líquido amniótico

MAPK proteína mitogênica ativada por quinase

MEC Matriz extra-celular

MACI implante autólogo de condrócito associado à matriz

OA Osteoartrite

Oct-4 Fator de transcrição octâmero de ligação 4

PBS Phosphate buffer saline - do inglês

Tampão de fosfato salino

PC Placa de crescimento

PLL proteína latente de ligação

Primers Iniciadores

qRT-PCR Transcrição reversa de Reação da cadeia da polimerase em tempo real
quantitativo

RNA Ácido ribonucleico

Runx2 Runt-related transcription fator 2

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - do inglês
electroforese em gel de poliacrilamida - Sodium dodecil sulfato

Sox-9 SRY (sex determining region Y)-box 9

TGF- β 3 Transforming Growth Factor β 3 – do Inglês

Fator de crescimento transformador – β

Tidemark Região de transição

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência dos <i>primers</i> (iniciadores) para reação de RT-PCR em tempo real.....	50
--------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FUGURAS

Figura 1. Processo de diferenciação celular.....	19
Figura 2. Fases do desenvolvimento da cartilagem.....	22
Figura 3. Interações condrócito matriz.....	24
Figura 4. Fases da expressão do Sox-9.....	32
Figura 5. Células de líquido amniótico com 7 dias de cultura.....	54
Figura 6. Citometria de fluxo de líquido amniótico humano com 14 dias de cultura.....	55
Figura 7. A- placa com 96 poços, B- vista inferior da placa mostrando o Vbotton, figura C- estrutura semelhante a cartilagem após 21 dias de cultura em sistema <i>micromass</i>	56
Figura 8. Curva da eficiência do SOX-9.....	59
Figura 9. Curva de eficiência do colágeno II.....	59
Figura 10. Curva de eficiência do agrecano.....	60
Figura 11. Curva de eficiência do GAPDH.....	60
Figura 12. Comparação da expressão do colágeno em monolayer (MSC), <i>micromass</i> (TGF- β 3 21 dias) e condrócitos adulto (normal cartilage).....	63

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparação da expressão do SOX-9 em monolayer (TO), <i>micromass</i> (A1) e condrócitos adulto (condro).....	61
Gráfico 2. Comparação da expressão do colágeno II em monolayer (TO), <i>micromass</i> (A1) e condrócitos adulto (condro).....	62
Gráfico 3. Comparação da expressão do agrecano em monolayer (TO), <i>micromass</i> (A1) e condrócitos adulto (condro).....	62

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo.....	2
Abstract.....	4
Lista de abreviaturas.....	6
Lista de tabelas.....	9
Lista de figuras.....	11
Lista de gráficos.....	13
Introdução	
1. Desenvolvimento da cartilagem.....	18
2. Condrócitos.....	20
3. Osteoartrite.....	26
4. Tratamentos atuais.....	28
5. Célula tronco.....	30
6. Sox-9.....	31
7. Agrecano.....	32
8. Colágeno II.....	33
9. Prolina.....	34
10. Ácido ascorbico.....	34
11. Dexametazona.....	35
12. TGF- β 3.....	35
13. <i>Micromass</i>	37
14. Células mesenquimais do líquido amniótico.....	37
Hipótese	
1. Hipótese.....	41

Justificativa	
1. Justificativa.....	43
Objetivo.....	45
Metodologia	
1. Coleta do líquido amniótico humano.....	47
2. Caracterização das células mesenquimais.....	48
3. Diferenciação.....	48
4. Confirmação da diferenciação dos condrócitos.....	49
5. Western Blotting.....	51
6. Análise estatística.....	52
Resultados	
1. Isolamento, expansão e caracterização das células.....	54
2. Citometria de fluxo.....	54
3. Diferenciação.....	56
4. RT- PCR em tempo real.....	57
4.1 Curva de eficiência dos primers: SOX-9 e colágeno II.....	59
4.1 Curva de eficiência dos primers: Agrecano e GAPDH.....	60
4.2 Gráficos da RT- PCR: SOX-9.....	61
4.2 Gráficos da RT- PCR: Colágeno II e Agrecano.....	62
5. Western Blotting.....	63
Discussão.....	65
Conclusão.....	72
Bibliografia.....	73

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

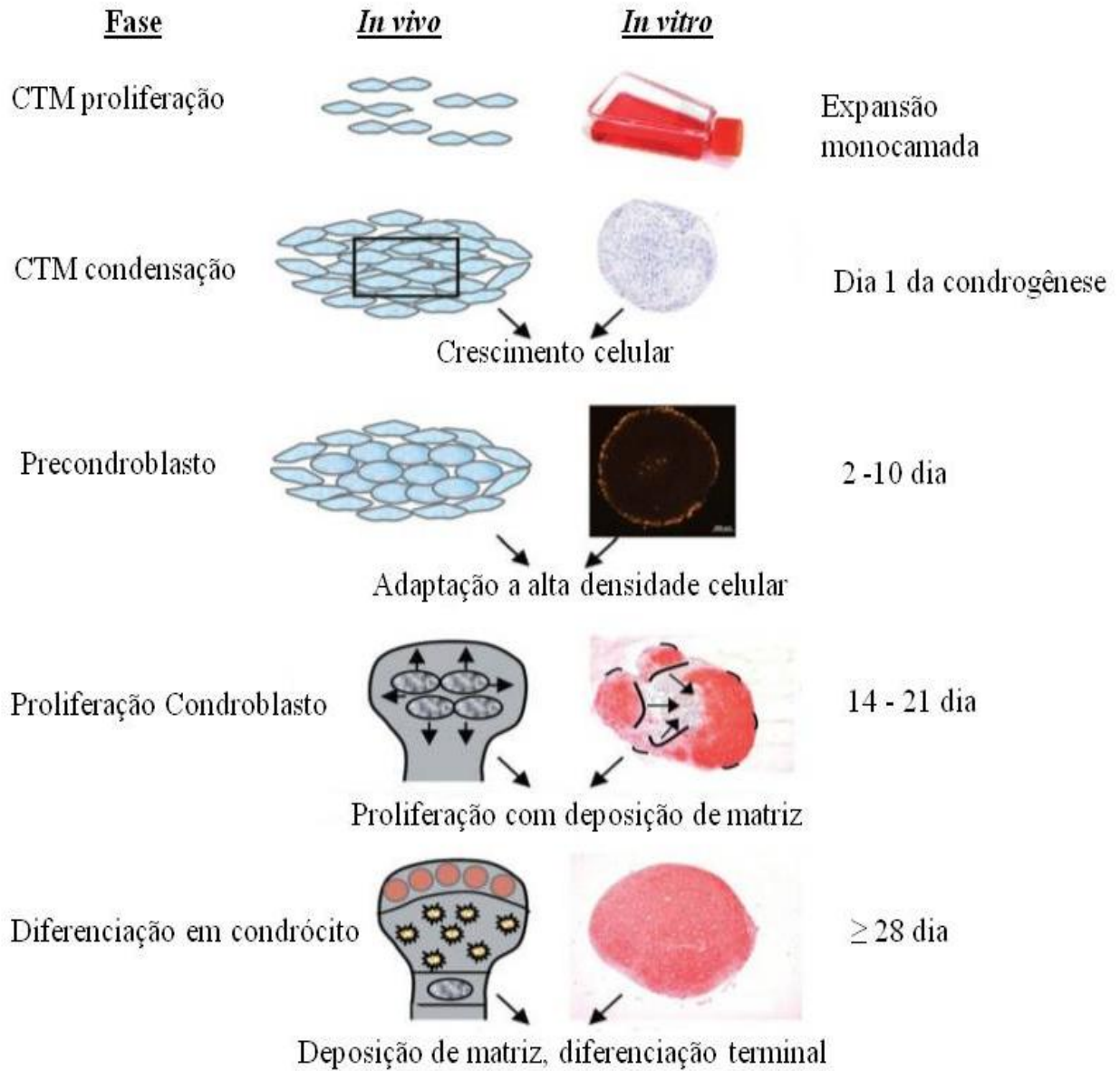
1. DESENVOLVIMENTO DA CARTILAGEM

Para que ocorra o processo de formação dos ossos nos vertebrados é necessário que haja um modelo cartilaginoso prévio para ser substituído posteriormente por osso. Condrogênese é o processo que resulta na formação de cartilagem, e leva ao processo de ossificação (1).

Durante o desenvolvimento e crescimento dos vertebrados, a condrogênese apresenta-se como um processo celular dinâmico, que leva à criação de vários tipos de cartilagens, tais como hialina, fibrosa e elástica. A cartilagem hialina é encontrada em estruturas craniofaciais, traqueia, brônquios, superfícies articulares das articulações diartrodiais e em placas de crescimento (PC) de ossos longos (2). As PCs são responsáveis pela condução do processo de crescimento ósseo durante o desenvolvimento pré e pós-natal. Este processo de crescimento ósseo longitudinal é regido por uma complexa rede de sinais endócrinos, incluindo o hormônio do crescimento (HC), fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), glicocorticoides, hormônios da tireoide, estrogênio, androgênio, vitamina D e leptina. Muitos destes sinais regulam a função da placa de crescimento, tanto atuando localmente em condrócitos como também, indiretamente, por modulação de sinais de vias endócrinas (3).

Os ossos formam-se através de dois processos conhecidos como: endocondral e intra-membranoso. O processo de ossificação endocondral dá origem à cartilagem articular (4), esquematizada *in vivo* e *in vitro* (figura 1) (5).

Figura 1. Processo de diferenciação celular



Modificado de Dexheimer V., *et al.* Stem Cells Dev. 2012 Feb 15.

Assim, a ossificação endocondral é caracterizada pela substituição da cartilagem por osso e por uma série de acontecimentos que têm início com agregação de células mesenquimais para posterior a diferenciação destas em condrócitos.

No embrião humano, o esqueleto apendicular desenvolve-se a partir de brotos, visíveis na quarta semana de gestação (6). O desenvolvimento das articulações é dividido em duas etapas: a primeira quando a cartilagem é substituída por osso, e a segunda quando cartilagem remanescente se torna cartilagem articular.

A cartilagem articular é um tecido avascular, composto por cartilagem do tipo hialina (7), não possui capacidade regenerativa, possivelmente porque não existem as vias vasculares que conduzem os mecanismos de reparo como fatores humorais e o recrutamento de células tronco (8).

Dessa forma, o tecido tem uma limitada capacidade de cicatrização, sendo que as lesões não costumam cicatrizar-se espontaneamente (9). Porém pode ocorrer reparo em regiões com pequenos defeitos, com a produção de cartilagem hialina (8), e o local pode ser tratado com terapia celular, já para os defeitos maiores o reparo acontece com produção de tecido fibroso ou fibrocartilagem que são bioquimicamente diferentes de cartilagem hialina normal (8).

2.CONDRÓCITOS

Os condrócitos são os únicos componentes celulares da cartilagem, são responsáveis por manter o ambiente extracelular através da síntese e degradação da matriz extracelular (MEC) (10).

A MEC da cartilagem articular é composta por água, colágeno II, VI, IX, e XI, além da proteína oligomérica de matriz (COMP), e proteoglicanos do tipo agrecano,

versicano, e fibromodulina. Entretanto, o colágeno II e o agrecano são os mais predominantes (11).

As fases de diferenciação dos condrócitos são caracterizadas por modificações na proliferação celular, morfologia das células e a quantidade de produção da matriz extracelular bem como as diferentes macromoléculas sintetizadas (12)

O processo de formação do condrócito, conhecido como condrogênese, requer o recrutamento de células-tronco mesenquimais precedido de um processo de condensação.

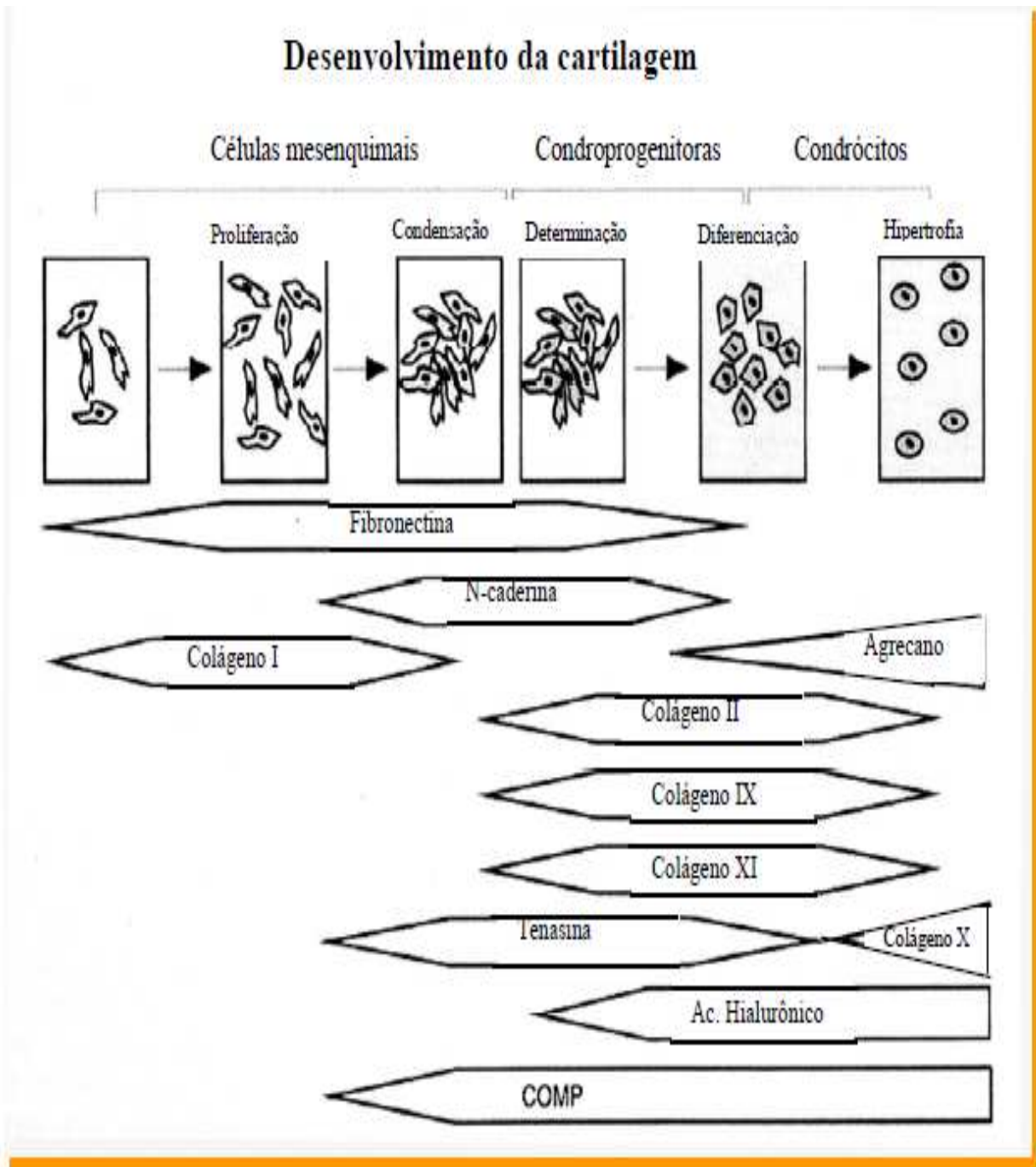
É sabido que a condensação faz com que as células comecem a expressar moléculas de adesão, tais como N-caderina (13), moléculas da célula neural (N-CAM) (14), fibronectina e laminina, todas são importantes para regular a condrogênese (15).

A expressão da fibronectina é regulada pelo fator transformador de crescimento β (TGF- β), em conjunto essas controlam o início da condensação (16)

As moléculas de adesão celular, tais como caderinas, imunoglobulinas e selectinas, mediam as interações célula-célula (17). A N-caderina, um membro da família caderina clássica (18) é muito expressa durante o desenvolvimento das fases de condensação celular (19). Ao inibir a N-caderina a condrogênese é impossibilitada (19). N-CAM é uma glicoproteína que se liga a outras moléculas de adesão de células de superfície ou para a matriz (20).

Algumas das principais proteínas envolvidas no processo da condrogênese estão esquematizadas na figura 2 (modificada de Shum L., et al (21)).

Figura 2. Fases do desenvolvimento da cartilagem



Modificado a partir de Shum L., et al., Birth Defects Res 69:102-122, 2003

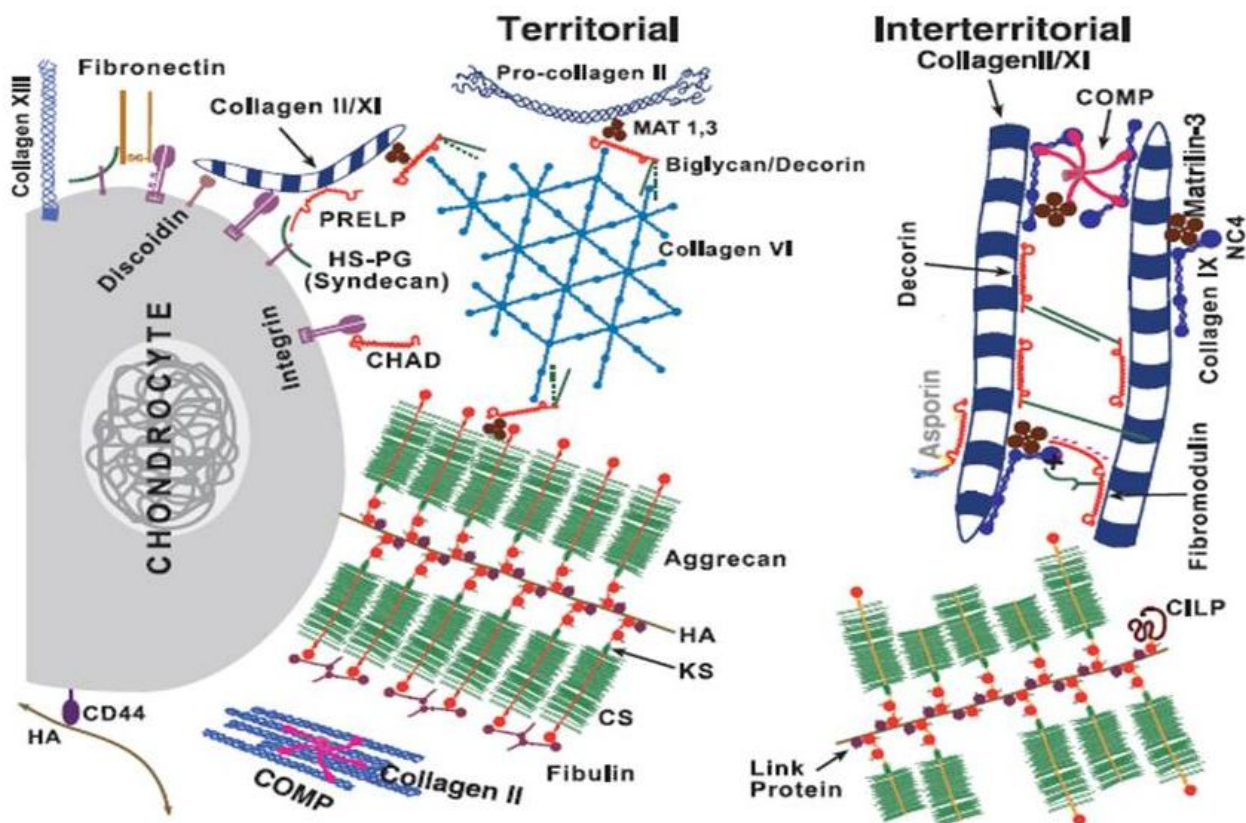
Além dos mecanismos de aderências célula-célula, as interações célula-matriz também estão envolvidas na condrogênese.

A matriz interterritorial da cartilagem, localizada entre as células é composta de uma rede de colágeno fibrilar que confere resistência à tração, difere da matriz territorial, localizada em torno do condrócito, pois esta contém microfibrilas de colágeno tipo VI, mas pouco ou nenhum colágeno fibrilar.

A rede de colágeno interterritorial consiste principalmente de fibrilas de colágeno tipo II em associação com o colágeno tipo XI e o colágeno tipo IX, formando uma estrutura integrada com um domínio que expõe uma região capaz de realizar associação com outros componentes da matriz e a retenção de proteoglicanos (22).

Os proteoglicanos são essenciais para proteger a rede de colágeno, que tem uma meia-vida de mais de 100 anos, se não submetido à degradação inapropriada. Um grande número de moléculas não-colagênicas, como biglicano, decorina, fibromodulina, matrilinas, e a COMP, também estão presentes na matriz. A COMP atua como um catalisador para a fibrilogênese do colágeno (23), já as interações entre o colágeno tipo IX e COMP ou matrilin-3 são essenciais para a adequada formação e manutenção da matriz da cartilagem articular (24). As interações célula-matriz estão esquematizadas na figura 3 (25).

Figura 3. Interações condrócito matriz



Dick Heinegard Int J Exp Pathol. 2009 Dec;90(6):575-86.

Após o processo de maturação da cartilagem articular, os condrócitos são distribuídos em quatro regiões distintas: 1- superficial, 2- intermediária, 3- profunda, e 4- calcificada, abaixo da qual está localizada a região de transição (tidemark) com o osso subcondral (26). Na zona superficial, os condrócitos são pequenos e achatados, e a matriz é composta por fibras colágenas finas associadas a uma elevada concentração de decorina e uma baixa concentração de agrecano. A zona intermediária, compreendendo 40 a 60 por cento do peso da cartilagem, consiste de condrócitos arredondados rodeado por feixes radiais de fibrilas de colágeno. Na zona profunda, os condrócitos são frequentemente agrupados em colunas ou “clusters” com feixes de colágeno espessos dispostos em uma

forma radial. Analisando o perfil da cartilagem desde a superfície até a zona profunda, a densidade celular diminui progressivamente, o volume da célula aumenta, e a proporção de proteoglicano aumenta em relação ao colágeno. A zona calcificada delimita a região da placa de crescimento com o *tidemark* (27) e ainda serve como um tampão mecânico importante entre a cartilagem articular não calcificada e o osso subcondral.

As diferenças entre as sub-populações de condrócitos da zona superficial, intermediária e profunda têm sido amplamente discutida (26). Como a cartilagem articular não é vascularizada, o condrócito deve contar com a difusão que ocorre na superfície articular ou a que ocorre na região do osso subcondral para a troca de nutrientes e metabólitos. A glicose serve tanto como uma fonte de energia principal para os condrócitos como um precursor essencial para síntese glicosaminoglicano(28).

O metabolismo do condrócitos opera a baixa tensão de oxigênio, variando de 10% na superfície para menos de 1% nas zonas profundas. *In vitro*, foi possível verificar que os condrócitos adaptaram-se a baixas tensões de oxigênio por regulação do fator- induzido por hipóxia 1 α (HIF-1 α) (29), que pode estimular a expressão de transportadores de glicose (30) bem como fatores angiogênicos, como fator de crescimento endotelial (VEGF) (31), e ainda inúmeros genes associados ao anabolismo da cartilagem e diferenciação dos condrócitos, incluindo *sex determining region Y-box 9* (Sox-9) e fator de crescimento transformador – β (TGF- β) (32).

Pelo fato do metabolismo da cartilagem ser lento, o tecido cartilaginoso originalmente era considerado inerte, atualmente é considerado capaz de responder a fatores extrínsecos que regulam a expressão gênica e a síntese de proteínas.

Numerosos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* têm confirmado que os condrócitos articulares são capazes de responder a lesão mecânica, instabilidade articular, bem como

estímulos biológicos, tais como citocinas, fatores crescimento e de diferenciação, todos contribuem para alterações estruturais na matriz cartilaginosa (10). Influências mecânicas sobre os condrócitos são consideradas importantes na patogênese e enfermidades tais como a osteoartrite (OA), mas as respostas de condrócitos a sinais moleculares podem variar de acordo com a zona em que a célula está. Em doenças articulares, o equilíbrio entre a síntese e a degradação de elementos da MEC é interrompido, pois taxa de perda de colágenos e proteoglicanos pode exceder a taxa de deposição de moléculas sintetizadas.

Assim, torna-se cada vez mais relevante a compreensão dos inúmeros fatores que contribuem para a regulação da forma da célula bem como os mecanismos de sinalização que são ativados a partir de interações célula-célula e célula-MEC, pois somente deste modo será possível abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da cartilagem.

Dessa forma, pelo fato do tecido cartilaginoso ter uma capacidade limitada de regeneração e as opções terapêuticas são escassas, a degeneração da cartilagem articular pode ter consequências graves(33), e muitas vezes progride para osteoartrite (34).

3. OSTEOARTRITE

Osteoartrite (OA) é uma doença articular progressiva, heterogênea e degenerativa, com participação de elementos pró-inflamatórios que acomete pessoas em todo o mundo. Está associada a destruição da cartilagem articular e pode ocorrer em qualquer articulação do corpo (35). Comum nas articulações que suportam peso como joelhos e coluna vertebral, mas também afeta as articulações inter-falangeanas das mãos, pescoço e pés, mas raramente afeta outras articulações, a menos que uma lesão ou estresse excessivo estejam envolvidos.

A OA faz com que a cartilagem de uma articulação fique frágil e perca elasticidade, tornando-a mais suscetível a danos.

Ao longo dos anos, a cartilagem de algumas áreas diminui consideravelmente sua capacidade biomecânica para distribuir a carga. Assim como a cartilagem articular se deteriora, também tendões e ligamentos, causando dor e até perda total da cartilagem. Nesta fase a única opção terapêutica é a substituição da articulação. As opções de tratamento atuais, além de substituírem a articulação total, são limitadas (36).

De um modo mais integrado, OA é caracterizada por uma degeneração da cartilagem articular, com inflamação intra-articular, sinovite, alterações peri-articular e no osso subcondral.

Múltiplos fatores estão envolvidos na patogênese da OA, incluindo influências mecânicas, efeitos do envelhecimento sobre a composição e estrutura da matriz da cartilagem, bem como fatores genéticos. As fases iniciais da OA envolvem o aumento da proliferação de condrócitos, bem como a e síntese de proteínas de matriz, proteinases, fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores inflamatórios.

Os condrócitos, as células do tecido conjunção, o osso subcondral e a sinóvia, todos contribuem para a patogênese da OA. O condrócito articular adulto, que normalmente mantém a cartilagem com um baixo metabolismo, tem limitada capacidade de regenerar a arquitetura da matriz. Ele pode tentar recapitular fenótipos dos estágios iniciais do desenvolvimento da cartilagem, mas não consegue reproduzir as características típicas que ele deve ter em cada zona. Intervenções farmacológicas atuais que tratam a dor crônica são insuficientes, e nenhuma terapia disponível apresenta eficiência comprovada. A engenharia de tecidos, associada ou não à terapia gênica, é assunto de investigação intensa. Existem

vários modelos animais para OA, mas não existe um modelo capaz de reproduzir fielmente as características da doença (10).

4. TRATAMENTOS ATUAIS

O tratamento efetivo para as lesões de cartilagem articular do joelho ainda permanece um desafio a ser vencido. As opções de tratamentos, variam desde medidas conservadoras como procedimentos cirúrgicos e até mais recentemente, o uso de fatores de crescimento e técnicas de terapia gênica. O resultado final de todas estas tentativas é geralmente um tecido de reparação fibroso (fibrocartilagem), que não tem as características biomecânicas da cartilagem hialina, necessárias para suportar as forças de compressão distribuídas no joelho. A fibrocartilagem geralmente se deteriora com o tempo, resultando em um retorno dos sintomas originais (37).

O tratamento das lesões condrais depende do estilo de vida que o paciente tem, como a frequência de atividades diárias, idade, etiologia e o grau da doença, bem como a qualidade da lesão.

As várias técnicas disponíveis com intervenção cirúrgica são:

Lavagem e desbridamento artroscópico. Primeiro observado por Burman em 1935, lavam as articulações sinoviais (38).

Perfuração artroscópica do osso subcondral. Foi utilizada pela primeira vez por Smillie e Dundee em 1957(39). Foi popularizada mais tarde por Pridie em 1959 (40);

Microfratura. Tem por finalidade promover um coágulo de fibrina. Steadman et al. propuseram para esse fim a utilização de um furador artroscópico para criar vários furos de 3-4 mm para além (41).

Implante autólogo de condrócitos (ACI). A utilização do implante autólogo de condrócitos humanos (ACI) foi documentada pela primeira vez por Brittberg et al. (1994) (42).

ACI associada à matriz (MACI). Com base em cirurgia de ACI, surgiu uma segunda geração que associa implante autólogo de condrócitos a uma matriz sintética (MACI), que foi aplicado pela empresa Verigen, tal como descrito por D'Anchise et al.(43). Atualmente, as terapias com células autólogas, técnicas com fator de crescimento e biomateriais indicam perfil promissor para respostas clínicas (43).

A falta de tratamentos eficientes para OA indica a necessidade de entender com riqueza de detalhes os mecanismos moleculares responsáveis pela destruição articular na OA. Como já comentado, o conceito de OA como uma "doença articular degenerativa" está dando lugar ao conceito de uma enfermidade auto-inflamatória na qual a inflamação está presente em nível molecular dentro da cartilagem articular e de outras estruturas adjacentes, caracterizando a doença como uma “insuficiência articular”.

Há evidências de que a destruição da cartilagem com OA é o resultado da atividade de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (44) que contribuem para a perda de cartilagem, estimulando a produção de fatores catabólicos que tanto inibem a síntese da matriz, quanto aumentam sua degradação. À medida que a OA progride, os condrócitos respondem aos danos e perdas de matriz aumentando sua proliferação (resultando na formação de “clusters” de condrócitos ou clones) e também passam a produzir mais elementos da matriz como o procolágeno tipo II. Entretanto, quando doente, ocorre um desequilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz.

As alterações observadas na OA podem ser correlacionadas à mudança fenotípica dos condrócitos que assumem algumas das características das células na zona hipertrófica

da placa de crescimento, como a produção de colágeno do tipo X e metaloproteinases, destacando-se a MMP-13(44).

5.CÉLULA TRONCO

Na última década, diferentes estudos utilizaram célula tronco mesenquimais (CTMs) como medida terapêutica (45, 46).

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são multipotentes, com capacidade de autorenovação e são uma estratégia promissora para a regeneração da cartilagem e do osso (47, 48).

As células-tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea foram descritas primeiramente em 1970 por Friedenstein et al. (49), que nomeou-as de fibroblasto formadores de colônia (CFU-Fs), devido à sua capacidade de se fixarem ao plástico, e desenvolverem-se em colônias. Desde a identificação e a primeira descrição detalhada do potencial das CTMs em diferenciar-se nas três linhagens germinativas feita em 1999 por Pittenger et al. (50), a compreensão dessas células ampliou muito.

As CTMs têm grande apelo para engenharia de tecidos e aplicações terapêuticas devido à sua multipotencialidade e relativa facilidade de isolamento a partir de diferentes tecidos. As células-tronco mesenquimais foram identificadas em inúmeros tecidos adultos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, sangue de cordão umbilical (51) e placenta. Elas abrem uma nova possibilidade para reparar lesões teciduais, e até retardam o envelhecimento (52).

Não há fenótipo específico para caracterização dessas células. Entretanto, para qualificá-la como mesenquimal elas devem apresentar requisitos mínimos, sugerido pela Sociedade Internacional de Citoterapia tais como: serem aderentes ao plástico sob

condições de cultura padrão; expressarem CD105, CD73 e CD90 e não expressarem CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79a e HLA-DR em sua superfície; Devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (53).

6. FATORES PARA DIFERENCIAÇÃO

SOX-9

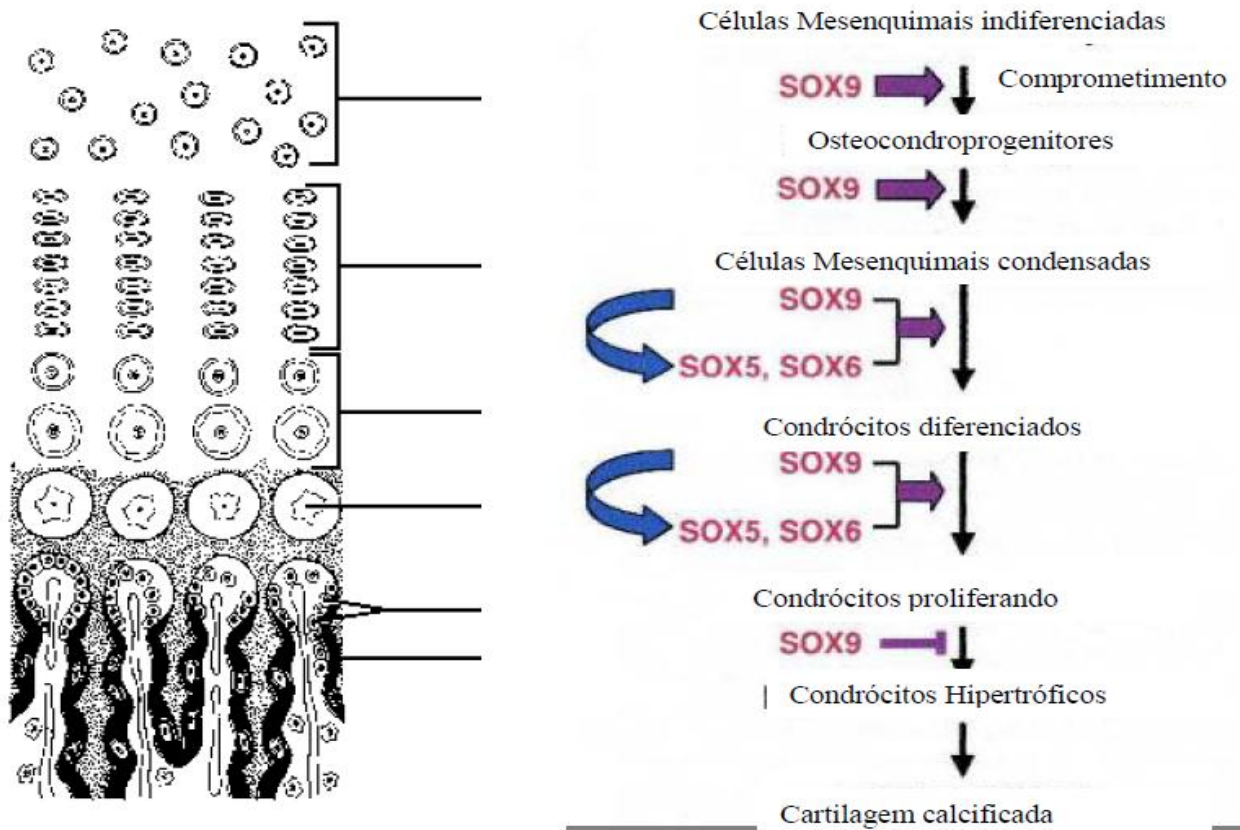
Pouco se sabe sobre os fatores que diferenciam as CTMs em condrócitos (54). Entretanto é sabido que o SOX-9 é um fator de transcrição que pertencente ao grupo de alta mobilidade -(HMG) que é expresso em condrócitos e outros tecidos (55).

O Sox-9 é um membro da família Sox (*Sry-type high mobility group box*), foi identificado primeiramente em regiões com elevada homologia com a Sry (região de determinação sexo Y) (56). Esta região codifica o aminoácido na posição 79 que é responsável por uma ligação específica da sequência do DNA (57). Várias proteínas desse grupo são conhecidas por atuarem como fatores de transcrição (58) e alguns dos genes Sox têm sido encontrado durante o desenvolvimento. O Sox-9 é expresso em células mesenquimais durante processo de condensações, e isto acontece durante o desenvolvimento do esqueleto de embriões (59).

Estas regiões que expressam Sox-9 coincidem com as de deposição de matriz da cartilagem, sugerindo a importância do Sox-9 na formação do esqueleto(60). Durante a embriogênese, o Sox-9 é expresso em todos os primórdios da cartilagem, coincidentemente com a expressão do gene colágeno II α 1 (II) (Col2 α 1)(56). Sox-9 também é expresso em outros tecidos, tais como sistema nervoso central e urogenital (56). Sox-9 se liga à sequência do Col2 α 1 e do gene de colágeno (XI). Assim, o Sox-9 é identificado como um regulador da diferenciação de condrócitos, além do Sox5 e Sox6 (61) esquema ilustrado na

figura 4. Em ratos quiméricos, sem a expressão de Sox-9-/- não ocorre a formação de cartilagens, bem como não ocorre a expressão de Col2 α 1 e COL9 α 2 e COL11 α 2 e agrecanos (62). Portanto, neste estudo investigamos a expressão deste fator transcrição.

Figura 4. Fases da expressão do Sox-9



Modificado a partir de Akiyama H., *et al.*, *Genes & Dev* 16:2813-2828, 2002.

7. AGRECANO

A resistência à compressão do tecido cartilaginoso dá-se principalmente pela presença do proteoglicano do tipo agrecano, que se une ao ácido hialurônico através de proteínas de ligação. A meia-vida do “core” proteico do agrecano varia entre 3 a 24 anos, e os componentes glicosaminoglicanos do agrecano são sintetizados mais prontamente sob

condições adversas, com um aumento mais rápido da matriz nas regiões pericelulares. Os agrecanos são ligados covalentemente a glicosaminoglicanos sulfatados (queratan sulfato e condroitin sulfato) hidrofílicas que apresentam propriedades eletronegativas que garantem resistência às forças de compressão aplicada ao tecido. A resistência à tração gerada pelo potencial eletronegativo do agrecano é proveniente de uma rede organizada de fibrilas reticuladas contendo principalmente o colágeno tipo II (63).

8. COLÁGENO II

O colágeno, é a principal proteína da cartilagem, oferece suporte e proporciona resistência à tração para os tecidos conjuntivos. Os condrócitos sintetizam e remodelam a cartilagem em resposta a diferentes estímulos, entre eles destacam-se forças mecânicas, estrutura de matriz, fatores de crescimento e citocinas.

Condrócitos isolados do tecido e mantidos em cultura desenvolvem uma matriz pericelular composta de colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico, fibronectina, e muitas moléculas menores (64). Em cartilagem articular de mamíferos, os componentes primários de colágeno são os do tipo II, IX e XI que apresentam-se expressos proporcionalmente.

A maior diferença da expressão destes ocorre com a maturação das finas fibras presentes na placa de crescimento de cartilagens jovens, sendo que $\geq 10\%$ do colágeno IX, $\geq 10\%$ colágeno XI, $\leq 80\%$ de colágeno II, já a cartilagem articular madura segue uma proporção de aproximadamente 1% colágeno IX, 3% do colágeno XI, $\geq 90\%$ de colágeno II) (65). Colágenos tipo II, IX, e XI formam uma estrutura fibrilar de um heteropolímero (66). Por isso, neste estudo investigamos a expressão de colágeno II.

9. PROLINA

Os colágenos representam uma família de moléculas triméricas da matriz extracelular, garantem a integridade estrutural das células além de outras funções. As três cadeias α que formam a parte da tripla hélice são compostas de repetição de peptídicos de glicina-X-Y, sendo que X e Y podem ser qualquer aminoácido, mas na maioria das vezes são aminoácidos de prolina e hidroxiprolina, respectivamente (67).

A formação da proteína colagênica presente em mamífero requer a incorporação de ligações peptídicas, interligadas com 35% de resíduos de glicina, 12% de resíduos de prolina e 10,5% de resíduos de hidroxiprolina.

Algumas das características físicas, mecânicas e propriedades químicas das fibras de colágeno podem ser associadas, pelo menos em parte, com seu elevado teor de hidroxiprolina (68).

A estrutura do colágeno de mamíferos é complexa, conta com a presença de inúmeros aminoácidos. Hidroxiprolina e hidroxilisina são encontrados em colágeno, entretanto são pouco encontrados em outras proteínas (69). Por estas razões, neste estudo utilizamos prolina nas culturas

10. ÁCIDO ASCÓRBICO

Ácido L-ascórbico é um cofator essencial para hidroxilação da lisina e prolina, enzimas essenciais para a biossíntese de colágeno. Além disso, ácido L-ascórbico estimula a síntese de colágeno de um modo que parece relacionar com o efeito do ácido L-ascórbico a reações de hidroxilação.

Hidroxiprolina é necessária para a formação da hélice do colágeno, e na sua ausência o colágeno não é capaz de ser secretado corretamente dos fibroblastos.

Hidroxilisina é essencial na formação ligação cruzada de colágeno, e na sua ausência, o colágeno seria estruturalmente instável (70). Por estas razões, neste estudo utilizamos o ácido ascórbico nas culturas.

11. DEXAMETASONA

Os glicocorticoides são conhecidos por apresentar diferentes efeitos nas atividades da célula. Eles são capazes de não só inibir a proliferação e diferenciação de osteoblastos (71), como também aumentam a atividade de fosfatase alcalina - e por consequência a mineralização (72, 73). Ele também tem a capacidade de induzir a diferenciação de condrócitos (74) bem como exerce influencias sobre a matriz cartilaginosa (75, 76). Outro estudo realizou um experimento no qual foi possível verificar a influencia da dexametasona na diferenciação de células-tronco mesenquimais proveniente de medula óssea (77). Neste estudo nós utilizamos a dexametasona para diferenciação celular.

12.TGF- β 3

A família desse fator de crescimento e diferenciação é conhecida como a superfamília TGF- β (78), um nome tomado a partir do primeiro membro da família a ser isolado (fator transformador de crescimento). Este nome poderia ser substituído, pois atualmente é sabido que o TGF- β tem um grande influencia em diferentes sistemas (79). Nos mamíferos, o TGF- β tem sido relacionado a moléculas que controlam o desenvolvimento sexual, a produção de hormônio na glândula pituitária, bem como a criação dos ossos e cartilagens (79).

Até o momento, quatro genes apresentam semelhança ao TGF- β . Estas moléculas foram originalmente chamadas de TGF- β 2, β 3, β 4, e β 5, mas são derivados de espécies

diferentes. Considerações evolutivas sugerem que o TGF- β 4 é provavelmente o homólogo TGF- β 1 (80) em mamíferos. A maior parte das moléculas de TGF- β têm atividades qualitativamente semelhantes em diferentes sistemas (78).

O estudo sobre as via de sinalização do TGF- β tem mostrado que ele está envolvido em inúmeros processos, incluindo desenvolvimento, cicatrização de feridas, fibrose, angiogênese, carcinogênese e imunidade. O TGF- β se liga a um complexo de transmembrana, heteromérico de serina / treonina quinases, que são compostos de receptores "tipo I" e "tipo II". Smads são uma família de proteínas importantes na sinalização da cascata do TGF- β . As Smad2 e Smad3 se ligam no citoplasma e formam um complexo ativado de TGF- β (81).

A cascata de sinalização do TGF- β é rigorosamente controlada por mecanismos de feedback proveniente da matriz extracelular, membrana celular, citoplasma e núcleo.

TGF- β é produzido por condrócitos, tem elevado peso molecular e fica em associação com a proteína latente de ligação (PLL). Em condrócitos presentes na placa de crescimento, o armazenamento de TGF- β por PLL é dependente da maturação das células. A liberação de plasmina transglutaminase, e MMPs são ativas pelo TGF- β (82).

Na placa de crescimento epifisário, TGF- β 1 e TGF- β 3 são expressos de 6 a 24 semanas de idade, em ratos, já o TGF- β 2 é expresso em áreas semelhantes na 6 semanas de idade, mas diminuiu durante o crescimento. A expressão de TGF- β em condrócitos hipertróficos é fraca. O tratamento com TGF- β aumenta a síntese de matriz da cartilagem, especialmente o agrecano. Dessa forma, o TGF- β aumenta a síntese de glicosaminoglicano em cartilagem imatura, mas não na cartilagem madura. Ele ajuda a manter os componentes da matriz da cartilagem em uma estado imaturo (83). O *runt-related transcription factor 2* (Runx2) é um fator de transcrição chave na diferenciação de osteoblastos e maturação

condrócitos (84). O tratamento com TGF- β resulta em fosforilação de Runx2 nos resíduos de treonina, possivelmente através da via de sinalização do sinal extracelular regulado por quinase (ERK). O efeito do TGF- β em Runx2 varia nos diferentes tipos celulares. Em células mesenquimais, o TGF- β induz Runx2 através das proteínas mitogênicas ativadas por quinases (MAPK). E ainda exerce influência no gene Wnt (84).

13. MICROMASS

O sistema de cultura *micromass* foi usado pela primeira vez para estudar desenvolvimento endocondral de esqueleto (85), e tem sido aplicado para induzir a condrogênese com células-tronco mesenquimais (86).

CTMs acumuladas proporcionam grandes interações célula-matriz e então, iniciam a condrogênese *in vivo*. *Micromass* é um sistema de cultura *in vitro* de alta densidade celular, que imita o primeiro passo de condensação das CTM que ocorre *in vivo*, além disso, promove mudanças na composição da matriz extracelular, fato este que permite a observação detalhada do processo de condrogênese. Assim sendo, esse modelo se torna bom para estudar os primeiros passos de condrogênese. Portanto, a cultura em *micromass* tem sido amplamente utilizado para a indução de condrogênese e também para investigar fatores e eventos de sinalização envolvidos na condrogênese (87).

14. CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

A primeira evidência de uma população distinta de células mesenquimais no líquido amniótico humano (CMLA) foi obtida por duas equipes de pesquisa de forma independente (88). Estas células expressaram ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para o fator de transcrição de ligação octâmero 4 (Oct4) (88), e resultados positivos para marcadores

mesenquimais tais como CD90 e CD105 e CD73, CD166 mas foram negativos para os marcadores hematopoiéticos, tais como CD45, CD34, CD14 (89). Foi demonstrado ainda que as CMLAs expressavam CD44 e CD105, mas não o CD34.

O líquido amniótico (LA) contém células das três camadas germinativas (90), e expressam os marcadores dessas três camadas: FGF-5 (um marcador ectodérmico), AFP (um marcador endodérmico) e Bra (um marcador mesodérmico) (91), também expressam Tra-1-8 e não expressam HLA-DR (92). O LA pode ser coletado durante o segundo trimestre de gestação, por amniocentese e é rico em células mesenquimais (90, 93) que possuem potencial de proliferação elevado, bem como apresentam capacidade adipogênica, osteogênica, miogênica, além de células endoteliais, de origem neural, e células hepáticas (94). Além disso, não desenvolvem tumor, retém telômeros longos, e mantem um cariótipo normal por mais de 250 passagens (94).

O LA apresenta ainda, a proteína NANOG e SSEA-4 (95), e perfil para diferenciação em condrócitos (96).

Há fortes evidências de que a origem das CTM de líquido amniótico seja proveniente do epiblasto (forma o assoalho da cavidade amniótica), portanto são sensíveis a sinais para diferenciação (97).

Estudos comparativos entre humanos e macacos *rhesus* têm mostrado que o processo de formação de âmnio é basicamente equivalente, em ambas as espécies. No entanto, a cavidade amniótica começa a se formar de 7-8 dias após a fertilização (dpf) no embrião humano. Já na outra espécie estudada, 10 dpf (98). O ectoderma embrionário (epiblasto) dá origem a todos os tecidos fetais. Em humanos, a ectoderme amniótica é a primeira estrutura que é facilmente distinguida do epiblasto logo após a implantação, bem antes do início da gastrulação (15-17 dpf)(99).

Essas células são consideradas originárias do feto em desenvolvimento e estão em um estágio intermediário entre as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas (94).

Dessa forma, considerando o LA como uma possível fonte de pluripotência, com características semelhantes à embrionária, decidiu-se estudar no corrente trabalho o potencial de diferencial condrogênico dessas células.

HIPÓTESE

HIPÓTESE

No líquido amniótico encontram-se células progenitoras mesenquimais, com potencial de originar condrócitos quando submetidas à cultura em presença de fatores de crescimento envolvidos com a condrogênese. Por serem células mais primitivas possuem maior capacidade de diferenciação e proliferação. Uma vez que estas células se diferenciam, poderemos avançar em direção a estudos de enxerto das mesmas em lesões articulares e doenças degenerativas.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

Com o sucesso desta pesquisa uma nova alternativa de tratamento para lesões articulares será possível, uma vez que lesões condrais, assim como doenças tal qual a OA são causadoras de grande morbidade. A possibilidade de terapia celular passa a ser uma alternativa promissora em doenças que comprometam a cartilagem articular. Além disso, o aumento do número de bancos de líquido amniótico, tanto públicos como privados, possibilitarão um acesso mais fácil a estas células.

OBJETIVO

OBJETIVO

Proporcionar a condrogênese a partir de células-tronco mesenquimais de líquido amniótico humano cultivadas em meio de cultura contendo TGF- β 3 em sistema de cultura de *micromass*.

METODOLOGIA

MATERIAL E MÉTODOS

1. COLETA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO

Após a assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecidos de 53 mulheres, gestantes e de segundo trimestre, essas foram submetidas à amniocentese e então coletados 40 ml de líquido amniótico (LA).

A indicação da amniocentese foi feita pela obstetrícia sob a suspeita de anomalia cromossômica, conforme protocolo específico do serviço de Medicina Fetal do hospital das clínicas da UNICAMP (anomalias estruturais fetais detectadas na ultra-sonografia e risco aumentado de cromossomopatias pela avaliação de risco fetal). Após orientação e consentimento informado, foi realizado amniocentese sob visão ecográfica.

O procedimento seguiu as seguintes etapas: antissepsia com PVPI alcoólico, isolamento por campo fenestrado, aplicação em pele e subcutânea de lidocaína 2% sem vasoconstritor, punção abdominal até cavidade amniótica com agulha raquídea 20G, para a retirada de 40 ml de líquido amniótico em duas seringas de 20 ml.

As amostras do LA logo após a coleta foram enviadas ao laboratório de biologia molecular da cartilagem - Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP (LABIMOCA), onde foram semeadas em garrafas de culturas contendo meio para expansão celular (α -mem, GIBCO, Grand Island, NY, EUA) por cerca de 7 dias em incubadora à 37°C com 5% de CO₂, para que as células pudessem aderir ao frasco. As células não aderentes foram descartadas.

Dos 53 líquidos amnióticos coletados, somente 12 exibiram cariótipo normal (realizado na medicina fetal) e, portanto continuaram a serem cultivados e expandidos, os que exibiram cariótipo alterado foram descartados.

Quando as células em cultivo atingiram cerca de 70% de confluência, foram retiradas da garrafa com 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco), lavadas duas vezes com PBS (Phosphate buffer saline) e centrifugadas a 300 G por 10 minutos. Foram permitidas três passagens para que atingissem um número populacional idealizado.

2. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS

Dos 12 LA com cariótipo normal, as células presentes no fluido foram analisadas por citometria de fluxo, para a investigação da expressão dos anticorpos CD90 conjugado com a fluorescência PE-CY5, CD15 conjugado com a fluorescência PE, CD45 conjugado com a fluorescência PERCP e CD34 conjugado com a fluorescência PE.

Citometria de fluxo é um sistema de fluxo hidrodinâmico que intercepta as partículas suspensas no fluido com um laser gerado por um sistema de iluminação. A interceptação do laser na partícula promove um desvio da luz e a emissão de uma fluorescência, estas informações são coletadas pelo sistema óptico e eletrônico, que traduz os sinais luminosos em informações armazenadas no sistema de controle e arquivo de dados.

Após a aquisição dos dados, foi possível realizar análises gráficas dos resultados, utilizando o programa FACS – CellQuest. A intensidade de fluorescência das células positivas foi determinada em relação à intensidade de fluorescência do anticorpo controle não relacionado.

3. DIFERENCIAÇÃO.

Dos 12 LA com cariótipo normais, somente 4 LA chegaram até a fase de expansão das células com três passagens, a quantidade de passagens foi necessária para obtermos o

número desejado de células. Após as três passagens às células foram divididas em gotas de 15µl contendo 5×10^5 células, pipetadas delicadamente em uma placa de cultura de 96 poços com fundo em V *bottom* (figura 1), e levadas à estufa mantida 37°C e 5% de CO₂ por duas horas para serem submetidas à cultura em *micromass*. Durante este tempo as células se aderiram entre si e à placa e então após duas horas o meio pode ser adicionado sem que as células se espalhassem.

O meio para diferenciação continha DMEM com alta glicose (Dulbecco's modified Eagle's medium) (life sciences), 10 ng/ml TGFβ-3 (R&D Systems), 100 nM dexametasona, 1x ITS+1 premix, 40µg/ml de prolina, e 25 µg/ml ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich, Poole, U.K.). As células permaneceram sob a condição de *micromass* por 21 dias.

4. CONFIRMAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DOS CONDRÓCITOS

4.1. qRT-PCR: reação de cadeia da polimerase em tempo real, após transcrição reversa.

Nos 4 LA foi realizado o *micromass* e após 21 dias nesse sistema de cultura, foi realizada a confirmação da diferenciação das células em condrócitos pela técnica de qRT-PCR.

O RNA foi extraído das células diferenciadas de 21 dias de *micromass* com TGF-β3, com Trizol ®(Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies Invitrogen™, Carlsbad, CA92008, EUA) tratado com DNase I (Invitrogen) (Life Technologies Invitrogen™, Carlsbad, CA92008, EUA) para digerir qualquer DNA genômico contaminante e seguida da reação de transcriptase reversa utilizando SuperScriptII (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante para obtenção do ácido desorribonucleico complementar (cDNA).

A PCR quantitativa (PCR em tempo real) foi realizada utilizando SYBR green, em uma máquina de detecção de sequência, Stratagene Mx3000P.

Do cDNA obtido através da transcriptase reversa realizamos a PCR em tempo real que agora recebe o nome de qRT-PCR, utilizamos a técnica para analisar a expressão das sequências gênicas de colágeno tipo II, Agrecano, SOX-9 e o GAPDH foi escolhido como controle endógeno da reação, o qual serve para normalizar a expressão dos genes de interesse nas diferentes amostras.

Esses *primers* foram construídos a partir de bibliotecas genômicas, utilizando o programa Primer ABI expresso (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os *primers* estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - As sequências de *primers* utilizados para qRT-PCR. Sequências de *primers* desenhados utilizando o programa Primer ABI expresso (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Collagen II Forward	GGCAATAGCAGGTTACGTACA
Collagen II Reverse	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
Aggrecan Forward	TCGAGGACAGCGAGGCC
Aggrecan Reverse	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA
GAPDH Forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH Reverse	CCACTTGATTTTGGAGGGATCT

Cada poço da placa da qRT-PCR continha um volume total de 12 µl sendo que 6µl eram da fluorescência do tipo SYBR Green PCR Master Mix, 3µl eram ou da amostra de

LA cultivados com TGF- β 3 durante 21 dias em *micromass* (**A1**) contendo 10 ng de cDNA, ou da amostra de LA em monocamada (**TO**) contendo 10 ng de cDNA, ou da cartilagem humana adulta (**CONDRO**) contendo 10 ng de cDNA e 3 μ l de cada um dos primers para a frente e reverso concentrados a 150 pM, totalizando assim os 12 μ l.

A reação da qRT-PCR foi realizada a 95° C por 10 min (ativação), 45 ciclos de 95 ° C por 15 segundos, 60 ° C por 20 segundos, 72 ° C por 20 seg. (amplificação), e 72 ° C por 1 min (extensão final).

As curvas de dissociação foram obtidas depois da PCR para confirmar a especificidade dos produtos amplificados.

A PCR em tempo real, nos propiciou uma quantificação relativa da expressão dos genes através da comparação da amplificação do RNAm entre os três grupos: 1- **TO** - células do LA sem o tratamento cultivadas em monocamada, 2- **A1**- células do LA submetidas ao sistema de *micromass* com TGF- β 3 cultivadas por 21 dias e 3- **CONDRO** - a cartilagem humana adulta como controle positivo da expressão dos genes investigados, este controle foi importante para termos certeza que os fenótipos gerados se aproximavam da real expressão.

5. WESTERN BLOTTING

Das células tronco presente nos 4 LA submetidos a 21 dias de cultura em *micromass* foram coletados os meios de cultura e deles foram obtidas as proteínas secretadas pelas células. As proteínas foram precipitadas com 2 mg/ml de pepsina (Sigma-AldrichH) e 30 v / v de ácido acético, PA glacial. As amostras foram mantidas a 30°C por 30 min e armazenadas durante a noite a 4°C sob agitação. Em seguida, centrifugadas por 90 min a 6400 RPM, formando um pellet.

Os pellets foram lavados duas vezes com tampão PBS. A proteína foi quantificada utilizando espectrofotômetro (Applied Biosystems). Em seguida, 30 mg de proteína foram colocadas em gel 10% de SDS-PAGE (dodecilsulfato de sódio de poliacrilamida) para eletroforese e posteriormente a proteína no gel foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (Thermo Scientific, USA) utilizando um aparelho trans-blot (Invitrogen).

A membrana foi bloqueada com 5% (v / v) de leite desnatado em PBS contendo 0,1%. Finalmente, a membrana de nitrocelulose foi incubada com um anticorpo primário para colágeno tipo II policlonal (ChemiconH) cuja diluição foi de 1:2000, capaz de reconhecer o telopeptídeos C-terminal do colágeno tipo II humano, que tem um peso molecular de 70 kD. O anticorpo foi lavado três vezes com PBS e, em seguida, incubado com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase contra IgG de coelho. Os sinais foram visualizados usando um kit Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate, contendo: Super Signal® West Pico Stable Peroxide Solution 500ml e Super Signal® West Pico Luminol Enhancer Solution 500ml) Thermo scientific, Pierce Protein Reserch Products.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi construída através do ONE-WAY ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA) utilizando o programa PRISMA. O intervalo de confiança foi de 95%, considerando as múltiplas comparações entre os grupos. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram os valores de p abaixo de 0,05.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS:

Foram coletados e processados 53 líquidos amnióticos dos quais apenas 12 apresentaram cariótipo normal. Desses, somente 4 foram desenvolvidos os *micromass* e submetidos à análise. O líquido amniótico foi coletado de gestantes no 2º trimestre de gestação, com um volume aproximado de 10 a 20 ml. A amostra foi colocada em cultura com até 24 h após a coleta. Nenhuma relação foi encontrada entre a idade gestacional e o número de células. Depois de 7 dias, as células aderentes adquiriram uma morfologia fibroblastóide. (figura 5)

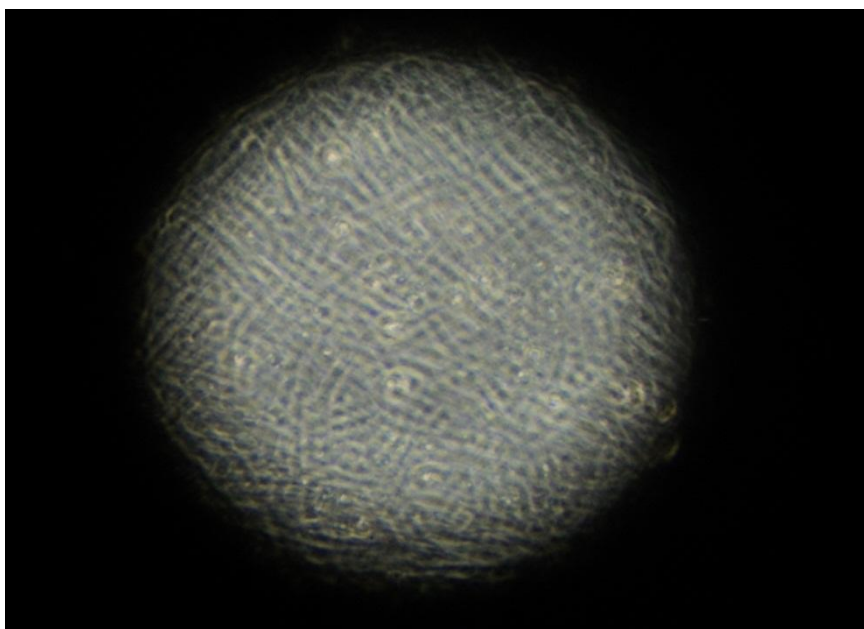
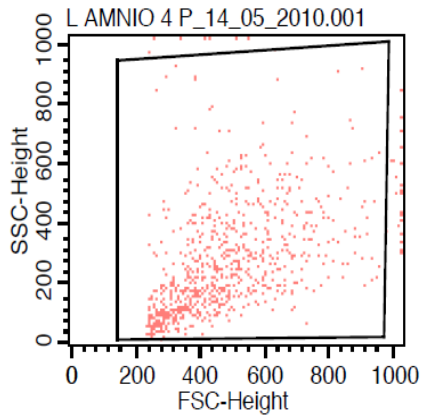


Figura 5. Células de líquido amniótico com 7 dias de cultura

2. CITOMETRIA DE FLUXO.

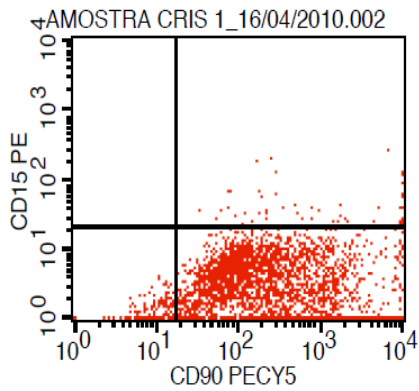
Na caracterização imunofenotípica das células mesenquimais de líquido amniótico após 7 dias de cultura, obtivemos os seguintes resultados: CD90 com 93,39%, CD45 com 7,22%, CD15 com 0%, CD 34 com 0,87% (Figura 6)



Region Statistics

File: L AMNIO 4 P_14_05_2010.001 Sample ID: 01
 Acquisition Date: 14-May-10 Gate: No Gate
 Gated Events: 780 Total Events: 7

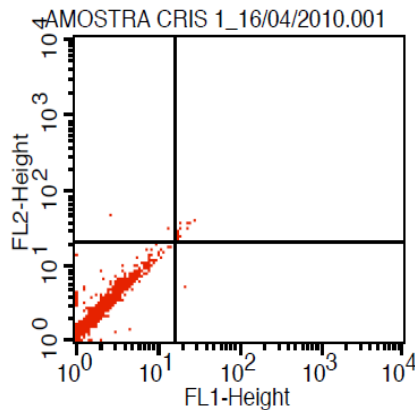
Region	Events	% Gated	% Total
R1	747	95.77	95.77
R2	177	22.69	22.69



Quadrant Statistics

File: AMOSTRA CRIS 1_16/04/2010.002 Sample ID: 1
 Acquisition Date: 16-Apr-10 Gate: G1
 Gated Events: 3027 Total Events: 3060
 Quad Location: 16, 21

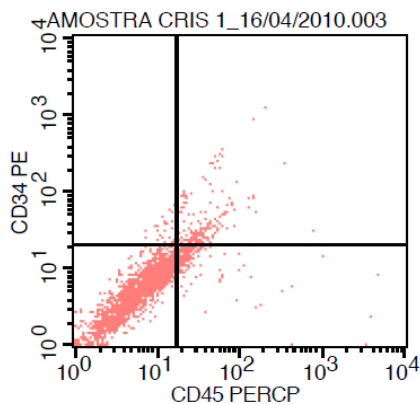
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***
UR	54	1.78	1.76	3566.18	971.43	51.02
LL	146	4.82	4.77	10.20	9.25	1.44
LR	2827	93.39	92.39	936.58	281.66	4.05



Quadrant Statistics

File: AMOSTRA CRIS 1_16/04/2010.001 Sample ID: 1
 Acquisition Date: 16-Apr-10 Gate: G1
 Gated Events: 1038 Total Events:
 Quad Location: 16, 21

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	3	0.29	0.29	10.36	31.84
UR	13	1.25	1.24	20.90	30.93
LL	1021	98.36	97.24	2.52	3.43
LR	1	0.10	0.10	20.91	4.91



Quadrant Statistics

File: AMOSTRA CRIS 1_16/04/2010.003 Sample ID: 1
 Acquisition Date: 16-Apr-10 Gate: No Gate
 Gated Events: 3090 Total Events: 3090
 Quad Location: 16, 21

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean
UL	27	0.87	0.87	12.32	12.03	34.52
UR	170	5.50	5.50	47.98	37.34	72.64
LL	2670	86.41	86.41	6.91	5.81	5.80
LR	223	7.22	7.22	89.07	26.26	13.50

Figura 6. Citometria de fluxo de líquido amniótico humano com 7 dias de cultura

3- DIFERENCIAÇÃO.

Após 21 dias cultura com as células de LA em placas de 96 poços com fundo em Vbottom (figura 7a, b), foi observada a formação de uma estrutura semelhante à cartilagem (figura c). Durante este tempo as células se aderiram entre si e à placa

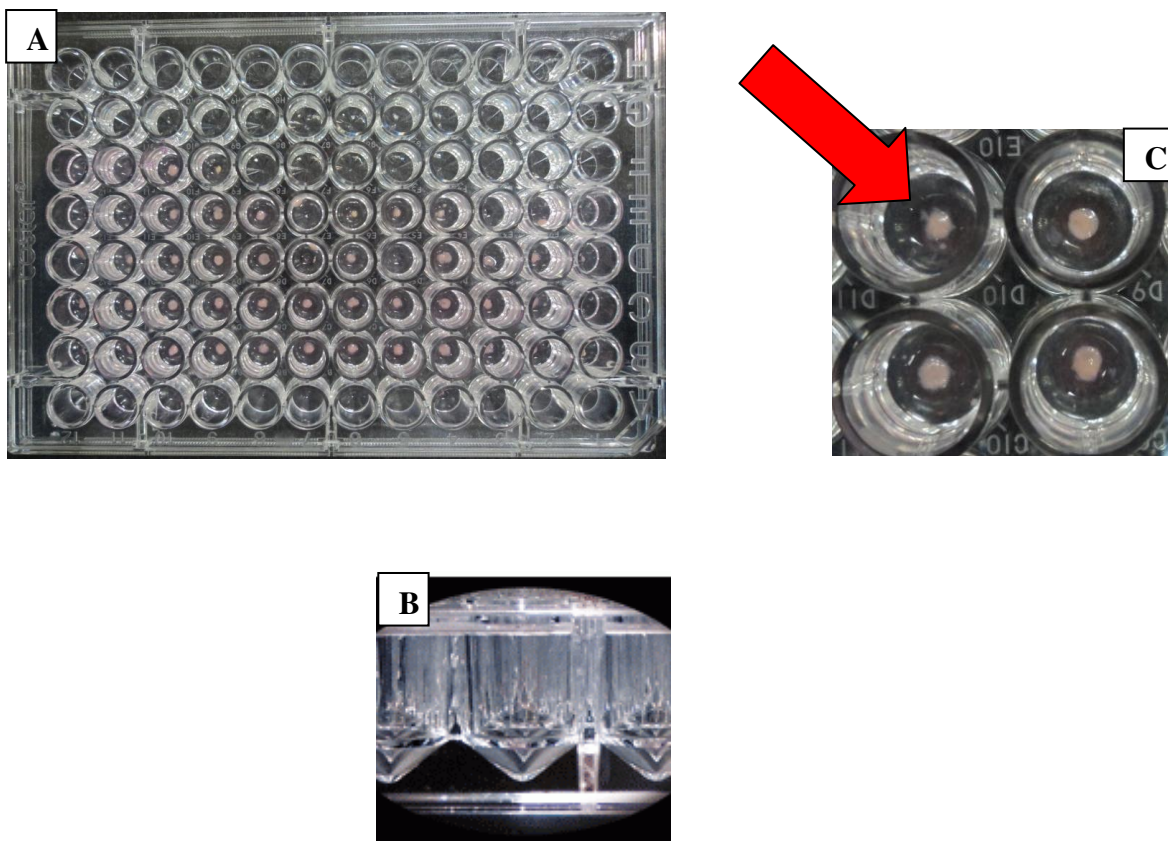


Figura 7A - placa com 96 poços, B- vista inferior da placa mostrando o Vbottom, figura C estrutura semelhante a cartilagem após 21 dias de cultura em sistema *micromass*.

4- RT-PCR EM TEMPO REAL

4. 1. Curva de eficiência dos *primers*

Após a reação de transcriptase reversa, determinamos a concentração ideal de *primers*, e para isto, eles foram diluídos em 100nM, 200 nM, 400nM e 800nM.

Usamos cDNA de condrócitos obtidos de pacientes submetidos à prótese total de joelho para amplificação dos genes investigados como controle positivo para os mesmos.

Obtivemos a amplificação de todos os *primers* com melhor eficiência a 400 nM. Por fim, encontramos a eficiência dos mesmos com 100,1% para Sox-9, 110,2% para colágeno tipo II, 113, 6% para Agrecano, e utilizamos como normalizador com 105,6% o GAPDH (figura 8,9,10,11 respectivamente).

A validação do sistema de genes de interesse/controlado endógeno (GAPDH), para verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes foram realizadas e apresentam-se semelhantes e próximas a 100%.

A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* do gene de interesse, quanto do controle endógeno dos cDNAs em duplicatas de uma amostra escolhida aleatoriamente. Essa etapa foi essencial para que o controle endógeno pudesse ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa dos genes de interesse.

Após o cálculo das eficiências de amplificação do gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual teve por finalidade definir qual foi a amplitude de concentrações para as quais o sistema foi eficiente.

Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y.

Em seguida, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta na qual foi possível verificar o valor da inclinação da mesma.

Com a validação realizada passou-se para a fase de realização dos ensaios de quantificação relativa, utilizando a melhor concentração de cDNA para os primers,

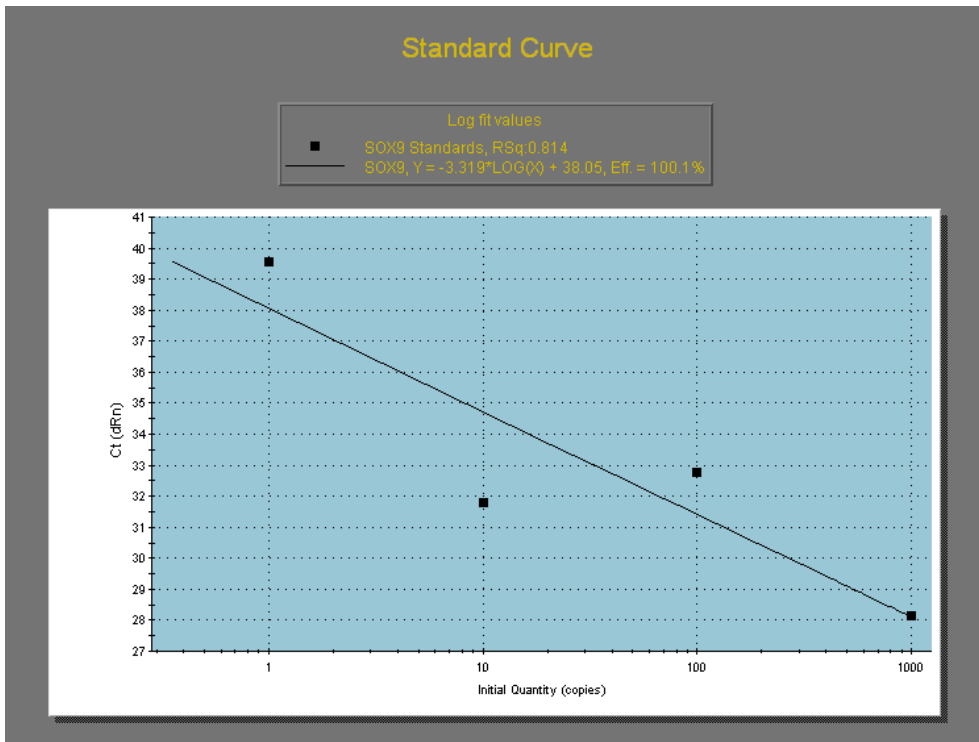


Figura 8. Curva da eficiência do SOX-9

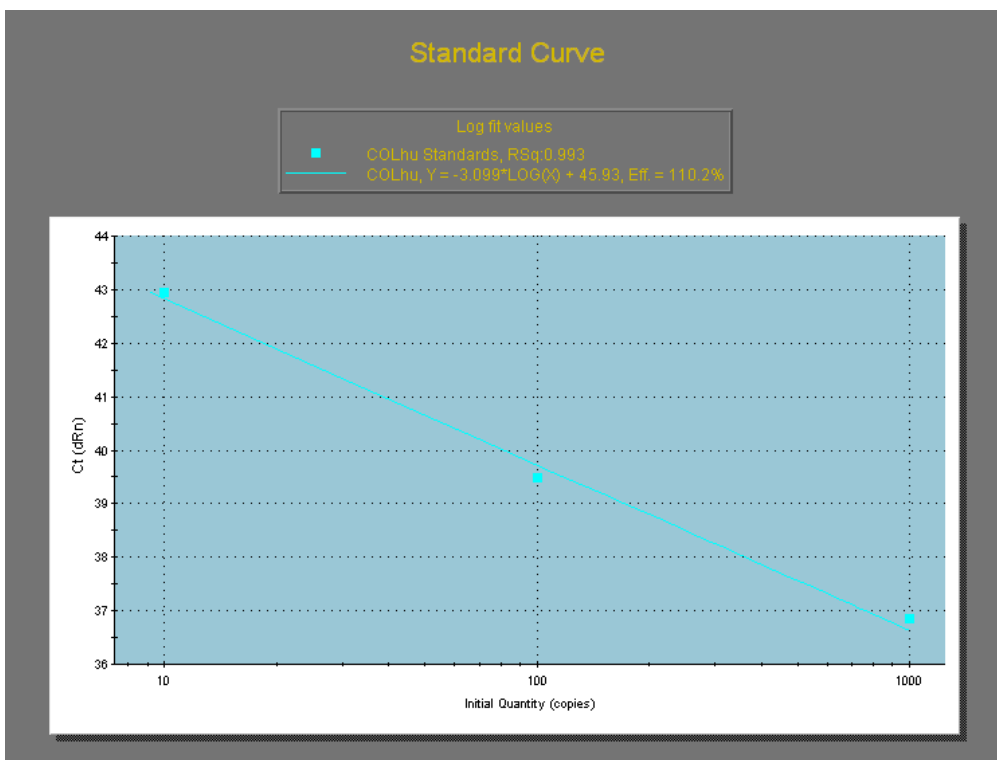


Figura 9. Curva de eficiência do colágeno II

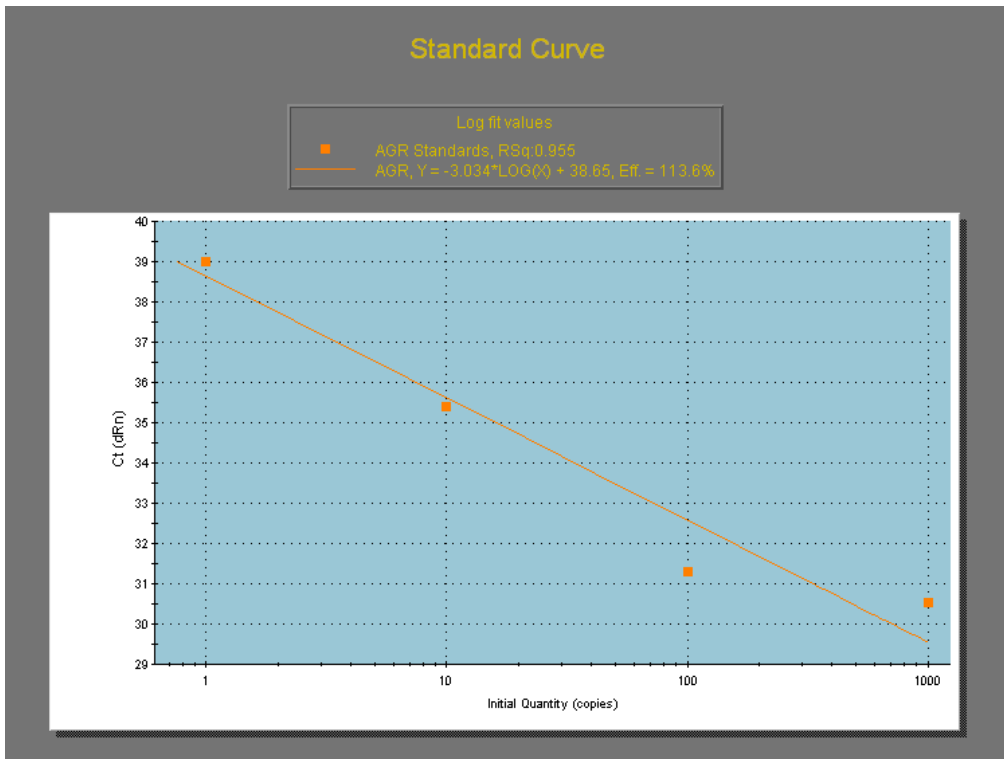


Figura 10. Curva de eficiência do agrecano.

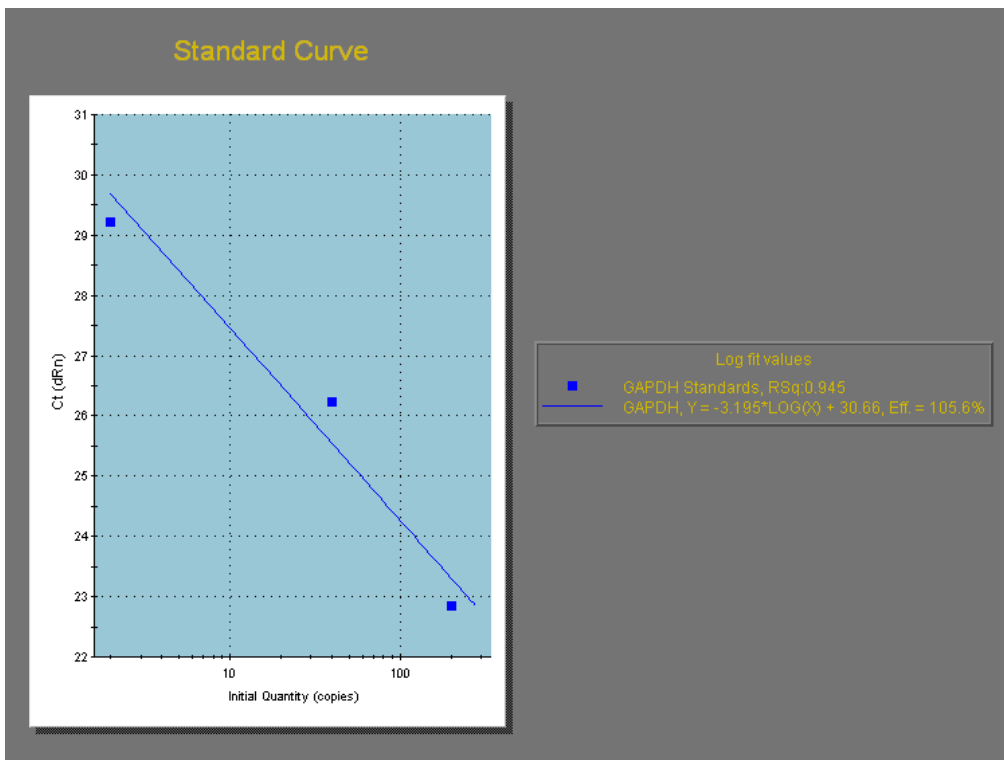


Figura 11. Eficiência do GAPDH

4.2. GRÁFICOS DA RT-PCR EM TEMPO REAL

Após 21 dias sob *micromass*, a expressão de SOX-9 foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) quando comparada ao TO (células-tronco de liquido amniótico em monolayer) e ao CONDRO (condrócitos humanos adultos), utilizados como controle (Figura 7). Já a expressão de colágeno II (figura 8) e agrecano (figura 9) foi maior que o do TO.

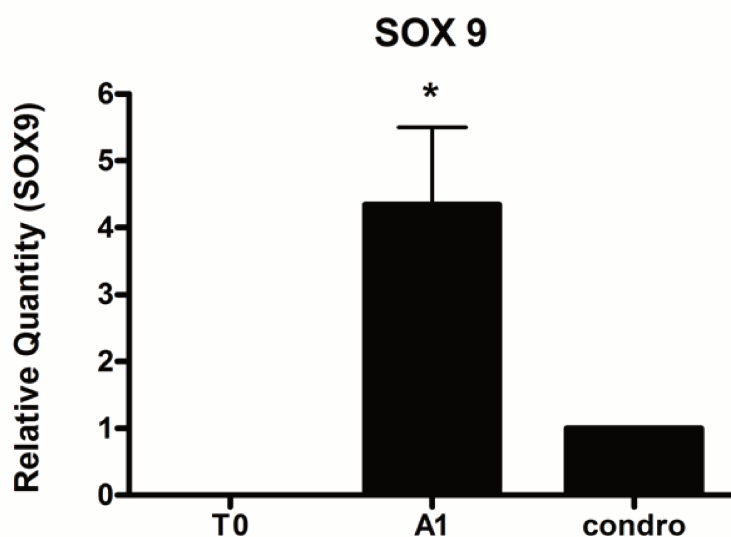


Gráfico 1. Comparação da expressão do SOX-9 em monolayer (T0), micromass (A1) e condrócitos adulto (condro). A expressão do SOX-9 em *micromass* foi significativamente maior do que em monolayer e em condrócitos adulto.

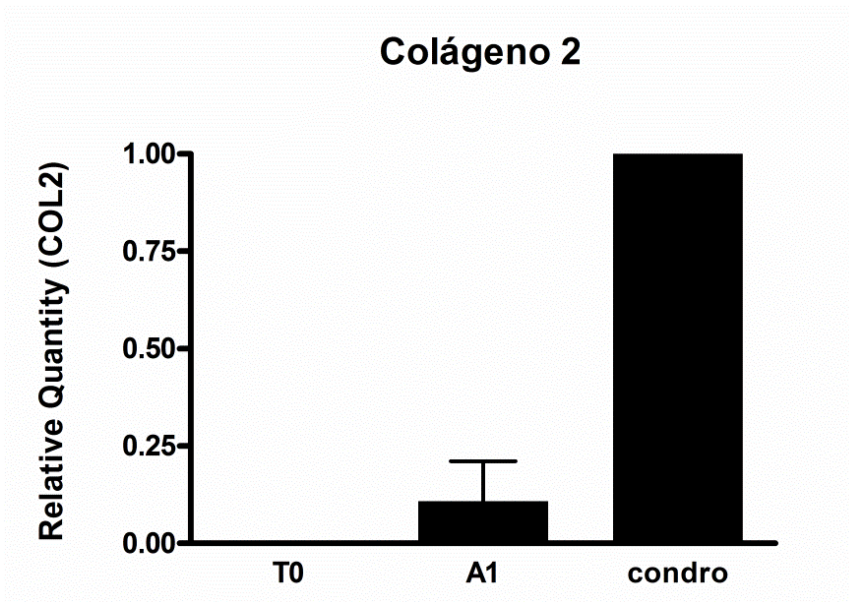


Gráfico 2. Comparação da expressão do colágeno II em monolayer (T0), *micromass* (A1) e condrócitos adulto (condro). A expressão do colágeno II foi maior em *micromass* do que em monolayer.

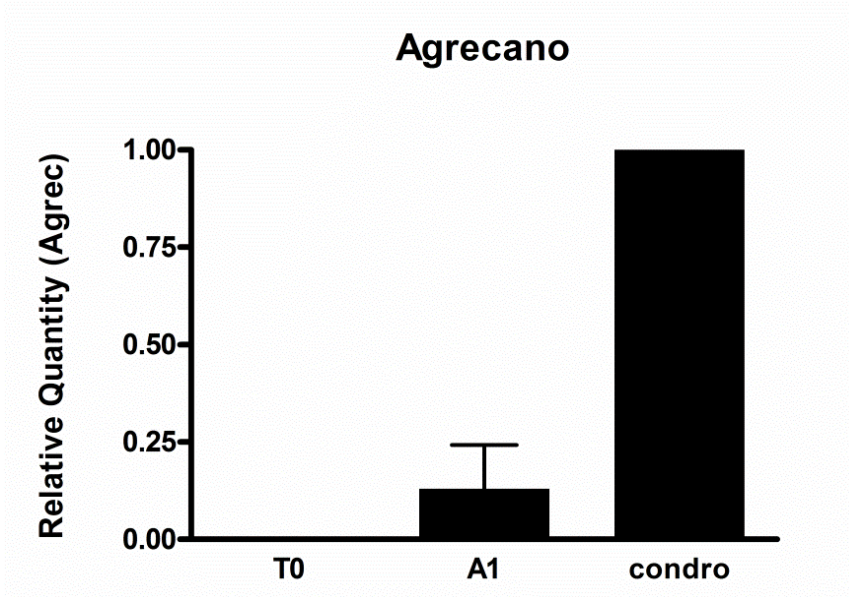


Gráfico 3. Comparação da expressão do agregcano em monolayer (T0), *micromass* (A1) e condrócitos adulto (condro). A expressão do agregcano foi maior em *micromass* do que em monolayer.

5. Western Blotting

Foi verificada a expressão de colágeno tipo II no 21 dia de cultura de *micromass* com TGF- β 3, bem como em cartilagem normal e em células em monolayer. A expressão de colágeno II foi maior em *micromass*, quando comparado em monolayer. (figura 11)

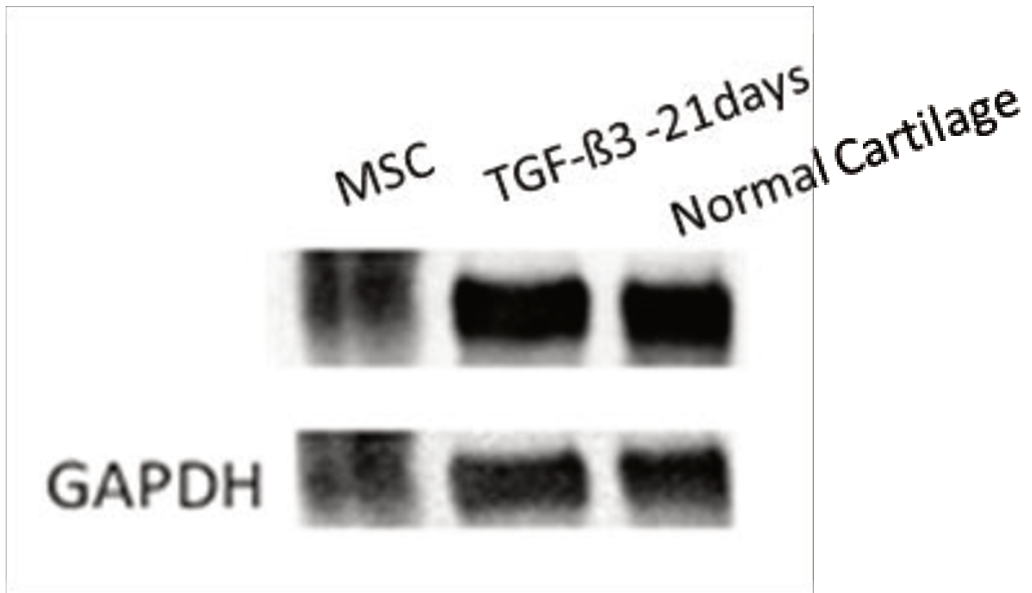


Figura 12. Comparação da expressão do colágeno em monolayer (MSC), *micromass* (TGF- β 3 21 dias) e condrócitos adulto (normal cartilage).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A preocupação em encontrar novas maneiras de reparar a cartilagem articular, incentivou a busca de uma fonte de células-tronco pouco explorada, prontamente disponível, de fácil acesso, e que apresentasse capacidade de se diferenciar em condrócitos.

A fonte de CTM proveniente do líquido amniótico humano (LA) preencheu todos os requisitos propostos e ainda, superou nossas expectativas. O LA vem mostrando-se capaz de auto-renovação elevada, bem como perfil para pluripotência (94).

Células do líquido amniótico são tradicionalmente utilizadas para o diagnóstico pré-natal de uma vasta gama de anomalias cromossômicas (100). Recentemente, as células do líquido amniótico foram descritas como uma fonte de células-tronco mesenquimal que apresenta uma população de células heterogêneas, uma vez que nele encontram-se células do tecido extra-embriônico, tais como células de âmnio, placenta, pele fetal, bem como as provenientes de vias respiratórias, gastrointestinal e urinário.(8) Além disso, num outro estudo, foram encontradas células provenientes da ectoderme, mesoderme e endoderme.

Sabe-se que o âmnio placentário pode ser derivado do epiblasto após oito dias da fertilização, o que justifica sua capacidade de manter as propriedades de células iniciais pluripotentes de maneira semelhante às do epiblasto, por isso, essas células podem servir como uma fonte de células-tronco mesenquimais.

As CTMs do LA foram primeiramente mencionadas como uma nova fonte para terapêutica de transplante em 2003 (9), o que reforça o quão nova é essa fonte e o quão necessário e relevante se torna o aprofundamento no seu estudo. Destaca-se ainda que o LA oferece inúmeras vantagens quando comparado a outras fontes de células perinatais para

uso clínico em terapias fetais e neonatais. A amniocentese tem se tornado um procedimento comum de diagnóstico que pode ser realizado com segurança sob a orientação do ultra-som. A técnica está associada a uma taxa de apenas 0,5% de aborto espontâneo e este dado a torna mais segura do que outros procedimentos invasivos pré-natais (10). Além disso, não há qualquer risco de se obter um adicional de 5 - a 10 ml de líquido amniótico durante sua realização, e essa quantidade é suficiente para a maioria das aplicações na engenharia de tecidos (11, 12). O LA desperta ainda mais o interesse uma vez que se trata de uma fonte pouco investigada, isolada de poucas espécies, incluindo o porco, no qual as células foram cultivadas em camada única (*monolayer*) (91), equinos (101), e humanos no qual as células foram avaliadas quanto ao potencial condrogênico sob a condição de pellet e hidrogel de alginato durante 14 e 21 dias (96) e não no sistema de *micromass* com utilizado no presente estudo.

As células provenientes do LA são capazes de gerar elementos das três camadas germinativas, e esta característica permitiu classificá-las como um estágio intermediário entre embrionária e adulta ou ainda como pluripotentes (94, 102). Além disso, cerca de 90% das células do LA expressam o fator de transcrição Oct-4, conhecido por ser expresso em células embrionárias. Essa versatilidade a torna muito interessante para aplicações clínicas (94). Quando comparadas às células-tronco embrionárias, as células-tronco do líquido amniótico podem ser obtidas sem a destruição de embriões humanos, aliviando assim grande parte da controvérsia ética que ainda existe na comunidade científica (103). Por todas essas razões, esta promissora fonte de CTM foi a escolhida nesse estudo para promover condrogênese.

Para dar início ao processo de diferenciação, primeiramente foi verificado se a célula escolhida era capaz de aderir ao plástico, uma vez que essa é uma das características de célula mesenquimais, e uma das maneiras mais simples e fácil de ser detectada (104). Após a confirmação prosseguimos para próxima fase.

Como próxima etapa, foi expandido o número das mesmas utilizando-se 20% de soro bovino fetal (SBF), pois há relatos de que quando utilizado apenas 10% a célula apresentou características de fibrocartilagem, com expressão de colágeno I e X, além de um processo lento de expansão (105). Por outro lado, há outros trabalhos que utilizaram uma concentração maior de SBF e que obtiveram outro perfil, semelhantemente aos nossos achados. (100, 106).

Como reforço para verificação do perfil mesenquimal, utilizamos também a técnica de citometria de fluxo para avaliarmos os marcadores de superfície como o CD90, que apresentou 93,39% de positividade, além de demonstrar o CD45 com apenas 7,22% o que a classifica como negativas, resultado semelhante aos estudos realizados com células humanas derivadas de LA (89, 94, 107) e este perfil é o mesmo encontrado em célula mesenquimais (108).

Morfologicamente, estas células adquiriram o formato fibroblastóide, também característico de células-tronco mesenquimais, reforçando ainda mais a existência destas células nesse tecido, em concordância com os achados de outros autores (50, 109).

Os resultados aqui observados evidenciaram que as CMLA apresentam um alto potencial proliferativo e uma rápida resposta a estímulos, da mesma forma que outros relataram (90, 106).

Decidimos promover a condrogênese lançando mão da técnica de *micromass*, pois recentemente foi descrita como a mais apropriada (105). Para o seu desenvolvimento utilizou-se uma placa com fundo em “V”, razão pela qual creditamos ter garantido que a expressão do colágeno II, agrecano, e Sox-9 fossem fiéis ao processo que ocorre *in vivo*. Já a escolha de placas com 24 poços, como utilizada por outro, não permitiu a mesma interação célula-célula, visto que os poços são maiores e observaram a presença de colágeno tipo I, indicador de fibrocartilagem, diferentemente do observado no corrente estudo (110).

Foi possível ainda nesse estudo confirmar que as células do LA são capazes de se diferenciar em condrócitos, o que reforça a possibilidade de utilizá-las para a regeneração da cartilagem. Verificou-se que o nosso modelo, utilizando o TGF- β 3, foi eficiente na indução da condrogênese, dado semelhante aos encontrados para outros tipos de fontes estudadas com este estímulo (111, 112). Associamos o TGF- β 3 a dexametasona, mesmo esta não sendo um fator de diferenciação específico, no entanto, várias publicações demonstraram que a dexametasona facilitada a diferenciação condrogênica de células mesenquimais (113) e células progenitoras mesodérmicas (114).

A nossa célula foi capaz de reproduzir fielmente o processo de condrogênese que ocorre *in vivo*, pois a expressão do Sox-9, confirmada pelo qRT-PCR, foi precedida da expressão do colágeno II, e é sabido que este fator de transcrição é fundamental para a

indução da proteína colagênica (115), pois é ativo predominantemente em células mesenquimais em condensações durante o desenvolvimento inicial do esqueleto de embriões (59), dessa forma, o Sox-9 torna-se um indicador de que estamos reproduzindo com segurança o processo condrogênico, diferentemente de outro estudo realizado pelo nosso grupo, onde foi utilizado como fonte as CTMs provenientes de sangue de cordão umbilical, onde verificou-se uma baixa expressão desse fator (116). A detecção deste fator exige uma ótima técnica capaz de promover condrogênese, associada a uma também ótima fonte de célula tronco, e nós conseguimos esta combinação. Entretanto, outro trabalho que avaliou o perfil condrogênico do LA e não verificou a expressão do Sox-9, fato que pode ter ocorrido em razão da técnica escolhida para a diferenciação por aqueles autores ter sido a técnica de diferenciação em *pellet* (96) enquanto no presente estudo utilizou-se a técnica de *micromass*, descrita como mais eficiente na indução de condrogênese (105).

Outro indicador que nossa maneira de diferenciação foi satisfatória, foi o fato da expressão do Sox-9 ter sido significativamente maior nas células em *micromass* do que em cartilagens adultas, situação que já se esperava, pois em células totalmente diferenciadas a expressão desse fator é menor (60).

Nesse estudo foi optado ainda para confirmar a diferenciação das CTMLA em condrócitos por meio da expressão dos genes do colágeno II e do agrecano, além do Sox-9 já comentado. Avaliou-se o nível proteico do colágeno II secretado pelas células recém-diferenciadas numa coleção de meio de cultura proveniente das trocas ao longo dos 21 dias.

A expressão do gene do agrecano, proteoglicano mais frequente na cartilagem humana, embora não seja exclusiva desse tecido, visto também ser encontrada em tendão (117) e placa de crescimento (21), foi positiva em nossas amostras, o mesmo ocorrendo

com o gene do colágeno II e com a sua tradução na proteína correspondente, o que reforçou ainda mais a eficiente condrogênese proposta no corrente estudo.

Em resumo, os achados aqui descritos indicam a possibilidade de realizarmos um salto da pesquisa de base para a pesquisa pré-clínica, abrindo uma nova via de realização de implante de condrócitos para a cartilagem lesionada, utilizando-se como fonte primária de células-tronco mesenquimais aquelas presentes no LA humano, sob a condição de cultivo em sistema de *micromass* associada a um *scaffold*. Nossos resultados sugerem ainda, uma nova possibilidade para investir-se em bancos de líquido amniótico humano procedentes de doações de gestantes.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

É possível concluir-se então, diante desses resultados, que a inédita combinação de *micromass* com células-tronco provenientes no líquido amniótico humano, na presença de TGF- β 3 durante 21 dias foi eficiente na indução de diferenciação condrogênica quanto à expressão dos genes SOX-9, colágeno tipo II e agrecano, além da produção da proteína colágeno do tipo II.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Cohn MJ, Tickle C. Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet.* 1996 Jul;12(7):253-7.
2. Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):429-38.
3. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res.* 2005;64(4):157-65.
4. Bobick BE, Chen FH, Le AM, Tuan RS. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2009 Dec;87(4):351-71.
5. Dexheimer V, Frank S, Richter W. Proliferation as a Requirement for In Vitro Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2012 Feb 15.
6. O'Rahilly R, Gardner E. The timing and sequence of events in the development of the limbs in the human embryo. *Anat Embryol (Berl).* 1975 Nov 6;148(1):1-23.
7. Sledge CB. Structure, development, and function of joints. *Orthop Clin North Am.* 1975 Jul;6(3):619-28.
8. Nakagawa T, Lee SY, Reddi AH. Induction of chondrogenesis from human embryonic stem cells without embryoid body formation by bone morphogenetic protein 7 and transforming growth factor beta1. *Arthritis Rheum.* 2009 Dec;60(12):3686-92.
9. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009 Nov;17(11):1289-97.
10. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007 Dec;213(3):626-34.
11. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP, et al. Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng.* 2006 Oct;12(10):2853-62.
12. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell.* 1995 Feb 10;80(3):371-8.
13. Delise AM, Tuan RS. Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev Dyn.* 2002 Oct;225(2):195-204.
14. Hall BK, Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays.* 2000 Feb;22(2):138-47.
15. Hashimoto J, Ogawa T, Tsubota Y, Miyazaki K. Laminin-5 suppresses chondrogenic differentiation of murine teratocarcinoma cell line ATDC5. *Exp Cell Res.* 2005 Nov 1;310(2):256-69.
16. Roark EF, Greer K. Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev Dyn.* 1994 Jun;200(2):103-16.
17. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:283-323.
18. Takeichi M, Inuzuka H, Shimamura K, Fujimori T, Nagafuchi A. Cadherin subclasses: differential expression and their roles in neural morphogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1990;55:319-25.
19. Oberlender SA, Tuan RS. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development.* 1994 Jan;120(1):177-87.

20. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*. 1987 May 15;236(4803):799-806.
21. Shum L, Coleman CM, Hatakeyama Y, Tuan RS. Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003 May;69(2):102-22.
22. Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater*. 2006;12:57-63.
23. Halasz K, Kassner A, Morgelin M, Heinegard D. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem*. 2007 Oct 26;282(43):31166-73.
24. Leighton MP, Nundlall S, Starborg T, Meadows RS, Suleman F, Knowles L, et al. Decreased chondrocyte proliferation and dysregulated apoptosis in the cartilage growth plate are key features of a murine model of epiphyseal dysplasia caused by a *matn3* mutation. *Hum Mol Genet*. 2007 Jul 15;16(14):1728-41.
25. Heinegard D. Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol*. 2009 Dec;90(6):575-86.
26. Hunziker EB, Michel M, Studer D. Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. *Microsc Res Tech*. 1997 May 15;37(4):271-84.
27. Lane LB, Villacin A, Bullough PG. The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. *J Bone Joint Surg Br*. 1977 Aug;59(3):272-8.
28. Mason RM, Sweeney C. The relationship between proteoglycan synthesis in Swarm chondrocytes and pathways of cellular energy and UDP-sugar metabolism. *Carbohydr Res*. 1994 Mar 4;255:255-70.
29. Sartori-Cintra AR, Mara CS, Argolo DL, Coimbra IB. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) expression by interleukin-1beta (IL-1 beta), insulin-like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in human osteoarthritic chondrocytes. *Clinics (Sao Paulo)*.67(1):35-40.
30. Mobasher A, Richardson S, Mobasher R, Shakibaei M, Hoyland JA. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol*. 2005 Oct;20(4):1327-38.
31. Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, et al. Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am J Pathol*. 2004 Jan;164(1):185-92.
32. Grimshaw MJ, Mason RM. Modulation of bovine articular chondrocyte gene expression in vitro by oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001 May;9(4):357-64.
33. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum*. 1998 Aug;41(8):1331-42.
34. Shelbourne KD, Jari S, Gray T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: a natural history study. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 2:8-16.
35. Kuettner KE, Cole AA. Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Feb;13(2):93-103.
36. Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater*. 2008;16:26-39.
37. Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int Orthop*. Jun;34(5):621-30.
38. Jackson RW. Arthroscopy Association of North America and Arthroscopy Board of North America. *Arthroscopy*. 1991;7(2):254.

39. Smillie IS. Treatment of osteochondritis dissecans. *J Bone Joint Surg Br.* 1957 May;39-B(2):248-60.
40. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg.* 1959;41-B:618-19.
41. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade.* 1999 Jan;28(1):26-32.
42. Brittberg M, Faxen E, Peterson L. Carbon fiber scaffolds in the treatment of early knee osteoarthritis. A prospective 4-year followup of 37 patients. *Clin Orthop Relat Res.* 1994 Oct(307):155-64.
43. D'Anchise R MN, Prospero E, Bevilacqua C, Gigante A. . Autologous implantation of chondrocytes on a solid collagen scaffold: clinical and histological outcomes after two years of followup. *J Orthop Traumatol.* 2005;6:36–43.
44. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008 Oct-Dec;8(4):303-6.
45. Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol.* 2002 Jul;197(4):419-23.
46. Yamanaka S, Li J, Kania G, Elliott S, Wersto RP, Van Eyk J, et al. Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Tissue Res.* 2008 Jan;331(1):5-22.
47. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Apr;36(4):568-84.
48. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol.* 2009 Feb;218(2):237-45.
49. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 Oct;3(4):393-403.
50. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
51. de Mara CS, Duarte AS, Sartori-Cintra AR, Luzo AC, Saad ST, Coimbra IB. Chondrogenesis from umbilical cord blood cells stimulated with BMP-2 and BMP-6. *Rheumatol Int.* Jan 12.
52. Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(5):815-20.
53. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
54. Wright EM, Snopek B, Koopman P. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res.* 1993 Feb 11;21(3):744.
55. Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J.* 1997 Mar;11(4):227-33.
56. Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrugghe B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn.* 1997 Aug;209(4):377-86.
57. Harley VR, Goodfellow PN. The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol Reprod Dev.* 1994 Oct;39(2):184-93.
58. Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature.* 1990 Apr 26;344(6269):830-6.
59. Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, et al. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet.* 1995 Jan;9(1):15-20.
60. Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, et al. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* 1997 Jun;16(2):174-8.

61. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 2002 Nov 1;16(21):2813-28.
62. Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, et al. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem.* 2000 Apr 14;275(15):10738-44.
63. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):224.
64. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Morphology of the pericellular capsule in articular cartilage revealed by hyaluronidase digestion. *J Ultrastruct Res.* 1985 Apr;91(1):13-23.
65. Eyre DR, Wu JJ, Apone S. A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types. *J Rheumatol.* 1987 May;14 Spec No:25-7.
66. Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol.* 1989 Jan;108(1):191-7.
67. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):247-57.
68. Gustavson KH. The function of hydroxyproline in collagens. *Nature.* 1955 Jan 8;175(4445):70-4.
69. Robertson WV. Metabolism of Collagen in Mammalian Tissues. *Biophys J.* 1964 Jan;4:SUPPL93-114.
70. Pinnell SR. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med.* 1985 Nov-Dec;58(6):553-9.
71. Pereira RM, Delany AM, Canalis E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone.* 2001 May;28(5):484-90.
72. Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 1999 Mar 1;72(3):396-410.
73. Purpura KA, Aubin JE, Zandstra PW. Sustained in vitro expansion of bone progenitors is cell density dependent. *Stem Cells.* 2004;22(1):39-50.
74. Quarto R, Campanile G, Cancedda R, Dozin B. Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(4):989-95.
75. Kato Y, Gospodarowicz D. Stimulation by glucocorticoid of the synthesis of cartilage-matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro. *J Biol Chem.* 1985 Feb 25;260(4):2364-73.
76. Sekiya I, Koopman P, Tsuji K, Mertin S, Harley V, Yamada Y, et al. Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. *J Endocrinol.* 2001 Jun;169(3):573-9.
77. Shintani N, Hunziker EB. Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. *Eur Cell Mater.* 2011;22:302-19; discussion 19-20.
78. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:597-641.
79. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 1992 Dec;119(5):1017-21.
80. Burt DW, Paton IR. Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family. *DNA Cell Biol.* 1992 Sep;11(7):497-510.
81. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 Jun 13;113(6):685-700.

82. Pedrozo HA, Schwartz Z, Robinson M, Gomes R, Dean DD, Bonewald LF, et al. Potential mechanisms for the plasmin-mediated release and activation of latent transforming growth factor-beta1 from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5806-16.
83. Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):14466-73.
84. Chang DJ, Ji C, Kim KK, Casinghino S, McCarthy TL, Centrella M. Reduction in transforming growth factor beta receptor I expression and transcription factor CBFa1 on bone cells by glucocorticoid. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):4892-6.
85. Mello MA, Tuan RS. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1999 May;35(5):262-9.
86. Scharstuhl A, Schewe B, Benz K, Gaissmaier C, Buhring HJ, Stoop R. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem Cells*. 2007 Dec;25(12):3244-51.
87. Weston AD, Rosen V, Chandraratna RA, Underhill TM. Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways. *J Cell Biol*. 2000 Feb 21;148(4):679-90.
88. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod*. 2003 Jul;18(7):1489-93.
89. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1548-9.
90. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004 Dec;18(6):877-91.
91. Chen J, Lu Z, Cheng D, Peng S, Wang H. Isolation and characterization of porcine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *PLoS One*. 2011;6(5):e19964.
92. Lovati AB, Corradetti B, Lange Consiglio A, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, et al. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet Res Commun*. Feb;35(2):103-21.
93. Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Freilinger A, Hengstschlager M. Human amniotic fluid stem cells: a new perspective. *Amino Acids*. 2008 Aug;35(2):291-3.
94. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007 Jan;25(1):100-6.
95. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007 Dec;16(6):931-52.
96. Kolambkar YM, Peister A, Soker S, Atala A, Guldberg RE. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *J Mol Histol*. 2007 Oct;38(5):405-13.
97. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol*. 2007 Oct;75(2):91-6.
98. Luettkett WP. The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos. *Am J Anat*. 1975 Oct;144(2):149-67.
99. Bianchi DW, Wilkins-Haug LE, Enders AC, Hay ED. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet*. 1993 Jun 15;46(5):542-50.

100. Gruber HE, Chow Y, Hoelscher GL, Ingram JA, Zinchenko N, Norton HJ, et al. Micromass culture of human anulus cells: morphology and extracellular matrix production. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010 May 1;35(10):1033-8.
101. Lovati AB, Corradetti B, Lange Consiglio A, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, et al. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet Res Commun*. 2011 Feb;35(2):103-21.
102. Cananzi M, Atala A, De Coppi P. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Reprod Biomed Online*. 2009;18 Suppl 1:17-27.
103. Antonucci I, Stuppia L, Kaneko Y, Yu S, Tajiri N, Bae EC, et al. Amniotic fluid as a rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. *Cell Transplant*. 2011;20(6):789-95.
104. Reed SA, Johnson SE. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol*. 2008 May;215(2):329-36.
105. Zhang L, Su P, Xu C, Yang J, Yu W, Huang D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett*. 2010;32:1339 - 46.
106. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*. 2004 Jun;19(6):1450-6.
107. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2396-402.
108. Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Valli A, Hengstschlager M. Stem cells in amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases. *Stem Cell Rev*. 2007 Dec;3(4):256-64.
109. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Aug;33(8):881-7.
110. Tanaka H, Murphy CL, Murphy C, Kimura M, Kawai S, Polak JM. Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. *J Cell Biochem*. 2004 Oct 15;93(3):454-62.
111. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 2002;20(6):530-41.
112. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, et al. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Feb 17;340(3):944-52.
113. Zimmermann B, Cristea R. Dexamethasone induces chondrogenesis in organoid culture of cell mixtures from mouse embryos. *Anat Embryol (Berl)*. 1993 Jan;187(1):67-73.
114. Poliard A, Nifuji A, Lamblin D, Plee E, Forest C, Kellermann O. Controlled conversion of an immortalized mesodermal progenitor cell towards osteogenic, chondrogenic, or adipogenic pathways. *J Cell Biol*. 1995 Sep;130(6):1461-72.
115. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):2336-46.
116. de Mara CS, Duarte AS, Sartori-Cintra AR, Luzo AC, Saad ST, Coimbra IB. Chondrogenesis from umbilical cord blood cells stimulated with BMP-2 and BMP-6. *Rheumatol Int*. 2010 Jan 12.
117. Vogel KG, Sandy JD, Pogany G, Robbins JR. Aggrecan in bovine tendon. *Matrix Biol*. 1994 Mar;14(2):171-9.