Camila Cohen Kaleka

**ESTUDO DA VIABILIDADE E DA INTERAÇÃO DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CULTIVADAS
COM ÁCIDO HIALURÔNICO EM MEMBRANA DE COLÁGENO**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para a
obtenção do título de Doutora em Ciências
da Saúde.

São Paulo

2021

Camila Cohen Kaleka

**ESTUDO DA VIABILIDADE E DA INTERAÇÃO DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CULTIVADAS
COM ÁCIDO HIALURÔNICO EM MEMBRANA DE COLÁGENO**

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para a
obtenção do título de Doutora em Ciências
da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mário Ferretti Filho
Coorientadora: Dra. Eliane Antonioli

São Paulo
2021

Kaleka, Camila Cohen

Estudo da viabilidade e da interação das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo cultivadas com ácido hialurônico em membrana de colágeno / Camila Cohen Kaleka. -- São Paulo, 2021.
xiv, 61 f., il.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Viability and interaction analyses of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue cultivated with hyaluronic acid on collagen membrane.*

1. Cartilagem articular. 2. Transplante de células-tronco mesenquimais. 3. Ácido hialurônico.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Camila Cohen Kaleka

**ESTUDO DA VIABILIDADE E DA INTERAÇÃO DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CULTIVADAS
COM ÁCIDO HIALURÔNICO EM MEMBRANA DE COLÁGENO**

Presidente da banca: Prof. Dr. Mario Ferretti Filho

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof. Dr. Alessandro Rozim Zorzi

Prof. Dr. Délio Eulálio Martins Filho

Membros suplentes:

Prof. Dr. André Wajnsztein

Prof. Dr. Alberto Pochini

Aprovada em: 01/06/2021.

Dedicatória

Aos amores que trazem luz à minha vida, meus filhos, Pedro e Felipe, a pureza de vocês me transforma a cada dia.

Ao meu marido, Joni, que me acompanha desde os meus 15 anos. Por entender o amor que tenho pela Medicina e me apoiar em cada passo dado, aplaudindo as conquistas e amenizando as dificuldades. Seu olhar de admiração é um presente diário que traz leveza para seguirmos a vida juntos.

Ao meu amado pai, Moisés, por ser desde sempre pura inspiração de vida, pessoal e profissional. Agradeço por conviver diariamente com você, sempre focado em manter os valores mais preciosos da vida: a família, o respeito, a dignidade, a generosidade e o senso de justiça. A sua mente aberta e a sua visão crítica certamente nos fazem enxergar que a dedicação vale a pena.

À minha supermãe, Estelita, um exemplo de dedicação, que nunca mediu esforços para proporcionar o melhor para família. Mulher de garra, companheira, amor que enche e transborda. Sempre com palavras e gestos de incentivo para que eu continuasse a minha jornada que, se dependesse dela, seria sempre mais fácil e vitoriosa.

À minha amada irmã, Carina, exemplo de honestidade e sinceridade, valente e carinhosa, com quem aprendo a buscar equilíbrio para tomar decisões. Orgulho imenso de ver a mulher que se tornou e pela família linda que formou com o Artur, trazendo as fofuras, Mário e Rodrigo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Miguel Cendoroglo, diretor médico e superintendente do Hospital Israelita Albert Einstein, por apoiar e incentivar os trabalhos que são conduzidos na Instituição.

Ao Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo, coordenador do curso de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde da Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, que me ofereceu suporte pessoal e científico quando necessário, sempre preocupado em manter o alto nível do programa de pós-graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Ferretti, doutor em ciências pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), profissional admirável que ajudou a engradecer a Ortopedia e Traumatologia do Hospital Israelita Albert Einstein, apoiando projetos científicos, ensinando e estimulando cada um dos seus alunos a contribuir para o crescimento do grupo.

À minha coorientadora, Dra. Eliane Antonioli, doutora em biologia celular e estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por ter trabalhado comigo neste e em outros projetos, por estar sempre disposta a ajudar, mesmo nos momentos difíceis, pessoais e profissionais, que enfrentou. Agradeço o esforço e a receptividade com que sempre recebeu minhas dúvidas e questionamentos, você foi muito importante para a conclusão deste trabalho.

A toda equipe do laboratório STEMCORP, especialmente, ao Dr. Eder Zucconi, doutor pelo Centro de Pesquisas sobre Genoma Humano e Céulas-Tronco da Universidade de São Paulo, pelo apoio e suporte, e por ter sido incansável em todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas, Dr. Ricardo Marujo e Dr. Gabriel Marujo, cirurgiões plásticos do corpo clínico do Hospital Israelita Albert Einstein, por terem aceitado coletar o material necessário de suas pacientes para que este estudo fosse realizado.

Ao grande amigo e parceiro, Prof. Dr. Pedro Debieux Vargas Silva, pós-doutorando no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP), agradeço pela convivência leve, gentil, pelas inúmeras provas de amizade e pela

colaboração certa na elaboração do artigo. Minha admiração pelo profissional e pessoa que é.

Ao amigo, Dr. Nelson Astur Neto, pós-graduando do curso de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde da Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, pelos conselhos, companheirismo e empenho incansável para finalização desta tese.

A todo o grupo do Instituto Cohen, especialmente ao grupo do Joelho, formado pelo Dr. Moisés Cohen, Dr. Joicemar Amaro, Dr. Diego Astur, Dr. Pedro Debieux, Dr. Gustavo Arliani, Dr. João Novaretti, profissionais de competência ímpar, que muito me inspiram, e nos engradem como equipe.

Ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde da Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, na pessoa da Sra. Laudiceia Almeida, coordenadora administrativa da Pós-Graduação, pela oportunidade de desenvolver este estudo e garantir o êxito do programa, acompanhando com muita paciência todos os alunos, desde a inscrição até a conclusão e a defesa dos trabalhos.

A Sra. Elivane da Silva Victor, coordenadora estatística do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, pela dedicação aos alunos e pelos ensinamentos sempre bem-humorados, facilitando a compreensão da estatística.

A todos da Diretoria de Pesquisa do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa (IIEP) do Hospital Israelita Albert Einstein.

A todos os amigos que fiz durante a Pós-Graduação no Hospital Israelita Albert Einstein.

Aos membros do Grupo do Departamento do Aparelho Locomotor, pelo estímulo em finalizar este trabalho.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo.

“A persistência é o caminho do êxito. O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis”.

José de Alencar (1829-1877)

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	5
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Cartilagem articular	7
2.2 Membrana de colágeno	12
2.3 Terapia celular	14
2.4 Ácido hialurônico	16
3 MÉTODOS	19
3.1 Considerações éticas e cálculo amostral.....	19
3.2 Isolamento das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	19
3.3 Caracterização das células isoladas	20
3.3.1 Imunofenotipagem	21
3.3.2 Ensaio de diferenciação	21
3.4 Ensaio de viabilidade.....	22
3.4.1 Interação célula + ácido hialurônico	22
3.4.2 Interação célula + ácido hialurônico + membrana de colágeno tipo I/III	23
3.5 Estudo de expressão gênica	24
3.5.1 Extração de RNA.....	25
3.6 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Isolamento das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	27
4.2 Caracterização das células isoladas	27
4.2.1 Imunofenotipagem	27
4.2.2 Ensaios de diferenciação.....	29
4.3 Ensaios de viabilidade	31
4.3.1 Interação célula + ácido hialurônico	31

4.3.2 Interação célula + ácido hialurônico + membrana de colágeno I/III.....	41
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	55
7 REFERÊNCIAS	56
Abstract	
Bibliografia consultada	

Lista de figuras

Figura 1. Graduação das lesões de cartilagem segundo a <i>International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society</i>	10
Figura 2. Algoritmo de tratamento das lesões focais da cartilagem articular do joelho em atletas profissionais de futebol	11
Figura 3. Superfícies da membrana de colágeno porcino I/III Chondro-Gide®	13
Figura 4. Colocação da célula-tronco mesenquimal derivada do tecido adiposo e o ácido hialurônico (cinco tipos) na membrana de colágeno I/III	23
Figura 5. Imunofenotipagem das células aderentes obtidas do tecido adiposo.....	28
Figura 6. Potencial de diferenciação osteogênico das células aderentes isoladas do tecido adiposo	29
Figura 7. Potencial de diferenciação adipogênico das células aderentes isoladas do tecido adiposo	30
Figura 8. Potencial de diferenciação condrogênico das células aderentes isoladas do tecido adiposo	30
Figura 9. Observação das células vivas para cálculo da viabilidade por momento	31
Figura 10. Descrição da porcentagem de células vivas por momento e por material associado	32
Figura 11. Médias e desvios-padrão de porcentagens de células vivas por indivíduo	36
Figura 12. Diferenças dos ácidos em relação ao tampão fosfato-salino.....	39
Figura 13. Porcentagem de células vivas por tratamento em 24 horas	41
Figura 14. Porcentagem de células vivas por tratamento em 48 horas	43
Figura 15. Porcentagem de células vivas por tratamento em 72 horas	44

Lista de tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos diferentes ácidos hialurônicos analisados	23
Tabela 2. Valores médios estimados por material e momento.....	32
Tabela 3. Valores-p para as comparações entre momentos separadamente por material.....	33
Tabela 4. Valores-p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial para a comparação entre materiais	34
Tabela 5. Descrição das médias e desvios-padrão de porcentagens de células vivas por indivíduo	35
Tabela 6. Valores médios estimados e comparações para as médias e desvios-padrão de porcentagens de células vivas.....	38
Tabela 7. Valores estimados e comparações para as diferenças dos ácidos em relação ao tampão fosfato-salino	40
Tabela 8. Porcentagens de células vivas estimadas em 24 horas.....	42
Tabela 9. Comparações múltiplas entre tratamentos em 24 horas	42
Tabela 10. Porcentagens de células vivas estimadas em 48 horas.....	43
Tabela 11. Comparações múltiplas entre tratamentos em 48 horas	44
Tabela 12. Porcentagens de células vivas estimadas em 72 horas.....	45
Tabela 13. Comparações múltiplas entre tratamentos em 72 horas	45
Tabela 14. Descrição do número de células por tratamento	46
Tabela 15. Absorbância após extração de RNA com Trizol durante toda a noite de uma das amostras	47

Lista de abreviaturas

AD-CTM	Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo
AH	Ácido hialurônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD	Cluster de diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPC	Centro de Processamento Celular
CTM	Células-tronco mesenquimais
DMEM-LG	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i> "low glucose"
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EthD	Etídio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
IAC	Implante autólogo de condrócitos
ICRS	<i>International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society</i>
MHC	Complexo de imuno-histocompatibilidade
OA	Osteoartrose
OAT	Transplante osteocondral autólogo (<i>osteocondral autologous transplantation</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
RDC	Resolução da diretoria colegiada
SBF	Soro fetal bovino
SVF	Fração vascular estromal da gordura (<i>stromal vascular fractions</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta

Resumo

Introdução: A definição de um protocolo ideal para cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo para aplicação clínica nas lesões da cartilagem articular é necessário. Sabe-se que o uso de meios de cultivo adequados associados ao uso de membrana de colágeno pode guiar o processo de condrogênese dessas células para posterior implantação no defeito da cartilagem articular. O ácido hialurônico é utilizado em diversos protocolos de terapias celulares por ser conhecido como um excelente veículo de células-tronco mesenquimais pelas suas propriedades físico-químicas e viscosidade, auxiliando no processo de reparação tecidual. No entanto, a análise das características das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo expostas a diferentes tipos de ácidos hialurônicos associados à membrana de colágeno tipo I/III ainda não foi reportada. **Objetivos:** Avaliar *in vitro* a viabilidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de tecido humano em diferentes soluções comerciais de ácido hialurônico antes e após serem semeadas em membrana de colágeno I/III. **Métodos:** Na primeira etapa, as células-tronco foram expostas a sete diferentes produtos comerciais de ácido hialurônico, ao tampão fosfato-salino (grupo controle negativo) e ao meio (soro bovino fetal) por diferentes tempos. Após 24, 48 e 72 horas foi realizada contagem para estimar o número de células vivas e mortas de cada amostra. Para a segunda etapa, foram selecionados os ácidos com maior número de células vivas (cinco tipos), mantidos o meio e o controle e, após a associação com as células foram colocadas na membrana de colágeno I/III. **Resultados:** Os resultados demonstraram uma diferença na viabilidade celular na exposição das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo aos diferentes produtos comerciais de ácidos hialurônicos em comparação com o grupo controle, entretanto, o meio com soro bovino fetal demonstrou a maior porcentagem de células vivas em 24, 48 e 72 horas, antes e depois das células serem dispostas na membrana. **Conclusão:** o ácido hialurônico pode ser um veículo para as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, porém, a associação do ácido hialurônico com as células não demonstrou superioridade quanto à viabilidade celular.

Descritores: Cartilagem articular; Transplante de células-tronco mesenquimais; Ácido hialurônico

1 INTRODUÇÃO

As lesões da cartilagem articular figuram-se entre as doenças musculoesqueléticas mais frequentes e de maior dificuldade de tratamento. A cartilagem articular, um tecido bem organizado e com alta durabilidade, apresenta baixa capacidade intrínseca de cicatrização por sua deficiência de circulação vascular e linfática.⁽¹⁾ Lesões condrais são provocadas por degradação da cartilagem articular, em resposta a estímulos metabólicos, genéticos, vasculares e traumáticos, podendo ocorrer devido a um único episódio de excesso de carga na articulação ou através de vários episódios cíclicos e de pequena magnitude. Lesões traumáticas ou degenerativas resultam na deterioração gradual do tecido condral, levando a limitação funcional da articulação.⁽²⁾

O manejo dos defeitos da cartilagem é desafiador devido à capacidade limitada de reparação do tecido condral. Portanto, várias modalidades de tratamento têm sido usadas para melhorar a cicatrização e promover a regeneração tecidual. As aplicações biológicas têm ganhado mais atenção, gerando alternativas de reparo mais próximas do tecido original.⁽³⁾ Em 1994, Brittberg et al.⁽⁴⁾ introduziram a primeira terapia celular para uso nas lesões condrais do joelho, conhecida como implante autólogo de condrócitos (IAC). Após essa primeira publicação, diversos trabalhos sobre IAC mostraram resultados clínicos e funcionais animadores, a médio e longo prazos, além da parte histológica, uma vez que o tecido de cicatrização da lesão de cartilagem assemelha-se mais ao original.⁽⁵⁻⁷⁾

A técnica de implantação das células nas lesões de cartilagem foi aprimorada com o uso de estruturas tridimensionais de suporte e contenção celular, conhecidas como *scaffolds*, e os resultados clínicos relatados após uma década de seguimento são superiores quando há associação entre essas estruturas e as células.⁽⁸⁾ As células, por sua vez, podem ser originárias de fontes diversas, podem ser derivadas da cartilagem saudável (condrócitos) ou células menos diferenciadas, conhecidas como células-tronco.

A escolha da utilização dos condrócitos como células para preenchimento das lesões da cartilagem é a técnica mais conhecida e utilizada quando se fala em terapia celular para lesões focais, ou seja, que têm um tamanho pré-estabelecido pelos exames de imagem e apresentam bordos de cartilagem viáveis,

pois apresenta vantagens. Trata-se do mesmo tipo celular que se espera formar no local implantado, é uma célula já madura e diferenciada e a técnica apresenta resultados positivos, publicados por inúmeros trabalhos científicos americanos e europeus. Entretanto, além dos resultados de sucesso, o uso dos condrócitos apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de realizar o procedimento em dois estágios (a coleta das células por via artroscópica e a implantação), a desdiferenciação dos condrócitos coletados a um fenótipo semelhante a fibroblastos durante o cultivo, etapa que requer bastante conhecimento no manejo laboratorial dessas células e o alto custo, que inviabiliza o uso em larga escala no nosso meio.⁽³⁾

Mais recentemente, as pesquisas voltaram-se para a busca de diferentes abordagens a fim de superar as limitações do uso dos condrócitos, sendo que o interesse principal era possibilitar o procedimento cirúrgico realizado em um único estágio, facilitando o procedimento e reduzindo os custos. Nessa perspectiva, apareceram trabalhos sobre as células-tronco mesenquimais (CTM) para uso na ortopedia, pois iam de encontro às expectativas pela capacidade de autorrenovação e plasticidade dessas células, que já haviam sido descritas anos atrás, em 1970.⁽⁹⁾ Desde então, só tem crescido o número de estudos clínicos e pré-clínicos com o uso de CTM demonstrando a eficácia e potencial dessas células nas diversas terapias regenerativas.⁽¹⁰⁾

A maior parte dos trabalhos de regeneração da cartilagem usando CTM tem sido com células derivadas da medula óssea. A aspiração da medula óssea, embora dolorosa, é um método estabelecido, utilizado em larga escala na América do Norte.⁽¹¹⁾ No entanto, as células-tronco podem ser derivadas de outras fontes, incluindo as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AD-CTM), músculo, osso esponjoso, sinóvia, periósteo e cordão umbilical.⁽¹²⁾ A escolha para a utilização das CTM depende do conhecimento e da preferência do grupo multidisciplinar envolvido em adquirir e manejar as células.

As células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo são as mais fáceis de serem adquiridas. Estudos *in vitro* demonstraram que essas células apresentam um perfil proliferativo e uma capacidade de diferenciação semelhantes às CTM da medula óssea, com a vantagem de estarem disponíveis em maior concentração, mais de 300 vezes a biodisponibilidade, quando comparadas ao mesmo volume do tecido da medula óssea.^(13,14) As células-tronco derivadas do tecido adiposo têm sido consideradas uma fonte celular ideal pela disponibilidade em adquirir grandes

quantidades, pelas propriedades não imunogênica e anti-inflamatória, e pela disponibilidade ser menos afetada pela idade do indivíduo.⁽¹⁵⁾

Outro ponto a ser considerado é o tipo de lesão de cartilagem que está sendo abordado: focal ou degenerativa, pois a abordagem do tratamento muda. Quando há uma lesão degenerativa, há um intenso processo inflamatório na articulação e as terapias regenerativas buscam controlar ou minimizar esse processo, utilizando injeções articulares de células-tronco, em concentrações e preparações pré-estabelecidas.⁽¹⁵⁾ Por outro lado, quando há uma lesão focal, o objetivo é melhorar o reparo do tecido condral lesado, realizando a implantação das células-tronco ou condrócitos semeadas em matrizes para preenchimento da lesão. As células são cultivadas *in vitro*, em meios nutritivos acrescidos ou não de estímulos exógenos (por exemplo, ácido hialurônico (AH), fatores de crescimento) e, após atingirem a quantidade/concentração desejada, realiza-se a implantação em matrizes tridimensionais. Esses biomateriais, como as membranas de colágeno tipo I/III (Chondro-Gide®; GeistlichPharma), também podem ser utilizados sem as células, em locais em que a terapia celular não está amplamente disponível, como no Brasil, com o objetivo de manter o local da lesão coberto e permitir que as células progenitoras oriundas de perfurações *in situ* promovam o estímulo medular ósseo.⁽¹⁶⁾

Apesar dos resultados promissores com relação ao uso das membranas e das AD-CTM em lesões condrais focais,⁽¹⁷⁾ questões fundamentais ainda persistem e devem ser avaliadas para validar a terapia celular como uma alternativa de tratamento. Dentre elas destacam-se o melhor protocolo para o cultivo de AD-CTM em condições adequadas para aplicação clínica em seres humanos e a via de administração das células no local da lesão.

A possibilidade de formar tecidos mais funcionais após a lesão é o que move a medicina regenerativa, controlando sinais e parâmetros que influenciam o comportamento celular para serem aplicados em estruturas de engenharia de tecidos. A matriz tridimensional conhecida como *scaffold* deve possibilitar a transdução de sinais celulares e permitir a diferenciação e a proliferação de tecidos *in vitro*, que podem melhorar o processo de reparo *in vivo* da cartilagem.^(18,19)

Além disso, o acréscimo de meios exógenos adequados e as membranas de colágeno podem induzir o processo de condrogênese dessas células menos diferenciadas para implantação no defeito condral focal após a preparação.

Dentre as opções de meios para cultivo celular, o AH é uma das opções viáveis; devido às suas propriedades físico-químicas e viscosidade, tem sido considerado candidato como carreador de CTM, objetivando a reparação tecidual.⁽²⁰⁾ Trata-se de um biopolímero formado pelo ácido glucurônico e a N-acetilglicosamina, secretado pelos sinoviócitos no líquido sinovial, de textura viscosa. É um importante glicosaminoglicano presente na articulação por ser a principal estrutura de agregação dos preteoglicanos na cartilagem hialina, entretanto, com o avançar da idade há redução da concentração de AH articular.⁽²¹⁻²³⁾

A utilização de AH comercial como terapia adjuvante para osteoartrose (OA) é aprovada como agente viscoelástico que melhora a lubrificação e a mecânica da articulação do joelho. Apesar da eficácia controversa decorrente dos resultados inconsistentes dos ensaios clínicos, a maioria demonstra um efeito benéfico. Esse efeito persiste após o metabolismo e a eliminação do AH, sugerindo uma ação biológica duradoura e persistente.⁽²³⁾ Uma das variáveis que deve ser considerada para análise dos resultados é a extensa variedade de preparações de AH disponíveis comercialmente, com diferentes características físico-químicas.

A indicação do uso do AH se dá pelos efeitos anti-inflamatório (diminuição da expressão gênica de citocinas, da produção de prostaglandinas e da concentração intra-articular de metaloproteinasas), analgésico (inibição dos nociceptores), estabilização da matriz cartilaginosa, proliferação de condrócitos, aumento da produção de colágeno tipo II e diminuição da sua degradação reportados em diferentes estudos.^(21,24) Entretanto, além do AH ser conhecido pelo uso intra-articular no tratamento da OA, os efeitos condroprotetor e de prevenção da progressão da degeneração articular ainda são controversos.⁽²⁵⁾ Ainda assim, muitos estudos clínicos e pré-clínicos em terapia celular têm sido conduzidos utilizando o AH como veículo⁽²⁶⁾ pela possibilidade de auxiliar a chegada das células à superfície da cartilagem articular.

Baseado nos princípios das células, da matriz tridimensional e do AH acredita-se na interação desses três elementos como forma de aprimorar o processo de reparo da cartilagem. Dessa maneira, este estudo foi conduzido para analisar a viabilidade das AD-CTM quando expostas aos AHs comerciais com diferentes propriedades e, após essa interação, associar esses dois elementos (células e AH) com a membrana de colágeno. Apesar de serem conhecidos o avanço decorrente do uso da membrana no preenchimento das lesões condrais focais e as

propriedades do AH, e os seus efeitos benéficos na articulação, há poucos dados na literatura sobre a resposta das AD-CTM quando em cultivo junto ao AH comercial, bem como se diferentes formulações influenciam na atividade celular e na capacidade de interação com a membrana de colágeno, por essa razão este estudo foi conduzido para compreender como seria a interação de conjunto de células, AH e membrana.

1.1 Objetivos

1. Avaliar *in vitro* a viabilidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano quando em contato com diferentes formulações comerciais de ácidos hialurônicos;
2. Utilizar o ácido hialurônico como veículo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em membrana de colágeno tipo I/III.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado, que viabiliza o movimento entre os segmentos ósseos, praticamente sem fricção nas articulações sujeitas à carga por períodos prolongados. Essa função é dependente dos condrócitos, da matriz extracelular produzida por essas células e de um sistema hidráulico, representado pelo fluido articular, que se move para dentro e para fora da matriz, mantendo-a lubrificada e exercendo pressão hidrostática adequada para suportar as solicitações mecânicas. É um tecido hipocelular, avascular e alinfático formado por uma matriz densa de colágeno tipo II e proteoglicanos que fornecem a superfície de baixa fricção e alta durabilidade. No entanto, a cartilagem articular tem baixo potencial de reparo ou regeneração.^(16,27,28)

A lesão da superfície da cartilagem articular leva a um processo degenerativo, uma das morbidades mais comuns em pessoas acima de 50 anos de idade. Como resultado do melhor entendimento da estrutura e função da cartilagem em condições fisiológicas e fisiopatológicas, novas estratégias para sua manutenção e reparo estão surgindo.

Do ponto de vista socioeconômico, há um aumento progressivo do número de pacientes com lesões degenerativas da cartilagem articular, em parte pelo envelhecimento normal da população, em parte pelo aumento progressivo das atividades esportivas. Como muitos desses pacientes estão em idade de trabalho, isso representa um alto custo para a sociedade, não só com o tratamento da doença, mas também com a perda da produtividade desses indivíduos.⁽²⁹⁾

Embora se conheça relativamente bem a anatomia, a fisiologia e os aspectos biomecânicos envolvidos nas funções articulares e, conseqüentemente, na cartilagem articular, bem como os fatores de risco para o desenvolvimento da OA, não existe até momento um consenso quanto à eficácia dos diversos tratamentos clínicos utilizados para alterar o curso natural da degeneração articular, motivo pelo qual é importante o conhecimento não só da anatomia como também da fisiologia da cartilagem articular como um tecido altamente diferenciado.⁽²⁸⁾

2.1 Cartilagem articular

A cartilagem articular apresenta-se como um tecido consistente, ligeiramente depressível e elástico, de superfície lisa, brilhante, com reflexo branco azulado, no jovem, e branco-amarelado nas pessoas com idade avançada. Na periferia da articulação, a cartilagem se prolonga por uma zona de transição, onde se encontra com a cápsula, com a membrana sinovial e com o periósteo. Em geral, a espessura da cartilagem é bastante variável e depende se está em articulações que suportam maior ou menor carga. Apesar de não conter vasos linfáticos ou nenhuma terminação nervosa, a cartilagem pode ser considerada, na sua intimidade, como uma estrutura altamente complexa, que suporta grandes exigências do ponto de vista funcional.⁽²³⁾

A cartilagem é estruturalmente dividida em quatro zonas principais, cada uma com uma morfologia celular única e disposição das fibras de colágeno do tipo II. A arquitetura tem papel importante no seu funcionamento. O arranjo clássico em zonas compreende a Zona de Deslizamento, a Zona de Transição, a Zona Profunda e a Zona Calcificada. A distribuição do conteúdo da matriz extracelular e a heterogeneidade da morfologia e concentração dos condrócitos dessas camadas fazem desse tecido um dos mais difíceis de ser reparado e reprodutível em engenharia tecidual.^(27,28)

A Zona de Deslizamento consiste em duas camadas: uma denominada de superficial e outra de tangencial. A mais superficial consiste apenas de colágeno, não se encontrando praticamente mucopolissacarídeos nesse local. O colágeno é organizado de forma aleatória em feixes achatados, que correm paralelos à superfície articular. As células, nessa camada tangencial, são pequenas, lembrando fibroblastos no seu longo eixo, paralelos à superfície articular. Devido a esse arranjo do colágeno, a cartilagem nessa região suporta, em geral, muito mais forças de tensão aplicadas paralelas ao seu eixo de movimento do que num plano perpendicular.⁽²³⁾ Quando a cartilagem sofre estresse contínuo, principalmente com movimentos rotatórios associados, mais frequentes nas instabilidades articulares do joelho ou do tornozelo, pode ocorrer ruptura desses feixes de colágeno, iniciando-se, desse modo, um processo de degeneração articular.^(16,30)

Nas outras zonas, os condrócitos mantêm uma forma arredondada característica. A Zona Intermediária ou de Transição é a mais espessa. Nessa região,

as fibras de colágeno são menos organizadas, mas normalmente estão em uma orientação oblíqua em relação à superfície. Na Zona Profunda ou Basal, os condrócitos e as fibras de colágeno são orientados em colunas verticais perpendiculares à superfície. A densidade celular é maior na camada superficial da cartilagem articular e diminui progressivamente através das Zonas Intermediária e Profunda até cerca de um terço da densidade da camada superficial.⁽²³⁾

De certo modo, essa arquitetura explica o porquê quando se aplica uma carga brusca sobre a cartilagem essa carga faz com que a pressão interna suba rapidamente e, à medida que a carga cessa, ocorre uma fase de adaptação e acomodação, provavelmente decorrente de uma nova organização dos líquidos e da água no seu interstício. Ao cessar a carga, a tendência é o retorno da situação de equilíbrio, porém, de forma lenta. Assim, deformações moderadas são reversíveis e não provocam lesão da cartilagem, mas deformações que rompem a trama fibrosa podem acarretar hiper-hidratação dos proteoglicanos, iniciando-se, assim, uma primeira etapa da degradação do tecido cartilaginoso.⁽²⁸⁾

As lesões que acometem a superfície de uma determinada articulação são denominadas lesões condrais ou osteocondrais, de acordo com a sua profundidade, sendo as últimas as que envolvem a cartilagem junto ao osso subcondral adjacente.^(2,31) O dano relacionado à cartilagem articular pode ocorrer tanto de forma crônica, por meio de traumas cíclicos, ou de forma aguda, usualmente após um evento traumático de maior energia.⁽³²⁾ No entanto, a maior parte da literatura foca nas lesões crônicas da cartilagem, uma vez que frequentemente o trauma inicial é subestimado.

Acreditava-se que a OA era uma doença caracterizada pelo desgaste, causada unicamente por forças mecânicas que levariam à degradação da articulação, independente da resposta biológica.⁽³⁰⁾ Entretanto, como em todo tecido vivo, hoje se sabe que a reação da cartilagem articular ao trauma segue uma sequência de eventos que envolve o aumento do conteúdo de água, degradação da matriz por enzimas endógenas, apoptose celular e necrose, seguidas por perda dos seus constituintes para o espaço articular, desencadeando uma resposta inflamatória junto ao tecido sinovial. Essa doença articular, caracterizada por progressiva falência bioquímica da cartilagem hialina, alterações tróficas do osso subcondral e presença de sinovite em grau leve ou moderado⁽³³⁾ é acompanhada por uma tentativa de reparação, na qual se observa aumento da atividade mitótica celular, aumento do número de células e da matriz extracelular, buscando a reparação. Embora os detalhes da

patogênese permaneçam ainda obscuros, essa doença envolve causas multifatoriais que atuam sobre o catabolismo e anabolismo da cartilagem hialina, assim como nos outros tecidos existentes na articulação, como a membrana sinovial, o osso subcondral e até os tendões e ligamentos.⁽³⁰⁾

Até o momento não há tratamento que modifique substancialmente a história natural da OA, a não ser a adoção de condutas sintomáticas que aliviem a dor ou melhorem temporariamente a função articular.⁽³⁴⁾ Por ser um tecido avascular e aneural, o condrócito da cartilagem articular recebe poucas informações por via humoral e imunológica do restante do corpo. Existem evidências muito fortes de que essas células são extremamente sensíveis à pressão ou à deformação e que alterações desse tipo atingem a sua membrana celular e modificam o metabolismo. Assim sendo, a carga e o bombeamento do fluído sinovial e da água no interstício da matriz intercelular parecem ser os principais estímulos para promover alterações bioquímicas na cartilagem e nas suas propriedades biomecânicas.⁽²³⁾

Atualmente, a degeneração articular avançada (OA) acomete aproximadamente 250 milhões de adultos no mundo e é a principal causa de incapacidade na população acima de 50 anos.⁽³⁰⁾ Nos esportistas, a incidência de lesões agudas ou crônicas de cartilagem também está em franca ascendência. A prevalência de defeitos condrais focais no joelho é de 36% entre os atletas comparados a 15% da população.⁽²⁾ De modo geral, o acometimento do joelho é responsável por 46% de todas as lesões que deflagram o fim da carreira de um jogador profissional de futebol e, dentre estas, mais de um quarto estão relacionadas ao comprometimento da cartilagem. Além disso, o risco de desenvolvimento de OA é cerca de 12 vezes maior entre os atletas comparado ao da população em geral.⁽²⁾

Dessa maneira, a lesão aguda, seja osteocondral ou condral, representa uma condição desafiadora pelo potencial de desencadear a degeneração articular precoce, processo de grande relevância clínica por deteriorar progressivamente a cartilagem, principalmente nas grandes articulações, como os joelhos, que atuam no suporte de carga e sob demanda elevada em esportes de alta performance.^(2,35)

A fim de auxiliar no racional do tratamento das lesões focais da cartilagem foi proposto um sistema de classificação pela *International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society* (ICRS)⁽³⁶⁾ baseado na profundidade do acometimento (espessura), subdividido de acordo com a espessura da cartilagem

acometida, desde uma lesão superficial até a lesão que envolve todas as camadas da cartilagem, atingindo o osso subcondral (Figura 1).

ICRS: *International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society*.

Fonte: Adaptado de Dwyer T, Martin CR, Kendra R, Sermer C, Chahal J, Ogilvie-Harris D, et al. Reliability and validity of the arthroscopic international cartilage repair society classification system: correlation with histological assessment of depth. *Arthroscopy*. 2017;33(6):1219–24.⁽³⁶⁾

Figura 1. Graduação das lesões de cartilagem segundo a *International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society*

Historicamente, o tratamento das lesões condrais/osteocondrais, sobretudo na área esportiva, representa um grande desafio, não somente pela pobre capacidade de autorreparo inerente a esse tecido, mas adicionalmente pelas grandes demandas articulares, exigência específica da população mais jovem e atlética.⁽³⁷⁾ Uma abordagem criteriosa e sistematizada faz-se crucial para o êxito terapêutico.⁽³²⁾

Pesquisas continuam sendo realizadas a fim de restabelecer a complexa e altamente especializada estrutura da cartilagem articular normal. Todavia, o desafio consiste em restaurar a natureza específica desse tecido. Podem-se dividir os procedimentos cirúrgicos disponíveis em quatro categorias principais: 1) Paliativos, que incluem desbridamento artroscópico e lavagem da articulação, promovendo alívio dos sintomas, no entanto, com pouca capacidade de regeneração condral;⁽¹⁶⁾ 2) Reparadores, tratamentos que estimulam o sangramento, criando um coágulo de fibrina com posterior transformação para fibrocartilagem, associado ou não à

membrana de colágeno para conter o sangramento;^(17,38) 3) Reconstructivos, que visam restaurar a superfície condral natural, através do enxerto osteocondral autólogo ou alógeno;⁽³⁹⁾ 4) Restauradores, que incluem as terapias celulares (condrócitos ou CTM) associadas aos avanços da engenharia tecidual.^(16,39)

As categorias citadas acima são as opções de tratamento cirúrgico atualmente disponíveis para os estágios mais precoces das lesões de cartilagem, com o objetivo de evitar a degeneração gradual e restaurar a superfície condral.⁽¹⁶⁾ A abordagem a este agravo baseia-se inicialmente na compreensão da “personalidade da lesão”, sumarizada didaticamente em nove variáveis: etiologia, espessura do defeito articular, tamanho da lesão, localização, presença de sinais sugestivos de instabilidade, integridade ligamentar e meniscal, alinhamento geral do membro e particularidades do atleta (Figura 2).⁽⁴⁰⁾

OAT: transplante osteocondral autólogo (*osteochondral autologous transplantation*); MF: microfraturas; IAC: implante autólogo de condrócitos. Sanduíche: técnica que preenche a lesão profunda com enxerto ósseo, seguida da membrana semeada com células na base do defeito e outra membrana na superfície.

Fonte: Traduzido e adaptado de Bekkers JE, de Windt TS, Brittberg M, Saris DB. Cartilage repair in football (soccer) athletes: what evidence leads to which treatment? A critical review of the literature. *Cartilage*. 2012;3(1 Suppl):43S–9S.⁽⁴⁰⁾

Figura 2. Algoritmo de tratamento das lesões focais da cartilagem articular do joelho em atletas profissionais de futebol

Mesmo frente a tantas opções de tratamento, todas as técnicas visam a melhora da função articular, porém, poucas conseguem atingir uma restauração satisfatória da função e da mecânica da cartilagem.

No intuito de melhorar os resultados dos tratamentos da lesão da cartilagem, iniciou-se o uso de células para preenchimento das lesões focais de cartilagem, por volta de 1990, na Suécia, com o uso do IAC, também denominado de transplante autólogo de condrócitos, por alguns autores.⁽⁶⁾ A técnica visa a regeneração da cartilagem hialina lesada, restaurando a biomecânica articular. Atualmente, essa abordagem terapêutica continua sendo amplamente indicada, conforme ilustrado na figura 2, e utilizada em países da Europa e nos Estados Unidos, sendo considerada como uma das melhores opções cirúrgicas para tratamento de pacientes jovens e ativos, entre 15 e 55 anos, com lesões condrais focais sintomáticas e avançadas, com relatos de resultados animadores após seguimento de 10 a 15 anos.^(16,39,41)

Existem três gerações de IAC, sendo a primeira descrita originalmente em 1994 e aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1997.⁽⁴²⁾ Na primeira geração faz-se necessário utilizar um fragmento de periósteo para cobrir a lesão condral. Com essa técnica, em 2003, foram realizados os três primeiros IACs na América Latina, com excelentes resultados após um seguimento mínimo de dois anos.⁽⁴³⁾ Entretanto, algumas barreiras dificultaram o amplo uso dessa técnica, como a necessidade de realizar dois procedimentos cirúrgicos, o seu alto custo e a hipertrofia da membrana do periósteo. A segunda geração de IAC desenvolvida para minimizar os efeitos do uso periósteo utiliza membranas de colágeno I/III de origem animal ou sintética. Recentemente, a terceira geração foi descrita, com os condrócitos semeados diretamente nessa matriz tridimensional para promover o crescimento celular.⁽⁴²⁾

2.2 Membrana de colágeno

As membranas de colágeno foram desenvolvidas com o propósito de melhorar os resultados obtidos com a técnica cirúrgica de microfraturas. A Chondro-Gide[®] é uma membrana de colágeno tipo I/III, de dupla face, desenvolvida especificamente para a regeneração de cartilagem (Figura 3). Fabricada a partir de

colágeno porcino altamente purificado, é produzida na Suíça, seguindo um rigoroso processo de fabricação, assegurando sua segurança e qualidade. A função do Chondro-Gide® é alavancar o potencial de cura do organismo para regenerar a cartilagem humana. Com uma camada superior lisa, e uma camada inferior rugosa, sua estrutura proporciona as condições necessárias para a regeneração da cartilagem.^(8,34,44) A estrutura lisa fica voltada à articulação e visa conter as células, por não ser porosa, e a face rugosa volta-se para o osso, permitindo a permeabilidade celular pelos poros.

A. Superfície superior lisa que funciona como barreira na passagem das células. B. Superfície inferior rugosa onde são colocadas as células.

Figura 3. Superfícies da membrana de colágeno porcino I/III Chondro-Gide®

As membranas são consideradas *scaffolds*, ou seja, estruturas que servem como suporte temporário, não apenas permitindo o suporte do crescimento e a formação do tecido, mas também fornecendo o ambiente biológico necessário para o crescimento celular, a diferenciação e a formação do tecido.⁽⁴⁵⁾ O princípio básico é imitar a estrutura e as funções biológicas da matriz extracelular nativa em termos de composição química e propriedades físicas, fornecendo suporte estrutural e espaço interno para as células incorporadas aderirem, proliferarem e se diferenciarem.^(3,45) Portanto, os requisitos obrigatórios dos *scaffolds* artificiais tridimensionais incluem: alta porosidade, degradação regulada, resistência mecânica e rigidez, e biocompatibilidade. Além disso, a superfície deve exibir propriedades adequadas para ajustar a formação de tecido celular. A porosidade deve permitir a migração e a proliferação de células aderentes junto com nutrientes e produtos residuais.⁽⁴⁶⁾

Esses produtos podem ser naturais ou sintéticos, geralmente fabricados em esponjas, hidrogéis ou nanofibras. Podem incluir colágeno, alginato, gelatina, quitosana, colágeno com glicosaminoglicano, colágeno com hialuronano, ácido poli-L-lático, seda, policaprolactona, ácido poliglicólico com ácido polilático, e biovidro.⁽⁴⁵⁾ Até o momento, no nosso meio, as membranas disponíveis são de origem animal e formadas por colágeno I/III. Os materiais naturais têm vantagens de biocompatibilidade, biodegradabilidade e boa fixação celular. As aplicações envolvem a formação de um tecido reparador, cartilagem tipo hialina e, teoricamente, tecido de cartilagem com colágeno tipo II expresso. Condrócitos autólogos, CTM autólogos, células-tronco alogênicas da medula óssea, sangue total autólogo e condrócitos nasais humanos são os tipos de células que estão sendo usados nessas aplicações por reportarem potencial condrogênico.

2.3 Terapia celular

Todos os procedimentos que envolvem terapia celular envolvem também o desafio de se tornarem viáveis tanto pelos órgãos de regulamentação nacional quanto pelos entraves financeiros decorrentes do seu alto custo. Para isso, uma das alternativas é o uso de células-tronco.⁽¹⁶⁾ As células-tronco adultas podem ser encontradas em diferentes tecidos do corpo e divididas quanto à sua fração hematopoiética ou mesenquimal. Células-tronco hematopoiéticas, comumente encontradas no sangue do cordão umbilical e da medula óssea, já são utilizadas com sucesso em aplicações terapêuticas, principalmente no tratamento de doenças hematológicas, como leucemias e anemias. Já as CTM apresentam algumas vantagens em relação às hematopoiéticas, as quais as tornam boas candidatas para os protocolos em medicina regenerativa, tais como: a) facilidade de isolamento e cultivo;⁽⁴⁷⁾ b) potencial de renovação e diferenciação em vários tipos de tecido, tais como, osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo;⁽⁴⁸⁾ c) efeitos tróficos mediados pela produção de fatores de crescimento e citocinas;⁽⁴⁹⁾ d) efeitos imunomodulatórios;⁽⁵⁰⁾ e) menor custo de obtenção e manuseio laboratorial.

As células-tronco são células indiferenciadas, capazes de se dividir, dando origem a células semelhantes às progenitoras. A nomenclatura dessas células gera certa confusão, tendo sido necessário, em 2019, um posicionamento da

Sociedade Internacional de Células e Terapia Gênica para definir os critérios mínimos das CTM multipotentes como sendo células aderentes ao plástico, que expressam *clusters* de diferenciação (CD) CD73, CD90 e CD105, sem a expressão de marcadores hematopoiéticos e endoteliais CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a e HLA-DR, e capazes de diferenciação *in vitro* em adipócito, linhagens de condrócitos e osteoblastos.^(51,52) Esses marcadores são conhecidos como marcadores mínimos para definir CTM expandidas *in vitro*. No entanto, alguns marcadores ainda são controversos, como a negatividade do marcador CD34, que nem sempre é um critério definitivo para a definição de uma CTM.

Na ausência de marcadores definitivos para CTM, a equivalência *in vivo* de CTM expandidas *in vitro* tem sido muito debatida. Há evidências de que as CTMs compartilham marcadores e funcionalidade com células perivasculares e murais (pericitos e células lisas vasculares).⁽⁵³⁾ Isso levou à hipótese de que as CTM se originam de populações de células perivasculares e migram para as paredes capilares dos tecidos fibrosos circundantes durante os períodos de desenvolvimento e, quando há lesão, contribuem para o processo de reparo.⁽⁵⁴⁾

No ser humano, a medula óssea é a fonte de CTMs mais utilizada. Entretanto, as CTMs têm sido isoladas de diversos órgãos e tecidos, tais como tecido adiposo (AD-CTM),⁽⁵⁵⁾ tecido do cordão umbilical,⁽⁵⁶⁾ polpa dentária,⁽⁵⁷⁾ sangue menstrual, dentre outros. Dentre estas, o tecido adiposo é uma das fontes mais ricas em CTMs. Além disso, o tecido adiposo é de fácil acesso, está presente em grandes quantidades no organismo e pode ser isolado após coleta ambulatorial, com técnicas pouco invasivas (procedimento cirúrgico mais simples, menor morbidade e mais seguro).⁽⁵⁸⁾ Quando comparado com a medula óssea, um grama de tecido adiposo tem 500 vezes mais CTM do que um grama daquele aspirado da medula óssea.⁽⁵⁹⁾ Este alto rendimento de isolamento de CTM é essencial para procedimentos de terapia celular e engenharia de tecidos, tornando esta fonte uma ótima candidata para este fim.

Estudos demonstraram que células mesenquimais do tecido adiposo apresentam potencial de diferenciação condrogênica, sendo uma excelente alternativa para o reparo de lesão de cartilagem.⁽⁶⁰⁾ Em contrapartida, diferentemente do IAC, o uso de células mesenquimais dispensa a necessidade de realizar um procedimento ortopédico para a realização da coleta de material cartilaginoso previamente ao tratamento cirúrgico definitivo. A técnica de transplante de célula-tronco para preencher

um defeito condral focal do joelho foi publicada primeiramente em 2011, caracterizando um procedimento em tempo único, com melhora significativa dos escores funcionais e de dor, após dois anos, sem nenhuma complicação ou reação adversa.⁽¹¹⁾

Um dos problemas que se enfrenta na terapia celular é encontrar o veículo ideal para as células manterem a viabilidade para o estímulo cicatricial no local da lesão. O AH é um elemento presente no líquido sinovial e na cartilagem. O peso molecular do líquido sinovial normal varia entre três e quatro MDa, elasticidade de 117Pa em 2,5Hz e viscosidade de 45Pa em 2,5Hz.^(21,22) No joelho com OA, o líquido sinovial torna-se menos viscoso e a concentração e o peso molecular do AH são reduzidos, o que altera suas propriedades, diminui a capacidade de absorção de choque e lubrificação, e leva ao dano da cartilagem, com aparecimento ou aumento dos sintomas.⁽³⁰⁾

2.4 Ácido hialurônico

O AH é um grande polissacarídeo, composto por repetições de um dissacarídeo de N-acetilglucosamina e ácido glucurônico. Nas articulações humanas saudáveis o peso molecular do AH é de 6000kDa, enquanto no joelho com OA o peso molecular decai entre 500-3000kDa.⁽⁶¹⁻⁶³⁾ O AH normalmente é secretado no líquido sinovial pelos sinoviócitos e é a estrutura principal dos proteoglicanos agregadores na cartilagem hialina. A ciência básica indica um papel biológico para o AH no metabolismo das articulações. O AH se liga ao CD44, um receptor de superfície celular presente em um grande número de células, estimulando os sinoviócitos a aumentar sua secreção de AH. Estudos demonstram taxas aumentadas de proliferação em condrócitos isolados ligados ao CD44, bem como indução de fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Em um modelo de coelho de OA, o AH diminuiu a inflamação conforme medido pela produção de óxido nítrico em sinoviócitos e fibroblastos meniscais, reduziu a apoptose de condrócitos articulares e teve um efeito condroprotetor na prevenção da degradação da cartilagem.⁽⁶⁴⁾

Outro estudo realizado em modelos de OA de coelhos utilizou dois tipos de AH com semelhante peso molecular, mas diferentes percentuais de concentração. Os dois tipos de AH apresentavam características físico-químicas diferentes e essas diferenças resultaram em comportamento *in vivo* diferente. Como

consequência, nem todos os AH com peso molecular semelhante podem ser considerados como equivalentes.⁽⁶⁵⁾

Em geral, porém, muito menos se conhece sobre os efeitos biológicos do AH em condrócitos, e nenhuma evidência sugere um efeito condroprotetor em humanos. Consequentemente, pesquisas básicas e clínicas substanciais são necessárias para compreender os mecanismos pelos quais o AH pode regular o metabolismo da cartilagem e fornecer um efeito condroprotetor.

O papel do AH como uma terapia eficaz para OA é controverso por causa dos resultados inconsistentes dos ensaios clínicos, embora a maioria dos ensaios clínicos demonstre um efeito benéfico na redução da dor e na melhora da mobilidade. Este efeito persiste após o metabolismo e a eliminação do AH injetado, sugerindo um efeito duradouro e persistente. O AH sintético está aprovado para o manejo da OA por suas propriedades como agente viscoelástico que melhora a lubrificação e a mecânica da articulação do joelho, e pelo efeito no macro e microambiente articular, alterando a resposta e o comportamento celular.⁽⁶⁶⁾

Diversas formulações contendo AH estão disponíveis para utilização da OA de joelhos. Os produtos divergem entre si por apresentar diferenças em características consideradas essenciais no êxito do tratamento clínico, como a origem (aviária ou fermentação bacteriana), o peso molecular, a quantidade e a concentração da substância por dose, além do número de aplicações no transcorrer do planejamento terapêutico proposto. O benefício consequente de sua utilização no manejo da artrose está vinculado ao tempo de permanência em ambiente articular, motivo pelo qual algumas formulações incorporam alterações em suas propriedades químicas e otimização nas ligações cruzadas (*crosslink*) no intuito de aumentar as propriedades viscoelásticas e a resistência, e reduzir a taxa de degradação, ao passo que o AH não modificado molecularmente sofre rápida degradação enzimática e oxidativa.⁽⁶⁷⁾

Entretanto, trata-se de um polímero biodegradável que pode atuar como suporte celular, além de possuir importantes funções biológicas, como a regulação da adesão, mobilidade, diferenciação e proliferação celular. Essas características, aliadas à sua baixa imunogenicidade, tornam o AH um biomaterial promissor para uso em engenharia de tecidos. Os géis de AH, assim como os substratos dele derivados, têm sido testados para o cultivo de condrócitos e produção de tecido cartilaginoso.⁽⁶⁸⁾

Estudo em experimentação animal avaliou a possibilidade de usar células mesenquimais pluripotentes da medula óssea juntamente com substratos de AH bifásico e fosfato tricálcico para o reparo de defeitos osteocondrais, com resultados animadores.⁽⁶⁹⁾ Por outro lado, a importância da interação entre AH e CTM em seu efeito terapêutico é destacada, bem como a produção de AH pelas próprias CTM como parte fundamental de seu mecanismo de ação.⁽⁶⁸⁾ Por fim, deve-se destacar que o AH pode ter um efeito positivo na diferenciação condrogênica das CTM quando utilizado como produto de cultivo das mesmas, porém, pouco se sabe sobre a influência das diferentes formulações comerciais disponíveis nas células mesenquimais provenientes do tecido adiposo humano.

Considerando que o uso de membranas de colágeno foi descrito como elemento-chave para o tratamento de lesão condral em transplante de condrócitos, acreditamos que a combinação do AH e da membrana de colágeno fornecerá substrato para o cultivo das CTM e para aplicação como terapia nas lesões condrais. No presente estudo pretendemos avaliar a viabilidade das células expostas a diferentes compostos comerciais à base de AH para serem um veículo para as CTMs e, posteriormente, analisar a viabilidade da combinação de uma membrana biossintética comercial, à base de colágeno tipo I/III (Chondro-Gide®; Geistlich Biomaterials) e AH como substrato para as CTM.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas e cálculo amostral

Para a realização deste estudo *in vitro*, foram obtidas amostras de tecido adiposo humano para isolamento de CTM (n=5). As mesmas foram coletadas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo doador ou responsável, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) (CAAE 60075616.5.0000.0071).

A seleção de cinco indivíduos para a coleta, entre fevereiro e abril de 2018, foi baseada nos estudos similares da literatura que utilizam entre três e cinco pessoas para realizar as avaliações,⁽²⁷⁾ sem nenhum outro cálculo adicional.

3.2 Isolamento das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

Todo o procedimento de coleta de material biológico, isolamento e manipulação das células *in vitro* foi realizado em parceria com a empresa StemCorp Serviços Biomédicos Ltda, licenciada pela vigilância sanitária como Centro de Processamento Celular (CPC), segundo os critérios da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.214, de 7 de fevereiro de 2018, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A coleta do tecido adiposo foi realizada por uma equipe de cirurgia plástica, no centro cirúrgico do HIAE, de cinco pacientes submetidos à cirurgia de lipoaspiração. Com a ajuda de uma cânula acoplada a uma seringa estéril foi coletado um volume entre 10mL e 20mL da região subcutânea abdominal de cada paciente. Após a coleta, as amostras foram transferidas para um frasco estéril, contendo 10mL de solução salina PBS 1x pH 7,4 (PBS – *phosphate-buffered saline*), contendo 200U/mL de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina, 0,5µg/mL de anfotericina e 50µg/mL de gentamicina (Gibco), fornecido no kit de coleta da empresa StemCorp®. Por fim, as amostras foram transferidas para uma caixa térmica, com monitoramento de temperatura (4 a 8°C), e transportadas até o laboratório da StemCorp® para isolamento das células.

Células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo foram isoladas, utilizando-se os métodos previamente descritos por Vieira et al.⁽⁷⁰⁾ Resumidamente, as amostras de tecido adiposo foram lavadas em PBS 1X contendo 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 0,25µg de anfotericina (Gibco). Em seguida, a amostra foi dissociada com 0,075% de colagenase (Sigma), a 37°C, por 30 minutos. Após essa etapa, o infranadante foi centrifugado a 300xg, durante cinco minutos e o *pellet* de células formado foi semeado em frascos de cultivo, respeitando a proporção de 3000-5000 células por cm².

Para o cultivo das células *in vitro* foi utilizado o meio de proliferação Dulbecco's *Modified Eagle Medium* "low glucose" (DMEM-LG) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco), 100U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina e 0,25µg/mL anfotericina (Gibco). As trocas de meio de proliferação foram realizadas cada três a quatro dias. Cada linhagem foi mantida em incubadora, a 37°C, em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ até atingirem confluência de 80%. Neste ponto, foi realizada uma passagem das células para novos frascos de cultivo, na proporção de área 1:3, utilizando o reagente TrypLE (Gibco). Esse procedimento foi repetido até atingir quantidades de células suficientes para a realização dos experimentos descritos adiante.

Parte das células, durante o procedimento de multiplicação celular, foi estocada em nitrogênio líquido, na passagem dois, caso fosse necessária a repetição de algum experimento. Para o procedimento de criopreservação, as células foram descoladas dos frascos de cultivo, utilizando-se TrypLE (Gibco), centrifugadas e ressuspensas em meio de congelamento StemPro (Gibco), contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). O congelamento das células foi realizado de maneira gradual, em criotubos de 2mL, utilizando-se o equipamento Freeze Control (CryoLogic) e, em seguida, transferidos para o tanque de nitrogênio líquido.

3.3 Caracterização das células isoladas

Para a definição da origem mesenquimal das células isoladas do tecido adiposo foram realizados os ensaios de caracterização: imunofenotipagem e caracterização.

3.3.1 Imunofenotipagem

Para a realização do teste de imunofenotipagem as células foram cultivadas até a passagem oito, descoladas dos frascos de cultivo, utilizando-se TrypLE (Gibco), e centrifugadas 280xg, por cinco minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células foram homogeneizadas e ressuspensas em PBS 1X.

As células foram, então, marcadas com anticorpos monoclonais: CD29-PerCP-Cy5, CD31-PE, CD45-FITC, CD73-PE, CD90-PE, CD105-PE, HLA-ABC-FITC, HLA-DR-PE (BD Biosciences), segundo recomendações do fabricante. Como controle negativo utilizamos células que não foram incubadas com anticorpos.

Para a marcação, as células foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos, na ausência de luz, à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi lavado com PBS 1X e centrifugado a 500xg, por cinco minutos, e ressuspenso em 200µL de PBS. A leitura das amostras foi realizada no laboratório clínico do HIAE, utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences), no qual foram adquiridos, pelo menos, 10.000 eventos por tubo. A análise foi realizada utilizando-se o *software* Kaluza (BeckmanCoulter Life Sciences).

3.3.2 Ensaio de diferenciação

Para confirmar se as células isoladas do tecido adiposo eram células estromais mesenquimais, ou seja, se tinham o potencial de dar origem a tipos celulares originários do mesoderma, as mesmas foram expandidas até a passagem nove e induzidas a diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos. Assim, as células foram cultivadas com meios específicos para a diferenciação: Stem Pro Adipogenesis – A10070-01, Stem Pro Chondrogenesis – A10071-01 e Osteogenesis Differentiation – A10072-01, kit Gibco/Life Technologies, seguindo-se as recomendações do fornecedor. Após esse período, as células foram coradas com Oil Red O (Sigma), Azul de Toluidina (Sigma) ou Alizarin Red S (Sigma) para confirmar os potenciais adipogênico, condrogênico e osteogênico, respectivamente. Amostras-controle, não induzidas, foram mantidas em meio de proliferação durante todo o ensaio.

3.4 Ensaio de viabilidade

3.4.1 Interação célula + ácido hialurônico

Linhagens de AD-CTM (n=5), na passagem seis, foram descoladas dos frascos de cultivo utilizando-se TrypLE (Gibco) e centrifugadas a 300xg, por cinco minutos. Ao final do processo, as células foram contadas na câmara de Neubauer e, de acordo com os valores encontrados, 3×10^5 células foram separadas e adicionadas em microtubos de 1,5mL cada. Depois, as células foram centrifugadas novamente a 300xg, por cinco minutos, e ressuspensas em 20µL de cada tipo de AH (Tabela 1) ou PBS 1X pH 7,4 ou meio de proliferação (SBF). Dessa maneira, foram estabelecidos nove grupos: AD-CTM com sete tipos comerciais diferentes de AH, CTM com PBS (controle negativo), AD-CTM com SBF.

Os produtos comerciais de AH pré-selecionados estavam armazenados no laboratório e foram retirados das embalagens para uso exclusivo no estudo. Apenas um biólogo, o que abriu as caixas, sabia o nome do produto a que se referiam cada identificação numérica, por sua vez, numeradas aleatoriamente. Não foi o mesmo biólogo que realizou os experimentos na bancada e tampouco a contagem das células.

Para a realização do ensaio de viabilidade, utilizamos o kit Live/Dead (Thermo), composto de dois corantes fluorescentes que marcam as células mortas em vermelho (homodímero-1 de etídio [EthD]) e as células vivas em verde (calceína-AM). Para o preparo do corante diluímos 1µL de calceína 4mM e 4µL de EthD 2mM em 995µL de PBS 1X pH 7,4. Na avaliação da viabilidade, as células foram incubadas em temperatura ambiente com os AHs, e as medidas foram realizadas no tempo zero e após 24, 48 e 72 horas de incubação das células. Para a leitura da viabilidade, utilizamos o equipamento Countess II FL (Thermo). Ao todo foram realizadas três leituras de cada tratamento (triplicata técnica), de cada amostra. Para as leituras foram utilizados 5µL da amostra com 5µL do corante preparado.

A contagem das células foi feita de modo manual, utilizando-se o *software* Image J, versão 1.8.0_172, disponível gratuitamente, no qual o número de células verdes (vivas) e vermelhas (mortas) foi contado e tabulado em uma planilha Excel para análise estatística.

Toda a parte experimental foi realizada em teste cego e cada AH recebeu uma numeração (Tabela 1). Ao final das análises, os nomes comerciais dos AHs foram revelados para fins comparativos.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos diferentes ácidos hialurônicos analisados

Produto	Molécula	Concentração	Peso molecular (MDa)	Elasticidade (Pa 2,5Hz)	Viscosidade (Pa 2,5Hz)	Fonte	Molécula crosslink
Opus Joint®	Hialuronato sódio	1,5%	5,4	145	100	Bacteriana	Não
SupraHyal® Duo	Hialuronato sódio	1%	0,75	1,2		Bacteriana	Não
Fermathron®	Hialuronato sódio	1%	1,19-2,03	0,84		Bacteriana	Não
Orthovisc®	Hialuronato sódio	1,5%	1-2,9	60	46	Bacteriana	Não
Synolis VA®	Hialuronato sódio + Sorbitol	2% + 4%	2	329	143	Bacteriana	Não
Synvisc®	Hilano GF-20	0,8%	6	111	25	Aviária	Sim
Osteonil®	Hialuronato sódio	1%	1-2	-	210	Bacteriana	Não

Fonte: bula dos produtos.

3.4.2 Interação célula + ácido hialurônico + membrana de colágeno tipo I/III

Para a análise da interação entre as células, o AH e a membrana de colágeno tipo I/III foram selecionados os cinco AHs que apresentaram a melhor taxa de viabilidade no experimento anterior (Figura 4).

AD-CTM: células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.

Figura 4. Colocação da célula-tronco mesenquimal derivada do tecido adiposo e o ácido hialurônico (cinco tipos) na membrana de colágeno I/III

Linhagens de células mesenquimais (n=5) isoladas do tecido adiposo, na passagem sete, foram descoladas dos frascos de cultivo, utilizando-se TrypLE (Gibco), e centrifugadas a 300xg, por cinco minutos. Ao final do processo, as células foram contadas na câmara de Neubauer e 2×10^5 células foram adicionadas em microtubos de 1,5mL, cada. As células, então, foram centrifugadas novamente a 300xg, por cinco minutos, e ressuspensas em 40µL de AHs diferentes (números 1, 2, 4, 5 e 7. Tabela 1) ou PBS 1X pH 7,4, ou SBF. As 200.000 células ressuspensas em 40µL do veículo foram, então, adicionadas a placas de 48 poços contendo no seu interior recortes da membrana de colágeno tipo I/III (Chondro-Gide[®], Geistlich). As células foram incubadas durante uma hora, em atmosfera de 5% CO₂, a 37°C, para aderir na membrana e, em seguida, foi adicionado 400µL de meio de proliferação sem a adição de SBF. Por fim, as células foram incubadas por mais 24, 48 e 72 horas em atmosfera de 5% CO₂, a 37°C, e as leituras de viabilidade, realizadas.

Para a realização do ensaio de viabilidade, utilizamos o kit Live/Dead (Thermo), conforme descrito anteriormente. Nos tempos de análise, as membranas foram lavadas três vezes com PBS 1X pH 7,4 e, em seguida, as células foram descoladas com a ajuda da enzima TrypLE (Thermo). As células soltas foram centrifugadas a 300xg, por cinco minutos, e o pellet ressuspenso em 50µL do corante Live/Dead. Para a leitura da viabilidade, utilizamos o equipamento Countess II FL (Thermo). Ao todo foram realizadas três leituras de cada tratamento (triplicata técnica).

A contagem das células foi feita de modo manual, utilizando-se o *software* Image J, versão 1.8.0_172. O número de células vivas e mortas foi determinado e tabulado em uma planilha Excel para análise estatística.

Toda a parte experimental foi feita em teste cego. Ao final das análises, os nomes comerciais dos AHs foram revelados para fins comparativos.

3.5 Estudo de expressão gênica

Para a análise do possível efeito da interação AH e membrana de colágeno tipo I/III na modulação da expressão gênica das células, as preparações citadas no experimento anterior (célula + AH + membrana) foram mantidas.

As soluções de células e AH (cinco tipos) foram semeadas na membrana de colágeno tipo I/III do experimento anterior por 28 dias, em atmosfera de

5% CO₂, a 37°C. A cada três a quatro dias, o meio de proliferação era trocado. Após os 28 dias em cultura, as células foram submetidas à análise de expressão gênica.

3.5.1 Extração de RNA

No dia 28 de cultivo, as membranas contendo as células foram lavadas três vezes com PBS 1X pH 7,4 e, em seguida, as células foram descoladas com a ajuda da enzima TrypLE (Thermo). As células foram centrifugadas a 300xg, por 5 minutos, e o pellet ressuspense em 1ml de Trizol (Thermo). As amostras, em seguida, foram pipetadas vigorosamente para ajudar na lise das células e, depois, armazenadas no congelador durante a noite inteira. Após descongelar as amostras em gelo, adicionou-se 0,2mL de clorofórmio, com incubação por três minutos, seguido de centrifugação a 12.000g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo e adicionou-se o mesmo volume de solução de etanol a 70% e as soluções foram agitadas vigorosamente. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 15 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 20µL de água.

A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, a partir da absorbância em 260nm. A pureza das amostras foi determinada pela razão entre os valores de absorbância em 260nm e 280nm.

Como a quantidade estimada das células foi baixa, optamos em utilizar protocolos para a extração de pequenas quantidades de RNA, utilizando o glicogênio como carreador. Resumidamente, adicionar 50µL de glicogênio (5mg/mL em 1mL de amostra); depois, adicionar 200µL de clorofórmio e agitar vigorosamente a amostra por 30 segundos; centrifugar a 12.000g, a 4°C, por 15 minutos, separar a fase aquosa em novo tubo e adicionar 500µL de isopropanol gelado; incubar durante a noite, a -20°C; centrifugar por 15 minutos, em temperatura ambiente, na velocidade de 12.000g; descartar o sobrenadante, adicionar 200µL de solução de etanol 70% e centrifugar por 10 minutos. Por fim, descartar o sobrenadante com cuidado e ressuspender em 2µL de água.

Outra opção para realizar a extração do material genético foi precipitar o RNA da amostra com a adição de acetato de sódio. Para isso, para cada 50µL RNA, adicionou-se 5µL de solução de 3M de acetato de sódio e três volumes da

amostra de etanol (100%). A solução foi incubada a noite toda, a -20°C e, depois, centrifugadas a 14.000rpm, por 30 minutos, a -4°C . O sobrenadante foi, então, descartado e adicionou-se 750 μL solução de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 7500rpm, por cinco minutos. Então, o sobrenadante foi descartado e o material ressuspenso em 20 μL de água.

3.6 Análise estatística

Para a comparação entre os momentos e materiais, foram utilizados modelos de equações de estimação generalizada aplicados às porcentagens de células mortas (100 – porcentagem de células vivas) e a distribuição Tweedie utilizada para acomodar a distribuição das porcentagens com menores erros. A porcentagem de células mortas foi escolhida por conta da assimetria observada na amostra, concentração em valores mais próximos de 100%, mas, após a modelagem estatística os valores foram transformados novamente para a porcentagem de células vivas. Os modelos foram aplicados separadamente, por momento, e contemplaram a dependência entre as leituras de um mesmo indivíduo. As comparações múltiplas entre tratamentos foram corrigidas pelo método de Bonferroni sequencial. Os resultados foram apresentados por valores médios estimados de porcentagem de células vivas por tratamento, intervalos de confiança de 95% e valores-p para as comparações. As análises foram realizadas com o auxílio dos pacotes R e SPSS e o nível de significância adotado foi de 5%.

Em abordagem alternativa, os valores médios e desvios-padrão da porcentagem de células vivas por indivíduo foi calculado em cada momento e para cada tratamento. Os tratamentos foram comparados separadamente por momento e considerando-se PBS como controle. Nesta análise os modelos foram similares aos anteriores, também com distribuição Tweedie. Foram calculadas, também, por indivíduo, as diferenças de cada ácido em relação ao PBS. As diferenças foram avaliadas por modelos considerando-se a distribuição normal, separadamente por momento, e tendo como referência o meio. As análises foram realizadas com o auxílio do pacote SPSS e o nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

Alcançamos 100% de sucesso na obtenção de células aderentes nas cinco amostras de tecido coletadas para a realização do estudo *in vitro*. As quantidades de tecido adiposo coletadas para isolamento das células de cada paciente foram: A1 (11,27 gramas); A2 (18,57 gramas); A3 (12,16 gramas); A4 (20,99 gramas); A5 (18,88 gramas). As amostras foram obtidas de pacientes do sexo feminino, com média de idade de 30,2 anos.

As cinco linhagens estabelecidas foram acompanhadas *in vitro* e a morfologia de cada uma delas avaliada com o decorrer das passagens. Todas as linhagens apresentaram morfologia compatível às células mesenquimais (longas e fusiformes, semelhantes a fibroblastos) e adequada taxa de proliferação até as passagens avaliadas. Contudo, para que essas células obtidas fossem classificadas como células mesenquimais, foi realizado um estudo de imunofenotipagem e um ensaio de diferenciação para confirmarmos o perfil mesenquimal das mesmas.

4.2 Caracterização das células isoladas

4.2.1 Imunofenotipagem

Um dos critérios definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cell Therapy*) para a caracterização de células mesenquimais é a realização de um painel de imunofenotipagem, que inclui a expressão de determinados marcadores de superfície celular, incluindo CD105, CD73 e CD90, e a ausência de expressão de marcadores como CD45, CD34, CD19 ou CD79, CD14 ou CD11b e HLA-DR.⁽⁵¹⁾

As cinco linhagens analisadas revelaram-se positivas para os marcadores de aderência CD29 e CD90; positivas para os marcadores mesenquimais CD73 e CD105; negativas para o marcador hematopoiético CD45; negativas para o marcador endotelial CD31; positivas para o marcador de complexo de imuno-

histocompatibilidade (MHC) classe I HLA-ABC e negativas para o marcador de MHC classe II HLA-DR, conforme demonstrado na figura 5. Assim, com estes parâmetros identificados, podemos defini-las como células do tipo mesenquimais.

Figura 5. Imunofenotipagem das células aderentes obtidas do tecido adiposo

Os histogramas em cinza representam a população de células não marcadas com anticorpos (controle negativo). Os histogramas em vermelho representam a população de células marcadas com os respectivos anticorpos descritos em cada linha. Os gráficos mostram o número de células *versus* intensidade de fluorescência. A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem às cinco amostras.

4.2.2 Ensaios de diferenciação

A plasticidade das células aderentes obtidas a partir do tecido adiposo foi avaliada quanto à sua capacidade de gerar pelo menos três linhagens celulares de origem mesodérmica, o que confirma o seu potencial *in vitro* de CTM. Assim, as células foram cultivadas nos meios indutores para os tipos celulares: adipócitos, condrócitos e osteócitos. As induções osteogênica (Figura 6), adipogênica (Figura 7) e condrogênica (Figura 8) foram confirmadas pela presença de depósitos de cálcio, vacúolos lipídicos e pela metacromasia características da matriz extracelular rica em mucopolissacarídeos, respectivamente. Juntos, estes resultados indicam a origem mesenquimal das células aderentes isoladas e o potencial de diferenciação multipotente *in vitro*.⁽⁵¹⁾

Figura 6. Potencial de diferenciação osteogênica das células aderentes isoladas do tecido adiposo

A primeira linha representa as células tratadas com meio de indução osteogênica por 21 dias e, a segunda linha, as células não induzidas à diferenciação (controle negativo). A diferenciação foi confirmada pela presença de depósitos de

cálcio (vermelho escuro) através da coloração com AlizarinRed S, em microscópio óptico com aumento de 400x. A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem às cinco amostras.

Figura 7. Potencial de diferenciação adipogênica das células aderentes isoladas do tecido adiposo

A primeira linha representa as células tratadas com meio de indução adipogênico por 14 dias e, a segunda linha, as células não induzidas à diferenciação (controle negativo). A diferenciação foi confirmada pela presença de gotículas de lipídios citoplasmáticas (vermelho) através da coloração com OilRed O, em microscópio óptico com aumento de 400x. A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem às cinco amostras.

Figura 8. Potencial de diferenciação condrogênica das células aderentes isoladas do tecido adiposo

A primeira linha representa as células tratadas com meio de indução condrogênico por 21 dias e, a segunda linha, as células não induzidas à diferenciação (controle negativo). A diferenciação foi confirmada pelo fenômeno de metacromasia através da coloração com azul de toluidina, que indica a presença de matriz

extracelular rica em mucopolissacarídeos, em microscópio óptico com aumento de 400x. A1, A2, A3, A4 e A5 correspondem às cinco amostras.

4.3 Ensaios de viabilidade

4.3.1 Interação célula + ácido hialurônico

O número de células total por paciente e por tempo avaliado foi variável, de acordo com a quantidade de células por lâmina, e a porcentagem de células vivas (verde) foi contabilizada (Figura 9).

Figura 9. Observação das células vivas para cálculo da viabilidade por momento

Os resultados encontrados no estudo demonstram que houve diferença na viabilidade celular de acordo com o AH utilizado para cultura celular em comparação ao grupo controle (PBS), conforme demonstrado na figura 10.

A porcentagem de células vivas variou entre pouco mais de 40 a 100%. As maiores variações são observadas para AH 5 e o meio. Os maiores valores são observados para PBS.

Figura 10. Descrição da porcentagem de células vivas por momento e por material associado

Ao comparar um mesmo material ao longo do tempo, identificamos evidências de diferença significativa entre (Tabela 2):

- Ácido 1 entre 24 e 48 horas, com valor médio maior em 48 horas ($p=0,038$);
- Ácido 2 entre 24 e 72 horas, com valor médio menor em 72 horas ($p=0,002$).

Tabela 2. Valores médios estimados por material e momento

Material	Momento (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Ácido 1	92,34 (86,78; 95,56)	96,32 (92,67; 98,15) ^a	92,56 (84,32; 96,47)
Ácido 2	94,75 (91,10; 96,90)	94,38 (90,73; 96,60) ¹	92,75 (90,30; 94,59) ^a
Ácido 3	93,69 (91,74; 95,17)	94,09 (90,71; 96,24)	93,59 (90,22; 95,80)
Ácido 4	92,70 (86,35; 96,10)	95,27 (87,10; 98,26)	92,60 (83,62; 96,66)
Ácido 5	96,08 (91,93; 98,09)	95,94 (92,81; 97,70)	85,52 (70,31; 92,94)
Ácido 6	95,40 (87,33; 98,33) ⁴	92,96 (84,02; 96,90)	94,37 (87,95; 97,37)
Ácido 7	95,49 (93,00; 97,09)	92,91 (84,58; 96,74) ⁴	94,03 (91,20; 95,95)
Meio	86,80 (78,73; 91,81) ^{4,6}	86,68 (81,38; 90,47) ^{1,2,4,5}	85,39 (74,88; 91,50)
PBS	96,50 (83,83; 99,24) ⁸	98,06 (95,26; 99,21) ^{2,3,8}	98,28 (94,50; 99,46) ^{2,3,8}

^a: diferença significativa em relação a 24 horas. PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

¹⁻⁸: diferença significativa.

Ao comparar dois materiais em um mesmo momento de tempo, identificamos evidências de diferença significativa (Tabelas 3 e 4).

Em 24 horas entre:

- Ácido 4 e Ácido 6, com valor médio maior para Ácido 6 ($p<0,001$);
- Ácido 4 e Meio, com valor médio maior para Ácido 4 ($p=0,017$);
- Ácido 6 e Meio, com valor médio maior para Ácido 6 ($p<0,001$).

Em 48 horas entre:

- Ácido 1 e Ácido 2, com valor médio maior para Ácido 1 ($p=0,044$);
- Ácido 1 e Meio, com valor médio maior para Ácido 1 ($p=0,001$);
- Ácido 2 e Meio, com valor médio maior para Ácido 2 ($p=0,001$);
- Ácido 2 e PBS, com valor médio maior para PBS ($p=0,012$);
- Ácido 3 e PBS, com valor médio maior para PBS ($p=0,010$);
- Ácido 4 e Ácido 7, com valor médio maior para Ácido 4 ($p<0,001$);
- Ácido 4 e Meio, com valor médio maior para Ácido 4 ($p=0,028$);
- Ácido 5 e Meio, com valor médio maior para Ácido 5 ($p<0,001$).

Em 72 horas entre:

- Ácido 2 e PBS, com valor médio maior para PBS ($p<0,001$);
- Ácido 3 e PBS, com valor médio maior para PBS ($p=0,010$).

Nos 3 momentos entre:

- Meio e PBS em 24, 48 e 72 horas, com valor médio maior para PBS ($p<0,001$).

Tabela 3. Valores-p para as comparações entre momentos separadamente por material

Material	Comparação		
	24h x 48h	24h x 72h	48h x 72h
Ácido1	0,038	0,872	0,095
Ácido2	0,806	0,002	0,191
Ácido3	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido4	0,287	0,959	0,360
Ácido5	0,946	0,125	0,125
Ácido6	0,416	>0,99	>0,99
Ácido7	0,442	0,379	0,691
Meio	>0,99	>0,99	>0,99
PBS	0,986	0,916	0,986

PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

Tabela 4. Valores-p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial para a comparação entre materiais

Comparação	Momento		
	24 horas	48 horas	72 horas
Ácido 1 x Ácido 2	>0,99	0,044	>0,99
Ácido 1 x Ácido 3	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 1 x Ácido 4	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 1 x Ácido 5	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 1 x Ácido 6	0,691	>0,99	>0,99
Ácido 1 x Ácido 7	>0,99	0,723	>0,99
Ácido 1 x Meio	0,731	0,001	0,287
Ácido 1 x PBS	>0,99	0,797	0,307
Ácido 2 x Ácido 3	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 2 x Ácido 4	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 2 x Ácido 5	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 2 x Ácido 6	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 2 x Ácido 7	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 2 x Meio	0,195	0,001	0,850
Ácido 2 x PBS	>0,99	0,012	<0,001
Ácido 3 x Ácido 4	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 3 x Ácido 5	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 3 x Ácido 6	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 3 x Ácido 7	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 3 x Meio	0,596	0,355	0,975
Ácido 3 x PBS	>0,99	0,010	0,010
Ácido 4 x Ácido 5	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 4 x Ácido 6	<0,001	0,803	>0,99
Ácido 4 x Ácido 7	>0,99	<0,001	>0,99
Ácido 4 x Meio	0,017	0,028	0,794
Ácido 4 x PBS	0,185	>0,99	0,669
Ácido 5 x Ácido 6	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 5 x Ácido 7	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 5 x Meio	0,443	<0,001	>0,99
Ácido 5 x PBS	>0,99	>0,99	0,143
Ácido 6 x Ácido 7	>0,99	>0,99	>0,99
Ácido 6 x Meio	<0,001	>0,99	0,758
Ácido 6 x PBS	>0,99	0,468	0,794
Ácido 7 x Meio	0,086	0,895	0,970
Ácido 7 x PBS	>0,99	0,510	0,186
Meio x PBS	<0,001	<0,001	0,001

PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

Para cada indivíduo, em cada momento e para cada tratamento, calculamos a média e o desvio padrão (DP) das porcentagens de células vivas descritas (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição das médias e desvios-padrão de porcentagens de células vivas por indivíduo

t	Material	Porcentagem vivas - média				Porcentagem vivas – DP			
		Média ± DP	Mediana	1º quartil	3º quartil	Média ± DP	Mediana	1º quartil	3º quartil
24 horas	Ácido 1	93,71 ± 4,44	93,59	89,82	97,60	2,70 ± 2,34	2,18	1,11	2,82
	Ácido 2	94,43 ± 3,79	95,45	92,19	96,34	2,91 ± 2,70	1,62	1,01	5,31
	Ácido 3	93,36 ± 2,55	92,94	91,89	93,43	2,05 ± 1,85	1,04	0,75	3,25
	Ácido 4	92,90 ± 5,89	95,47	90,98	96,62	3,71 ± 2,66	3,33	2,57	5,97
	Ácido 5	96,23 ± 3,86	97,19	96,95	97,53	1,65 ± 1,60	1,17	1,16	1,24
	Ácido 6	95,30 ± 5,65	97,14	93,16	99,72	2,22 ± 2,33	1,83	0,27	3,39
	Ácido 7	94,75 ± 3,30	94,45	93,79	96,88	2,46 ± 2,56	1,67	1,01	1,72
	Meio	88,21 ± 5,37	87,23	86,25	89,40	3,77 ± 2,60	3,39	2,38	4,01
	PBS	97,26 ± 5,33	99,67	98,85	100,00	2,58 ± 4,89	0,57	0,00	1,02
48 horas	Ácido 1	95,74 ± 5,21	97,85	96,53	98,73	2,36 ± 3,49	0,89	0,76	1,29
	Ácido 2	94,46 ± 4,21	95,34	94,55	96,76	1,20 ± 0,70	1,19	0,74	1,80
	Ácido 3	94,07 ± 3,16	93,33	92,66	97,12	2,61 ± 1,38	2,38	1,43	3,11
	Ácido 4	95,04 ± 5,78	96,64	95,93	98,54	2,98 ± 2,34	2,52	2,32	2,56
	Ácido 5	95,81 ± 3,11	96,39	94,16	97,54	2,82 ± 2,26	2,39	1,64	2,78
	Ácido 6	93,46 ± 6,28	97,14	88,82	97,33	3,42 ± 2,95	3,10	1,46	4,10
	Ácido 7	92,67 ± 7,30	96,54	92,54	96,83	2,28 ± 0,69	2,04	1,79	2,85
	Meio	86,06 ± 5,38	87,23	81,05	89,35	5,68 ± 5,13	3,75	3,55	5,97
	PBS	98,11 ± 2,40	99,53	95,95	100,00	1,33 ± 2,10	0,51	0,00	1,15
72 horas	Ácido 1	93,95 ± 7,19	97,10	90,53	99,58	3,23 ± 3,86	2,47	0,40	3,66
	Ácido 2	94,27 ± 3,19	95,67	91,52	95,75	3,74 ± 2,07	4,16	3,49	5,19
	Ácido 3	93,57 ± 2,35	93,98	91,84	94,04	5,63 ± 5,65	2,80	2,36	8,00
	Ácido 4	91,64 ± 6,43	90,54	87,56	96,90	3,08 ± 2,78	3,61	0,51	4,41
	Ácido 5	88,48 ± 10,94	87,82	87,33	97,58	7,26 ± 7,09	5,37	0,79	13,93
	Ácido 6	93,28 ± 5,07	90,13	89,60	98,42	4,57 ± 3,55	6,21	1,08	7,40
	Ácido 7	92,67 ± 3,45	92,61	89,76	95,61	2,90 ± 0,92	2,71	2,52	3,02
	Meio	82,65 ± 17,12	91,20	85,03	91,40	4,39 ± 2,79	4,97	2,54	6,05
	PBS	98,63 ± 1,86	99,31	98,93	99,55	2,05 ± 3,35	0,71	0,64	0,90

t = momento da análise; DP: desvio padrão; PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

Observando-se os dados nos gráficos de linha, visualiza-se que, no momento 24 horas, há um indivíduo com variação discrepante se comparada aos demais indivíduos (C), sendo este valor alto observado com PBS. Quanto à média, este mesmo indivíduo apresenta o menor valor para PBS. No momento 48 horas, vemos também um valor de DP discrepante para o indivíduo C, para o meio. Em 72 horas, o mesmo indivíduo se destaca dos demais, apresentando a menor média de porcentagem de células vivas para o meio e para o Ácido 5. Os indivíduos C e F apresentam DP maiores que os demais indivíduos para o Ácido 5 e o indivíduo MP (amostra 3) apresenta DP alto para o Ácido 3 (Figura 11).

ID: identificação dos participantes.

Figura 11. Médias e desvios-padrão de porcentagens de células vivas por indivíduo

As diferenças entre os tratamentos com relação ao PBS para a média de porcentagens, e também para o DP, foram avaliadas buscando identificar os tratamentos com menor variabilidade (Tabela 6).

No momento 24 horas, o tratamento com valor médio de porcentagens de células vivas mais próximo do PBS foi o Ácido 5, com média estimada 96,2. Não há evidências de diferenças entre PBS e Ácido 1 ($p=0,075$), Ácido 2 ($p=0,169$), Ácido 3 ($p=0,090$), Ácido 5 ($p=0,704$) e Ácido 6 ($p=0,084$).

No momento 48 horas, o resultado mais próximo do PBS foi também para o Ácido 5, com média estimada 95,8. Neste momento não há evidências de diferenças entre PBS e Ácido 1 ($p=0,097$), Ácido 4 ($p=0,059$) e Ácido 5 ($p=0,089$).

No momento 72 horas, todos os tratamentos apresentaram evidências de diferença significativa em relação ao PBS quanto à média de porcentagem de células vivas.

Com relação ao DP de porcentagem de células vivas, no momento 24 horas, o tratamento mais próximo do PBS foi o Ácido 1, com DP estimado 2,7 e $p=0,956$. O DP para PBS foi 2,6. Neste momento não há evidências de diferenças significantes entre os DPs dos tratamentos em relação ao PBS.

No momento 48 horas, o DP mais próximo do PBS foi o do Ácido 2, com DP 1,2 e $p=0,865$. O DP para PBS no momento 48 foi 1,3. Não há evidências de diferenças entre os DPs estimados de PBS e Ácido 1 ($p=0,095$), Ácido 2 ($p=0,965$), Ácido 3 ($p=0,272$) e Ácido 7 ($p=0,173$).

No momento 72 horas, o DP mais próximo de PBS foi para o Ácido 7, com valor 2,9 e $p=0,534$. O DP para PBS foi 2,1. Neste momento não há evidências de diferenças de DP em relação à PBS quanto ao Ácido 1 ($p=0,105$), Ácido 2 ($p=0,308$), Ácido 3 ($p=0,123$), Ácido 4 ($p=0,299$), Ácido 6 ($p=0,059$), Ácido 7 ($p=0,534$) e Meio ($p=0,091$).

Tabela 6. Valores médios estimados e comparações para as médias e desvios-padrão de porcentagens de células vivas

Momento	Tratamento	Média de % de células vivas		DP de % de células vivas	
		Média (IC 95%)	Valor-p	Média (IC 95%)	Valor-p
24 horas	Ácido 1	93,7 (90,3; 97,3)	0,075	2,7 (1,4; 5,3)	0,956
	Ácido 2	94,4 (91,5; 97,5)	0,169	2,9 (1,4; 6,0)	0,839
	Ácido 3	93,4 (91,4; 95,4)	0,090	2,1 (1,0; 4,2)	0,707
	Ácido 4	92,9 (88,4; 97,6)	<0,001	3,7 (2,1; 6,5)	0,470
	Ácido 5	96,2 (93,3; 99,3)	0,704	1,7 (0,8; 3,5)	0,669
	Ácido 6	95,3 (91,0; 99,8)	0,084	2,2 (1,0; 5,1)	0,854
	Ácido 7	94,7 (92,2; 97,4)	0,041	2,5 (1,1; 5,6)	0,908
	Meio	88,2 (84,1; 92,5)	<0,001	3,8 (2,2; 6,5)	0,276
	PBS	97,3 (93,2; 100,0)	Referência	2,6 (0,6; 11,4)	Referência
48 horas	Ácido 1	95,7 (91,7; 99,9)	0,097	2,4 (0,7; 7,5)	0,095
	Ácido 2	94,5 (91,2; 97,8)	0,001	1,2 (0,8; 1,9)	0,865
	Ácido 3	94,1 (91,6; 96,6)	<0,001	2,6 (1,7; 4,0)	0,272
	Ácido 4	95,0 (90,6; 99,7)	0,059	3,0 (1,6; 5,5)	<0,001
	Ácido 5	95,8 (93,4; 98,3)	0,089	2,8 (1,5; 5,3)	<0,001
	Ácido 6	93,5 (88,7; 98,5)	0,003	3,4 (1,7; 6,7)	<0,001
	Ácido 7	92,7 (87,1; 98,6)	0,011	2,3 (1,8; 2,9)	0,173
	Meio	86,1 (81,9; 90,4)	<0,001	5,7 (2,8; 11,5)	0,002
	PBS	98,1 (96,2; 100,0)	Referência	1,3 (0,4; 4,6)	Referência
72 horas	Ácido 1	93,9 (88,5; 99,8)	0,049	3,2 (1,3; 8,2)	0,105
	Ácido 2	94,3 (91,8; 96,8)	<0,001	3,7 (2,4; 5,8)	0,308
	Ácido 3	93,6 (91,7; 95,4)	<0,001	5,6 (2,6; 12,4)	0,123
	Ácido 4	91,6 (86,7; 96,8)	0,002	3,1 (1,5; 6,3)	0,299
	Ácido 5	88,5 (80,3; 97,5)	0,007	7,3 (3,4; 15,6)	0,025
	Ácido 6	93,3 (89,4; 97,3)	0,002	4,6 (2,5; 8,4)	0,059
	Ácido 7	92,7 (90,0; 95,4)	<0,001	2,9 (2,3; 3,7)	0,534
	Meio	82,6 (70,3; 97,2)	0,009	4,4 (2,7; 7,2)	0,091
	PBS	98,6 (97,2; 100,0)	Referência	2,1 (0,6; 7,4)	Referência

IC: intervalo de confiança; DP: desvio padrão; PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

Calculou-se a diferença de cada um dos ácidos, por paciente, em relação ao PBS, para identificar qual tem o comportamento mais parecido com o PBS, com relação tanto à média de porcentagem de células vivas como também com relação ao DP de porcentagem de células vivas. Na figura 12 a linha de referência está no zero, e consideraram-se mais próximos de PBS os valores mais próximos do zero.

Figura 12. Diferenças dos ácidos em relação ao tampão fosfato-salino

As diferenças em relação ao PBS foram avaliadas por meio de modelos, e estimadas as médias e intervalos de confiança para a média e para a variação das porcentagens de células vivas. No momento 24 horas, estão mais próximos do PBS (diferenças próximas de zero, com intervalos de confiança contendo o zero) os tratamentos com Ácido 5, Ácido 6, Ácido 2, Ácido 1 e Ácido 3. Os valores-p representam as comparações com o meio, e observamos que, no momento 24 horas, todos os ácidos apresentam diferenças menores em relação ao PBS quando comparados com o meio (Tabela 7).

Tabela 7. Valores estimados e comparações para as diferenças dos ácidos em relação ao tampão fosfato-salino

Momento	Tratamento	Média de % de células vivas - diferença em relação ao PBS		DP de % de células vivas - diferença em relação ao PBS	
		Média (IC 95%)	Valor-p	Média (IC 95%)	Valor-p
24 horas	Ácido 1	-3,6 (-7,5; 0,4)	0,001	0,1 (-4,1; 4,4)	0,378
	Ácido 2	-2,8 (-6,8; 1,2)	0,008	0,3 (-2,9; 3,5)	0,276
	Ácido 3	-3,9 (-8,4; 0,6)	0,001	-0,5 (-3,3; 2,2)	<0,001
	Ácido 4	-4,4 (-6,6; -2,2)	0,010	1,1 (-1,9; 4,2)	0,944
	Ácido 5	-1,0 (-6,3; 4,3)	0,004	-0,9 (-5,2; 3,3)	0,113
	Ácido 6	-2,0 (-4,2; 0,3)	<0,001	-0,4 (-4,2; 3,4)	0,121
	Ácido 7	-2,5 (-4,9; -0,1)	0,003	-0,1 (-2,0; 1,8)	0,013
	Meio	-9,1 (-12,5; -5,6)	Referência	1,2 (-1,0; 3,4)	Referência
48 horas	Ácido 1	-2,4 (-5,2; 0,4)	<0,001	1,0 (-0,2; 2,2)	<0,001
	Ácido 2	-3,7 (-5,8; -1,5)	<0,001	-0,1 (-1,6; 1,4)	0,016
	Ácido 3	-4,0 (-5,8; -2,3)	0,002	1,3 (-1,0; 3,6)	0,181
	Ácido 4	-3,1 (-6,3; 0,1)	<0,001	1,6 (1,0; 2,2)	0,038
	Ácido 5	-2,3 (-5,0; 0,4)	<0,001	1,5 (1,0; 1,9)	0,029
	Ácido 6	-4,7 (-7,7; -1,6)	0,015	2,1 (1,2; 3,0)	0,100
	Ácido 7	-5,4 (-9,6; -1,2)	0,017	0,9 (-0,4; 2,3)	0,091
	Meio	-12,1 (-16,5; -7,6)	Referência	4,4 (1,6; 7,1)	Referência
72 horas	Ácido 1	-4,7 (-9,3; 0,0)	0,019	1,2 (-0,2; 2,6)	0,542
	Ácido 2	-4,4 (-6,7; -2,0)	0,070	1,7 (-1,6; 4,9)	0,694
	Ácido 3	-5,1 (-6,8; -3,3)	0,100	3,6 (-1,0; 8,1)	0,562
	Ácido 4	-7,0 (-11,4; -2,6)	0,122	1,0 (-0,9; 3,0)	0,476
	Ácido 5	-10,2 (-17,5; -2,8)	0,099	5,2 (0,6; 9,8)	0,198
	Ácido 6	-5,4 (-8,8; -1,9)	0,099	2,5 (-0,1; 5,1)	0,927
	Ácido 7	-6,0 (-8,4; -3,5)	0,115	0,8 (-1,8; 3,5)	0,134
	Meio	-16,0 (-28,0; -4,0)	Referência	2,3 (-0,4; 5,0)	Referência

PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*); DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança.

No momento 48 horas, estão mais próximos do PBS os Ácidos 5, 1 e 4. Nota-se que nesse momento todos os ácidos apresentam diferenças menores em relação ao PBS quando comparados com o meio.

No momento 72 horas, está mais próximo do PBS o Ácido1, sendo que este é o único que apresenta evidências de valor mais próximo do PBS que o meio ($p=0,019$).

Quanto à diferença de DP, no momento 24 horas, os tratamentos mais próximos do PBS são os ácidos: 1, 7, 2, 3, 6, nessa ordem. Apresentam evidências de diferenças em relação ao meio os ácidos 3 e 7. No momento 48 horas, estão com DP mais próximo do PBS os ácidos 1, 2 e 7. Apresentam evidências de diferenças com relação ao meio os tratamentos com ácido 1, ácido 2, ácido 4 e ácido 5.

No momento 72 horas, as menores diferenças de DP em relação ao PBS são para os ácidos 7 e 4. Nenhum dos tratamentos apresenta evidência de diferença significativa em relação ao meio quanto à diferença de DP do PBS.

4.3.2 Interação célula + ácido hialurônico + membrana de colágeno I/III

Após a avaliação dos resultados da primeira etapa (interação célula + AH) foram selecionados os ácidos com melhor taxa de viabilidade (cinco diferentes preparações de AH), além do meio e o PBS.

No momento inicial, são cinco medidas de porcentagens de células vivas, com variação entre 87 e 99,96%, com média de 95,38% e DP de 4,9%. A porcentagem de células vivas em 24 horas variou entre 41 e 100%. As maiores variações são observadas para os ácidos 5, 2 e 1. Os maiores valores são observados para o SBF e PBS (Figura 13).

Figura 13. Porcentagem de células vivas por tratamento em 24 horas

As médias estimadas mostram que os menores valores estimados são para os Ácidos 2 e 5. Nas comparações com PBS, a única diferença encontrada foi com relação ao SBF, que apresenta porcentagem maior de células vivas (95,8%) (Tabela 8). Nas comparações múltiplas, observamos evidências de que o SBF também é significativamente maior que os ácidos 1, 4 e 5 (Tabela 9).

Tabela 8. Porcentagens de células vivas estimadas em 24 horas

Tratamento	Média estimada (IC 95%)	Valor-p
SBF	95,8 (93,4; 97,4)	<0,001
Ácido 7	86,3 (77,7; 91,5)	0,826
Ácido 5	81,3 (72,3; 87,3)	0,350
Ácido 4	86,6 (81,8; 90,2)	0,801
Ácido 2	81,2 (61,8; 90,7)	0,429
Ácido 1	83,7 (74,4; 89,6)	0,555
PBS	87,8 (74,5; 94,1)	Referência

IC: intervalo de confiança; SBF: soro bovino fetal; PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

Tabela 9. Comparações múltiplas entre tratamentos em 24 horas

Comparação			Valor-p corrigido
SBF	x	Ácido 7	0,105
SBF	x	Ácido 5	0,003
SBF	x	Ácido 4	<0,001
SBF	x	Ácido 2	0,497
SBF	x	Ácido 1	0,028
Ácido 7	x	Ácido 5	0,497
Ácido 7	x	Ácido 4	>0,99
Ácido 7	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 7	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 5	x	Ácido 4	0,497
Ácido 5	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 5	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 4	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 4	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 2	x	Ácido 1	>0,99

SBF: soro bovino fetal.

Em 48 horas, a porcentagem de células vivas variou entre 65,8% e 100% e a maior variabilidade ocorreu com os ácidos 4, 5 e 7 (Figura 14).

PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*); SBF: soro bovino fetal.

Figura 14. Porcentagem de células vivas por tratamento em 48 horas

As médias estimadas mostram que a maior porcentagem de células vivas é observada para SBF (média 95,0) (Tabela 10) e que nas comparações múltiplas há evidências de diferença significativa em relação aos ácidos 1 (média 89,5) e 5 (média 86,9). Nas comparações com PBS, os ácidos 1 e 5 também apresentam evidências de porcentagens menores de células vivas (Tabela 11).

Tabela 10. Porcentagens de células vivas estimadas em 48 horas

Tratamento	Média estimada (IC 95%)	Valor-p
SBF	95,0 (93,3; 96,3)	0,395
Ácido 7	93,0 (88,9; 95,5)	0,755
Ácido 5	86,9 (79,3; 91,8)	0,017
Ácido 4	88,6 (78,6; 93,9)	0,222
Ácido 2	92,9 (89,8; 95,0)	0,699
Ácido 1	89,5 (86,7; 91,7)	0,033
PBS	93,8 (90,9; 95,7)	Referência

IC: intervalo de confiança; SBF: soro bovino fetal; PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

Tabela 11. Comparações múltiplas entre tratamentos em 48 horas

Comparação			Valor-p corrigido
SBF	x	Ácido 7	>0,99
SBF	x	Ácido 5	0,017
SBF	x	Ácido 4	>0,99
SBF	x	Ácido 2	>0,99
SBF	x	Ácido 1	0,033
Ácido 7	x	Ácido 5	0,197
Ácido 7	x	Ácido 4	>0,99
Ácido 7	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 7	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 5	x	Ácido 4	>0,99
Ácido 5	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 5	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 4	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 4	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 2	x	Ácido 1	0,204

SBF: soro bovino fetal.

Em 72 horas, a porcentagem de células vivas variou entre 60 e 100% e as maiores variações são observadas para os ácidos 1 e 5 (Figura 15). As médias estimadas mostram que a maior porcentagem de células vivas é observada para SBF (Tabela 12), sendo que as comparações múltiplas mostram diferenças deste tratamento em relação aos ácidos 1, 5 e 7 (Tabela 13). Não observamos evidências de diferenças significantes entre os demais tratamentos.

PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*); SBF: soro bovino fetal.

Figura 15. Porcentagem de células vivas por tratamento em 72 horas

Tabela 12. Porcentagens de células vivas estimadas em 72 horas

Tratamento	Média estimada (IC 95%)	Valor-p
SBF	95,6 (93,3; 97,0)	0,063
Ácido 7	89,7 (84,8; 93,0)	0,765
Ácido 5	86,1 (78,2; 91,1)	0,749
Ácido 4	90,8 (81,7; 95,4)	0,674
Ácido 2	92,5 (87,7; 95,4)	0,298
Ácido 1	85,5 (79,7; 89,6)	0,671
PBS	88,4 (75,9; 94,4)	Referência

IC: intervalo de confiança; SBF: soro bovino fetal; PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

Tabela 13. Comparações múltiplas entre tratamentos em 72 horas

Comparação			Valor-p corrigido
SBF	x	Ácido 7	0,002
SBF	x	Ácido 5	0,012
SBF	x	Ácido 4	>0,99
SBF	x	Ácido 2	>0,99
SBF	x	Ácido 1	<0,001
Ácido 7	x	Ácido 5	>0,99
Ácido 7	x	Ácido 4	>0,99
Ácido 7	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 7	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 5	x	Ácido 4	>0,99
Ácido 5	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 5	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 4	x	Ácido 2	>0,99
Ácido 4	x	Ácido 1	>0,99
Ácido 2	x	Ácido 1	0,213

SBF: soro bovino fetal.

O número total de células vivas observadas em cada momento nos ácidos PBS ou SBF está demonstrado na tabela 14.

Tabela 14. Descrição do número de células por tratamento

Tratamento	Análise	24 horas		48 horas		72 horas	
		Número células vivas	Número total células	Número células vivas	Número total células	Número células vivas	Número Total células
PBS	Mediana	91	107	135	150	122	134
	1º quartil	83	96	104	116	103	106
	3º quartil	111	132	155	167	180	195
	Mínimo	67	70	44	50	26	38
	Máximo	177	192	180	187	288	297
Ácido 1	Mediana	22	28	49	55	57	64
	1º quartil	12	16	25	28	22	27
	3º quartil	31	34	140	149	76	88
	Mínimo	9	12	7	8	14	19
	Máximo	35	40	184	195	98	123
Ácido 2	Mediana	26	34	50	50	68	74
	1º quartil	21	28	31	34	29	33
	3º quartil	36	38	136	144	100	118
	Mínimo	14	24	25	27	27	28
	Máximo	50	54	188	198	207	208
Ácido 4	Mediana	24	26	57	62	46	48
	1º quartil	18	21	38	40	14	16
	3º quartil	35	45	99	117	201	207
	Mínimo	7	8	17	20	6	9
	Máximo	51	56	246	262	233	252
Ácido 5	Mediana	15	18	50	57	29	34
	1º quartil	13	14	33	39	20	21
	3º quartil	26	34	69	77	36	41
	Mínimo	5	6	25	33	5	8
	Máximo	30	43	121	124	44	46
Ácido 7	Mediana	48	58	55	59	68	73
	1º quartil	35	38	14	16	32	36
	3º quartil	69	79	104	117	117	137
	Mínimo	10	13	7	7	3	4
	Máximo	127	131	123	126	192	202
SBF	Mediana	118	127	159	164	182	195
	1º quartil	98	107	114	122	143	146
	3º quartil	151	159	194	200	260	281
	Mínimo	66	71	80	82	83	91
	Máximo	193	197	257	266	417	428

PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*); SBF: soro bovino fetal.

4.4 Expressão gênica

Não obtivemos sucesso na extração do RNA das células mesenquimais cultivadas com as diferentes soluções de AH na membrana de colágeno por 28 dias.

Após a tentativa de extração utilizando-se o procedimento com Trizol, observamos uma contaminação de fenol na quantificação do RNA. Então, optamos em realizar uma precipitação do RNA com solução de acetato de sódio.

Entretanto, a concentração obtida foi insuficiente para a continuidade para análise de expressão gênica (Tabela 15).

Tabela 15. Absorbância após extração de RNA com Trizol durante toda a noite de uma das amostras

Amostra	Concentração (ng/mL)	260/280nm	260/230nm
Ácido 1	-16,8	1,02	0,43
Ácido 2	0,359	1,66	0,35
Ácido 4	0,160	1,46	0,27
Ácido 5	0,153	1,46	0,27
Ácido 7	0,439	1,75	0,55
PBS	0,234	1,54	0,32
SBF	0,930	1,45	0,30
Referência	0,217	1,54	0,32

PBS: tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*); SBF: soro bovino fetal.

5 DISCUSSÃO

Terapias biológicas, como o uso das células mesenquimais, têm ganhado espaço e aceitação para o tratamento de condições inflamatórias, incluindo as doenças musculoesqueléticas. A associação das CTM com AH e membranas de colágeno vem sendo estudada como provável arsenal terapêutico para as lesões da cartilagem articular, razão pela qual, no Brasil, iniciaram-se estudos *in vitro* visando o uso clínico dessa combinação.

Como resultado principal desse estudo pode-se afirmar que o AH comercial é um produto biocompatível com as células mesenquimais provenientes do tecido adiposo, porém, a viabilidade celular variou muito, não sendo possível estabelecer relação entre a viabilidade e o tipo de preparação comercial do produto. A manipulação celular também sofreu interferência de acordo com a viscosidade da formulação, o que pode interferir nos futuros resultados de estudos clínicos. Esse achado se manteve mesmo quando realizamos a associação da AD-CTM com AH e membrana de colágeno I/III. O meio com SBF resultou na melhor taxa de viabilidade nos tempos analisados (24, 48 e 72 horas), aproximadamente 95%, ou seja, nenhum ácido conseguiu resultado semelhante ao SBF. Houve diferença estatística apenas em 24 horas (SBF *versus* PBS) e, nesse tempo, os ácidos testados apresentaram desempenho semelhante ao PBS. Nos demais tempos, considerando-se o PBS como referência, não encontramos diferença.

O campo da medicina regenerativa tem apresentado grande importância na ortopedia, pois se tornou uma alternativa atrativa para o tratamento de problemas crônicos, como lesões da cartilagem articular e processos inflamatórios, como artrites. Isso ocorre devido ao fato de os tratamentos até então disponíveis serem insuficientes para a cura completa das lesões, resultando, muitas vezes, na diminuição da mobilidade e na perda da autonomia do paciente. A regeneração tecidual utiliza como estratégia a terapia celular, na qual células-tronco são utilizadas para o reparo e o tratamento de lesões. Nesse contexto, por sua capacidade potencial de diferenciação em tecido ósseo e cartilaginoso, as CTM são promissoras e podem ser isoladas de vários locais do organismo humano, como medula óssea, gordura, periósteo, membrana sinovial, entre outros.^(47,55,57)

Além das células autólogas, diversos estudos pré-clínicos utilizam células alogênicas para evitar o procedimento invasivo da coleta celular, além de facilitar a aquisição de células congeladas em banco de tecidos. Um desses estudos, publicado por Li et al.⁽⁷¹⁾ realizou o tratamento da lesão condral no joelho de um modelo canino, em três grupos distintos, possibilitando avaliar tanto o papel do AH isolado na lesão como a interação do AH com a célula alogênica derivada da medula óssea. Concluíram que tanto o AH isolado como associado à CTM alogênica promoviam a regeneração do tecido de cartilagem canino, mas que o efeito terapêutico mais pronunciado ocorreu quando houve a interação entre AH e as células alogênicas. Os resultados foram obtidos através da análise macroscópica, da avaliação da ressonância magnética e da avaliação histológica (preservação da superfície, junção osteocondral, morfologia celular, espessura da neocartilagem), após 28 semanas da injeção intra-articular. Acredita-se que a vantagem de usar o AH é promover a migração celular para que a CTM alogênica se diferencie em linhagem condral. Entretanto, apesar da melhora do reparo no grupo com células e AH associados, não se sabe se isso ocorre por ação direta das células ou como consequência da nutrição local.⁽⁷¹⁾ Assim, neste estudo pré-clínico sinaliza-se que o comportamento das células *in vivo* pode ser diferente do comportamento das células *in vitro*. Dessa maneira, em nosso estudo, o AH comercial não ofereceu vantagens bem definidas às AD-CTM, mas por se tratar de um estudo *in vitro*, resultados diferentes podem ser alcançados em estudos *in vivo*.

O tecido adiposo é considerado um ótimo candidato como fonte para a terapia celular, pois é acessado por técnicas relativamente simples e pouco invasivas, além de apresentar uma grande concentração de CTM. O uso das CTM tem sido explorado extensivamente como solução biológica para o alívio da dor dos pacientes com artrose do joelho, mesmo que diferenciação específica dessas células em condrócitos não seja bem estabelecida.⁽⁷²⁾ O tecido adiposo tem ganhado espaço como fonte de células-tronco pela sua facilidade de aquisição, área disponível e quantidade de células-tronco. Além disso, a quantidade de células presentes nesse tecido não varia de acordo com a idade, ao contrário da medula óssea, apesar de haver redução na qualidade das células.^(73,74) Neste estudo, convencionamos que a fonte seria a gordura abdominal, entretanto, outras origens são conhecidas e estudadas, por exemplo, a região interna da coxa, os flancos, a gordura pré-patelar. A

região abdominal inferior é a que apresenta melhor qualidade das AD-CTM, contudo, não há alteração da viabilidade celular.⁽⁷⁴⁾

Acredita-se que o efeito parácrino e a ação imunossupressora sejam uma das ações que influenciam na função terapêutica.⁽¹⁴⁾ Em uma revisão sistemática e uma metanálise publicada com 25 estudos (13 nível I e 12 nível II de evidência), totalizando 439 indivíduos, sobre o uso de CTM para artrose e lesões condrais focais do joelho, 14 estudos utilizavam a célula adquirida da gordura, denotando a importância que tem sido dada a esse tipo de célula, apesar dos estudos serem heterogêneos. Como conclusão deste estudo, observamos que o tratamento com CTM trouxe benefício funcional e no volume da cartilagem significativamente relevante para o tratamento da lesão da cartilagem articular quando administrada em forma de injeção. Entretanto, a qualidade do tecido regenerado não se mostrou superior aos controles.⁽¹⁴⁾

Assim, a busca pela formação de um tecido condral mais semelhante ao original traz os avanços da terapia celular, já que a célula isoladamente talvez não seja capaz de reparar os defeitos ósseos ou condrais de grandes dimensões. Nesse sentido, a engenharia de tecidos é vista como uma estratégia promissora, utilizando *scaffolds* como biomateriais que imitam a arquitetura da matriz extracelular do tecido específico, induzindo o crescimento e a diferenciação celular. Este fato já foi observado por Hidaka et al.,⁽⁷⁵⁾ He et al.⁽⁷⁶⁾ e Marra et al.⁽⁷⁷⁾, em 2007 e 2008, quando os mesmos obtiveram sucesso utilizando *scaffolds* com células progenitoras para a substituição de tecido ósseo, cutâneo e adiposo, respectivamente. Pela necessidade de melhor compreender a interação dos biomateriais com as células mesenquimais humanas, optamos por estudar as células provenientes do tecido adiposo com dois potenciais biomateriais para uso clínico, o AH e a membrana de colágeno. A membrana de colágeno utilizada no estudo foi selecionada por ser a primeira disponibilizada no Brasil, desde 2015, e que apresenta o maior número de trabalhos publicados na literatura, desde 2005.⁽¹⁷⁾

O AH tem sido amplamente utilizado como biomaterial, por apresentar características de biocompatibilidade e biodegradabilidade exigidas a esses materiais para tornarem-se compostos dos desenhos tridimensionais na engenharia tecidual. Entretanto, na literatura, há uma escassez de dados quanto ao efeito do AH *in vitro* sobre as células mesenquimais.^(20,78,79) Neste estudo, optamos por selecionar compostos disponíveis no meio nacional, com as formulações mais influentes, que

variassem quanto às características físico-químicas e permitissem ampliar o uso terapêutico de alguns compostos após a união com as células.

Na mesma linha, Jeong et al.,⁽⁶²⁾ em 2014, analisaram oito compostos de AH com polietilenoglicol para aplicações em conjunto com as células e na regeneração de tecidos moles, mais especificamente, para avaliar o comportamento na síntese da matriz e no comportamento de células do núcleo pulposo e ânulo fibroso. Nesse estudo foi possível demonstrar como diferentes formulações de hidrogéis compostos por AH podem influenciar o comportamento das células. Além disso, os autores demonstraram que os hidrogéis injetáveis têm o potencial de apoiar as células para a cultura celular *in vitro*, com potencial para servir como transportadores tridimensionais para a entrega de células no futuro. Os resultados sugerem que o ajuste cuidadoso das formulações para incorporar AH de baixo peso molecular (27kDa) é útil para garantir a sobrevivência celular máxima e a produção de glicosaminoglicanos.

Ding et al. avaliaram o efeito sobre a proliferação celular das AD-CTM provenientes da gordura pré-patelar e concluíram que a concentração entre 25-75% de AH não afeta a proliferação celular. Entretanto, nesse estudo, a viabilidade celular não foi avaliada, apenas verificou-se um aumento da diferenciação celular das células mesenquimais da gordura após duas semanas de cultivo na presença do ácido.⁽⁷⁸⁾ No presente estudo, também não conseguimos encontrar uma correlação entre as diferentes características dos produtos e a viabilidade celular.

Outro estudo avaliou *in vitro* os efeitos de um produto comercial de AH nas AD-CTM, em doses diferentes (0,1; 0,3 e 1,0mg/mL), num período de sete dias (avaliação com um, três, cinco e sete dias). Concluiu-se que a presença de AH não é tóxica, não alterou a expressão do marcador CD44 (receptor de AH), nem tampouco apresentou indução da diferenciação condrogênica das células no curto intervalo de sete dias. Além disso, notou-se um aumento de duas vezes na expressão da IL-10 (fator anti-inflamatório) e redução em quatro vezes da expressão basal da IL-6 (marcador pró-inflamatório na artrose), denotando um estímulo ao perfil anti-inflamatório dessas células.⁽²⁰⁾ Assim como o nosso estudo, concluiu-se que o AH pode ser considerado como veículo adequado para a injeção das AD-CTM, porém, como não houve diferença significativa em relação ao PBS, sugere-se que o acréscimo de AH é desnecessário.

Ainda no modelo *in vitro*,⁽⁸⁰⁾ com células mesenquimais derivadas da gordura em cocultura com hialuronato (Hilano G-F 20: Synvisc®) avaliou o perfil das citocinas inflamatórias no secretoma de três grupos diferentes: 1) fração vascular estromal da gordura (SVF – *stromal vascular fractions*), adquirida após centrifugação do conteúdo lipoaspirado; 2) SVF com adipócitos maduros; 3) AD-CTM cultivada e purificada; todos os grupos com o AH. Os resultados encontrados seguem o que o mesmo grupo de autores vem preconizando em outros trabalhos: a presença de dois tipos de células adiposas (SVF e adipócito, grupo dois) resulta em decréscimo das citocinas pró-inflamatórias, associado a uma pior evolução da degeneração articular, e produz um efeito terapêutico superior baseado na expressão das citocinas.⁽⁸⁰⁾

Outro estudo que procurou compreender como a concentração de AH nos produtos comerciais pode interferir na interação com as AD-CTM alogênicas, avaliou o efeito de diferentes concentrações de AH de alto peso molecular (0,5mg/mL; 1,0mg/mL; 2,0mg/mL; 3,0mg/mL; 4,0mg/mL; 5,0mg/mL) nas células, mensurando a aderência e a proliferação em superfície plástica e em ensaios de adesão da cartilagem.⁽⁸¹⁾ Uma das hipóteses dos autores é que a alta viscosidade do AH influenciaria negativamente a ligação com as células, o que se confirmou ao se verificar que quanto maior a concentração, menor a aderência e que o hialuronato tem efeito dose-dependente na cinética do crescimento celular nas concentrações superiores a 1mg/mL. Em altas concentrações, o efeito da viscosidade supera a ação do hialuronato e reduz o número de células aderidas.⁽⁸¹⁾ Ao longo da realização do nosso estudo percebemos a interferência negativa da viscosidade elevada dos produtos de AH na manipulação das células, porém, não conseguimos estabelecer uma relação com a concentração dos produtos. Vale ressaltar que os produtos com a menor concentração não foram selecionados para a etapa de interação com a membrana por não terem demonstrado bons resultados iniciais, lembrando que os produtos selecionados para segunda fase da avaliação não eram conhecidos.

Com base em estudo prévio do mesmo grupo percebeu-se que a viabilidade celular das CTM derivadas do tecido adiposo humano depende da seleção do AH comercial selecionado para a cultura.⁽⁸²⁾ Nesse contexto, acredita-se que o peso molecular e a viscosidade possam ser os responsáveis pelas diferenças encontradas. Dentre as marcas, o Suprahyal® apresentou a maior quantidade de células-tronco viáveis no término do período analisado, e é o produto com o peso molecular mais baixo, 0,75MDa, entre os grupos avaliados. Esse resultado pode ser explicado pela

evidência de que o AH de alto peso molecular age como inibidor da angiogênese e da proliferação celular, além de ter efeito anti-inflamatório e imunossupressor.⁽⁷⁹⁾

Assim sendo, podemos sugerir que a viabilidade celular pode estar diretamente relacionada com a concentração e o peso molecular do AH utilizado e que isso pode ser um fator determinante no sucesso do tratamento cirúrgico da lesão condral.

Entretanto, é importante salientar que os resultados discutidos acima são pertinentes à influência do AH nas células-tronco no contexto da engenharia de tecidos e não à sua utilização como viscosuplementação no tratamento conservador da OA, visto que, para esta finalidade, existem evidências do seu benefício clínico e da provável superioridade do AH de médio e alto peso molecular.^(29,83,84)

Além dos trabalhos *in vitro*, aproximadamente 110 trabalhos pré-clínicos foram realizados com o uso de CTM. A maioria dos estudos baseia-se em joelhos de coelhos e é controlado em laboratório.⁽¹⁰⁾ Entretanto, numa revisão sistemática de todos os trabalhos para regeneração e reparo da cartilagem, os autores concluíram que há falta de conectividade entre os dados *in vitro*, pré-clínicos e os estudos em humanos, com falta de evidências sinérgicas.⁽¹⁰⁾ A conclusão dessa revisão sinaliza a dificuldade de homogeneizar os grupos, os produtos, os critérios de melhora e até os marcadores moleculares, retardando o uso clínico de muitos produtos comerciais por falta de evidências clínicas.

Em 2019, um grupo chinês publicou um dos trabalhos para a avaliação da segurança e da eficácia das AD-CTM associadas ao AH para o tratamento das lesões condrais em humanos.⁽⁸⁵⁾ Nesse estudo fase IIa, 30 pacientes com lesão no côndilo femoral medial foram randomizados em três grupos: 1) microfratura artroscópica com infiltração de substância salina; 2) microfratura artroscópica com infiltração de AH; 3) microfratura artroscópica com infiltração de AH e células mesenquimais progenitoras derivadas de tecido gorduroso (Re-Join[®], *Cellular Biomedicine Group*). Após seis meses, houve uma segunda avaliação artroscópica, para a coleta de biópsia e avaliação histológica do tecido, além da avaliação funcional e com ressonância magnética. Todos esses critérios demonstraram a eficácia superior do tratamento no grupo em que as microfraturas foram combinadas às células e ao AH.^(78,81,86)

Em outro estudo clínico multicêntrico, realizado por autores da Bélgica e da Grécia, porém, para lesões focais, foram publicados os primeiros

resultados da associação das células com os biomateriais provenientes do AH. Foram tratados 25 pacientes com lesão condral focal sintomática do joelho (maior que 2cm²) com AD-CTM em membrana de AH (Hyalofast[®]), evoluindo com melhora clínica, funcional e radiológica após três anos de tratamento.⁽⁸⁷⁾ Portanto, demonstraram que o procedimento em único estágio, com AD-CTM expandidas em laboratório e cultivadas na membrana de AH, é seguro e eficiente.

Esse estudo foi importante para dar início à validação da metodologia de cultivo das AD-CTM, porém, também tem limitações. A escolha dos AHs foi feita de acordo com a diversidade dos produtos, mas muitas outras formulações comerciais estão disponíveis no mercado e a avaliação com imunohistoquímica, após alguns dias de interação, traria informações pertinentes sobre o secretoma e o desempenho celular.

Corroborando com o estudo de Kyriakidis,⁽⁸⁷⁾ entendemos que a AD-CTM pode ser fonte para a terapia celular em lesões condrais quando associadas com biomateriais, como a membrana de colágeno.

6 CONCLUSÕES

1. O soro fetal bovino apresentou o melhor desempenho para a manutenção da viabilidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano, em comparação com as diferentes formulações comerciais de ácidos hialurônicos analisadas, com e sem a membrana;

2. O ácido hialurônico pode ser utilizado como carreador de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.

7 REFERÊNCIAS

1. Oshima Y, Harwood FL, Coutts RD, Kubo T, Amiel D. Variation of mesenchymal cells in polylactic acid scaffold in an osteochondral repair model. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(4):595–604.
2. Harris JD, Brophy RH, Siston RA, Flanigan DC. Treatment of chondral defects in the athlete's knee. *Arthroscopy*. 2010;26(6):841–52.
3. Yanke AB, Chubinskaya S. The state of cartilage regeneration: current and future technologies. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2015;8(1):1–8.
4. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889–95.
5. Kraeutler MJ, Belk JW, Purcell JM, McCarty EC. Microfracture versus autologous chondrocyte implantation for articular cartilage lesions in the knee: a systematic review of 5-year outcomes. *Am J Sports Med*. 2018;46(4):995–9.
6. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med*. 2010;38(6):1117–24.
7. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(374):212–34.
8. de Girolamo L, Schönhuber H, Viganò M, Bait C, Quaglia A, Thiebat G, et al. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC) and AMIC Enhanced by Autologous Concentrated Bone Marrow Aspirate (BMAC) allow for stable clinical and functional improvements at up to 9 years follow-up: results from a randomized controlled study. *J Clin Med*. 2019;8(3):1–15.
9. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568–84.
10. Goldberg A, Mitchell K, Soans J, Kim L, Zaidi R. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. *J Orthop Surg Res*. 2017;12(1):39.
11. Gobbi A, Karnatzikos G, Scotti C, Mahajan V, Mazzucco L, Grigolo B. One-step cartilage repair with bone marrow aspirate concentrated cells and collagen matrix in full-thickness knee cartilage lesions: results at 2-year follow-up. *Cartilage*. 2011;2(3):286–99.
12. Mohal JS, Tailor HD, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells and their applicability for musculoskeletal applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7(2):103–9.
13. Wang YH, Wu JY, Chou PJ, Chen CH, Wang CZ, Ho ML, et al. Characterization and evaluation of the differentiation ability of human adipose-derived stem cells growing in scaffold-free suspension culture. *Cytotherapy*. 2014;16(4):485–95.
14. Maheshwer B, Polce EM, Paul K, Williams BT, Wolfson TS, Yanke A, et al. Regenerative potential of mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis and chondral defects: a systematic review and meta-analysis. *Arthroscopy*. 2021;37(1):362-78.

15. Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, Piacentini A, Filardo G, Peyrafitte JA, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis Rheum.* 2013;65(5):1271–81.
16. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):21–34.
17. Gao L, Orth P, Cucchiaroni M, Madry H. Autologous matrix-induced chondrogenesis: a systematic review of the clinical evidence. *Am J Sports Med.* 2019;47(1):222–31.
18. Monaco G, El Haj AJ, Alini M, Stoddart MJ. Sodium hyaluronate supplemented culture media as a new hMSC chondrogenic differentiation media-model for in vitro/ex vivo screening of potential cartilage repair therapies. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:243.
19. Pak J, Lee JH, Park KS, Jeong BC, Lee SH. Regeneration of cartilage in human knee osteoarthritis with autologous adipose tissue-derived stem cells and autologous extracellular matrix. *Biores Open Access.* 2016;5(1):192–200.
20. Moreno A, Martinez A, Olmedillas S, Bello S, de Miguel F. Hyaluronic acid effect on adipose-derived stem cells. Biological in vitro evaluation. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2015;59(4):215–21.
21. Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;19(2):CD005321.
22. Altman R, Bedi A, Manjoo A, Niazi F, Shaw P, Mease P. Anti-inflammatory effects of intra-articular hyaluronic acid: a systematic review. *Cartilage.* 2019;10(1):43–52.
23. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg.* 2003;11(6):421–30.
24. Ammar TY, Pereira TA, Mistura SL, Kuhn A, Saggin JI, Lopes Junior OV. Viscosupplementação no tratamento da osteoartrose do joelho: uma revisão da literatura. *Rev Bras Ortop.* 2015;50(5):489–94.
25. Gallagher B, Tjoumakaris FP, Harwood MI, Good RP, Ciccotti MG, Freedman KB. Chondroprotection and the prevention of osteoarthritis progression of the knee: a systematic review of treatment agents. *Am J Sports Med.* 2015;43(3):734–44.
26. Chiang ER, Ma HL, Wang JP, Liu CL, Chen TH, Hung SC. Allogeneic mesenchymal stem cells in combination with hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis in rabbits. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149835.
27. Gómez-Aristizabal A, Kim KP, Viswanathan S. A systematic study of the effect of different molecular weights of hyaluronic acid on mesenchymal stromal cell-mediated immunomodulation. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147868.
28. Tuan RS, Chen AF, Klatt BA. Cartilage regeneration. *J Am Acad Orthop Surg.* 2013;21(5):303–11.
29. Conrozier T, Bozgan AM, Bossert M, Sondag M, Lohse-Walliser A, Balblanc JC. Standardized follow-up of patients with symptomatic knee osteoarthritis treated with a single

intra-articular injection of a combination of cross-linked hyaluronic acid and mannitol. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2016;9:175–9.

30. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393(10182):1745-59.

31. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1(6):461–8.

32. Elliott JM, Tirman PF, Grainger AJ, Brown DH, Campbell RS, Genant HK. MR appearances of the locked knee. *Br J Radiol*. 2000;73(874):1120–6.

33. Bauer KL. Osteochondral injuries of the knee in pediatric patients. *J Knee Surg*. 2018;31(5):382-91.

34. Gomoll AH, Probst C, Farr J, Cole BJ, Minas T. Use of a type I/III bilayer collagen membrane decreases reoperation rates for symptomatic hypertrophy after autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med*. 2009;37(1 Suppl 1):20S–3S.

35. Krych AJ, Pareek A, King AH, Johnson NR, Stuart MJ, Williams RJ 3rd. Return to sport after the surgical management of articular cartilage lesions in the knee: a meta-analysis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2017;25(10):3186–96.

36. Dwyer T, Martin CR, Kendra R, Sermer C, Chahal J, Ogilvie-Harris D, et al. Reliability and validity of the arthroscopic international cartilage repair society classification system: correlation with histological assessment of depth. *Arthroscopy*. 2017;33(6):1219–24.

37. Pedersen ME, DaCambra MP, Jibri Z, Dhillon S, Jen H, Jomha NM. Acute osteochondral fractures in the lower extremities - approach to identification and treatment. *Open Orthop J*. 2015;9(1):463–74.

38. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture: its history and experience of the developing surgeon. *Cartilage*. 2010;1(2):78–86.

39. Richter DL, Schenck RC Jr, Wascher DC, Treme G. Knee articular cartilage repair and restoration techniques: a review of the literature. *Sports Health*. 2016;8(2):153–60.

40. Bekkers JE, de Windt TS, Brittberg M, Saris DB. Cartilage repair in football (soccer) athletes: what evidence leads to which treatment? A critical review of the literature. *Cartilage*. 2012;3(1 Suppl):43S–9S.

41. Barie A, Kruck P, Sorbi R, Rehnitz C, Oberle D, Walker T, et al. Prospective long-term follow-up of autologous chondrocyte implantation with periosteum versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am J Sports Med*. 2020;48(9):2230–41.

42. Kuroda T, Matsumoto T, Mifune Y, Fukui T, Kubo S, Matsushita T, et al. Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. *Ups J Med Sci*. 2011;116(2):107–14.

43. Cohen M, Peccin MS, Ressio C, Asaumi I, Lombello C. Autologous chondrocyte implantation to treat femoral condyle and talar lesions. *Einstein (Sao Paulo)*. 2008;6(1):37–41.

44. Astur DC, Lopes JC, Santos MA, Kaleka CC, Amaro JT, Cohen M. Surgical treatment of chondral knee defects using a collagen membrane - autologous matrix-induced chondrogenesis. *Rev Bras Ortop*. 2017.

45. Kalkan R, Nwekwo CW, Adali T. The use of scaffolds in cartilage regeneration. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2018;28(4):343–8.
46. Park IK, Cho CS. Stem cell-assisted approaches for cartilage tissue engineering. *Int J Stem Cells*. 2010;3(2):96–102.
47. Paschos NK, Sennett ML. Update on mesenchymal stem cell therapies for cartilage disorders. *World J Orthop*. 2017;8(12):853–60.
48. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143–7.
49. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076–84.
50. English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):431–42.
51. 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.
52. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*. 2019;21(10):1019–24.
53. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301–13.
54. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1445–51.
55. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211–28.
56. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008;26(1):146–50.
57. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531–5.
58. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(14):2724–52.
59. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*. 2012;2012:812693.
60. Estes BT, Diekmann BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc*. 2010;5(7):1294–311.

61. Jang YL, Ku SH, Jin S, Park JH, Kim WJ, Kwon IC, et al. Hyaluronic acid-siRNA conjugate/reducible polyethylenimine complexes for targeted siRNA delivery. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(10):7388–94.
62. Jeong CG, Francisco AT, Niu Z, Mancino RL, Craig SL, Setton LA. Screening of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) composite hydrogels to support intervertebral disc cell biosynthesis using artificial neural network analysis. *Acta Biomater*. 2014;10(8):3421–30.
63. Elmorsy S, Funakoshi T, Sasazawa F, Todoh M, Tadano S, Iwasaki N. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(1):121–7.
64. Diaz-Gallego L, Prieto JG, Coronel P, Gamazo LE, Gimeno M, Alvarez AI. Apoptosis and nitric oxide in an experimental model of osteoarthritis in rabbit after hyaluronic acid treatment. *J Orthop Res*. 2005;23(6):1370–6.
65. Sanchez Lazaro JA, Granado PC, Del Sol MG, Gonzalez Medina A, Diaz Gallego L, Gonzalez-Arabo Sandoval D, et al. The role of different hyaluronic acids in the articular cartilage of rabbit. *Open Orthop J*. 2010;4(1):44–7.
66. Astur DC, Lopes JC, Santos MA, Kaleka CC, Amaro JT, Cohen M. Surgical treatment of chondral knee defects using a collagen membrane - autologous matrix-induced chondrogenesis. *Rev Bras Ortop*. 2018;53(6):733-9.
67. Hepper CT, Halvorson JJ, Duncan ST, Gregory AJ, Dunn WR, Spindler KP. The efficacy and duration of intra-articular corticosteroid injection for knee osteoarthritis: a systematic review of level I studies. *J Am Acad Orthop Surg*. 2009;17(10):638–46.
68. Kota DJ, Prabhakara KS, Cox CS, Olson SD. MSCs and hyaluronan: sticking together for new therapeutic potential? *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;55:1–10.
69. Liu S, Wu J, Liu X, Chen D, Bowlin GL, Cao L, et al. Osteochondral regeneration using an oriented nanofiber yarn-collagen type I/hyaluronate hybrid/TCP biphasic scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(2):581–92.
70. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant*. 2010;19(3):279–89.
71. Li L, Duan X, Fan Z, Chen L, Xing F, Xu Z, et al. Mesenchymal stem cells in combination with hyaluronic acid for articular cartilage defects. *Sci Rep*. 2018;8(1):9900.
72. Lee WY, Wang B. Cartilage repair by mesenchymal stem cells: clinical trial update and perspectives. *J Orthop Translat*. 2017;9:76–88.
73. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005;87(1):125–8.
74. Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):45.
75. Hidaka M, Su GN, Chen JK, Mukaisho K, Hattori T, Yamamoto G. Transplantation of engineered bone tissue using a rotary three-dimensional culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2007;43(2):49–58.

76. He L, Nan X, Wang Y, Guan L, Bai C, Shi S, et al. Full-thickness tissue engineered skin constructed with autogenic bone marrow mesenchymal stem cells. *Sci China C Life Sci.* 2007;50(4):429–37.
77. Marra KG, DeFail AJ, Clavijo-Alvarez JA, Badylak SF, Taieb A, Schipper B, et al. FGF-2 enhances vascularization for adipose tissue engineering. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(4):1153–64.
78. Ding DC, Wu KC, Chou HL, Hung WT, Liu HW, Chu TY. Human infrapatellar fat pad-derived stromal cells have more potent differentiation capacity than other mesenchymal cells and can be enhanced by hyaluronan. *Cell Transplant.* 2015;24(7):1221–32.
79. Lam J, Truong NF, Segura T. Design of cell-matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Acta Biomater.* 2014;10(4):1571–80.
80. Succar P, Breen EJ, Kuah D, Herbert BR. Alterations in the secretome of clinically relevant preparations of adipose-derived mesenchymal stem cells cocultured with hyaluronan. *Stem Cells Int.* 2015;2015:421253.
81. Succar P, Medynskyj M, Breen EJ, Batterham T, Molloy MP, Herbert BR. Priming adipose-derived mesenchymal stem cells with hyaluronan alters growth kinetics and increases attachment to articular cartilage. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9364213.
82. Kaleka CC, Zucconi E, Vieira TD, Secco M, Ferretti M, Cohen M. Evaluation of different commercial hyaluronic acids as a vehicle for injection of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Rev Bras Ortop.* 2018;53(5):557–63.
83. Ricci M, Micheloni GM, Berti M, Perusi F, Sambugaro E, Vecchini E, et al. Clinical comparison of oral administration and viscosupplementation of hyaluronic acid (HA) in early knee osteoarthritis. *Musculoskelet Surg.* 2017;101(1):45–9.
84. Maheu E, Rannou F, Reginster JY. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: evidence from real-life setting trials and surveys. *Semin Arthritis Rheum.* 2016;45(4 Suppl):S28–33.
85. Qiao Z, Tang J, Yue B, Wang J, Zhang J, Xuan L, et al. Human adipose-derived mesenchymal progenitor cells plus microfracture and hyaluronic acid for cartilage repair: a Phase IIa trial. *Regen Med.* 2020;15(1):1193–214.
86. Qu C, Rilla K, Tammi R, Tammi M, Kröger H, Lammi MJ. Extensive CD44-dependent hyaluronan coats on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced by hyaluronan synthases HAS1, HAS2 and HAS3. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;48(1):45–54.
87. Kyriakidis T, Iosifidis M, Michalopoulos E, Melas I, Stavropoulos-Giokas C, Verdonk R. Good mid-term outcomes after adipose-derived culture-expanded mesenchymal stem cells implantation in knee focal cartilage defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2020;28(2):502–8.

Abstract

Introduction: The definition of an ideal protocol is still necessary for the cultivation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue for clinical application in articular cartilage injuries. The use of suitable culture media associated with the use of collagen membrane is recognized to enable the guidance of the process of chondrogenesis of these cells for subsequent implantation in the articular chondral defect. Hyaluronic acid has been used in a number of protocols due to be an excellent cell vehicle for its physical-chemical properties and viscosity that helps the tissue repair process. However, the analysis of the characteristics of adipose mesenchymal stem cells exposed to different commercial products of hyaluronic acids associated with type I/III collagen membrane has not yet been reported. **Purpose:** To evaluate *in vitro* the viability of human adipose mesenchymal stem cells in different commercial solutions of hyaluronic acid before and after cells being seeded in collagen I/III membrane. **Methods:** In the first stage, mesenchymal stem cells derived from adipose tissue were exposed to 7 different commercial products of hyaluronic acid to phosphate-saline buffer (negative control group), and to the medium (fetal bovine serum) for different times. After 24, 48 and 72 hours, a counting was performed to estimate the number of live and dead cells in each sample. For the second stage, the acids with the highest number of live cells (5 types) were selected, the medium and the control maintained and, after association with the mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, the cells with the vehicle were placed in a collagen I/III membrane. **Results:** The results clearly demonstrated a significant difference in cell viability when mesenchymal stem cells derived from adipose tissue were exposed to different hyaluronic acids compared with the control group. However, the medium with fetal bovine serum showed the highest percentage of living cells in 24, 48 and 72 hours before and after the cells be arranged in the membrane. **Conclusion:** Hyaluronic acid may be a vehicle for mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, however, the association of any hyaluronic acid with mesenchymal stem cells derived from adipose tissue did not show superiority in cell viability compared with fetal bovine serum.

Keywords: Cartilage, articular; Mesenchymal stem cell transplantation; Hyaluronic acid

Bibliografia consultada

Altman D. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall/CRC; 1991.

IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk: IBM Corp.

Liang K, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika*. 1986;73(1):13–22.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2015.

Rother ET, Braga ME. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ed. rev. ampl. São Paulo; 2005.