

ALINE SILVESTRINI DA SILVA

**SECRETOMA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS PERIVASCULARES
DO CORDÃO UMBILICAL CANINO PARA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Emily Correna Carlo Reis

Coorientadores: Adriano Sabino de Paula
Andrea Pacheco B. Borges
Fabiana Azevedo Voorwald

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586c
2023
Silva, Aline Silvestrini da, 1989-
Secretoma de células estromais mesenquimais
perivasculares do cordão umbilical canino para regeneração da
cartilagem / Aline Silvestrini da Silva. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (74 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Emily Correna Carlo Reis.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.471>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Osteoartrite - Tratamento. 2. Cartilagem articular.
3. Células-tronco. I. Reis, Emily Correna Carlo, 1980-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.08967223


ALINE SILVESTRINI DA SILVA

**SECRETOMA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS PERIVASCULARES
DO CORDÃO UMBILICAL CANINO PARA REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 14 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **ALINE SILVESTRINI DA SILVA**
Data: 11/08/2023 09:20:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Aline Silvestrini da Silva
Autora

Documento assinado digitalmente
 **EMILY CORRENA CARLO REIS**
Data: 11/08/2023 17:14:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Emily Correna Carlo Reis
Orientadora

A dona Inês.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe dona Inês, quem mais me incentivou, motivou e inspirou.
As minhas irmãs Claudia, Jane, Yolanda e Sandra e aos meus irmãos Marcos e Erich.

A minha amiga e irmã Fernanda.

A Soraia e Dêni, meus segundos pais.

Ao Wellington, meu coração.

As minhas amigas Juliana e Pollyanna.

Aos meus amigos Pedro e Theo.

A Maria Clara, minha amiga e heroína.

Ao professor Leandro Licursi.

Ao professor Adriano Sabino.

A minha orientadora, Emily.

Ao Fabrício meu coorientador e amigo.

A todos meus amigos.

Está um pouco difícil expressar com palavras em um documento que ficará para sempre nos meus registros, mas cada um de vocês, citados e não citados também, sabem como foi escrita essa história.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

SILVA, Aline Silvestrini da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Secretoma de células estromais mesenquimais perivasculares do cordão umbilical canino para regeneração da cartilagem.** Orientadora: Emily Correna Carlo Reis. Coorientadores: Adriano Sabino de Paula, Andrea Pacheco Batista Borges e Fabiana Azevedo Voorwald.

A osteoartrite é uma doença articular degenerativa que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Embora a doença seja multifatorial e envolva diversos mecanismos patológicos, o microambiente articular desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão da osteoartrite. Compreender a composição e função do microambiente articular é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes. Dentre as estratégias que têm despertado um grande interesse mais recentemente está a aplicação do secretoma de células estromais mesenquimais (MSCs), que se mostra uma abordagem promissora para o tratamento da osteoartrite. Nesse contexto, esta tese tem como objetivo explorar o potencial terapêutico do secretoma de MSCs na osteoartrite. A tese foi dividida em dois capítulos principais. O primeiro capítulo consiste em uma revisão sistemática sobre o papel do microambiente na osteoartrite, analisando fatores importantes para o desenvolvimento de terapias com MSCs. O segundo capítulo é dedicado à apresentação de um trabalho *in vitro* investigando os efeitos do secretoma de MSCs na proliferação, migração e manutenção do fenótipo condrogênico de condrócitos articulares de coelhos, por meio de marcação de glicaminoglicanos e expressão gênica de fatores associados à condrogênese.

Palavras-chave: Doença articular degenerativa. Meio condicionado. Terapia *cell free*.

ABSTRACT

SILVA, Aline Silvestrini da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Secretome of perivascular mesenchymal stromal cells from canine umbilical cord for cartilage regeneration.** Adviser: Emily Correna Carlo Reis. Coorientadores: Adriano Sabino de Paula, Andrea Pacheco Batista Borges and Fabiana Azevedo Voorwald.

Osteoarthritis is a degenerative joint disease that affects millions of people worldwide. Although the disease is multifactorial and involves various pathological mechanisms, the joint microenvironment plays a crucial role in the development and progression of osteoarthritis. Understanding the composition and function of the joint microenvironment is essential for the development of effective therapeutic strategies. Among the strategies that have recently attracted great interest is the application of the secretome of mesenchymal stromal cells (MSCs), which shows promise as an approach for the treatment of osteoarthritis. In this context, this thesis aims to explore the therapeutic potential of MSC secretome in osteoarthritis. The thesis is divided into two main chapters. The first chapter consists of a systematic review on the role of the microenvironment in osteoarthritis, analysing important factors for the development of MSCs-based therapies. The second chapter is dedicated to the presentation of an *in vitro* study investigating the effects of MSC secretome on the proliferation, migration, and maintenance of the chondrogenic phenotype of rabbit articular chondrocytes, through the labeling of glycosaminoglycans and gene expression of factors associated with chondrogenesis.

Keywords: Degenerative joint disease. Conditioned medium. Cell-free therapy.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1.	Referências bibliográficas	11
2.	CAPÍTULO I	14
2.1.	Graphical abstract	14
2.2.	Abstract	14
2.3.	Introduction	15
2.4.	Material e methods	17
2.4.1.	Search strategy	17
2.4.2.	Selection criteria	17
2.4.3.	Data extraction	19
2.5.	Results	19
2.6.	Discussion	32
2.7.	Conclusion	38
2.8.	References	38
3.	CAPÍTULO II	47
3.1.	Resumo gráfico	47
3.2.	Resumo	47
3.3.	Introdução	48
3.4.	Material e métodos	49
3.4.1.	Isolamento e Cultivos de UC-MSCs	49
3.4.2.	Obtenção do MC-VE positivo e MC-VE negativo	50
3.4.3.	Controles negativo e positivo	50
3.4.4.	Ensaio funcionais	50
3.4.4.1.	Isolamento e Cultivo de condrócitos	50
3.4.4.2.	Proliferação celular	51
3.4.4.3.	Migração celular	51
3.4.4.4.	Manutenção do fenótipo condrogênico	52
3.4.4.5.	Colorações para fenótipo condrogênico	53
3.4.4.6.	Extração do RNA total dos condrócitos	53
3.4.4.7.	Quantificação do RNA	54
3.4.4.8.	Eletroforese em gel de agarose	54
3.4.4.9.	Transcrição reversa	54
3.4.4.10.	Amplificação do cDNA em PCR em tempo-real (qPCR)	55

3.4.5.	Análise estatística	55
3.5.	Resultados	56
3.5.1.	Ensaio de proliferação celular – MTT	56
3.5.2.	Ensaio de migração celular	56
3.5.3.	Ensaio de manutenção do fenótipo condrogênico	60
3.6.	Discussão.....	63
3.7.	Conclusão	69
3.8.	Referências bibliográficas	69
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

A osteoartrite (OA) é uma doença articular degenerativa e uma das principais causas de incapacidade em adultos em todo o mundo. Com uma população envelhecida em associação com a obesidade e o sedentarismo, esta síndrome está se tornando ainda mais prevalente do que nas décadas anteriores, com estimativas mundiais sugerindo que 250 milhões de pessoas estão atualmente afetadas (Hunter and Bierma-Zeinstra, 2019). A OA resulta em dor, rigidez e perda de função nas articulações afetadas. Apesar dos recentes avanços no entendimento da fisiopatologia da OA, as opções terapêuticas atuais ainda são limitadas e incapazes de promover a regeneração efetiva do tecido cartilaginoso (Grässel and Muschter, 2020).

Nas últimas décadas, as células estromais mesenquimais (MSCs) têm emergido como uma promissora abordagem terapêutica para doenças musculoesqueléticas, incluindo a OA (Qu and Sun, 2021). As MSCs são células multipotentes que podem ser isoladas de diversos tecidos, como a medula óssea (Eleotério *et al.*, 2016), o tecido adiposo (Rhijn *et al.*, 2013) e o cordão umbilical (Sepúlveda *et al.*, 2020). Além de sua capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares, as MSCs secretam uma ampla gama de fatores solúveis e vesículas extracelulares (VEs), formando o chamado "secretoma" das MSCs (Yang *et al.*, 2018; Baberg *et al.*, 2019).

O secretoma das MSCs tem despertado grande interesse devido ao seu potencial regenerativo no tratamento de diversos tecidos, como tecido ósseo, articular e cutâneo (Benavides-Castellanos, Garzón-Orjuela and Linero, 2020; Kearney *et al.*, 2022; Ormazabal *et al.*, 2022). O tecido cartilaginoso é especialmente suscetível à degeneração devido ao seu baixo potencial de regeneração endógena, o que ganha ainda mais importância no contexto da OA. Esse baixo potencial de reparação se deve a algumas características intrínsecas do próprio tecido como: i) avascularidade: a cartilagem é um tecido avascular, o que significa que não possui vasos sanguíneos que forneçam oxigênio e nutrientes diretamente às células. Isso torna o processo de reparo mais lento em caso de lesão; ii) baixa taxa metabólica: os condrócitos, possuem uma baixa taxa metabólica, o que afeta sua capacidade de autorreparação e regeneração e iii) pressão mecânica constante: em algumas partes do corpo, como nas articulações, a cartilagem está sob constante pressão mecânica devido ao movimento e à carga exercida durante as atividades diárias. Isso pode causar

desgaste ao longo do tempo (Ulici *et al.*, 2022). O secretoma das MSCs pode ajudar na regeneração do tecido cartilaginoso na redução da inflamação, no estímulo à proliferação celular, na modulação da matriz extracelular e na inibição da morte celular programada (Maumus *et al.*, 2013; Cosenza *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018).

O microambiente e o nicho celular desempenham papéis fundamentais na manutenção da homeostase do tecido cartilaginoso, e qualquer desequilíbrio nesse ambiente pode levar à progressão da OA (Borrelli *et al.*, 2019). Acredita-se que o secretoma das MSCs possa modular o microambiente e promover a regeneração do tecido cartilaginoso (W. Chen *et al.*, 2019).

O processo inflamatório desempenha um papel fundamental na regeneração tecidual. Embora a inflamação seja frequentemente associada a uma resposta negativa, ela é, na verdade, uma parte essencial do processo de cura e regeneração do tecido após lesão ou dano (Janakiram *et al.*, 2021) Trata-se de uma resposta imunológica natural do organismo que visa proteger a área afetada, remover os tecidos danificados e iniciar o processo de reparação.

Além disso, é preciso destacar o papel significativo que o secretoma desempenha no microambiente inflamatório da osteoartrite (Wang and Xu, 2021). Estudos têm demonstrado que o secretoma de células-tronco mesenquimais (MSCs) atua na imunomodulação e é capaz de atenuar a resposta inflamatória exacerbada observada na osteoartrite (Jin *et al.*, 2022; Nabavizadeh *et al.*, 2022).

O secretoma é constituído por fatores solúveis e vesículas extracelulares (VEs), que transportam uma carga de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios bioativos (Fan *et al.*, 2020). Esses fatores solúveis têm a capacidade de modular a atividade das células imunes, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e promovendo um microambiente anti-inflamatório.

Outra função relevante do secretoma de MSCs é o estímulo à proliferação de células endógenas, como condroblastos e células-tronco mesenquimais residentes, que desempenham um papel crucial na regeneração e reparação do tecido cartilaginoso (Klinder *et al.*, 2020; Contentin *et al.*, 2022).

É importante ressaltar que, embora a inflamação seja essencial para a regeneração, é necessário garantir que a resposta inflamatória seja equilibrada para que a regeneração ocorra de forma adequada. Uma inflamação excessiva ou prolongada pode levar a problemas de reparação e até mesmo ao desenvolvimento

de doenças crônicas. Portanto, o controle adequado da inflamação é essencial para assegurar uma regeneração tecidual eficaz e saudável (Janakiram *et al.*, 2021).

Apesar do crescente interesse e dos avanços na pesquisa sobre o secretoma das MSCs, essas são ainda muito recentes e existem desafios a serem superados. A compreensão dos mecanismos de ação e a identificação dos componentes críticos do secretoma são essenciais para o desenvolvimento de terapias baseadas em MSCs para a OA. Além disso, é fundamental investigar os efeitos do secretoma em diferentes estágios da doença e considerar as interações complexas entre as células do tecido cartilaginoso e o microambiente circundante. Assim, o objetivo deste estudo foi explorar o potencial terapêutico do secretoma das MSCs e aprofundar nossa compreensão sobre sua influência no microambiente do tecido cartilaginoso na OA. No capítulo I, apresentaremos uma revisão sistemática sobre os fatores identificados na indução de lesões osteoartriticas em modelos animais. No capítulo II, abordaremos um estudo que avaliou *in vitro* o efeito do secretoma derivado de MSCs em condrócitos articulares.

1.1. Referências bibliográficas

Baberg, F. *et al.* (2019) 'Secretome analysis of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1867(4), pp. 434–441. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2019.01.013>.

Benavides-Castellanos, M.P., Garzón-Orjuela, N. and Linero, I. (2020) 'Effectiveness of mesenchymal stem cell-conditioned medium in bone regeneration in animal and human models: a systematic review and meta-analysis', *Cell Regeneration*, 9(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/S13619-020-00047-3>.

Borrelli, J. *et al.* (2019) 'Understanding Articular Cartilage Injury and Potential Treatments', *Journal of orthopaedic trauma*, 33 Suppl 6, pp. S6–S11. Available at: <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001472>.

Chen, W. *et al.* (2019) 'Conditioned medium of mesenchymal stem cells delays osteoarthritis progression in a rat model by protecting subchondral bone, maintaining matrix homeostasis, and enhancing autophagy', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(9), pp. 1618–1628. Available at: <https://doi.org/10.1002/TERM.2916>.

- Contentin, R. *et al.* (2022) 'Bone Marrow MSC Secretome Increases Equine Articular Chondrocyte Collagen Accumulation and Their Migratory Capacities', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS23105795/S1>.
- Cosenza, S. *et al.* (2017) 'Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis', *Scientific Reports*, 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-017-15376-8>.
- Eleotério, R.B. *et al.* (2016) 'Isolamento, expansão e diferenciação de células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de coelhos', *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(5), pp. 423–430. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000500012>.
- Fan, X.L. *et al.* (2020) 'Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(14), p. 2771. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00018-020-03454-6>.
- Grassel, S. and Muschter, D. (2020) 'Recent advances in the treatment of osteoarthritis', *F1000Research*, 9. Available at: <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.22115.1>.
- Hunter, D.J. and Bierma-Zeinstra, S. (2019) 'Osteoarthritis', *Lancet (London, England)*, 393(10182), pp. 1745–1759. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9).
- Janakiram, N.B. *et al.* (2021) 'The Role of the Inflammatory Response in Mediating Functional Recovery Following Composite Tissue Injuries', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS222413552>.
- Jin, Q.H. *et al.* (2022) 'Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cell-conditioned media inhibited macrophages activation in vitro', *Scientific Reports*, 12(1), p. 4754. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-022-08398-4>.
- Kearney, C.M. *et al.* (2022) 'Treatment Effects of Intra-Articular Allogenic Mesenchymal Stem Cell Secretome in an Equine Model of Joint Inflammation', *Frontiers in Veterinary Science*, 9, p. 907616. Available at: <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.907616/FULL>.
- Klinder, A. *et al.* (2020) 'Influence of Conditioned Media on the Re-Differentiation Capacity of Human Chondrocytes in 3D Spheroid Cultures', *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.3390/JCM9092798>.
- Liu, Y. *et al.* (2018) 'MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit

apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis', *Cell Cycle*, 17(21–22), p. 2411. Available at:

<https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1526603>.

Maumus, M. *et al.* (2013) 'Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis', *Stem Cell Research*, 11(2), pp. 834–844. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2013.05.008>.

Nabavizadeh, S.S. *et al.* (2022) 'Attenuation of osteoarthritis progression through intra-articular injection of a combination of synovial membrane-derived MSCs (SMMSCs), platelet-rich plasma (PRP) and conditioned medium (secretome)', *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 17(1). Available at:

<https://doi.org/10.1186/S13018-021-02851-2>.

Ormazabal, V. *et al.* (2022) 'Secretome from Human Mesenchymal Stem Cells-Derived Endothelial Cells Promotes Wound Healing in a Type-2 Diabetes Mouse Model', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). Available at:

<https://doi.org/10.3390/IJMS23020941/S1>.

Qu, H. and Sun, S. (2021) 'Efficacy of mesenchymal stromal cells for the treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials', *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 16(1). Available at:

<https://doi.org/10.1186/S13018-020-02128-0>.

Rhijn, M.R. *et al.* (2013) 'Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells are Immunosuppressive In vitro and in a Humanized Allograft Rejection Model', *Journal of stem cell research & therapy*, Suppl 6(1).

Available at: <https://doi.org/10.4172/2157-7633.S6-001>.

Sepúlveda, R.V. *et al.* (2020) 'Canine umbilical cord perivascular tissue: A source of stem cells for therapy and research', *Research in Veterinary Science* [Preprint].

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.006>.

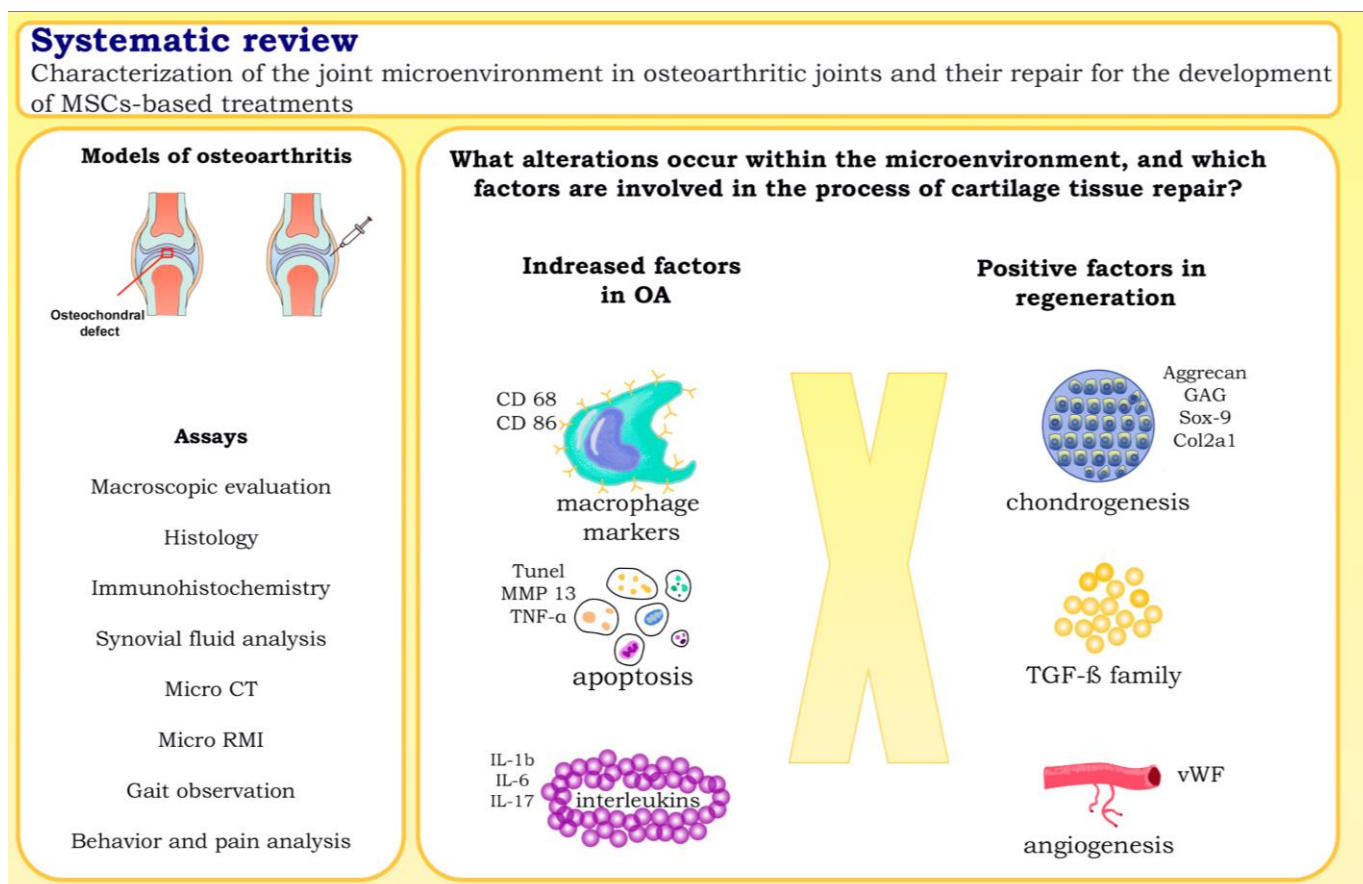
Ulici, V. *et al.* (2022) 'Anatomy, Cartilage', *Hip Joint Restoration*, pp. 15–22. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0694-5_2.

Yang, Y.H.K. *et al.* (2018) 'Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro', *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13287-018-0876-3/FIGURES/9>.

2. CAPÍTULO I

Characterization of the joint microenvironment in osteoarthritic joints and their repair for the development of MSCs-based treatments - Systematic Review

2.1. Graphical abstract



2.2. Abstract

Osteoarthritis is a degenerative joint disease characterized by progressive deterioration of the articular cartilage, leading to pain, stiffness, and loss of joint function. The disease is multifactorial and involves various pathological mechanisms, in which the joint microenvironment plays a crucial role in the development and progression of osteoarthritis. The joint microenvironment is composed of various cells, including chondroblasts, chondrocytes, synovial cells, and immune cells. These cells interact with each other and with the extracellular matrix, secreting a variety of bioactive molecules that can influence joint homeostasis or contribute to osteoarthritis pathology. This study aimed to investigate the factors that are negatively expressed or regulated in a healthy and diseased joint. The search was conducted in the PubMed, Web of

Science, and Scopus databases. The vast majority of studies used smaller animal models. In all studies, the osteoarthritis induction model was performed in the femorotibiopatellar joint. Sample analyses varied widely between studies and included macroscopic analysis, histology, immunohistochemistry, Elisa, micro-computed tomography, micromagnetic resonance, and behavioral and pain analysis. The results of these analyses have identified a range of factors associated with joint inflammation, including macrophage markers, MMP-13, TNF, apoptotic markers, and interleukins. Additionally, factors related to chondrogenesis, such as aggrecan GAG, collagen type II, TGF beta family, and vWF, were also found to be correlated. Modulating the inflammatory process and chondrocyte survival in an osteoarthritic joint may be key points for further research. Based on the findings described in the studies covered by this systematic review, we can conclude that chondrocyte survival is one of the central factors involved in regulating the microenvironment of the articular cartilage.

Keywords: Musculoskeletal disease. Niche. Tissue repair.

2.3. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are greatly known for their regenerative and immunomodulatory effect which has been leading the increasing number of researches on their therapeutic effects on many diseases (Gale *et al.*, 2019; Assi *et al.*, 2023). Osteoarthritis (OA), a degenerative joint disease in which inflammation occurs in a progressive cycle (Kloppenborg and Berenbaum, 2020), is an example in which MSCs have been successfully used for treatment (Chahal *et al.*, 2019). OA is a highly prevalent musculoskeletal disorder that affects approximately 250 million people worldwide (Hunter and Bierma-Zeinstra, 2019). OA can affect any joint but most commonly affects the knee, hands, hip, and spine. In addition to this evident harm to the individual's health, the economic burden of OA for patients and society is considerable (James *et al.*, 2018; Kloppenborg and Berenbaum, 2020), with large expenses related to long-term treatments and the number of people affected, a number that has increased by 48% between 1990 and 2019 (James *et al.*, 2018; Network, 2020).

Cell therapy still carries the concerns of foreign cell transplant, related both to the cell culture and expansion procedures and adverse immune responses (Petrus-Reurer *et al.*, 2021). Since MSCs mostly exert their therapeutic effects through secreted paracrine factors, recently, extracellular vesicles (EVs) have been studied on an effort to develop cell-free therapeutic strategies (Zhang *et al.*, 2020; Hertel *et al.*, 2022; Liang *et al.*, 2022) It has been shown that EVs contain numerous bioactive molecules including lipids, proteins, mRNAs, transfer RNA (tRNA), long noncoding RNAs (lncRNAs), microRNAs (miRNAs) and mitochondrial DNA (mtDNA) (S *et al.*, 2016), which can influence local tissues with regenerative and anti-inflammatory effects (S *et al.*, 2017). D'arrigo *et al.*, (2019) clearly showed this promising field on the systematic review, showing 20 studies on extracellular vesicles for OA treatment. Results showed reduction of inflammatory factors and improvement on cell proliferation in in vitro works and the prevention of cartilage destruction, improvement of subcondral bone integrity and decrease in M2 macrophage infiltration and inflammatory cytokines in animal models.

On thinking about possible benefits of EVs and MSCs as well, these cells are not quiescent in the adult tissues where they reside, but exert functions related to that tissue microenvironment (Caplan, 2009). Even their therapeutic effects have been shown to be affected by the microenvironment from where they are harvested (Gómez-Aristizábal *et al.*, 2012; Yannarelli *et al.*, 2013). Also, upon implantation on cell therapy, MSCs receive information from the microenvironment in which they are implanted and thus respond with the right bioactive factors (Sarugaser *et al.*, 2009). Therefore, therapeutic effects of extracellular vesicles is probably related to the microenvironment in which MSCs cells came from or the conditions where they were cultured in (Hertel *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022). Indeed, Gupta (2022) and Duan (2021) have shown differences on MSCs secretome and their effect as a consequence of different in vitro pre-conditioning methods.

Currently, several characteristics of the OA microenvironment are known, it is clear, however, that the factors present in an osteoarthritic joint need to be better understood. An example of this is the influence that the inflammatory microenvironment can exert when cell therapy is applied to an osteoarthritic joint; cartilage regeneration has been documented but also fibrocartilage or hypertrophied cartilage, tissues that are not the goal of an adequate repair for joint function (Jayasuriya *et al.*, 2016). Similarly, the microenvironment of an osteoarthritic joint in

the process of recovery (reduction in inflammation and/or cartilage regeneration) is still the result of many studies seeking the basis to favor this process. Thus, with this systematic review, we aimed at analyzing the articular microenvironment in an osteoarthritic joint as well as in those undergoing different treatments, seeking to detail the factors involved both in the disease and regeneration which we believe to be the key to developing pre-conditioning methods for future therapies with MSCs and their derived extracellular vesicles.

2.4. Material e methods

2.4.1. Search strategy

This systematic literature review was carried out by two independent authors and conducted following the guidelines of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA). An initial protocol was defined to guide the research:

- a) Population: animal model for induction of articular osteoarthritis;
- b) Intervention: treatment protocols applied directly to the lesion;
- c) Results: description of the microenvironment of a damaged joint in the process of repair.

The search was carried out in PubMed, Web of Science, and Scopus databases. The databases were accessed in March 2021. To achieve maximum sensitivity of the search strategy, we combined the following keywords (strings) with Boolean operators (AND or OR): (cartilage OR chondr*) AND (repair OR regeneration OR healing) AND (niche OR microenvironment)) AND ("growth factor" OR GF OR cytokine). From this research, the studies were analyzed (n= 650 studies) using the StArt software (State of the Art through Systematic Review) developed by the Federal University of São Carlos (UFSCar).

2.4.2. Selection criteria

The studies were selected in three consecutive steps and according to the eligibility criteria chosen by the authors. First, after eliminating duplicates, the titles were selected to assess their eligibility. Then, the articles that met or were considered to meet the criteria had their abstracts evaluated. Sequentially, the selected articles

were retrieved as full texts. In the final step, all studies that reported the outcome of interest were selected. Details are shown in Figure 1.

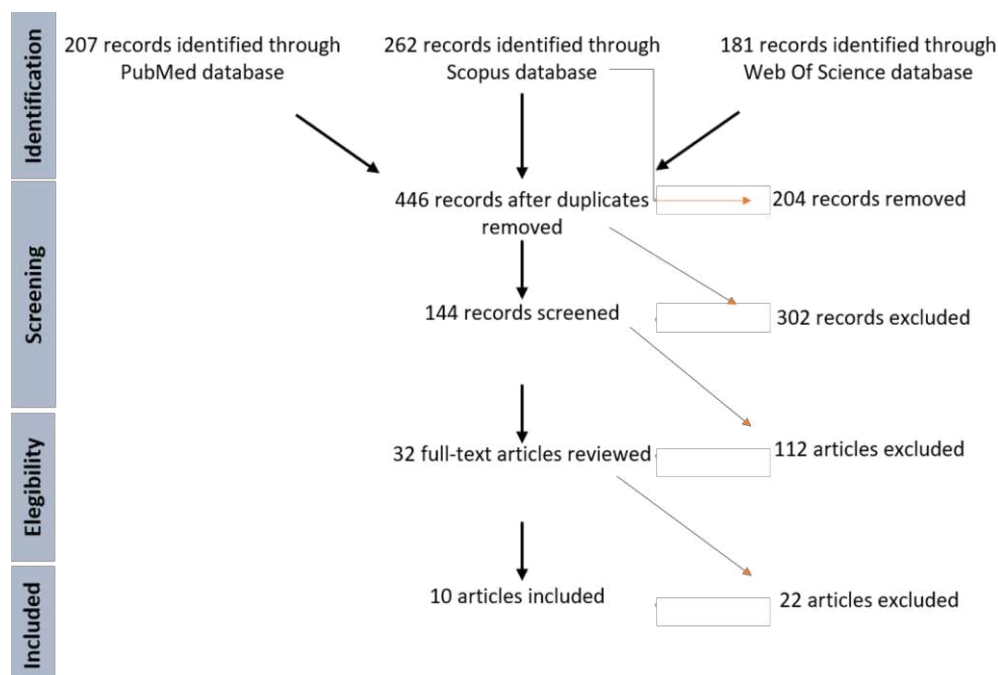


Figure 1: Flowchart of the systematic review execution mechanism.

Studies were considered eligible if they met the following criteria:

- Experimental studies with induction of articular osteoarthritis in an animal model;
- Only studies in English;
- Studies that addressed the description of the in vivo microenvironment/niche for the development of osteoarthritis;
- Studies that had a negative control group.

The following exclusion criteria were defined:

- Studies only in vitro;
- Studies that addressed the microenvironment/niche only in in vitro evaluations.
- Studies that addressed cartilage that was not of the hyaline type;
- Studies that did not have a negative control group.

2.4.3. Data extraction

Qualitative data were extracted from all included articles. Data extracted from each study included: author's name, year of publication, animal model, sample number, OA induction model and anatomical site, types of treatments tested and negative control, application routes and frequency, evaluation timepoints, types of analyzes performed on tissue samples and their results, as follows. The data referring to the control groups were analyzed to understand the factors involved in the disease, comparing them with the factors observed when the treatment resulted in successful cartilage regeneration. Thus, it was possible to define the reduced, normal or increased factors in the presence of the disease without treatment and with the treatment proposed by each study, having as reference the success or not of the performed treatment.

To assess the methodological quality of the included studies, the Risk of Bias (RoB) tool of the Center for Systematic Review for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE) was used (Hooijmans et al. 2014). This tool is based on the Cochrane RoB (Higgins et al. 2011). Each domain will be graded as “low risk”, “unclear” or “high risk” within each domain through evaluations of the following points: 1) Sequence generation - selection bias; 2) Baseline characteristics - selection bias; 3) Allocation concealment - selection bias; 4) Random housing - performance bias; 5) Blinding of participants - performance bias; 6) Evaluation of random results - detection bias; 7) Blinding of results - detection bias; 8) Incomplete result data - attrition bias; 9) Selective reporting - reporting bias, and 10) Other sources of bias.

2.5. Results

Of the 32 studies selected for the extraction phase, 22 of them were excluded for not addressing the joint microenvironment or for not evaluating a control group in comparison with the proposed treatments. Of the ten studies included in this work, eight of them were carried out in the last five years (80%).

Regarding the experimental animal model, five studies used the rabbit as an animal model, four of them the rat and one the swine. As for the induction of OA, one study performed it through the intra-articular injection of monosodium iodoacetate (MIA), two studies through ligament rupture associated with medial meniscus excision, and seven studies through the creation of an osteochondral defect on the joint surface.

In the latter, the diameter and depth of the osteochondral defects varied according to the animal model used, all of which were considered critical size defects for the species in question. In all included studies, OA was induced in the femorotibiopatellar joint uni or bilaterally. Timepoints of euthanasia for collection of joints for analysis varied considerably among studies, with a minimum observation timepoint of two weeks and a maximum of 6 months. Summary information is available in table 1.

Complementary analyzes and tests varied greatly. Of the ten studies included, only one of them performed only a descriptive histological analysis. All others performed their histological analyzes based on techniques already described for classification, score definition and staging of osteoarthritis, as shown in table 2.

Except for one study (Zhou et al. 2006), all others evaluated positive and negative regulators of chondrogenesis (upregulated and downregulated, respectively) in the experimental and control groups. The chondrogenesis regulators evaluated by the studies are listed in table 3.

Table 1: Summary of study characteristics, the animal model used, and OA induction model. N: number of joints evaluated

Authors	N	Animal Model	Time-points (weeks)	OA induction model
Zhou <i>et al.</i> , 2006	16	Porcine	12 and 24	Two bilateral osteochondral defects measuring 8mm in diameter x 6mm in depth in the trochlea.
Chang <i>et al.</i> , 2013	44	Rabbit	4 and 12	A bilateral osteochondral defect measuring 3 mm in diameter x 3 mm in depth in the medial femoral condyle.
Wang <i>et al.</i> , 2017	60	Rabbit	4, 8 and 12	An osteochondral defect measuring 4 mm in diameter and 3 mm in depth in the trochlea.
Han <i>et al.</i> , 2018	8	Rabbit	12	Two osteochondral defects in the same joint measuring 3.5 mm in diameter and 5 mm in depth in the trochlea.
Dai <i>et al.</i> , 2018	36	Rat	6	Ligament rupture and partial bilateral medial meniscus excision
Gan <i>et al.</i> , 2019	10	Rabbit	12	Two unilateral osteochondral defects measuring 3.5 mm in diameter and 5.0 mm in depth in the trochlea.
Chen <i>et al.</i> , 2019	40	Rat	12	A bilateral osteochondral defect measuring 1.6 mm in diameter x 1.6 mm in depth in the trochlea.
Hu <i>et al.</i> , 2019	Value not informed	Rat	7	Ligament rupture and partial bilateral medial meniscus excision

Jiang <i>et al.</i> , 2021	40 16	Rabbit	12 e 24 (rabbits)	An osteochondral defect measuring 3.0 mm in diameter and 1.5 mm in depth in the trochlea.
			10 e 20 days (rats)	An osteochondral defect measuring 2.0 mm in diameter and 1.0 mm deep in the trochlea.
Mou <i>et al.</i> , 2021	45	Rat	2 and 12	Intra-articular injection of monoiodoacetic acid.

Table 2: Results observed in control groups after induced OA in each of the included studies.

BV/TV (ratio between bone volume and tissue volume), BVF (bone volume fraction), CD105 (marker of angiogenesis), CD206 (macrophage marker), CD68 (macrophage marker), CD73 (MSCs marker), CD86 (macrophage marker), GAG (glycosaminoglycan), IL-1 (Interleukin-1), IL-10 (Interleukin-10), IL-17 (Interleukin-17), IL-1b (Interleukin-1 beta), IL-6 (Interleukin-6), MMP13m (Matrix Metalloproteinase 13), MR (M2 macrophage marker), Tb.Th (thickness of the trabecular bone), TGF- β 2 (transforming growth factor beta 2), TGF- β 3 (transforming growth factor beta 3), TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), TUNEL (method for detecting apoptotic DNA fragmentation), vWF (von Willebrand factor), WBI (weight-bearing index), WORMS (Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score).

Authors	Analysis	Time-points (weeks)	Results
(Zhou <i>et al.</i> , 2006)	Macroscopic evaluation	12	There was no repair.
		24	Incomplete repair in a few samples and the majority there was no repair.
		12	Worst indices in the Wakitani and Pineda histological score among the study groups.
		24	Worst indices in the Wakitani and Pineda histological score among the study groups.
(Chang <i>et al.</i> , 2013)	Wayne score macroscopic evaluation (Wayne <i>et al.</i> , 2005)	4	Worst indices in Wayne's macroscopic score among study groups.
		12	Worst indices in Wayne's macroscopic score among study groups.

Micro-CT: BV/TV and Tb.Th.	4	Lower BV/TV and Tb.Th values between study groups.
	12	Lower BV/TV and Tb.Th values between study groups.
Histology: Wayne score (Wayne <i>et al.</i> , 2005) and GAG quantification.	4	Worst indices in Wayne's histological score among study groups. Quantification of GAG did not differ between study groups.
	12	Worst indices in Wayne's histological score among study groups. Lower GAG quantification between study groups.
Immunohistochemistry (type I collagen, type II collagen, SOX9, CD31 e o vWF, TGF-b2 e TGF-b3	4	Lower expression of CD31 and vWF among study groups.
	12	Lower expression of CD31 and vWF among study groups.
(Wang <i>et al.</i> , 2017) Histology: ICRS score (Mainil-Varlet <i>et al.</i> , 2010)	4	Worst indices in the ICRS histological score among the study groups.
	8	Worst indices in the ICRS histological score among the study groups.
	12	Worst indices in the ICRS histological score among the study groups.
Immunohistochemistry: type II collagen	4	Did not express type II collagen

		8	Did not express type II collagen
		12	Did not express type II collagen
Han <i>et al.</i> , 2018	Macroscopic evaluation	12	Worst indices in the ICRS macroscopic score among the study groups
	Histology: O'Driscoll score (O'Driscoll <i>et al.</i> , 2001)	12	Worst indices in the O'Driscoll histological score among the study groups.
	Immunohistochemistry: type II collagen	12	Did not express type II collagen
Dai <i>et al.</i> , 2018	Gait observation	6	After the first six weeks, the control group still presented a painful gait, unlike the other groups.
	Toluidine blue staining histology for GAG labeling.	6	The articular cartilage surface exhibited structural damage, including discontinuities and fractures. Weak tagging for GAG.
	Immunohistochemistry: MMP13, CD68, MR, and TUNEL	6	Strong tagging for MMP13, CD68, and TUNEL analysis. Weak tagging for MR.
	Synovial fluid ELISA: TGF- β 1 and TGF- β 3.	6	Significantly decreased levels of TGF- β 1 and TGF- β 3.
Gan <i>et al.</i> , 2019	Macroscopic evaluation	12	Worst indices in the ICRS macroscopic score among the study groups.
	Histology: O'Driscoll score (O'Driscoll <i>et al.</i> , 2001) with safranin O fast green (GAG) staining.	12	

			Worst indices in O' Driscoll histological score between study groups. Weak tagging for GAG.
Chen <i>et al.</i> , 2019	Macroscopic evaluation	12	Worst indices in the ICRS macroscopic score among the study groups.
	Histology: ICRS score (Mainil-Varlet <i>et al.</i> , 2010)	12	Worst indices in the ICRS histological score among the study groups.
	Immunohistochemistry: collagen type II and MMP13.	12	Weak type II collagen labeling on the defective joint surface and high MMP13 expression.
Hu <i>et al.</i> , 2019	Histology: OARSI score (Pritzker <i>et al.</i> , 2006) with toluidine blue staining and safranin O fast green (GAG)	7	Worst indices in the OARSI histological score among the study groups. Reduced GAG content.
	Immunohistochemistry: TUNEL, type II collagen, aggrecan, MMP-13, CD68, and MR.	7	Low labeling of aggrecan, collagen type II, and MR High marking of MMP-13, CD68, and TUNEL.
	Synovial fluid ELISA (TGF- β 1 and TGF- β 2).	7	Low levels of TGF- β 1 and TGF- β 2.
Jiang <i>et al.</i> , 2021	Macroscopic evaluation	12	Worst indices in the ICRS macroscopic score among the study groups.

	24	Worst indices in the ICRS macroscopic score among the study groups.
Histology: Guo score (Guo <i>et al.</i> , 2010) with safranin O fast green (GAG and collagen).	12	Worst indices in Guo histological score among study groups Weak staining for GAG and collagen.
	24	Worst indices in Guo histological score among study groups Weak staining for GAG and collagen.
Immunohistochemistry: , IL-1, IL-10 and TNF- α , CD206, CD68 and CD86, CD73 and CD105	10 days	Weak labeling for IL-10, CD206 and CD68. Strong tagging for CD86. There was no difference in the labeling of TNF- α , IL-1, CD73, and CD105 between groups.
	20 days	Weak labeling for IL-10, CD206, and CD68. Strong tagging for CD86. There was no difference in the labeling of TNF- α , IL-1, CD73, and CD105 between groups.
Micro-MRI: WORMS.	12	Higher WORMS scores among treated groups.
	24	Higher WORMS scores among treated groups.
Micro-CT: BVF and Tb.Th	12	Lower BVF values and no statistical difference in Tb.Th values between groups.
	24	Lower BVF and Tb.Th values between groups.
Synovial fluid ELISA: TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-17.	2	High expression of TNF- α , IL-1b, IL-6 and IL-17.

Mou <i>et al.</i> , 2021	12	High expression of TNF- α , IL-1b, IL-6, and IL-17.
Histology: Kikuchi score (Kikuchi, Yamada and Shimmei, 1996) with safranin O fast green (GAG) color	2	Worst indices in Kikuchi histological score among study groups Weak scoring for GAG.
	12	Worst indices in Kikuchi histological score among study groups Weak scoring for GAG.
Immunohistochemistry: TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-17.	2	High expression of TNF- α , IL-1b, IL-6, and IL-17.
	12	High expression of TNF- α , IL-1b, IL-6, and IL-17.
Behavior and pain analysis: WBI.	2	Low WBI value
	12	Low WBI value

Tabela 3: List of expressed and unexpressed factors in joints submitted to OA.

Authors	Increased Factors in OA	Decreased factors in OA	Factors without change, regardless of treatment	Factors that increased in chondrogenesis
Chang <i>et al.</i> , 2013		CD31p vWFp GAG		CD31p vWFp GAG Sox9 Type II collagen
Wang <i>et al.</i> , 2017		Type II collagen		Type II collagen
(Han <i>et al.</i> , 2018)		Type II collagen		Type II collagen
Dai <i>et al.</i> , 2018	MMP13 CD68 TUNEL.	GAG MR TGF- β 1 TGF- β 3		GAG MR TGF- β 1 TGF- β 3
Gan <i>et al.</i> , 2019		GAG		GAG
Chen <i>et al.</i> , 2019	MMP13	Type II collagen		Type II collagen

Hu <i>et al.</i> , 2019	MMP-13 CD68 TUNEL	Aggrecan, Type II collagen MR TGF- β 1 TGF- β 2		Aggrecan, Type II collagen MR
Jiang <i>et al.</i> , 2021	CD86	GAG Type II collagen IL-10 CD206 CD68	IL-1 TNF- α CD73 CD105	GAG Type II collagen IL-10 CD206 CD68
Mou <i>et al.</i> , 2021	TNF- α IL-1b IL-6 IL-17	GAG		GAG

Regarding the quality of studies and risk of bias, Figure 2 shows the main characteristics of their assessment. The high proportion of “unclear” scores indicates inadequate reporting of most analyzed items.

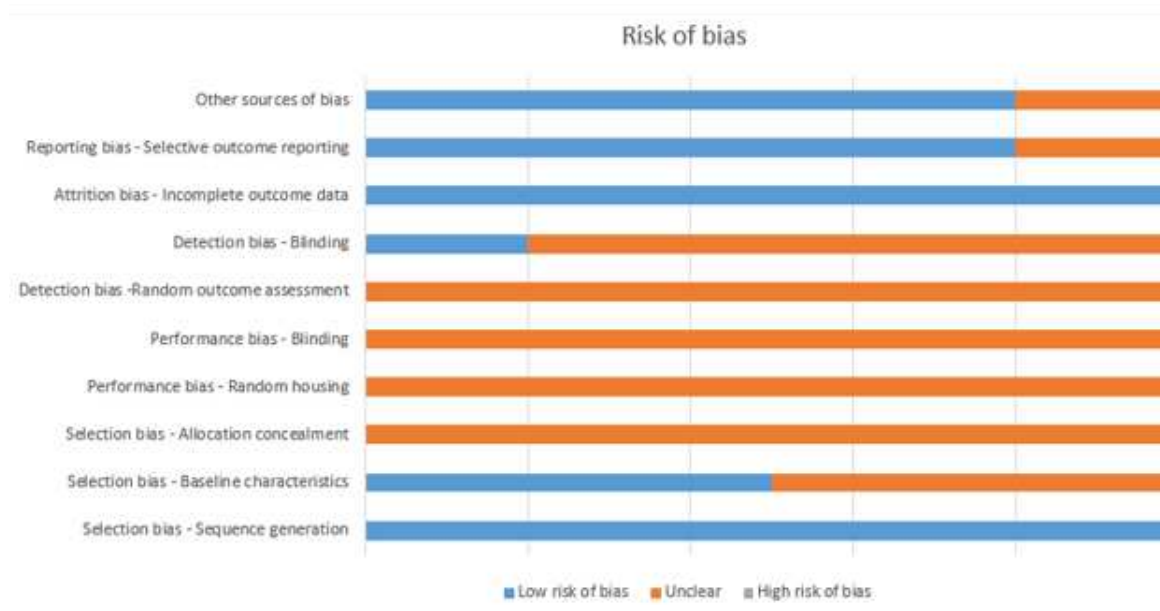


Figure 2: Risk of bias in assessing the methodological quality of the 10 articles included in the systematic review.

Regarding the generation of random sequences, a “low risk” score was identified in all studies. The method used to conceal the allocation has not been reported, but all studies claim that the allocation was performed in a randomized manner. As for baseline characteristics, 50% of the studies were identified as having a “low risk” score for providing complete information regarding animal characteristics and distribution between groups. The others were identified as “unclear” because they concealed some information regarding the characteristics of the animals or did not describe whether they carried out an equal distribution in the groups regarding the gender of the animals when using animals of both sexes. As for allocation concealment, random housing, blinding of participants, and evaluation of random outcomes, all studies were identified with a score of “unclear” because they did not provide information that would allow this assessment to be made. As for the blinding of the results, 20% of the studies were identified with an “unclear” score because they did not report whether the evaluators were blinded, while the majority, 80%, did so, being classified as “low risk”. All studies were identified with a “low risk” score for the incomplete data of the results, since they provided the results of all evaluated groups.

A “low risk” score was also assigned to selective report, as 80% of the studies provided information on the protocols. As for other sources of bias, 20% of the studies were identified with an “unclear” score as they did not provide quantitative or descriptive data regarding the findings in immunohistochemistry, providing only microscopic images.

2.6. Discussion

Before discussing the main objective of the present study, OA microenvironment, the methodological quality of the studies must be assessed. The risk of bias analysis showed an overall low or unclear risk, with no high risk reported. Among the methodological variations among the studies, we consider animal models and evaluation methods to be the ones with a greater probability to interfere on the reported results.

On the animal models, each model presents advantages and disadvantages, the choice depending on the specific objectives of each work, which must be analyzed since it could be a source for diverging or at least different results. Most studies used smaller animal models, such as rats and rabbits, possibly focusing on the shorter time required for OA changes. Smaller animal models are much easier to handle, allow for quick experimental study, generate lower maintenance costs, and are more easily accessible than larger animal models (horses, pigs, and dogs) (Little and Smith, 2008; Kuyinu *et al.*, 2016). However, they may not allow an adequate collection of tissue samples due to their small size and tend to differ to a greater extent in their anatomical and histological structure when compared to humans (McCoy, 2015). Another aspect is the longer lifetime of larger animal models, which allows for a slower progression of the disease and more time to assess the stages of OA, similar to what is observed in humans. Only the study by Zhou (2006) (Zhou *et al.*, 2006) used swine, probably to be able to assess the progression of OA over a longer period of time (24 weeks). However, larger animal models are more costly and their studies take longer to conduct. Overall, no aspect of any of the used animal models negatively interfered with the results on microenvironment evaluation.

Also, evaluation methods must be consistently considered once results are highly dependent on their accuracy. All studies in this review performed histological analysis of joint tissue samples, as well as macroscopic evaluation, both important to relate the microenvironment factors to the stage of OA evaluated. Several histological scoring systems for staging and classifying OA can be found to be applied universally

in any OA induction model, mainly joint instability, enzymatic-induced degradation, or critical osteochondral defect (Glasson *et al.*, 2010). The most widely used histological scoring systems are Pineda (Pineda *et al.*, 1992), Wakitani (S Wakitani *et al.*, 1994), Kikuchi (Kikuchi, Yamada and Shimmei, 1996), O'Driscoll (O'Driscoll *et al.*, 2001), Wayne (Wayne *et al.*, 2005), OARSI (Pritzker *et al.*, 2006), ICRS (Mainil-Varlet *et al.*, 2010), and Guo (Guo *et al.*, 2010). No predominance of any of these systems was observed.

Based on the findings of control groups of the studies in this review, it was clear that upon triggering factors, mostly an exogenous substance, joint instability, or critical osteochondral defect, the joint is unable to recover its structural and functional integrity if it does not receive adequate therapy. This is evident by the findings of fibrocartilage, tissue disorganization, joint surface irregularity, poor score in histological OA staging scores, increased expression of negative chondrogenesis regulators, and decreased expression of positive chondrogenesis regulators or of those that should be expressed in a normal joint. In such microenvironment, the negative regulators of chondrogenesis that had high expression were MMP13 (Dai *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019; Y. Chen *et al.*, 2019), CD68 (Dai *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019), apoptosis markers (Dai *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019), CD86 (Jiang *et al.*, 2021), TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-17 (Mou *et al.*, 2021). Of these, the main ones are the pro-inflammatory cytokines, fundamental mediators of the onset and progression of OA, many related to macrophages. For instance, macrophages are the main producers of TNF α and, interestingly, are also highly responsive to TNF α (Parameswaran and Patial, 2010). IL-1 β is an important macrophage-derived pro-inflammatory cytokine that acts primarily through the induction of a cytokine network (Dinarello, 2009). IL-6 plays an important role in macrophage polarization (Chen *et al.*, 2018) and IL-17 is involved in macrophage activation (Nakai *et al.*, 2017). These show the importance of macrophage and their products for the OA microenvironment and should be taken into account when designing an in vitro pre-conditioning method.

Macrophages are among the variety of immune system cells included in the regulation of the inflammatory process. Macrophages are phagocytic cells that can be found in almost every tissue. There is growing evidence to suggest that macrophages may be strongly involved in modulating inflammation in osteoarthritic joints through the secretion of inflammatory mediators (Wu *et al.*, 2020), an information reinforced by what was shown in this review. Depending on the signaling, macrophages can present two

phenotypes: a) M1 type macrophages that are pro-inflammatory; b) M2 type macrophages which are anti-inflammatory and pro-resolving. The imbalance between these two phenotypes can lead to chronic inflammation and has been identified as essential in the development of OA because they can differentially modulate the anabolic or catabolic responses of different cell types with the onset or progression of OA (Xie *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020). Type M1 macrophages secrete, in addition to inflammatory cytokines, cartilage matrix degradation enzymes, including MMPs, leading to cartilage degeneration (Gómez-Aristizábal *et al.*, 2019). Macrophages with M2 anti-inflammatory phenotype promote responses that fight inflammation and are subdivided into M2a (induced by IL-4 and IL-13), M2b (induced by TLR agonists), and M2c (induced by IL-10) (M, B and JL, 2008). Therefore, when designing an in vitro system for MSCs pre-conditioning aiming at obtaining extracellular vesicles to favor cartilage repair, a suitable strategy would be the co-culture of MSCs with M2 macrophages, always avoiding the pro-inflammatory M1 macrophages and their factors such as IL-1b and IL-6. Indeed, numerous co-culture systems with macrophages have been described (Jackson and Krasnodembskaya, 2017; Caires *et al.*, 2018; Dymowska *et al.*, 2021).

Importantly, there are a large number of commonly used macrophage markers such as CD14, CD16, CD64, CD68, CD71, and CCR5. The exact marker to use will depend on the macrophage subset and conditions in your local environment. CD80, CD68, and iNOS markers are expressed on M1 macrophages; the markers CD163 and CD200r are expressed in the M2a phenotype; CD86 and MHCII markers are expressed by both M1 and M2b macrophages; the M2c macrophages express the markers CD163, TLR1, and TLR8. There are few unique macrophage markers, and often multiple markers will be needed to identify your cell type (*Macrophages & their Markers* / Bio-Rad, no date). In this review, we could observe that some studies included in their analysis the evaluation of the expression of macrophage surface markers (CD68), M1 macrophage markers (CD86), and M2 macrophage markers (MR), the first two increased in OA and MR decreased in OA and increased in chondrogenesis. They also evaluated the expression of macrophage and cytokine products (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, and MMP13), all increased in OA (detailed information in table 3). This information is essential for us to understand the mechanisms involved in the progression of OA and the evolution of the repair process of articular cartilage tissue exposed to an inflammatory microenvironment. However,

most studies used a small number to characterize the macrophage phenotype, although multiple markers are needed to identify cell type. Therefore, with the complexity of co-culture systems and macrophage phenotyping, when designing an in vitro microenvironment for MSCs preconditioning, a suitable strategy to be explored is the direct use factors produced by M2 macrophages.

In addition to cytokine and macrophage analysis, TUNEL analysis was also performed by Guillaume-Jugnot *et al.*, (2016). Dai *et al.*, (2018) and Hu *et al.*, (2019) shown to be increased in OA, as it allows the detection of apoptotic cells, thus helping to assess the evolution of the disease (Kyrylkova *et al.*, 2012). Evidence indicates that cell death may be an important factor in the early stages of OA development and its perpetuation, what may also contribute with the microenvironment signaling. Accordingly, a strategy to be explored for OA treatment would be the prevention of cell death using the manipulation of the microenvironment, including MSCs and their products.

Therapeutic modalities analyzed by the studies included in this review were highly variable, including biomaterials (Han *et al.*, 2018; Mou *et al.*, 2021), cell therapy (Zhou *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2013), growth factors (Wang *et al.*, 2017; Gan *et al.*, 2019; Y. Chen *et al.*, 2019), collagen (Dai *et al.*, 2018), flavonoids (Hu *et al.*, 2019) and exosomes (Jiang *et al.*, 2021). These treatments, despite being very promising, did not achieve complete regeneration of the articular cartilage, a fact mainly observed when compared to the sham/normal group (Chang *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2021). However, these results are here analyzed not only for the treatment itself but from another perspective: assessing the microenvironment of these repair processes, identifying the factors related to regeneration to mimic this successful microenvironment in vitro for the development of treatment options, including MSCs and their derived products.

Many studies included in this review evaluated the expression of aggrecan, GAG, type II collagen, and Sox9 in normal joints, untreated osteoarthritic joints, and osteoarthritic joints treated with therapies that were shown to be chondrogenic. In the presence of OA these factors were found decreased or not expressed, contrary to what has been reported in normal and treated joints, in which these factors are highly expressed. Most of these factors are related to chondrocyte activity, such as Sox9, an important transcription factor that regulates chondrocyte differentiation, remaining expressed throughout life in resident chondrocytes of healthy articular cartilage. It is

essential in normal chondrogenesis for being responsible for chondrogenic lineage compromise, promoting cell survival, and regulating genes responsible for the structural components and specific regulatory factors of cartilage (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2017). In turn, aggrecan, GAG, and type II collagen constitute the majority of the extracellular matrix (ECM) components of whole articular cartilage (Gomes, Farach-Carson and Carson, 2004), with some of the MEC component proteins being regulated by Sox9, including type II collagen. Type II collagen expression is necessary for chondrocyte differentiation (Vandenberg *et al.*, 1991). Aggrecan is a large proteoglycan that gives articular cartilage the ability to support loads and possesses a central protein with covalently linked GAG chains (Watanabe, Yamada and Kimata, 1998; Roughley and Mort, 2014).

Also among the important factors for the activity of chondrocytes is transforming growth factor β (TGF β) superfamily, which regulates their activity (Thielen, van der Kraan and van Caam, 2019) in addition to controlling the development of articular cartilage tissue (Sophia Fox, Bedi and Rodeo, 2009). The three types of TGF β s found in mammals are TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3, each encoded by a different gene (Ogawa *et al.*, no date), and all forms are produced and secreted by chondrocytes (Pombo-Suarez *et al.*, 2009). Furthermore, its signaling is directly associated with the synthesis and maintenance of ECM of the cartilage tissue, increasing the synthesis of proteoglycans (Blaney Davidson *et al.*, 2006) and the neutralization of pro-inflammatory signaling mediated by IL-1 (Takahashi *et al.*, 2005). Another important role played by TGF β is that of regulating and blocking hypertrophy in chondrocytes (Yang *et al.*, 2001). These data corroborate the results found by Dai (2018) e Hu (2019). In both studies, in the presence of an osteoarthritic joint in which there was mostly formation of fibrotic tissue, the expression of TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3 were very low, in contrast to what is found in sham/normal joints (significant expression of TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 and type II collagen).

CD31 and vWF are the most common endothelial cell markers (Mbagwu and Filgueira, 2020). The study by Chang (2013) demonstrated a decreased expression of both CD31 and vWF in OA and increased in chondrogenesis, in the later, the presence of neovascularization coming from the subchondral bone. Tissue pre-vascularization is indicated by the presence of a network of endothelial cells, which facilitate remodeling and regeneration (Tsigkou *et al.*, 2010). Therefore, these authors indirectly evaluated the repair process, evaluating angiogenesis for MSCs direct implantation or

for extracellular vesicles isolation. Indeed, these strategies have started to be explored, showing promising results (Tan *et al.*, 2021). However, they still need to be studied in detail so to better understand their effect and to assess its clinical usefulness. All these positive regulators of chondrogenesis and chondrocyte activity may be the potential targets for the development of therapeutic strategies on the development of treatments with MSCs. These markers can be studied to mimic *in vitro* a successful microenvironment for cartilage regeneration, i.e., the pre-condition factor in order to obtain adequate MSCs directed to cartilage repair for both MSC implantation or to isolate extracellular vesicles from MSCs. Different approaches have been applied to regulate exosome composition and function, such as pre-conditioning of parental cells, for example. A study using MSCs loaded with curcumin revealed that exosomes derived from this pre-conditioned microenvironment reduced the expression of pro-inflammatory mediators including IL-6, TNF- α , MMP1, and PGE2 (He *et al.*, 2023). Similar findings were observed with the use of kartogenin which besides that, increased the expression of chondrogenic genes (aggrecan, Collagen II and SOX9) (Xie *et al.*, 2022). Other factors extensively described like pretreatment of parent cells are the ones of the TGF beta family (Nakazaki *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2022; Yoo *et al.*, 2022).

Physical activity and joint mobility play a crucial role in preserving joint health and preventing or managing OA (Hurley *et al.*, 2018). Only two studies have conducted behavioral and pain posture analyses in this context. Dai (2018) examined the gait of animals with OA, and Mou (2021) evaluated pain and behavior. The restoration of function in the affected limb is one of the main treatment goals for OA, making these parameters essential to be analyzed in OA therapies.

Numerous works have shown how MSCs respond to the microenvironment and, for cartilage, a great example is the work from (Sarugaser *et al.*, 2009). Upon a single MSCs implantation in an osteochondral defect *in vivo* model, MSCs adherent on the metaphysis favored bone formation and the ones adherent to the growth plate favored new chondroblast. Therefore, it is to expect that MSCs receiving the signaling of positive regulators of chondrogenesis in the culture medium, like TGF- β 1 and TGF- β 3, or as a matrix, like type II collagen or aggrecan, or even as a co-culture with M2 macrophages, would then be directed to produce extracellular vesicles favoring chondrogenesis. Not only this, pre-conditioning methods can be developed targeting the increase of these factors in MSCs culture. However, many aspects may affect

MSCs pre-conditioning and extracellular vesicles production, not only the soluble factors but their combination, dosage and period of treatment, for example. All these must be the objective of future studies, aiming at promoting the best standardized method for MSCs commitment and extracellular vesicles production for OA treatment.

2.7. Conclusion

After this extensive evaluation, we can consider that controlling the inflammatory process and the mechanisms of chondrocytes survival and the maintenance of their activity are the key points for further research on OA treatment strategies. This is a direct consequence of the fact that the negative regulatory factors of chondrogenesis present in inflammation (MMP13, CD68, CD86, TUNEL, TNF- α , IL-1b, IL-6, and IL-17) are intimately and inversely associated with the expression of factors shown to be indicative of a good evolution in regeneration (aggrecan, GAG, Sox9, Type II collagen, MR, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, IL-10, and CD206). Considering future strategies for MSCs-based therapies, upon the findings of our systematic review, we can consider that chondrocyte survival and the maintenance of their activity is one of the central points involved in the regulation of the articular cartilage microenvironment.

2.8. References

- Assi, R. *et al.* (2023) 'Innovation in Targeted Intra-articular Therapies for Osteoarthritis', *Drugs*, 83(8), pp. 649–663. Available at: <https://doi.org/10.1007/S40265-023-01863-Y/METRICS>.
- Blaney Davidson, E.N. *et al.* (2006) 'TGF β -induced cartilage repair is maintained but fibrosis is blocked in the presence of Smad7', *Arthritis Research and Therapy*, 8(3), p. R65. Available at: <https://doi.org/10.1186/ar1931>.
- Caires, H.R. *et al.* (2018) 'A co-culture system with three different primary human cell populations reveals that biomaterials and MSC modulate macrophage-driven fibroblast recruitment', *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(3), pp. e1433–e1440. Available at: <https://doi.org/10.1002/TERM.2560>.
- Caplan, A.I. (2009) 'Why are MSCs therapeutic? New data: new insight', *The Journal of pathology*, 217(2), pp. 318–324. Available at: <https://doi.org/10.1002/PATH.2469>.
- Chahal, J. *et al.* (2019) 'Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Osteoarthritis Results in Overall Improvement in Pain and Symptoms and Reduces

Synovial Inflammation.’, *Stem cells translational medicine* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0183>.

Chang, N.J. *et al.* (2013) ‘Transplantation of autologous endothelial progenitor cells in porous PLGA scaffolds create a microenvironment for the regeneration of hyaline cartilage in rabbits’, *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(10), pp. 1613–1622. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.07.016>.

Chen, L. *et al.* (2018) ‘IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor’, *Oncotarget*, 9(25), pp. 17443–17454. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24734>.

Chen, Y. *et al.* (2019) ‘Sustained Release SDF-1 α /TGF- β 1-Loaded Silk Fibroin-Porous Gelatin Scaffold Promotes Cartilage Repair’, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(16), pp. 14608–14618. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.9b01532>.

D’arrigo, D. *et al.* (2019) ‘Secretome and Extracellular Vesicles as New Biological Therapies for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review’, *Journal of clinical medicine*, 8(11). Available at: <https://doi.org/10.3390/JCM8111867>.

Dai, M. *et al.* (2018) ‘Cartilage repair in degenerative osteoarthritis mediated by squid type II collagen via immunomodulating activation of M2 macrophages, inhibiting apoptosis and hypertrophy of chondrocytes’, *Biomaterials*, 180, pp. 91–103. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.011>.

Dinarello, C.A. (2009) ‘Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family’, *Annual Review of Immunology*, pp. 519–550. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.

Duan, A. *et al.* (2021) ‘Extracellular vesicles derived from LPS-preconditioned human synovial mesenchymal stem cells inhibit extracellular matrix degradation and prevent osteoarthritis of the knee in a mouse model’, *Stem cell research & therapy*, 12(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02507-2>.

Dymowska, M. *et al.* (2021) ‘Interaction between Macrophages and Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Wharton’s Jelly—A Comparative Study’, *Pharmaceutics*, 13(11). Available at: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13111822>.

Gale, A.L. *et al.* (2019) ‘Comparison of the Chondrogenic Differentiation Potential of Equine Synovial Membrane-Derived and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells’, *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JUN), p. 178. Available at:

<https://doi.org/10.3389/FVETS.2019.00178>.

Gan, D. *et al.* (2019) 'Mussel-inspired dopamine oligomer intercalated tough and resilient gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels for cartilage regeneration', *Journal of Materials Chemistry B*, 7(10), pp. 1716–1725. Available at:

<https://doi.org/10.1039/c8tb01664j>.

Glasson, S.S. *et al.* (2010) 'The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse', *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(SUPPL. 3). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.05.025>.

Gomes, R.R., Farach-Carson, M.C. and Carson, D.D. (2004) 'Perlecan Functions in Chondrogenesis: Insights from in vitro and in vivo Models', in *Cells Tissues Organs*. Cells Tissues Organs, pp. 79–86. Available at: <https://doi.org/10.1159/000075029>.

Gómez-Aristizábal, A. *et al.* (2012) 'Effects of two mesenchymal cell populations on hepatocytes and lymphocytes', *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 18(11), pp. 1384–1394. Available at:

<https://doi.org/10.1002/LT.23500>.

Gómez-Aristizábal, A. *et al.* (2019) 'Synovial fluid monocyte/macrophage subsets and their correlation to patient-reported outcomes in osteoarthritic patients: A cohort study', *Arthritis Research and Therapy*, 21(1). Available at:

<https://doi.org/10.1186/s13075-018-1798-2>.

Guillaume-Jugnot, P. *et al.* (2016) 'State of the art. Autologous fat graft and adipose tissue-derived stromal vascular fraction injection for hand therapy in systemic sclerosis patients.', *Current research in translational medicine*, 64(1), pp. 35–42.

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.01.006>.

Guo, X. *et al.* (2010) 'Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model', *Acta Biomaterialia*, 6(1), pp. 39–47. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.07.041>.

Gupta, S. *et al.* (2022) 'Hypoxia preconditioning elicit differential response in tissue-specific MSCs via immunomodulation and exosomal secretion', *Cell and tissue research*, 388(3), pp. 535–548. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00441-022-03615-Y>.

Han, L. *et al.* (2018) 'Mussel-Inspired Tissue-Adhesive Hydrogel Based on the Polydopamine-Chondroitin Sulfate Complex for Growth-Factor-Free Cartilage

Regeneration', *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(33), pp. 28015–28026. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.8b05314>.

Han, T. *et al.* (2022) 'MSC secreted extracellular vesicles carrying TGF-beta upregulate Smad 6 expression and promote the regrowth of neurons in spinal cord injured rats', *Stem cell reviews and reports*, 18(3), pp. 1078–1096. Available at: <https://doi.org/10.1007/S12015-021-10219-6>.

He, X. *et al.* (2023) 'Curcumin-Loaded Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Efficiently Attenuate Proliferation and Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes', *Applied biochemistry and biotechnology*, 195(1), pp. 51–67. Available at: <https://doi.org/10.1007/S12010-022-04090-5>.

Hertel, F.C. *et al.* (2022) 'Preconditioning Methods to Improve Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in Bone Regeneration-A Systematic Review', *Biology*, 11(5). Available at: <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11050733>.

Hu, Y. *et al.* (2019) 'Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages', *Free Radical Biology and Medicine*, 145, pp. 146–160. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.024>.

Hunter, D.J. and Bierma-Zeinstra, S. (2019) 'Osteoarthritis', *Lancet (London, England)*, 393(10182), pp. 1745–1759. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9).

Jackson, M. and Krasnodembskaya, A. (2017) 'Analysis of Mitochondrial Transfer in Direct Co-cultures of Human Monocyte-derived Macrophages (MDM) and Mesenchymal Stem Cells (MSC)', *Bio-protocol*, 7(9). Available at: <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.2255>.

James, S.L. *et al.* (2018) 'Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017', *The Lancet*, 392(10159), pp. 1789–1858. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7).

Jayasuriya, C.T. *et al.* (2016) 'The influence of tissue microenvironment on stem cell-based cartilage repair', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1383(1), pp. 21–33. Available at: <https://doi.org/10.1111/nyas.13170>.

Jiang, S. *et al.* (2021) 'Enhancement of acellular cartilage matrix scaffold by Wharton's jelly mesenchymal stem cell-derived exosomes to promote osteochondral

- regeneration', *Bioactive Materials*, 6(9), pp. 2711–2728. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.01.031>.
- Kikuchi, T., Yamada, H. and Shimmei, M. (1996) 'Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis', *Osteoarthritis and Cartilage*, 4(2), pp. 99–110. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(05\)80319-X](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(05)80319-X).
- Kloppenburg, M. and Berenbaum, F. (2020) 'Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy', *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd, pp. 242–248. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.01.002>.
- Kuyinu, E.L. *et al.* (2016) 'Animal models of osteoarthritis: Classification, update, and measurement of outcomes', *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. BioMed Central Ltd., pp. 1–27. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13018-016-0346-5>.
- Kyrylkova, K. *et al.* (2012) 'Detection of apoptosis by TUNEL assay', *Methods in Molecular Biology*, 887, pp. 41–47. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-860-3_5.
- Lefebvre, V. and Dvir-Ginzberg, M. (2017) 'SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage', *Connective Tissue Research*. Taylor and Francis Ltd, pp. 2–14. Available at: <https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1183667>.
- Liang, Y. *et al.* (2022) 'Chondrocyte-specific genomic editing enabled by hybrid exosomes for osteoarthritis treatment', *Theranostics*, 12(11), p. 4866. Available at: <https://doi.org/10.7150/THNO.69368>.
- Little, C. and Smith, M. (2008) 'Animal Models of Osteoarthritis', *Current Rheumatology Reviews*, 4(3), pp. 175–182. Available at: <https://doi.org/10.2174/157339708785133523>.
- M, B., B, D. and JL, M. (2008) 'Macrophage polarization in bacterial infections', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6), pp. 3733–3739. Available at: <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.6.3733>.
- Macrophages & their Markers | Bio-Rad* (no date). Available at: <https://www.bio-rad-antibodies.com/macrophage-m1-m2-tam-tcr-cd169-cd-markers-antibodies.html> (Accessed: 22 October 2021).
- Mainil-Varlet, P. *et al.* (2010) 'A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II', *American Journal of Sports Medicine*, 38(5), pp. 880–890. Available at: <https://doi.org/10.1177/0363546509359068>.
- Mbagwu, S.I. and Filgueira, L. (2020) 'Differential expression of CD31 and von

- willebrand factor on endothelial cells in different regions of the human brain: Potential implications for cerebral malaria pathogenesis', *Brain Sciences*, 10(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/brainsci10010031>.
- McCoy, A.M. (2015) 'Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations', *Veterinary Pathology*, 52(5), pp. 803–818. Available at: <https://doi.org/10.1177/0300985815588611>.
- Mou, D. *et al.* (2021) 'Intra-articular Injection of Chitosan-Based Supramolecular Hydrogel for Osteoarthritis Treatment', *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 18(1), pp. 113–125. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00322-z>.
- Nakai, K. *et al.* (2017) 'IL-17A induces heterogeneous macrophages, and it does not alter the effects of lipopolysaccharides on macrophage activation in the skin of mice', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12756-y>.
- Nakazaki, M. *et al.* (2021) 'Small extracellular vesicles released by infused mesenchymal stromal cells target M2 macrophages and promote TGF- β upregulation, microvascular stabilization and functional recovery in a rodent model of severe spinal cord injury', *Journal of extracellular vesicles*, 10(11). Available at: <https://doi.org/10.1002/JEV2.12137>.
- Network, G.B. of D.C. (2020) 'Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) results. Osteoarthritis —level 3 cause'.
- O'Driscoll, S.W. *et al.* (2001) 'Validation of a simple histological-histochemical cartilage scoring system', *Tissue Engineering*, 7(3), pp. 313–320. Available at: <https://doi.org/10.1089/10763270152044170>.
- Ogawa, Y. *et al.* (no date) 'Purification and characterization of transforming growth factor-beta 2.3 and-beta 1.2 heterodimers from bovine bone.', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818458814> (Accessed: 9 April 2021).
- Parameswaran, N. and Patial, S. (2010) 'Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages', *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. Begell House Inc., pp. 87–103. Available at: <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10>.
- Petrus-Reurer, S. *et al.* (2021) 'Immunological considerations and challenges for regenerative cellular therapies', *Communications Biology*, 4(1), p. 798. Available at: <https://doi.org/10.1038/S42003-021-02237-4>.

- Pineda, S. *et al.* (1992) 'A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair', *Cells Tissues Organs*, 143(4), pp. 335–340. Available at: <https://doi.org/10.1159/000147272>.
- Pombo-Suarez, M. *et al.* (2009) 'Differential upregulation of the three transforming growth factor beta isoforms in human osteoarthritic cartilage', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(4), pp. 568–571. Available at: <https://doi.org/10.1136/ard.2008.090217>.
- Pritzker, K.P.H. *et al.* (2006) 'Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging', *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(1), pp. 13–29. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014>.
- Roughley, P.J. and Mort, J.S. (2014) 'The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage', *Journal of Experimental Orthopaedics*, 1(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40634-014-0008-7>.
- S, C. *et al.* (2017) 'Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis', *Scientific reports*, 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-017-15376-8>.
- S, K. *et al.* (2016) 'ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo', *Journal of molecular biology*, 428(4). Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2015.09.019>.
- Sarugaser, R. *et al.* (2009) 'Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy', *PloS one*, 4(8). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006498>.
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A. and Rodeo, S.A. (2009) 'The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function', *Sports Health* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>.
- Takahashi, N. *et al.* (2005) 'Elucidation of IL-1/TGF- β interactions in mouse chondrocyte cell line by genome-wide gene expression¹', *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(5), pp. 426–438. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.12.010>.
- Tan, S.S.H. *et al.* (2021) 'Mesenchymal Stem Cell Exosomes for Cartilage Regeneration: A Systematic Review of Preclinical In Vivo Studies', <https://home.liebertpub.com/teb>, 27(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2019.0326>.
- Teeple, E. *et al.* (2013) 'Animal models of osteoarthritis: Challenges of model

selection and analysis', *AAPS Journal*. AAPS J, pp. 438–446. Available at:

<https://doi.org/10.1208/s12248-013-9454-x>.

Thielen, N.G.M., van der Kraan, P.M. and van Caam, A.P.M. (2019) 'TGF β /BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis', *Cells*. NLM (Medline). Available at:

<https://doi.org/10.3390/cells8090969>.

Tsigkou, O. *et al.* (2010) 'Engineered vascularized bone grafts', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), pp. 3311–3316. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0905445107>.

Vandenberg, P. *et al.* (1991) 'Expression of a partially deleted gene of human type II procollagen (COL2A1) in transgenic mice produces a chondrodysplasia',

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88(17), pp. 7640–7644. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7640>.

Wakitani, S *et al.* (1994) 'Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage.', *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 76(4), pp. 579–592.

Wakitani, S. *et al.* (1994) 'Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage', *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 76(4), pp. 579–592. Available at: <https://doi.org/10.2106/00004623-199404000-00013>.

Wang, Y. *et al.* (2017) 'Stromal Cell-Derived Factor-1 Accelerates Cartilage Defect Repairing by Recruiting Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Promoting Chondrogenic Differentiation', *Tissue Engineering - Part A*, 23(19–20), pp. 1160–1168. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0046>.

Watanabe, H., Yamada, Y. and Kimata, K. (1998) 'Roles of Aggrecan, a Large Chondroitin Sulfate Proteoglycan, in Cartilage Structure and Function', *Journal of Biochemistry*, 124(4), pp. 687–693. Available at:

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022166>.

Wayne, J.S. *et al.* (2005) 'In vivo response of polylactic acid-alginate scaffolds and bone marrow-derived cells for cartilage tissue engineering', in *Tissue Engineering*. Tissue Eng, pp. 953–963. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.953>.

Wu, C.L. *et al.* (2020) 'The role of macrophages in osteoarthritis and cartilage repair', *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd, pp. 544–554. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.12.007>.

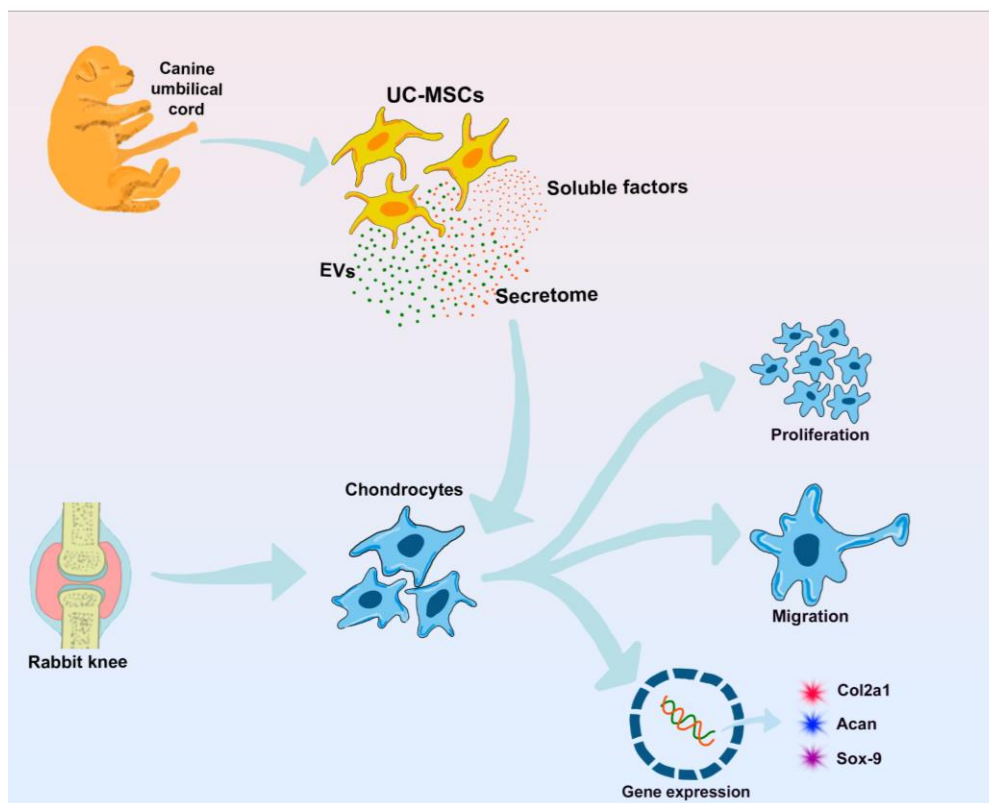
Xie, A. *et al.* (2022) 'Kartogenin Induced Adipose-Derived Stem Cell Exosomes Enhance the Chondrogenic Differentiation Ability of Adipose-Derived Stem Cells',

- Disease Markers*, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/6943630>.
- Xie, J. *et al.* (2019) 'Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee', *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd, pp. 36–44. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.03.004>.
- Yang, X. *et al.* (2001) 'TGF- β /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage', *Journal of Cell Biology*, 153(1), pp. 35–46. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.153.1.35>.
- Yannarelli, G. *et al.* (2013) 'Human umbilical cord perivascular cells exhibit enhanced cardiomyocyte reprogramming and cardiac function after experimental acute myocardial infarction', *Cell transplantation*, 22(9), pp. 1651–1666. Available at: <https://doi.org/10.3727/096368912X657675>.
- Yoo, K.H.O. *et al.* (2022) 'Transforming growth factor- β family and stem cell-derived exosome therapeutic treatment in osteoarthritis (Review)', *International Journal of Molecular Medicine*, 49(5), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3892/IJMM.2022.5118/HTML>.
- Zhang, B. *et al.* (2022) 'Hypoxia-Preconditioned Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells Improve Cartilage Repair in Osteoarthritis', *Membranes*, 12(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES12020225>.
- Zhang, J. *et al.* (2020) 'Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization', *Aging (Albany NY)*, 12(24), p. 25138. Available at: <https://doi.org/10.18632/AGING.104110>.
- Zhou, G. *et al.* (2006) 'Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells', *Tissue Engineering*, 12(11), pp. 3209–3221. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.3209>.

3. CAPÍTULO II

Secretoma de células estromais mesenquimais perivasculares do cordão umbilical canino para regeneração da cartilagem.

3.1. Resumo gráfico



3.2. Resumo

A osteoartrite (OA) é uma doença articular degenerativa que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar dos avanços no tratamento da osteoartrite, ainda não existe uma cura definitiva para essa condição debilitante. Recentemente, tem havido um crescente interesse no uso do secretoma e fatores solúveis de células estromais mesenquimais (MSCs) como uma abordagem terapêutica promissora para a OA. O secretoma de MSCs consiste em uma combinação de moléculas bioativas secretadas pelas células, como fatores de crescimento, citocinas, microRNAs e vesículas extracelulares (VEs). Essas substâncias têm a capacidade de modular o microambiente articular, influenciando processos celulares, como a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células presentes na articulação. Neste estudo, foram analisados o secretoma e a fração solúvel de MSCs derivadas do cordão

umbilical (UC-MSCs) em culturas de condrócitos primários. Os resultados demonstraram que o secretoma das UC-MSCs foi capaz de manter a proliferação celular, melhorar a migração celular e aumentar os fatores envolvidos na manutenção do fenótipo condrogênico dos condrócitos articulares *in vitro*. As descobertas desse estudo sugerem que o secretoma de UC-MSCs pode ser uma estratégia promissora para a terapia da osteoartrite, fornecendo um microambiente favorável para a sobrevivência e função dos condrócitos.

Palavras-chave: Tecido cartilaginoso. Regeneração. Fração solúvel. Meio condicionado.

3.3. Introdução

A OA é uma doença articular degenerativa que afeta milhões de pessoas em todo o mundo (Hunter and Bierma-Zeinstr, 2019). Caracterizada pela evolução crônica, desgaste progressivo da cartilagem articular, espessamento da cápsula articular, redução do espaço articular e exposição do osso subcondral, a OA resulta em dor, perda da função da articulação acometida e redução na qualidade de vida dos pacientes (Sugasawa *et al.*, 2020). Apesar dos avanços em abordagens terapêuticas, como a substituição total do joelho, ainda não existe uma cura efetiva para a OA. Os tratamentos geralmente envolvem o controle de dor e desaceleração da progressão de alterações degenerativas, o que destaca a necessidade de novas estratégias de tratamento (Hunter *et al.*, 2022).

A regeneração do tecido cartilaginoso tem sido alvo de intensa pesquisa na busca por terapias inovadoras para a OA (Assi *et al.*, 2023). Nesse contexto, as MSCs surgiram como uma promissora abordagem terapêutica devido à sua capacidade intrínseca de autorrenovação e diferenciação em vários tipos de células do tecido conjuntivo, incluindo as células do tecido cartilaginoso (Gale *et al.*, 2019). Acreditava-se que o poder de regeneração das MSCs era oriundo da sua diferenciação em condrócitos, no entanto, evidências recentes indicam que os efeitos benéficos das MSCs são em maior parte, à sua capacidade de secretar uma variedade de moléculas bioativas e fatores de crescimento, conhecidos como secretoma (Mabotuwana *et al.*, 2022). Essa ação parácrina do secretoma das MSCs tem despertado um interesse crescente, uma vez que estudos indicam que esses fatores têm o potencial de modular a resposta inflamatória, estimular a proliferação e

diferenciação de células progenitoras, promover a angiogênese, inibir a apoptose e fibrose tecidual e modular manutenção da matriz extracelular (Chang *et al.*, 2021).

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do secretoma de MSCs na recuperação do tecido cartilaginoso, fornecendo informações sobre o potencial terapêutico dessas células na OA. Por meio de abordagens experimentais *in vitro*, buscamos comparar o efeito do secretoma das MSCs e da fração solúvel do secretoma na manutenção do fenótipo de condrócitos articulares. Ao preencher essas lacunas de conhecimento, esperamos contribuir para o desenvolvimento de terapias mais efetivas e personalizadas para a OA, que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes e mitigar o impacto crescente dessa doença na saúde global.

3.4. Material e métodos

3.4.1. Isolamento e Cultivos de UC-MSCs

Os cordões umbilicais foram obtidos de cesarianas realizadas em cadelas no Hospital Veterinário da UFV, com a coleta aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 32-2020. Após a coleta, os cordões foram dissecados delicadamente, seguindo técnicas assépticas, em uma capela de fluxo laminar. Uma ligadura foi realizada em cada uma das extremidades de cada vaso. Em seguida, os vasos foram submetidos a um coquetel de digestão enzimática durante cinco horas sob atmosfera controlada (37°C, 5% de CO₂). O coquetel enzimático foi preparado diluindo 16 mg de colagenase em 40 ml de PBS contendo cálcio e magnésio. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi centrifugado a 1050 rpm durante cinco minutos para a peletização das células. O pellet foi gentilmente quebrado e ressuspensão em meio completo contendo 37,1% D-MEM alta glicose, 37,1% DMEM sem glicose, 15% soro fetal bovino (SFB), 10% solução antimicrobiana (159 U/mL penicilina A e 50 µg/mL gentamicina), 0,4% aminoácidos não essenciais e 0,4% l-glutamina. A suspensão celular de UC-MSCs foi transferida para garrafas T25 e cultivada até atingir 80% de confluência, realizando-se as passagens até obter quantidade suficiente de células para a obtenção do meio condicionado (MC). Essa metodologia foi baseada no trabalho de Sepulveda *et al.*, (2020).

3.4.2. Obtenção do MC-VE positivo e MC-VE negativo

As células da quarta passagem foram cultivadas até atingirem 80% de confluência, momento em que foi adicionado meio completo com 15% de SFB livre de VEs. Para a obtenção do SFB livre de VEs foi realizado um processo de ultracentrifugação de 100 000 g durante duas horas para remoção das VEs. Após vinte e quatro horas, o MC foi coletado e submetido a centrifugações seriadas: i) 300 g durante dez minutos; ii) 2 000 g durante vinte minutos; e iii) 10 000 g durante trinta minutos. Em seguida, o meio foi filtrado em uma membrana de 0.22 µm. O MC resultante foi dividido em dois volumes iguais. Metade foi submetida a duas ultracentrifugações de 100 000 g durante setenta minutos para esgotar a presença de VEs em suspensão, obtendo-se a fração solúvel denominada MC-VE negativo (fração solúvel), livre de VEs. O MC que não foi ultracentrifugado permaneceu com as VEs em suspensão e foi chamado de MC-VE positivo (secretoma). A ultracentrifugação foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia e Sinalização Celular do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

3.4.3. Controles negativo e positivo

Como controle negativo do MC, foi preparado meio completo que foi adicionado a frascos de cultivo sem a presença de células, submetendo-os às mesmas condições de temperatura e atmosfera dos MC-VE positivo e VE negativo pelo mesmo período de vinte e quatro horas. Este foi denominado MC-CN. Como controle positivo, foi utilizado meio completo comum sem nenhum outro aditivo, aplicando-se um tipo de tratamento conhecido. Este foi denominado MC-CP.

3.4.4. Ensaio funcionais

Para a realização dos ensaios funcionais, foram utilizados condrócitos obtidos da cartilagem articular de coelhos da raça Nova Zelândia.

3.4.4.1. Isolamento e Cultivo de condrócitos

Um coelho da raça Nova Zelândia, com 3 meses de idade, foi submetido à eutanásia, com sobredose anestésica de propofol seguida de administração de cloreto de potássio, coletando-se os membros pélvicos que foram acondicionados em meio de cultura contendo solução de antibióticos. Dentro de uma capela de fluxo laminar, os membros pélvicos foram dissecados utilizando técnica asséptica. A cartilagem

articular da região femorotibiopatelar foi extraída com o auxílio de uma lâmina de bisturi número dez. Nesse momento, foram tomados cuidados para remover apenas os fragmentos de cartilagem que apresentavam aparência translúcida. Não se deve coletar tecido ósseo, e caso haja acesso ao canal medular, o material deve ser descartado devido ao risco de contaminação com outros tipos celulares. Os fragmentos de cartilagem foram lavados duas vezes com PBS e, em seguida, fragmentados com o auxílio da lâmina de bisturi até atingirem cerca de um milímetro de diâmetro/ largura. Os fragmentos foram transferidos para um coquetel de digestão enzimática contendo 30 mg de colagenase em 7,5 ml de D-MEM alta glicose e 7,5 ml de D-MEM sem glicose.

Toda a parte experimental de cultivo celular feita neste estudo, foi realizada no Laboratório de Manutenção de Ovócitos e Fecundação “In Vitro” – MOVIF do Departamento de Veterinária da UFV.

3.4.4.2. Proliferação celular

Os condrócitos foram plaqueados em uma placa de 96 poços com uma densidade celular de 1.7×10^4 células/cm², utilizando meio completo sem fenol red contendo 10% de SFB. Após 24 horas do plaqueamento, o meio completo foi substituído pelos seguintes tratamentos: MC-VE positivo, MC-VE negativo, MC-CN e MC-CP em diferentes concentrações (10%, 20%, 40% e 60%). Após 24, 48 e 72 horas da aplicação dos tratamentos, os meios foram removidos, os poços foram lavados com PBS e incubados por três horas com 100 µl de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil (MTT) a 0,5 mg/ml, protegidos da luz. Após esse tempo, o MTT foi removido e adicionaram-se 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) aos precipitados de formazana. Em seguida, a placa foi mantida em agitação por 30 minutos para a solubilização dos cristais de formazana. A leitura da absorbância dos cristais de formazana foi feita utilizando um leitor de ELISA com comprimento de onda de 550 e 570 nm.

3.4.4.3. Migração celular

Os condrócitos foram plaqueados em uma placa de 24 poços com uma densidade celular de 1.7×10^4 células/cm², utilizando meio completo contendo 7,5% de SFB. Após 48 horas, as células estavam confluentes e formaram uma monocamada. As monocamadas foram arranhadas, criando uma linha sem células (ranhura), utilizando uma ponteira de 200 µl estéril perpendicular ao fundo da placa

para manter a largura da linha uniforme. O meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS aquecido para remover as células desprendidas. As placas receberam os seguintes tratamentos: MC-VE positivo, MC-VE negativo, MC-CN e MC-CP em diferentes concentrações (10%, 20%, 40% e 60%).

A área da linha foi fotografada imediatamente após a aplicação do tratamento (tempo 0), assim como 24 horas após o tratamento, utilizando um microscópio invertido com uma objetiva que permitiu a visualização de ambas as bordas da ranhura com aumento de 20 ×. As imagens foram salvas como arquivos *.tif. Para obter o mesmo campo, foram criados pontos de referência através de uma linha reta, utilizando uma caneta de ponta ultrafina, no fundo externo dos poços da placa. A marca de referência foi colocada fora do campo de imagem de captura, mas dentro do campo de visão do microscópio. Duas áreas da linha, acima e abaixo da linha guia, foram medidas em cada poço nos tempos 0, 24 e 36 horas do tratamento, utilizando um plugin do software ImageJ. A porcentagem de fechamento da ranhura foi quantificada utilizando a seguinte fórmula: % fechamento da ranhura = [(área inicial - área final) / área inicial] × 100, onde a área inicial corresponde à área no tempo 0 e a área final corresponde à área no tempo 24 horas. No tempo de 36 horas não foi possível realizar a medida da área de fechamento, pois a maioria das ranhuras já haviam sido preenchidas pelos condrócitos.

3.4.4.4. Manutenção do fenótipo condrogênico

Os condrócitos foram cultivados em uma placa de 24 poços com uma densidade celular de 2.000 células/cm², utilizando meio completo contendo 10% de SFB. Após 24 horas de incubação para permitir a adesão das células à placa, o meio completo foi substituído pelos seguintes tratamentos: MC-VE positivo, MC-VE negativo, MC-CN e MC-CP, na concentração que apresentou os melhores resultados nos ensaios de proliferação e migração celular, além do meio condrogênico contendo TGF-β. Os tratamentos foram trocados a cada 48 horas até que as células atingissem confluência máxima nos poços, o que ocorreu no oitavo dia após o plaqueamento.

Para avaliar a manutenção do fenótipo condrogênico, a cultura de condrócitos foi submetida à coloração da matriz extracelular utilizando azul de alcian e safranina O, e à análise da expressão de genes relacionados à condrogênese, colágeno tipo II, ACAN (marcador para glicosaminoglicanos) e Sox-9 (fator de transcrição relacionado à condrogênese).

3.4.4.5. Colorações para fenótipo condrogênico

Para a coloração de azul de alcian, o meio foi aspirado dos poços e, em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS. Foi adicionado 1 ml de solução de formalina a 10% em cada poço e deixado agir por 15 minutos. A formalina foi aspirada e adicionado 2 ml de HCl 0,1N. Após a aspiração do HCl, foi adicionado 1 ml de azul de alcian a 1% e deixado agir por 30 minutos. O azul de alcian foi aspirado e substituído pelo HCl. Após esses procedimentos, os poços foram fotografados utilizando um microscópio invertido, com as células ainda imersas em HCl.

Para a coloração com safranina O, o meio foi aspirado dos poços e, em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS. Foi adicionado 1 ml de solução de formalina em cada poço e deixado agir por 10 minutos. A formalina foi aspirada e adicionado 2 ml de HCl 0,1N. Após a aspiração do HCl, foi adicionado 1 ml de safranina O e deixado agir por 15 minutos. A safranina O foi aspirada e os poços foram lavados duas vezes com PBS. Após esses procedimentos, os poços foram fotografados utilizando um microscópio invertido.

3.4.4.6. Extração do RNA total dos condrócitos

O meio foi aspirado e 300 µl de trizol foram adicionados em cada poço. Observou-se pelo microscópio que todas as células se desprenderam do fundo do poço após a adição de trizol. O trizol contendo a suspensão celular foi aspirado e transferido para microtubos, que foram armazenados a -20°C até o momento da extração de RNA. As amostras foram descongeladas e 200 µl de clorofórmio foram adicionados a cada microtubo. Os microtubos foram agitados delicadamente por 15 segundos e incubados por 2 minutos em temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 1200 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi possível observar a estratificação das camadas, com o precipitado de DNA no fundo, uma camada contendo proteínas e o sobrenadante contendo o RNA. Foi coletado apenas 200 µl do sobrenadante de cada microtubo para evitar a contaminação da amostra. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e 200 µl de isopropanol foram adicionados, seguido de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi removido, o pellet foi lavado com 1000 µl de etanol 75% e centrifugado a 12000 rpm por 1 minuto

a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos até secarem completamente. O pellet foi ressuspenso em 20 µl de água livre de RNase.

3.4.4.7. Quantificação do RNA

A concentração do RNA obtido foi determinada por meio da análise da densidade óptica das amostras em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. O grau de pureza das amostras foi avaliado pela relação A260/A280, considerando que o RNA puro, livre de contaminantes, apresenta uma razão compreendida entre 1,8 e 2,2. A qualidade do RNA foi analisada com base na relação de absorbância A260nm/A280nm, além da visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose.

3.4.4.8. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi utilizada para verificar a pureza das amostras de RNA e detectar possível contaminação com DNA. Foi utilizado um gel de agarose a 2% em tampão TBE (Tris, Borato, EDTA). Um poço foi utilizado para carregar um marcador de massas moleculares para estimar o tamanho dos fragmentos de material genético. Após a aplicação das amostras, a eletroforese foi realizada com uma voltagem de 130 volts por 30 minutos. O resultado foi registrado pela análise do gel sob luz ultravioleta em uma câmara. Uma câmera acoplada registrou a imagem do gel.

3.4.4.9. Transcrição reversa

As amostras foram submetidas a uma reação de transcrição reversa para a síntese de DNA complementar (cDNA), que possui maior estabilidade e é menos suscetível à degradação em comparação com as fitas de RNA. O cDNA das amostras foi sintetizado utilizando o kit Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse, seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, o mix de reagentes foi preparado utilizando 2 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTP Mix, 2 µl de 10X RT Random Primers, 1 µl de MultiScribe Reverse Transcriptase e 14,2 µl da amostra de RNA. O material foi colocado em um termociclador e submetido ao seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento de sua amplificação em PCR em tempo real.

3.4.4.10. Amplificação do cDNA em PCR em tempo-real (qPCR)

O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno. Os oligonucleotídeos utilizados como primers nas reações de PCR foram descritos na Tabela 1. Para a amplificação, aproximadamente 100 ng/μl do cDNA obtido foi adicionado à reação contendo 10 μl do SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Fermentas, K0251), 9 μl de água livre de RNase, 1 μl cDNA e 1 μl de cada primer, totalizando um volume final de 20 μl. As condições de qPCR para Cada um dos genes analisados foram submetidos às seguintes condições: i) pré-incubação a 95°C por 60 s; desnaturação a 95°C por 5 s; anelamento a 64°C por 30 s e alongamento a 72°C por 20 s.

Tabela 1: Sequência dos nucleotídeos dos primers utilizados na expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto
GAPDH	F-TGAAGGTCGGAGTGAACGGAT	183
	R-CGTTCTCAGCCTTGACCGTG	
Col2a1	F-ACCGCAAGGATTTCAAGGCA	124
	R-AGGTTTTCCAGCTTCGCCAT	
Acan	F-CGGGACACCAACGAGACCTAT	79
	R-CTGGCGACGTTGCGTAAAA	
Sox-9	F-AATCTCCTGGACCCCTTCAT	198
	R-GTCCTCTTCGCTCTCCTTCT	

A expressão gênica foi determinada de acordo com o Método de Livak (2^{-ΔΔCq}).

Todas as etapas experimentais em Biologia Molecular foram realizadas no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Geral da UFV.

3.4.5. Análise estatística

Para avaliar as diferenças entre os grupos, foram realizadas a ANOVA com post-hoc test de (Tukey) para os dados do qPCR e ANOVA de dois fatores para os dados de migração, considerando para este último os efeitos da concentração e do tratamento.

3.5. Resultados

3.5.1. Ensaio de proliferação celular – MTT

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na proliferação celular entre os grupos tratados nem entre as concentrações dos diferentes tratamentos, conforme demonstrado na Figura 1. Todos os grupos e concentrações apresentaram crescimento e proliferação celular até atingir a confluência completa nos poços. Não houve evidência de morte celular em nenhum dos poços.

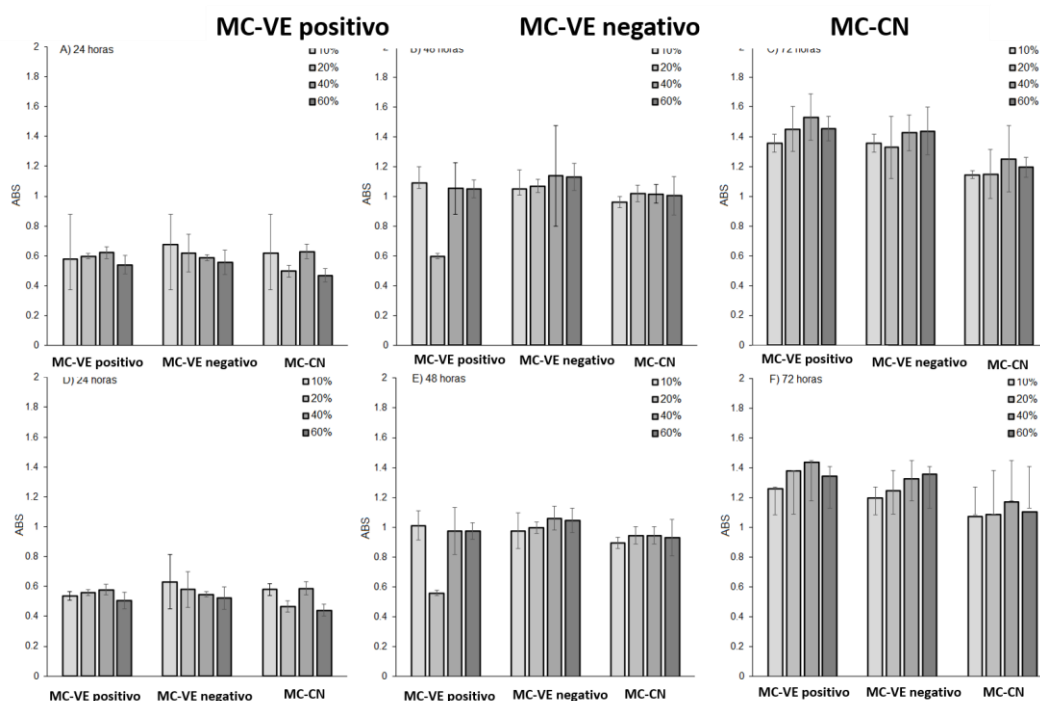


Figura 1: Gráficos representativos dos valores de absorvância da produção intracelular de formazan ao longo do tempo (24, 48 e 72 horas) e em dois comprimentos de onda (550 nm e 570 nm).

3.5.2. Ensaio de migração celular

Referente ao ensaio de migração celular, foram observados efeitos separados dos tratamentos e das diferentes concentrações. Quanto aos tipos de tratamentos foi observado maior porcentagem de fechamento da ranhura no grupo MC-VE positivo e MC-VE negativo em relação aos outros, sendo significativamente maior no grupo MC-VE positivo ($p < 0,01$). Referente à concentração foi observado maior porcentagem de fechamento da ranhura nos grupos que receberam o tratamento com 10% de MC em relação às outras concentrações ($p < 0,01$), conforme ilustrado na Figura 2. As imagens

das áreas das feridas podem ser visualizadas nas Figuras 3, 4, 5, 6 e 7. Nas bordas, os condrócitos estão dispostos em monocamada, enquanto no centro é possível observar uma área sem células correspondente à linha de ranhura gerada pela

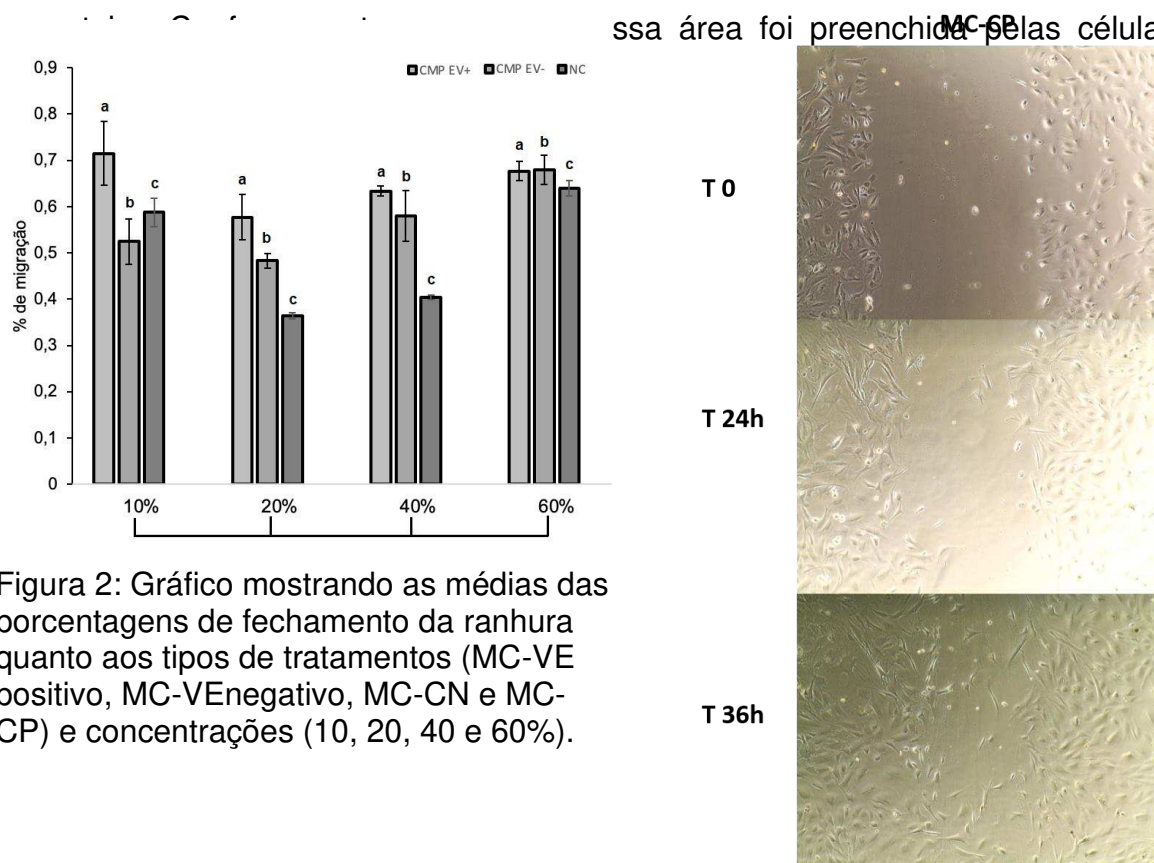


Figura 2: Gráfico mostrando as médias das porcentagens de fechamento da ranhura quanto aos tipos de tratamentos (MC-VE positivo, MC-VE negativo, MC-CN e MC-CP) e concentrações (10, 20, 40 e 60%).

Figura 3: Fotomicrografias capturadas em campo medindo 687 μm , mostrando a evolução da ferida ao longo do tempo (0, 24 e 36 horas) do grupo CP

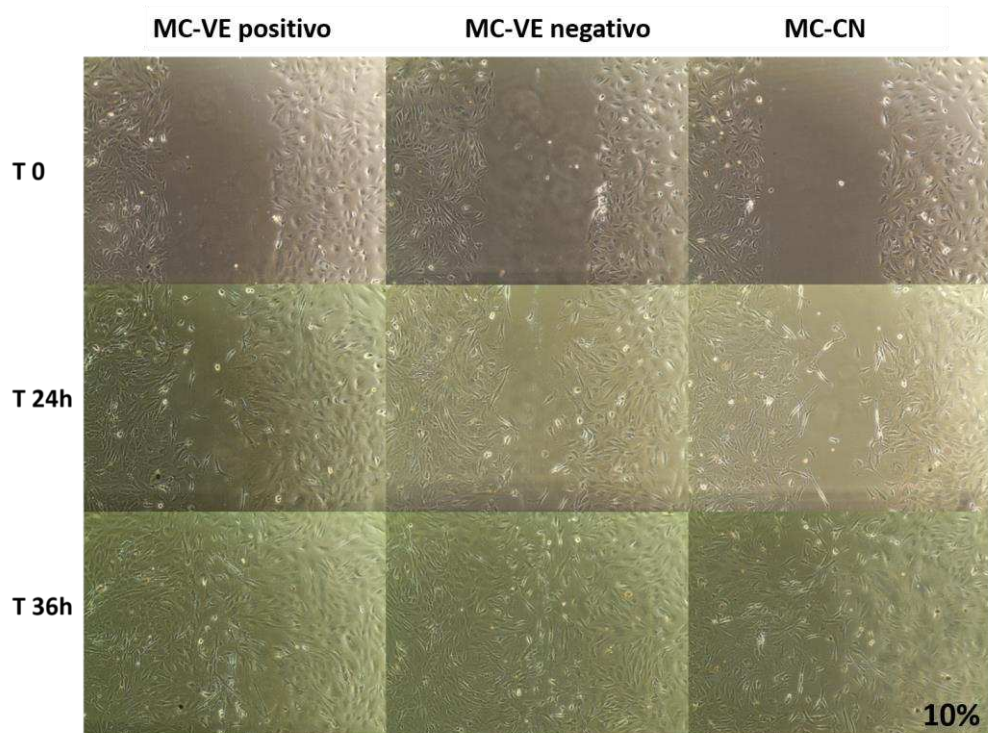


Figura 4: Fotomicrografias capturadas em campo medindo 687 μm , mostrando a evolução da ferida ao longo do tempo (0, 24 e 36 horas), nos grupos de tratamento MC-VE positivo, MC-VE negativo e CN com uma concentração de 10%.

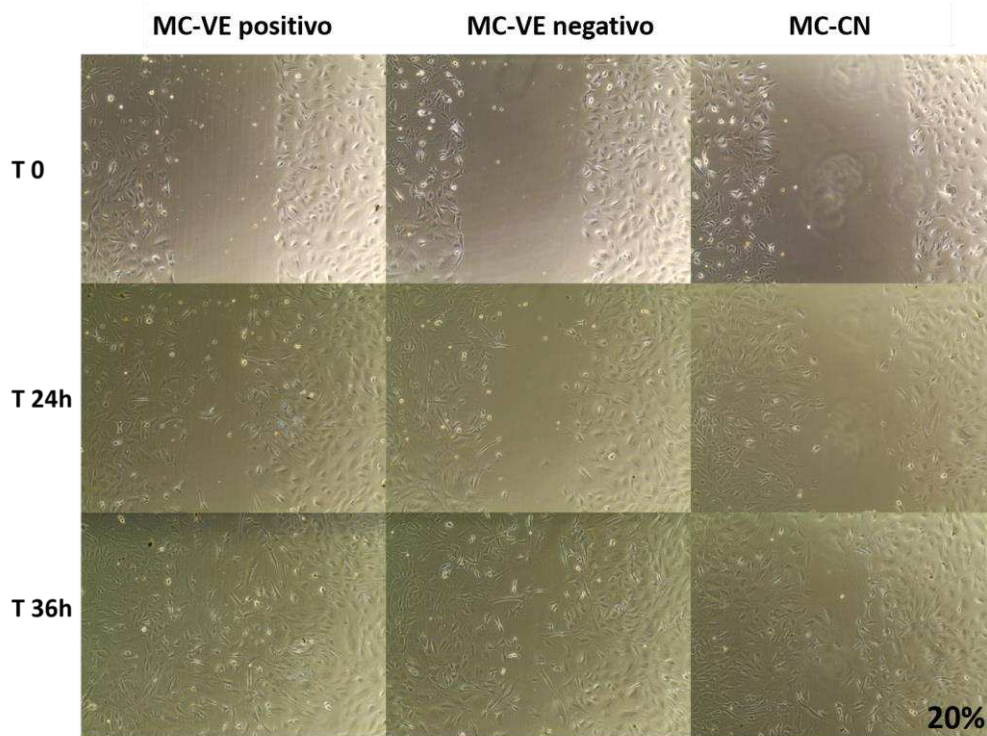


Figura 5: Fotomicrografias capturadas em campo medindo 687 μm , mostrando a evolução da ferida ao longo do tempo (0, 24 e 36 horas), nos grupos de tratamento MC-VE positivo, MC-VE negativo e CN com

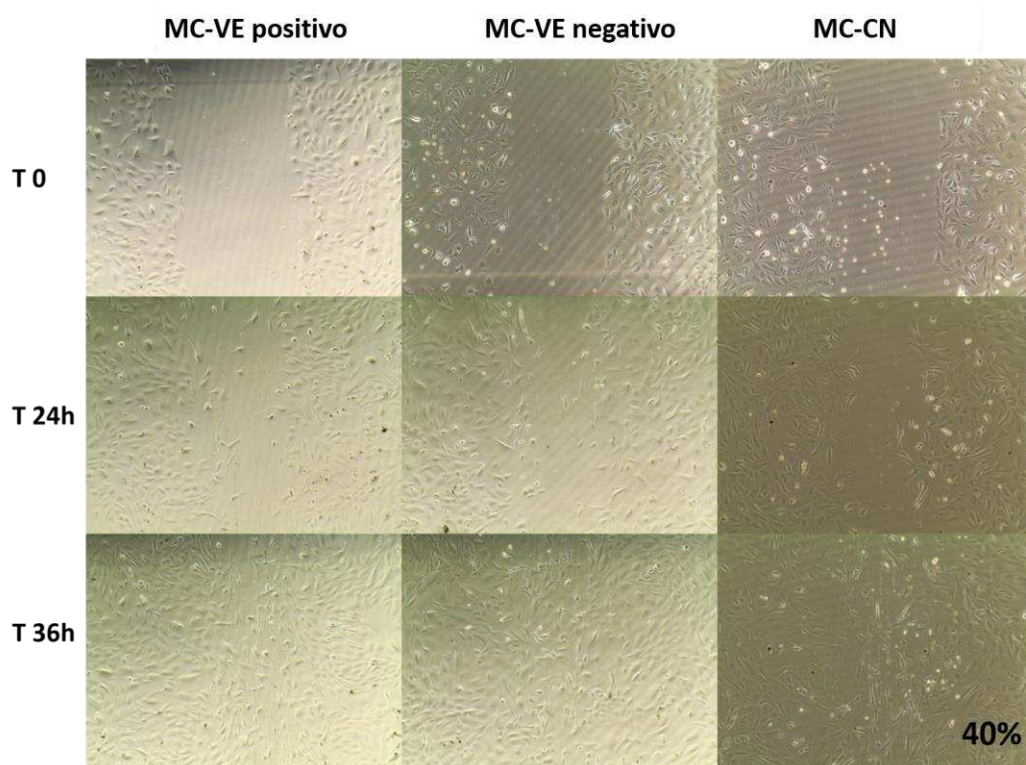


Figura 6: Fotomicrografias capturadas em campo medindo 687 μm , mostrando a evolução da ferida ao longo do tempo (0, 24 e 36 horas), nos grupos de tratamento MC-VE positivo, MC-VE negativo e CN com uma concentração de 40%.

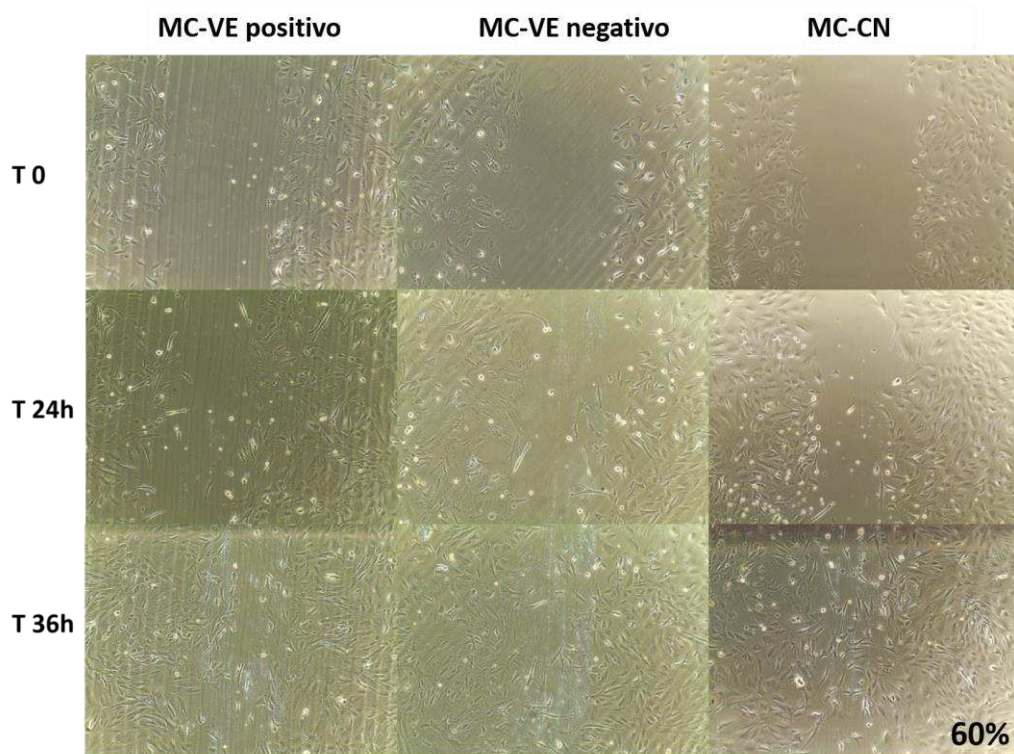


Figura 7: Fotomicrografias capturadas em campo medindo 687 μm , mostrando a evolução da ferida ao longo do tempo (0, 24 e 36 horas), nos grupos de tratamento MC-VE positivo, MC-VE negativo e CN com uma concentração de 60%.

3.5.3. Ensaio de manutenção do fenótipo condrogênico

No ensaio de manutenção do fenótipo condrogênico, os condrócitos apresentaram bom crescimento e mantiveram uma morfologia celular normal de células aderentes em crescimento e proliferação em todos os grupos tratados utilizando a concentração de 10% de meio condicionado. Não foram observados sinais significativos de morte celular durante os oito dias de cultivo, e as células continuaram a crescer até atingir a confluência total da área do poço.

As colorações com azul de alcian e safranina O revelaram marcação de GAG e MEC, respectivamente, em todos os grupos, indicando que os condrócitos não apenas mantiveram seu estado de proliferação celular, mas também sintetizaram matriz extracelular (Figura 8).

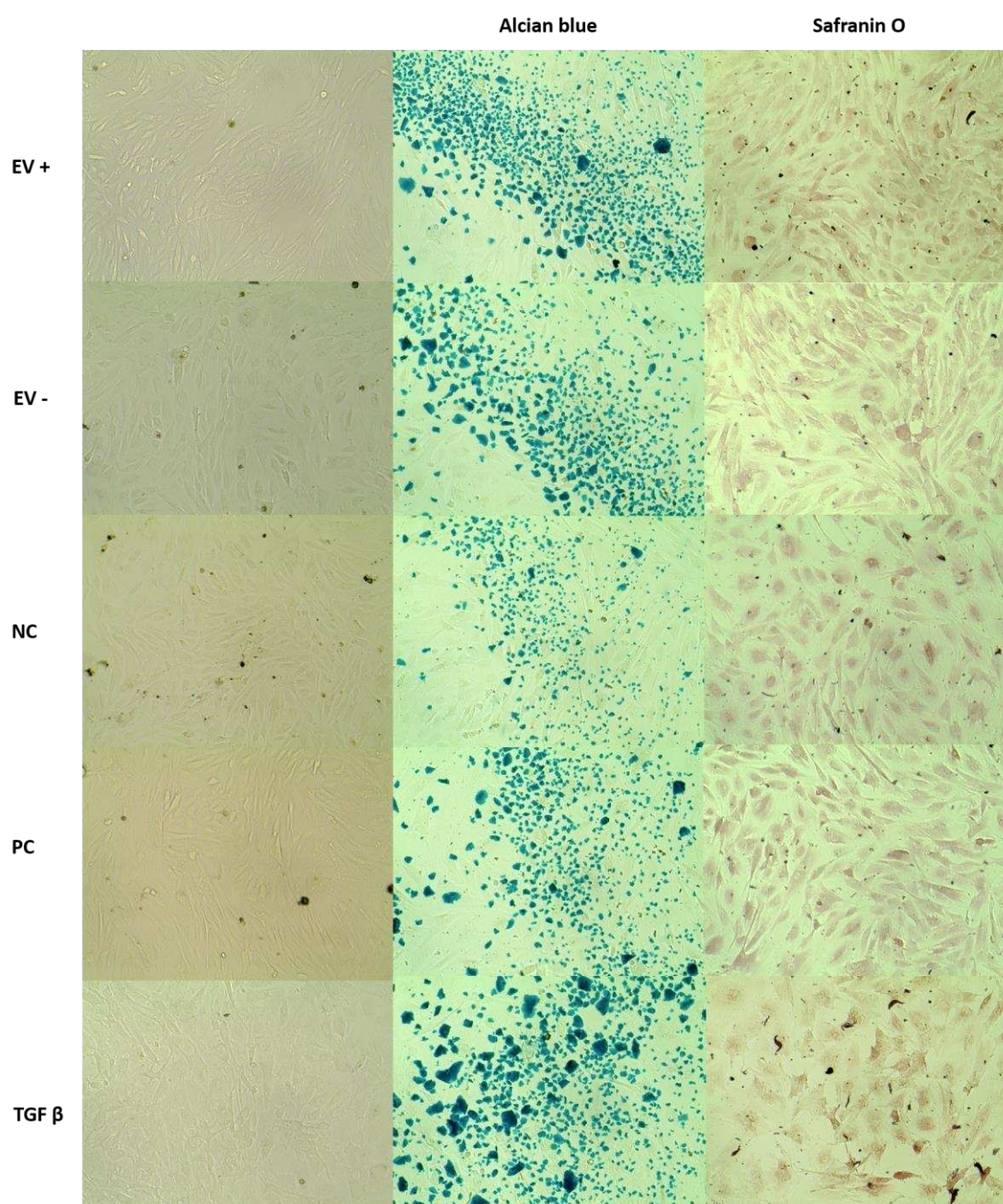


Figura 8: Fotomicrografias capturadas em campo medindo 687 μm , exibindo condrócitos cultivados em monocamada. Na primeira coluna: células sem coloração; na segunda coluna: coloração com azul de alcian; e na terceira coluna: coloração com safranina O.

A extração de RNA total das amostras apresentou uma eficiência satisfatória, com um rendimento médio de 100 ng de RNA total por ml de suspensão celular de condrócitos com trizol. As bandas do RNA ribossomal 28S e 18S foram claramente definidas no gel de agarose, não mostrando sinais de degradação, conforme pode ser observado na Figura 9.

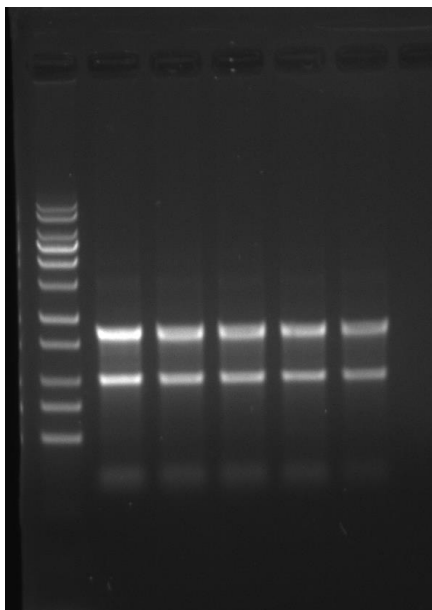


Figura 9: Registro de imagem sob luz ultravioleta mostrando o resultado da eletroforese em gel de agarose. A primeira coluna contém o marcador de massa molecular, seguida pelas amostras. As bandas do RNA ribossomal 28S e 18S são claramente visíveis no gel de agarose.

Quanto à expressão gênica, observou-se um aumento na expressão do colágeno tipo II no grupo tratado com MC-VE positivo, MC-CP e no grupo tratado com TGF- β , sendo significativamente maior no grupo TGF- β ($p < 0,05$). Os grupos tratados com MC-VE negativo e MC-CN houve diminuição da expressão de colágeno tipo II. Em relação ao gene Acan, sua expressão aumentou significativamente no grupo CM-EV positivo e diminuiu nos demais grupos ($p < 0,05$). Quanto ao fator de transcrição Sox-9, apenas o grupo CP apresentou redução em sua expressão, enquanto os demais grupos tiveram aumento, com destaque para o grupo CM-EV negativo ($p < 0,05$) (Figura 10).

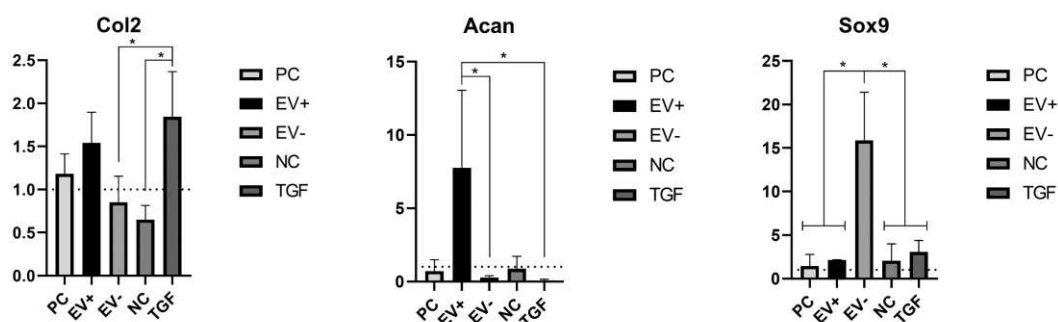


Figura 10: Expressão gênica de Colágeno Tipo II, ACAN e SOX-9, média e desvio padrão nos grupos tratados com MC-VE positivo, MC-VE negativo, MC-CN, MC-CP e TGF- β .

3.6. Discussão

Neste estudo foi investigado o efeito do secretoma em aspectos importantes para uma futura utilização terapêutica das UC-MSCs na OA, notadamente, biocompatibilidade, manutenção do fenótipo de condrócitos articulares, e de seu efeito na proliferação e migração celulares. Utilizando o teste de MTT, constatamos que o secretoma das UC-MSCs não induziu a proliferação celular. Os condrócitos articulares apresentam dificuldades de crescimento, uma vez que tendem a perder seu fenótipo característico durante a expansão em placas de cultura, podendo também se desdiferenciar quando expandidos em monocamada. Essa instabilidade do fenótipo acarreta na regulação negativa da expressão de colágeno tipo II e alteração no padrão de síntese de GAG (Darling and Athanasiou, 2005; Costa *et al.*, 2018). Embora não tenhamos observado um aumento na capacidade proliferativa dos condrócitos, é importante ressaltar que o secretoma das UC-MSCs preservou a viabilidade dessas células, sem induzir morte celular, evidenciando a ausência de citotoxicidade associada a essa abordagem terapêutica. Nossos resultados revelaram também que o secretoma das UC-MSCs teve efeitos positivos significativos na capacidade migratória dos condrócitos articulares de coelhos, além de estimular a manutenção do fenótipo das células articulares produtoras de matriz extracelular, observada pela maior síntese de colágeno, glicosaminoglicanos e expressão de genes condrogênicos.

O secretoma contém uma variedade de componentes, como proteínas, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e matriz extracelular secretada pelas células. Além disso, também são liberadas pelas células pequenas moléculas, como metabólitos, íons, peptídeos, microvesículas e VEs. A secreção de proteínas é um processo biológico fundamental, pois desempenha um papel essencial na regulação de diversas funções celulares (Pawitan, 2014). O uso do secretoma apresenta várias vantagens, sendo a alogenia uma delas, o que significa que pode ser utilizado em diferentes indivíduos. Além disso, o secretoma contém proteínas que promovem a proliferação, diferenciação e migração das células e o reparo tecidual (Cases-Perera *et al.*, 2022). A utilização de MC com e sem VEs nos permitiu observar um comportamento distinto das células-alvo em relação à sua capacidade de migração e expressão fenotípica. Mesmo o uso do MC-VE negativo, que não contém as nanopartículas, revelou-se efetivo devido à presença de fatores solúveis que também contribuíram para a migração células e expressão de fatores condrogênicos.

Nas avaliações iniciais de citotoxicidade e proliferação celular, testamos diferentes concentrações de tratamento (10%, 20%, 40% e 60%) nas células-alvo. A quantidade adequada de meio condicionado a ser utilizada no tratamento de culturas de células pode variar dependendo do tipo de célula, da finalidade do experimento e das características específicas do meio condicionado. Não existe uma quantidade única que seja considerada universalmente adequada. Em alguns casos, uma concentração mais baixa pode ser suficiente, enquanto em outros experimentos uma concentração mais elevada pode ser necessária para obter os efeitos desejados.

No ensaio de proliferação celular, não foi observada diferença significativa entre as diferentes concentrações e tratamentos testados. Estudos anteriores relataram que o meio condicionado derivado de MSCs teve efeito inibitório na proliferação de certos tipos celulares, como por exemplo, queratinócitos humanos (He *et al.*, 2020). No entanto, em nosso estudo, observamos resultados distintos, pois não constatamos uma redução na proliferação celular. Pelo contrário, constatamos uma manutenção da capacidade proliferativa dos condrócitos, independentemente dos diferentes estímulos aplicados. Nossos achados são consistentes com estudos prévios que investigaram o efeito do secretoma das MSCs da medula óssea em condrócitos articulares de equinos (Contentin *et al.*, 2022), e estudos que avaliaram o secretoma das MSCs de seres humanos e ratos em condrócitos articulares de suínos (Yang *et*

al., 2023). Os resultados desses estudos também não observaram aumento da proliferação celular e corroboram nossas descobertas.

Por outro lado, no ensaio de migração celular, foi observada uma resposta melhor com a utilização de uma concentração de 10% de MC. Nesse caso, o grupo MC-VE positivo apresentou a maior porcentagem de fechamento da ranhura durante o período de 24 horas. Estudos prévios demonstraram que meios condicionados contendo diferentes estímulos foram capazes de induzir uma maior capacidade migratória tanto em condrócitos quanto em MSCs (Yang *et al.*, 2023). É importante notar que o secretoma contendo VEs apresentou maiores taxas de migração em comparação com os demais grupos, tanto meio não condicionado quanto em relação ao meio condicionado sem VEs. Isso demonstra a participação das VEs no favorecimento da migração celular (MC-VE positivo maior do que MC-VE negativo), mas que os fatores solúveis também influenciam o processo de migração (MC-VE negativo maior do que MC-CN). Essa observação deve ser analisada quando delineando possíveis modalidades terapêuticas no uso do secretoma, em face de fatores relacionados quanto à estabilidade da formulação efeito desejado, grau de OA, dentre outros.

A cultura *in vitro* de condrócitos apresenta diversos desafios devido à natureza especializada dessas células e ao ambiente único em que normalmente se encontram. Os condrócitos possuem um fenótipo altamente especializado, caracterizado pela produção de uma matriz extracelular rica em colágeno tipo II e glicosaminoglicanos (GAGs) (Yoon *et al.*, 2015). Um dos principais obstáculos na terapia baseada em células para lesões de cartilagem é a preservação do fenótipo condrogênico durante o cultivo *ex vivo* das células. Neste estudo, observamos que os condrócitos foram capazes de produzir GAGs em todos os tratamentos, como evidenciado pela coloração com azul de alcian (Björnsson, 1998) e safranina O (Király *et al.*, 1996). Essas colorações são amplamente utilizadas para corar GAGs e matriz extracelular, respectivamente, e nos forneceram uma avaliação qualitativa da manutenção do fenótipo condrogênico. Além disso os condrócitos apresentaram uma morfologia muito semelhante em todos os grupos avaliados. Esses resultados indicam que os condrócitos foram capazes de preservar seu fenótipo condrogênico durante o cultivo *in vitro*, independentemente dos diferentes estímulos aplicados. Essa preservação é essencial tanto para a confiabilidade de estudos *in vitro* quanto para o sucesso da

terapia celular e regeneração de cartilagem, pois garante que as células permaneçam capazes de sintetizar a matriz extracelular.

Ao analisarmos a expressão gênica de forma quantitativa e pudemos observar diferenças entre os grupos avaliados. Especificamente, a expressão do colágeno tipo II foi significativamente aumentada nos grupos MC-VE positivo e TGF- β . A expressão gênica de colágeno tipo II é fundamental para caracterizar e marcar uma cartilagem saudável devido ao seu papel estrutural, sua especificidade tecidual, sua relevância na remodelação e regeneração da cartilagem, e sua utilidade na avaliação da qualidade do tecido cartilaginoso. Por ser um componente estrutural chave, o colágeno tipo II é a principal proteína estrutural presente na matriz extracelular da cartilagem, conferindo-lhe resistência e flexibilidade (Alcaide-Ruggiero *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2021). Além disso, o colágeno tipo II é altamente específico para a cartilagem, o que significa que sua expressão gênica é predominantemente encontrada nesse tipo de tecido. Portanto, a detecção de colágeno tipo II indica a presença de células especializadas na produção de matriz cartilaginosa e sugere a existência de uma cartilagem saudável. A diminuição da expressão de colágeno tipo II pode indicar um desequilíbrio no processo de remodelação ou regeneração da cartilagem, podendo estar associada a condições patológicas, como a OA (Port *et al.*, 2023).

Estudos anteriores já relataram que as VEs derivadas das MSCs possuem efeito sobre as atividades das células precursoras do tecido cartilaginoso, além de promoverem a proliferação e a diferenciação condrogênica (Xue *et al.*, 2021). Neste sentido, a elevação observada na expressão do colágeno tipo II no grupo MC-VE positivo indica que as VEs oriundas das UC-MSCs desempenharam um papel notável na condrogênese. O que se torna ainda mais notável ao ser comparado ao grupo que recebeu TGF- β , um reconhecido indutor *in vitro* de diferenciação de MSCs em condrócitos. O TGF- β , uma citocina multifuncional, desempenha um papel fundamental no processo de condrogênese, sendo responsável por regular diversas etapas desse processo, incluindo a proliferação, diferenciação, síntese da matriz extracelular e modulação da resposta inflamatória (Lin *et al.*, 2022; Mortensen *et al.*, 2023). Sendo assim, a expressão de colágeno tipo II comparável entre esses grupos indica o alto potencial do secretoma contendo VEs na regeneração da cartilagem. Por outro lado, não observamos um aumento na expressão do colágeno tipo II no grupo que recebeu o meio condicionado esgotado de suas VEs (grupo MC-VE negativo).

Isso reforça a importância das VEs presentes no secretoma das UC-MSCs na promoção da condrogênese. Esses resultados sugerem que as VEs provenientes das UC-MSCs possuem propriedades benéficas para a regeneração do tecido cartilaginoso, uma vez que influenciam positivamente a expressão de genes relacionados ao principal componente de sua matriz, o colágeno tipo II.

O Acan é um marcador essencial para GAGs encontrado na matriz extracelular da cartilagem. Ele desempenha um papel fundamental na resistência e capacidade de retenção de água do tecido cartilaginoso. O Acan é uma das principais proteínas responsáveis pela estruturação da matriz cartilaginosa e pela regulação das propriedades biomecânicas do tecido (Dabiri and Li, 2013). No nosso estudo, observamos um aumento significativo na expressão gênica do Acan apenas no grupo tratado com o MC-VE positivo, em comparação com os demais grupos. Esses resultados indicam que o secretoma das UC-MSCs, contendo as VEs e outros fatores solúveis, desempenha um papel importante na regulação da expressão do Acan.

Estudos anteriores já relataram o papel imunomodulador do secretoma das MSCs em discos intervertebrais degenerados, além da capacidade de promover a deposição de GAGs (Ferreira *et al.*, 2021). Nossos achados estão em concordância com essas descobertas, fornecendo evidências adicionais do potencial terapêutico do MC-VE positivo na regulação da expressão do Acan. Além disso, esses resultados são promissores e sugerem que o secretoma das UC-MSCs, especialmente as VEs presentes no MC-VE positivo, pode ser uma estratégia eficaz para melhorar a formação e função da matriz cartilaginosa.

O Sox-9 desempenha um papel fundamental na condrogênese, processo pelo qual as células precursoras se diferenciam em condrócitos (Ikeda *et al.*, 2005). Esse fator de transcrição regula a expressão de genes essenciais para a formação da cartilagem, como os genes do colágeno tipo II e do Acan (Yang *et al.*, 2011). Em nosso estudo, observamos um aumento significativo na expressão do Sox-9 no grupo tratado com o CM-EV negativo (fatores solúveis) em relação aos outros grupos. É interessante notar que a superexpressão de Sox-9 tem sido associada à inibição da inflamação na OA tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Ouyang *et al.*, 2019). Contudo, em certas condições patológicas, como a OA, já foi relatado o aumento da expressão de Sox-9 (Dolzani *et al.*, 2019) o que poderia ser uma resposta adaptativa. O sistema de regulação do crescimento e diferenciação dos condrócitos cultivados *in vitro* é propenso a desequilíbrios, que podem levar ao envelhecimento celular e à perda de

características especializadas (Charlier *et al.*, 2019). A complexidade envolvida na expressão e regulação do Sox-9 ainda precisa ser melhor compreendida para obtermos respostas mais claras sobre seu funcionamento.

As MSCs possuem um alto grau de plasticidade, o que significa que a composição do seu secretoma varia dependendo do ambiente em que as células estão localizadas. Essa característica oferece a oportunidade de manipular o microambiente das MSCs, direcionando-as para um fenótipo que produza um secretoma rico em fatores de interesse para a célula alvo, como as VEs (Múzes and Sipos, 2022). Essas vesículas desempenham um papel importante na comunicação intercelular e podem ser encontradas no secretoma das MSCs. Dessa forma, é possível explorar a capacidade das MSCs de modular seu ambiente e secretar VEs, o que oferece oportunidades promissoras para a terapia celular e a regeneração de tecidos (Simons and Raposo, 2009; Lener *et al.*, 2015).

O secretoma derivado de UC-MSCs revela-se uma abordagem promissora para favorecer a regeneração da cartilagem na OA, ao apresentar efeitos positivos sobre condrócitos *in vitro*, especificamente em sua migração e na produção de matriz extracelular. Destaca-se o maior efeito do secretoma contendo VEs do que do secretoma sem VEs, o que demonstra a importância das vesículas no efeito desejado, o que a princípio pode chamar a atenção para uma possível estratégia terapêutica. Contudo, efeitos notáveis do MC esgotado de VEs já foram descritos em diferentes contextos. Em um modelo experimental de OA *in vitro* induzida por IL-1, o MC sem a presença de VEs foi capaz de produzir um efeito anti-inflamatório semelhante ao observado quando as VEs ou o secretoma estavam presentes (Palamà *et al.*, 2020). Além disso, em um estudo que comparou a utilização de VEs, MC e fração solúvel derivada de MSCs na redução da expressão de metaloproteinases (MMP) em células do disco intervertebral, o MC demonstrou a maior redução de MMP (González-Cubero *et al.*, 2022). Essas descobertas destacam a importância da composição do secretoma e de suas diferentes frações, bem como a carga das VEs, para os efeitos observados. Essas variações podem ser também influenciadas pela célula alvo e pela via de sinalização envolvida. A melhor compreensão dessas complexidades é essencial para maximizar o potencial terapêutico do secretoma das MSCs e suas frações, incluindo as VEs, em diferentes aplicações clínicas. Sendo assim, é importante ressaltar que nosso estudo destaca o potencial promissor do secretoma das UC-MSCs como uma estratégia terapêutica para o tratamento de lesões articulares.

3.7. Conclusão

Os resultados obtidos indicaram que o secretoma das UC-MSCs desempenhou um papel significativo ao promover a migração celular, estimular a síntese dos componentes cruciais da matriz extracelular e assegurar a sobrevivência dos condrócitos. É relevante ressaltar que o grupo tratado com o secretoma contendo as VEs (MC-VE positivo) obteve os melhores resultados em termos de migração celular, expressão dos genes do colágeno tipo II e Acan, em comparação ao grupo que recebeu apenas os fatores solúveis (MC-VE negativo), o que indica a importância das VEs no funcionamento do secretoma. Esses efeitos exercem um papel fundamental na manutenção e reparação do tecido articular danificado.

3.8. Referências bibliográficas

- Alcaide-Ruggiero, L. *et al.* (2021) 'Main and Minor Types of Collagens in the Articular Cartilage: The Role of Collagens in Repair Tissue Evaluation in Chondral Defects', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS222413329>.
- Assi, R. *et al.* (2023) 'Innovation in Targeted Intra-articular Therapies for Osteoarthritis', *Drugs*, 83(8), pp. 649–663. Available at: <https://doi.org/10.1007/S40265-023-01863-Y/METRICS>.
- Björnsson, S. (1998) 'Quantitation of proteoglycans as glycosaminoglycans in biological fluids using an alcian blue dot blot analysis', *Analytical biochemistry*, 256(2), pp. 229–237. Available at: <https://doi.org/10.1006/ABIO.1997.2494>.
- Cases-Perera, O. *et al.* (2022) 'Development of secretome-based strategies to improve cell culture protocols in tissue engineering', *Scientific Reports*, 12(1), p. 10003. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-022-14115-Y>.
- Chang, C. *et al.* (2021) 'Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Paracrine Signals and Their Delivery Strategies', *Advanced Healthcare Materials*, 10(7). Available at: <https://doi.org/10.1002/ADHM.202001689>.
- Charlier, E. *et al.* (2019) 'Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA)', *Biochemical pharmacology*, 165, pp. 49–65. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2019.02.036>.

- Contentin, R. *et al.* (2022) 'Bone Marrow MSC Secretome Increases Equine Articular Chondrocyte Collagen Accumulation and Their Migratory Capacities', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS23105795/S1>.
- Costa, E. *et al.* (2018) 'Maintenance of chondrocyte phenotype during expansion on PLLA microtopographies', *Journal of Tissue Engineering*, 9. Available at: https://doi.org/10.1177/2041731418789829/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_2041731418789829-FIG8.JPEG.
- Dabiri, Y. and Li, L.P. (2013) 'Influences of the depth-dependent material inhomogeneity of articular cartilage on the fluid pressurization in the human knee', *Medical engineering & physics*, 35(11), pp. 1591–1598. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MEDENGPHY.2013.05.005>.
- Darling, E.M. and Athanasiou, K.A. (2005) 'Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations', *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 23(2), pp. 425–432. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ORTHRES.2004.08.008>.
- Dolzani, P. *et al.* (2019) 'Ex vivo physiological compression of human osteoarthritis cartilage modulates cellular and matrix components', *PLoS ONE*, 14(9). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0222947>.
- Ferreira, J.R. *et al.* (2021) 'IL-1 β -pre-conditioned mesenchymal stem/stromal cells' secretome modulates the inflammatory response and aggrecan deposition in the intervertebral disc', *European Cells and Materials*, 41, pp. 431–453. Available at: <https://doi.org/10.22203/ECM.V041A28>.
- Gale, A.L. *et al.* (2019) 'Comparison of the Chondrogenic Differentiation Potential of Equine Synovial Membrane-Derived and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells', *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JUN), p. 178. Available at: <https://doi.org/10.3389/FVETS.2019.00178>.
- González-Cubero, E. *et al.* (2022) 'Extracellular vesicle and soluble fractions of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secretome induce inflammatory cytokines modulation in an in vitro model of discogenic pain', *Spine Journal*, 22(7), pp. 1222–1234. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2022.01.012>.
- He, D. *et al.* (2020) 'LOXL2 from human amniotic mesenchymal stem cells accelerates wound epithelialization by promoting differentiation and migration of keratinocytes', *Aging*, 12(13), pp. 12960–12986. Available at:

<https://doi.org/10.18632/AGING.103384>.

Hunter, C.W. *et al.* (2022) 'Consensus Guidelines on Interventional Therapies for Knee Pain (STEP Guidelines) from the American Society of Pain and Neuroscience', *Journal of Pain Research*, 15, p. 2683. Available at:

<https://doi.org/10.2147/JPR.S370469>.

Hunter, D.J. and Bierma-Zeinstra, S. (2019) 'Osteoarthritis', *Lancet (London, England)*, 393(10182), pp. 1745–1759. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9).

Ikeda, T. *et al.* (2005) 'Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation', *Journal of bone and mineral metabolism*, 23(5), pp. 337–340. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00774-005-0610-Y>.

Király, K. *et al.* (1996) 'Application of selected cationic dyes for the semiquantitative estimation of glycosaminoglycans in histological sections of articular cartilage by microspectrophotometry', *Histochemical Journal*, 28(8), pp. 577–590. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02331378/METRICS>.

Lener, T. *et al.* (2015) 'Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper', *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), p. 4. Available at: <https://doi.org/10.3402/JEV.V4.30087>.

Lin, S. *et al.* (2022) 'TGF- β 1 regulates chondrocyte proliferation and extracellular matrix synthesis via circPhf21a-Vegfa axis in osteoarthritis', *Cell communication and signaling : CCS*, 20(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/S12964-022-00881-9>.

Mabotuwana, N.S. *et al.* (2022) 'Paracrine Factors Released by Stem Cells of Mesenchymal Origin and their Effects in Cardiovascular Disease: A Systematic Review of Pre-clinical Studies', *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(8), p. 2606. Available at: <https://doi.org/10.1007/S12015-022-10429-6>.

Mortensen, R.E.J. *et al.* (2023) 'Pre-existing TGF- β -specific T-cell immunity in patients with pancreatic cancer predicts survival after checkpoint inhibitors combined with radiotherapy', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 11(3), p. e006432. Available at: <https://doi.org/10.1136/JITC-2022-006432>.

Múzes, G. and Sipos, F. (2022) 'Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases', *Cells*, 11(15). Available at: <https://doi.org/10.3390/CELLS11152300>.

Ouyang, Y. *et al.* (2019) 'Overexpression of SOX9 alleviates the progression of human osteoarthritis in vitro and in vivo', *Drug Design, Development and Therapy*,

13, p. 2833. Available at: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S203974>.

Palamà, M.E.F. *et al.* (2020) 'The secretome derived from mesenchymal stromal cells cultured in a xeno-free medium promotes human cartilage recovery in vitro', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 90. Available at: <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00090/BIBTEX>.

Pawitan, J.A. (2014) 'Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine', *BioMed Research International*, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/965849>.

Port, H. *et al.* (2023) 'A Highly Sensitive Biomarker of Type II Collagen C-Terminal Pro-Peptide Associated with Cartilage Formation', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS24010454>.

Simons, M. and Raposo, G. (2009) 'Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication', *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), pp. 575–581. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2009.03.007>.

Sugasawa, T. *et al.* (2020) 'Characterization of Osteoarthritis in a Medial Meniscectomy-Induced Animal Model Using Contrast-Enhanced X-ray Microtomography', *Biomedicines*, 8(3), p. 56. Available at: <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8030056>.

Wu, Z. *et al.* (2021) 'Collagen type II: From biosynthesis to advanced biomaterials for cartilage engineering', *Biomaterials and Biosystems*, 4, p. 100030. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBIOSY.2021.100030>.

Xue, K. *et al.* (2021) 'Hypoxic ADSCs-derived EVs promote the proliferation and chondrogenic differentiation of cartilage stem/progenitor cells', *Adipocyte*, 10(1), p. 322. Available at: <https://doi.org/10.1080/21623945.2021.1945210>.

Yang, Y. *et al.* (2023) 'Secretive derived from hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration and mitigate joint inflammation via extracellular vesicles', *Bioactive Materials*, 27, pp. 98–112. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2023.03.017>.

Yang, Z. *et al.* (2011) 'Sox-9 facilitates differentiation of adipose tissue-derived stem cells into a chondrocyte-like phenotype in vitro', *Journal of Orthopaedic Research*, 29(8), pp. 1291–1297. Available at: <https://doi.org/10.1002/JOR.21336>.

Yoon, H.J. *et al.* (2015) 'Type II collagen and glycosaminoglycan expression induction in primary human chondrocyte by TGF- β 1', *BMC Musculoskeletal Disorders*, 16(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/S12891-015-0599-X>.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa sobre o secretoma e fatores solúveis na manutenção do fenótipo condrogênico de condrócitos articulares apresenta um potencial significativo como terapia na osteoartrite. A revisão sistemática realizada no Capítulo I proporcionou uma melhor compreensão do microambiente articular em condições normais e na presença da osteoartrite. Ao examinar a expressão gênica e a inibição de fatores associados nessas duas situações, buscamos entender melhor as dificuldades enfrentadas pela cartilagem na regeneração, além de analisar fatores importantes para pré-condicionamento *in vitro* de MSCs necessários ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas. No Capítulo II, abordamos alguns desses fatores em cultivo celular de condrócitos primários tratados com o secretoma de MSCs. Observamos vantagens promissoras nesse contexto, com efeitos do secretoma na migração de condrócitos e produção de matriz cartilaginosa. No entanto, como em muitas áreas de pesquisa, enfrentamos desafios significativos. O baixo rendimento na produção de EVs, que inicialmente era o foco do estudo como um potencial tratamento para os condrócitos, é um exemplo desses obstáculos. Além disso, a ampla variedade de metodologias disponíveis e de isolamento das VEs resultam em baixa reprodutibilidade e confiabilidade. É crucial dedicar atenção especial aos aspectos necessários para a tradução dessas pesquisas para o uso clínico.

Adicionalmente, é importante ressaltar que a pesquisa em medicina regenerativa frequentemente enfrenta desafios financeiros devido à dificuldade em obter financiamento adequado. A realização de estudos tecnologicamente avançados requer recursos significativos, e a obtenção de financiamento adequado é fundamental para o avanço contínuo nessa área. Apesar dos desafios, a pesquisa sobre o secretoma e fatores solúveis na osteoartrite continua a oferecer um horizonte promissor para o desenvolvimento de terapias inovadoras. Com mais investimentos em pesquisa, a superação dos obstáculos enfrentados e a colaboração entre cientistas e profissionais da área da saúde, é possível avançar rumo a tratamentos

eficazes para a osteoartrite, beneficiando milhões de pessoas que sofrem com essa condição debilitante.