

Márcia Monteiro Franco

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Association of Strategies of Gene Delivery and Stem Cells for Cartilage Repair” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Marisa Botelho e da Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Márcia Monteiro Franco

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Association of Strategies of Gene Delivery and Stem Cells for Cartilage Repair” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Marisa Botelho e da Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, *Márcia Monteiro Franco*, estudante do *Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas*, com o nº 2011158608, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “*Association of Gene Delivery Strategies and Stem Cells for Cartilage Repair*” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 14 de setembro de 2017.

Márcia Monteiro Franco

(*Márcia Monteiro Franco*)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela instituição de ensino de excelência que representa, sobretudo devido a todo o corpo docente e não docente, que tão bem me transmitiu o conhecimento ao longo do meu percurso académico.

À Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes, por toda a disponibilidade, compreensão e rigor, fundamentais na excelente orientação da minha monografia.

À Dra. Marisa Botelho pela admirável orientação do meu estágio, assim como a toda a equipa da Farmácia Holon Leiria, pela paciência, ensinamentos e amizade.

Ao Núcleo de Estudantes de Farmácia da Associação Académica de Coimbra (NEF/AAC), em especial aos elementos do Pelouro da Formação 2016/2017, com os quais pude crescer imenso tanto na vertente profissional, como na vertente pessoal.

Ao programa Erasmus +, que me permitiu complementar o meu percurso académico proporcionando-me uma experiência muito enriquecedora.

Aos meus colegas de casa, pelo companheirismo e momentos vividos, sei que são amigos para a vida.

Aos meus amigos, aos de sempre e aos que partilharam este percurso académico comigo, por estarem presentes em todos os momentos.

Finalmente, ao alicerce do meu percurso, os meus pais e irmã que sempre me apoiaram em tudo o que faço, e principalmente por tornarem possível a realização deste sonho.

A vós, um agradecimento sincero!

“It always seems impossible until it’s done.”

Nelson Mandela

ÍNDICE

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA	6
ABREVIATURAS	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. CONTEXTUALIZAÇÃO DA FHL	9
3. PONTOS FORTES – <i>STRENGTHS</i>	10
3.1. Localização, Utentes e Horário de Funcionamento da FHL	10
3.2. Equipa Técnica	10
3.3. Farmácia Certificada	11
3.4. Grupo <i>Holon</i>	11
3.5. Organização do Estágio	13
3.6. <i>Robot</i>	13
3.7. Valormed.....	14
4. PONTOS FRACOS – <i>WEAKNESSES</i>	14
4.1. Programa Informático - <i>Winphar</i> ®.....	14
4.2. Medicamentos de referência vs DCI	15
4.3. Organismos de Comparticipação.....	15
4.4. Preparação de Medicamentos Manipulados.....	15
4.5. <i>Stock</i> reduzido e rutura de <i>stocks</i>	15
4.6. Intervenção Farmacêutica	16
4.7. Formações Externas	16
5. OPORTUNIDADES – <i>OPPORTUNITIES</i>	16
5.1. Testes Vida Saudável	16
5.2. Auditoria Interna.....	17
5.3. Projetos internos e externos	17
6. AMEAÇAS – <i>THREATS</i>	18
6.1. Cartão Sauda.....	18
6.2. Desconfiança dos Medicamentos Genéricos.....	18
6.3. Local de venda de MNSRM adjacente	19
6.4. Variação de preços	19
6.5. Dispensa de MSRM	19
7. CASOS CLÍNICOS	20
8. CONCLUSÃO	22
BIBLIOGRAFIA.....	23
ANEXO I	24

PORTE II – ASSOCIATION OF GENE DELIVERY STRATEGIES AND STEM CELLS FOR	
CARTILAGE REPAIR	25
ABBREVIATIONS	26
RESUMO	28
ABSTRACT.....	29
1. INTRODUCTION	30
2. ARTICULAR CARTILAGE.....	31
2.1. Articular Cartilage Formation.....	31
2.2. Articular Cartilage Structure.....	33
3. MECHANISMS OF ARTICULAR CARTILAGE DESTRUCTION	34
3.1. Inflammatory Mediators and Cartilage Degradation.....	35
3.2. Chondrocyte Hypertrophy and Osteophytosis.....	36
4. STEM CELLS	38
4.1. Mesenchymal Stem Cells.....	39
4.2. Sources of Mesenchymal Stem Cells.....	39
4.3 Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair and Regeneration.....	40
5. GENETIC MODIFICATION OF MSCs AS A STRATEGY TO ENHANCE ARTICULAR	
CARTILAGE REGENERATION/REPAIR	41
6. TARGET GENES FOR MSC’S MODIFICATION	42
7. STRATEGIES FOR GENE DELIVERY	43
8. CONCLUSION	46
REFERENCES	47

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

ABREVIATURAS

COE	Contraceção Oral de Emergência
CNP	Código Nacional de Produto
DCI	Denominação Comum Internacional
FHL	Farmácia <i>Holon</i> Leiria
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
MSRM	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i> (Pontos fortes, Pontos fracos, Oportunidades e Ameaças)

I. INTRODUÇÃO

O estágio em farmácia comunitária é fundamental para aplicar os conhecimentos adquiridos nos 5 anos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Este permite-nos ter uma visão global não só de farmácia comunitária, bem como de outras áreas do circuito do medicamento, como é a indústria farmacêutica e os armazenistas.

Por outro lado, a farmácia comunitária é a área do setor farmacêutico onde o farmacêutico, para além das suas atividades diretamente relacionadas com o medicamento, representa um agente de saúde pública. O farmacêutico é último contacto que o utente tem antes de iniciar uma nova terapêutica, tendo este um papel fundamental na saúde e bem-estar do utente.

As farmácias comunitárias, têm enfrentado vários desafios ao longo dos anos e várias modificações foram ocorrendo. Também um pouco na vertente da faculdade se manter atualizada e poder ajustar a formação de excelência ao contexto real do mercado laboral, o relatório de estágio contribuiu para um *feedback*, no formato de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) identificando os pontos fortes a manter, os pontos fracos a melhorar, as oportunidades a agarrar e as ameaças a ultrapassar.

O presente relatório corresponde ao estágio realizado na Farmácia *Holon* Leiria (FHL), no período de 3 de abril a 22 de julho de 2017.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO DA FHL

A FHL está localizada na Avenida Heróis de Angola, uma das principais artérias da cidade de Leiria.

O horário de funcionamento da mesma é das 09h00 às 00h00, de segunda a sábado, encerrando aos domingos e feriados.

A FHL tem uma zona de atendimento ao público com três postos de atendimento, sendo um deles sentado, destinado ao atendimento de utentes com dificuldades motoras, grávidas ou utentes que necessitem de um maior acompanhamento na terapêutica. Tem um gabinete onde se realiza a medição de parâmetros bioquímicos, a administração de vacinas, medicamentos e a prestação de serviços farmacêuticos. Dispõe também de uma zona de receção de encomendas e as instalações sanitárias. No piso superior encontra-se o gabinete da direção técnica, zona de refeições e o *robot*.

A equipa é constituída por 7 elementos, que para além do atendimento ao público têm outras funções específicas. O Dr. Nuno Machado, diretor técnico, é responsável pela definição dos objetivos financeiros e administração, a Dra. Marisa Botelho, farmacêutica substituta, responsável pelo sistema de gestão da qualidade, compras da farmácia e controlo do receituário de psicotrópicos; a Dra. Rita Girão, farmacêutica responsável pelo marketing e comunicação; Dra. Marina Marques, farmacêutica responsável pelo fecho do receituário; Dra. Tânia Cotrim – técnica superior de diagnóstico e terapêutica, responsável pelos projetos e serviços *Holon* e o Sr. Jorge Moreira, técnico de farmácia, responsável pela realização encomendas e pelos produtos *Holon*.

3. PONTOS FORTES

3.1. Localização, Utentes e Horário de Funcionamento da FHL

A FHL localiza-se na principal avenida da baixa de Leiria, estando nas imediações da rodoviária de Leiria, de supermercados, do teatro José Lúcio da Silva, de clínicas, consultórios e lojas de comércio diversificado. Por conseguinte, considero que a localização seja um ponto forte, pois é uma zona bastante movimentada com uma afluência de utentes muito diversos, proporcionando atendimentos distintos.

Apesar de grande parte dos utentes serem de passagem, também contactei com utentes fidelizados já da anteriormente denominada Farmácia Avenida, ainda assim conhecida por muitos. Estes são na sua maioria idosos, polimedicados, que tendo mais comorbidades deslocam-se com maior regularidade à farmácia, proporcionando-me desta forma um maior acompanhamento.

O facto do horário de funcionamento ser alargado permitiu-me ter contacto com o período noturno, o que me permitiu presenciar um tipo de atendimento diferente do atendimento diurno, sendo este na maioria após uma ida à urgência.

Aos sábados também verifiquei que os utentes e tipo de atendimento eram distintos, envolvendo utentes mais jovens assim como um maior número de turistas, possivelmente devido ao estágio ter decorrido no período de verão. Estes usualmente procuravam aconselhamento farmacêutico de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), o que me permitiu desenvolver as minhas competências nesta área bem como melhorar competências linguísticas. Também foi interessante tentar encontrar medicamentos com composição semelhante aos que tinham nos seus países.

3.2. Equipa Técnica

A FHL tem uma equipa jovem, dinâmica e bastante motivada. É exemplar o espírito de equipa e entre ajuda presente na FHL, este foi sem dúvida um dos aspetos que mais me marcou durante o meu estágio. Integraram-me da melhor forma, mostrando-se sempre disponíveis para troca de ideias e esclarecimento das minhas dúvidas garantindo assim uma progressão na qualidade do meu atendimento. Esta postura de esclarecimento de dúvidas não era só em relação às estagiárias, mas permanentemente entre todos os elementos da equipa, o que considero bastante benéfico, pois cada um pode dar o seu contributo para a construção de uma equipa mais forte.

3.3. Farmácia Certificada

Desde 2016 que a FHL é certificada segundo a norma NP EN ISO 9001:2008. Anualmente, realiza-se uma auditoria externa que visa a renovação da certificação, sendo esta antecedida por uma auditoria interna. Neste âmbito, no início do estágio, foi-me apresentado todo o sistema de gestão da qualidade.

Estagiar numa farmácia certificada foi sem dúvida uma mais-valia, pois todos os processos relacionados com a farmácia realizam-se de forma regulamentada, organizada e documentada, aumentando assim a qualidade do serviço prestado aos utentes. Saliento ainda a organização e rotatividade de funções da equipa nomeadamente o registo das temperaturas, controlo de prazos de validade entre outros.

3.4. Grupo *Holon*

A palavra *Holon* surge do grego *Holos*, conceito que significa algo que é um todo em si mesmo e, simultaneamente, uma parte de um sistema maior. Desta forma, o grupo *Holon* é uma rede nacional de farmácias, independentes e autónomas que partilham uma mesma marca, imagem e forma de estar. Cada farmácia tem a responsabilidade de contribuir para que o grupo *Holon* seja mais forte. ¹

O facto de ter escolhido estagiar numa farmácia *Holon* foi motivado pelo facto de querer experienciar o atendimento personalizado ao utente, bem como todas as vantagens associadas ao grupo, as quais passo a destacar:

- **Protocolos Aconselhamento e Manual de Atendimento**

Com o intuito de uniformizar a forma de atendimento foram criados manuais de atendimento e protocolos de aconselhamento farmacêutico. Cada um destes enquadra e descreve uma situação de aconselhamento farmacêutico distinto, as questões a colocar ao utente, as situações que devemos encaminhar para a consulta médica, medidas não farmacológicas adequadas, bem como exemplos do tratamento farmacológico aconselhado.

Sempre que me surgia alguma dúvida, estes revelaram-se essenciais durante todo o estágio, principalmente na fase inicial da minha aprendizagem, onde tive a oportunidade ler todos estes protocolos e consolidar melhor a informação, preparando-me assim para o atendimento.

▪ **Serviços Holon**

Durante o meu estágio pude aprender mais acerca dos serviços prestados na farmácia, nomeadamente serviços de nutrição, podologia, pé diabético, dermofarmácia, consulta farmacêutica nível III e preparação individualizada da medicação (PIM) (Fig.1).



Figura 1 – Modelo de preparação individualizada da medicação.

A intervenção farmacêutica dispõe de várias intervenções entre elas a consulta

farmacêutica e a preparação do PIM. A FHL disponibiliza também o serviço de administração de injetáveis e vacinas, que pude presenciar diversas vezes ao longo do estágio. Também pude realizar, frequentemente, medições de pressão arterial, glicémia e colesterol.

▪ **Produtos Holon**

Tendo em vista a saúde e bem-estar do utente, o grupo *Holon* desenvolveu uma vasta gama de produtos, desde produtos de higiene e de primeiros socorros a suplementos alimentares e dispositivos médicos. Visto que estes apresentavam um preço competitivo em relação aos produtos já existentes, permitiu-me ter mais alternativas a oferecer ao utente. Pois muitas das vezes ter opções mais económicas é um fator relevante para fidelizar o cliente, e mais importante do que isso, evitar que este suspenda o tratamento.

▪ **Projetos**

Cada farmácia deve implementar os projetos do grupo *Holon*, o que a meu ver é um aspeto positivo, pois demonstra que o farmacêutico para além da dispensa de medicamentos e aconselhamento farmacêutico, deve desempenhar um papel proativo na sociedade, participando ativamente na promoção da saúde e deteção precoce e prevenção da doença.

▪ **Formações Internas**

Considero que as formações são importantes para o crescimento dos estagiários, que numa fase inicial têm maior dificuldade, assim como para a restante equipa, de modo a estar a par de todas as informações relacionadas com o medicamento e produtos de saúde.

Durante o estágio pude receber formação por parte das prestadoras de serviços *Holon*. Assisti à formação de podologia onde me foram explicadas as principais patologias e as situações em que devemos referenciar este serviço. Tive também oportunidade de assistir à formação de Nutrição, em que me foram apresentados os produtos *Holon* respeitantes à linha de emagrecimento, o que me permitiu estar mais segura no aconselhamento dos mesmos. Presenciei também formação correspondente aos serviços prestados pela intervenção farmacêutica.

3.5. Organização do Estágio

Fui muito bem recebida no primeiro dia de estágio, que curiosamente coincidiu com o aniversário da farmácia, sendo por isso um dia festivo. Para além disto, um novo elemento integrou a equipa técnica, pelo que pude acompanhar a sua formação. Achei que me explicaram detalhadamente as atividades relacionadas com a realização, receção e devolução de encomendas, notas de crédito, armazenagem no *robot* da farmácia, realização de análises clínicas e validação do receituário. Durante o período da manhã dava entrada das encomendas o que foi crucial para contactar com os medicamentos e associar os nomes comerciais com a denominação comum internacional (DCI). No período da tarde comecei por acompanhar os atendimentos, posteriormente a atender acompanhada, e por fim, a atender autonomamente. Considero que este atendimento progressivo preparou-me adequadamente para a fase autónoma, tendo sempre a equipa disponível para qualquer dúvida que surgisse.

3.6. Robot

O *robot* é um elemento essencial, na FHL, encontra-se totalmente visível (Fig.2), sendo também por isso uma atração da farmácia. Este elemento é uma mais valia pois permite armazenar grande quantidade de produtos e a dispensa destes é feita de acordo com o princípio “*first in, first out*” o que permite uma



Figura 2 - Zona de atendimento da FHL.

melhor gestão dos prazos de validade. Considero um ponto forte, primeiramente porque minimiza consideravelmente os erros de dispensa, uma vez que os produtos são arrumados

de acordo com o código nacional de produto (CNP) que é posteriormente pedido pelo computador. Por outro lado, o tempo que teria de despendido na deslocação ao *backoffice* para obter o produto, posso passá-lo com o utente, não havendo uma interrupção no atendimento.

Esta poupança de tempo permitiu um melhor atendimento, tendo maior disponibilidade para a escuta ativa das necessidades do utente e para garantir que a informação era bem transmitida e compreendida.

3.7. Valormed

A FHL colabora com a VALORMED na recolha dos medicamentos fora de prazo ou que já não são utilizados. Como farmacêuticos, considero que devemos ter um papel ativo durante o uso propriamente dito, mas também na parte da sua eliminação. Sempre que possível alertávamos os utentes para o uso racional do medicamento e minimização do impacto que os resíduos de medicamentos podem vir a causar sobre o meio ambiente. Fiquei bastante surpreendida pela positiva ao deparar-me que os utentes se deslocavam frequentemente à farmácia apenas para depositar os medicamentos, o que revela sensibilidade para esta problemática.

4. PONTOS FRACOS

4.1. Programa Informático - Winphar[®]

O *Winphar* é o *software* utilizado na FHL, que permite rececionar encomendas, realizar devoluções, processar receituário e faturação, controlo de prazos de validade, análises reais das vendas, stocks e compras, tendo bastante impacto na gestão da farmácia.²

Por outro lado, tem também uma componente de aconselhamento farmacêutico. Sem dúvida que este foi um dos principais pontos fracos no decorrer do estágio, uma vez que esta componente era muito limitada no que diz respeito a informação técnico-científica, nomeadamente consulta de informação relativa a qualquer medicamento, como indicações terapêuticas, posologia reações adversas, contraindicações entre outras informações úteis.

4.2. Medicamentos de Referência vs DCI

Inicialmente, senti dificuldades com as designações dos medicamentos de referência e a sua associação aos diferentes princípios ativos, dificultando por vezes no atendimento. Contudo, à medida que situações semelhantes iam aparecendo e com a ajuda dos colegas, consegui melhorar esta lacuna.

4.3. Organismos de Participação

Existem vários organismos de participação, antes do estágio não tinha contactado com esta realidade sendo que inicialmente, esta foi uma das minhas dificuldades. Ao longo do tempo foi ultrapassada.

4.4. Preparação de Medicamentos Manipulados

A FHL optou por não realizar medicamentos manipulados dado que estes são pouco solicitados. Para além disso, a falta de um espaço adequado assim como todas as questões de qualidade que estes acarretam também são um impedimento. Cada vez mais a indústria farmacêutica tenta adaptar-se às necessidades dos utentes oferecendo as mais diversas alternativas, pelo que estas preparações dia para dia vão caindo em desuso. Porém, quando requisitados na FHL estes eram encaminhados para uma farmácia subcontratada. Desta forma considero que tenha sido um ponto franco o facto de não ter tido oportunidade de contactar com a preparação de medicamentos manipulados. No entanto, pude efetuar diversas vezes a reconstituição de preparações extemporâneas, nomeadamente antibióticos orais.

4.5. Stock Reduzido e Rutura de Stocks

As farmácias têm de dispor, no mínimo, no seu *stock* de três medicamentos de cada grupo homogéneo, de entre aqueles que correspondem aos cinco preços mais baratos.³

A FHL ter um *stock* reduzido de cada produto, acabando sempre por haver roturas. Esta situação verificava-se em produtos de baixa rotação, rateados/esgotados nos armazéns e em medicamentos que não constavam na encomenda automática. Geralmente conseguíamos dar resposta ao pedido no próprio dia, contudo era sempre um fator de insatisfação para o utente e desconfortável para o farmacêutico.

4.6. Intervenção Farmacêutica

Considero a Intervenção Farmacêutica um dos pontos com maior potencial de aprendizagem do grupo *Holon* bem como da aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo do MICF. Não tive oportunidade de assistir a uma consulta farmacêutica, nem de participar na preparação individualizada da medicação, aspetos que gostaria de ter aprofundado.

4.7. Formações Externas

As formações são uma excelente ferramenta para o farmacêutico estar permanentemente atualizado. Ao longo do estágio apenas se proporcionaram duas oportunidades de participar formações externas, lecionadas por delegados de laboratório farmacêuticos, uma do grupo Merck e outra do grupo Yfarma. A meu ver foi insuficiente e gostava de ter participado em mais formações, dado todo o potencial de aprendizagem que estas constituem.

5. OPORTUNIDADES

5.1. Testes Vida Saudável

Durante o meu estágio tive oportunidade participar na parceria “Testes de Vida Saudável”, fruto de um protocolo estabelecido entre as Farmácias *Holon* e a Advance Care (gestora de seguros), no âmbito do Serviço de Apoio à Subscrição e Avaliação Clínica, prestado pela Advance Care a seguradoras do ramo vida.

Para tal, realizei testes aos segurados que englobaram a medição da pressão arterial, registo do peso e altura e aplicação do teste da cotinina (Fig.3), um imunoensaio para determinação qualitativa, através da saliva, de hábitos tabágicos ou exposição ao fumo do tabaco. Foi uma experiência diferente, que me enriqueceu o programa de estágio e os meus conhecimentos.

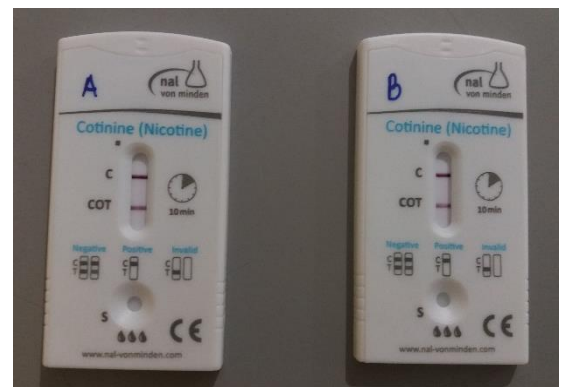


Figura 3 -Teste de Cotinina.

5.2. Auditoria Interna

Tive oportunidade de presenciar o decorrer de uma auditoria interna, de compreender a sua estruturação e de auxiliar a equipa nos meses antecedentes a verificar se todos os pontos referidos no manual da qualidade estavam conformes.

5.3. Projetos Internos e Externos

No decorrer do estágio participei em vários projetos (Anexo I):

- **Rastreios nas Piscinas Municipais de Leiria**

Os rastreios nas piscinas municipais de Leiria integraram um dos projetos da FHL. Estes decorreram nas instalações das piscinas municipais e destinaram-se à população idosa. Foram avaliados parâmetros como a glicémia e a pressão arterial. Com este projeto pude ter uma maior proximidade com o utente, apercebendo-me do reconhecimento do farmacêutico como um profissional, que para além de dispensa de medicamentos, também representa um agente de saúde. Além disso, considero que o farmacêutico não deve ser associado apenas à doença, deve ser visto como um interveniente junto da população “saudável”, pois muitas vezes é nos rastreios que se detetam alterações, representando uma forma de prevenção.

- **“Vamos Dar Corda aos Sapatos”**

Para assinalar o Dia Mundial da Atividade Física, as Farmácias *Holon* organizaram uma corrida “Vamos dar corda aos sapatos”, desafiando os seus utentes a caminhar pela sua saúde. Mais uma vez, o papel do farmacêutico foi muito além do espaço da farmácia. As iniciativas de promoção de educação para a saúde mostram outra vertente que o farmacêutico pode desempenhar como agente de saúde pública.

- **Dia da Criança**

Para celebrar o dia da criança, a *FHL* esteve presente numa iniciativa que juntou diversas entidades, destinada a crianças dos 4 aos 9 anos. No nosso posto dinamizámos jogos didáticos de promoção para a saúde e uso responsável do medicamento. Esta foi uma iniciativa na qual adorei fazer parte, já desde a altura da participação na Geração Saudável promovida pela Ordem dos Farmacêuticos, fui desenvolvendo um imenso gosto em transmitir conhecimentos aos mais novos. Penso que a consciencialização para o uso responsável do medicamento e promoção para a saúde deve ser feita desde criança.

▪ **Shop On**

O *Shop On* foi uma atividade promovida pela Associação de Comércio, Indústria e Serviços da Região de Leiria, cujo objetivo foi a valorização do comércio local. Os estabelecimentos aderentes permaneceram em funcionamento até às 24h, com ofertas e descontos para os seus clientes, acompanhados de animação musical na rua.

No exterior, a FHL desafiou os utentes que iam passando a testar alguns dos produtos *Holon* em exposição, oferecendo amostras dos mesmos conjuntamente com a revista *Holon*. Foi uma oportunidade de demonstrar as alternativas que produtos *Holon* oferecem, num contexto mais descontraído, notando-se maior receptividade dos utentes em comparação com o atendimento na farmácia.

6. AMEAÇAS

6.1. Cartão Saúda

O cartão Saúda é o cartão de fidelização que pode ser utilizado na rede de Farmácias Portuguesas⁴. Foram diversas as vezes que os utentes na impossibilidade de utilizar o referido cartão na FHL, negaram-se a ser atendidos, inclusivamente já na fase do pagamento, após a explicação de como utilizar todos os produtos.

6.2. Desconfiança nos Medicamentos Genéricos

A prescrição por DCI veio permitir ao utente optar por medicamento de referência ou pelo medicamento genérico. Ao questionar o utente pela sua preferência, a resposta na maior parte das vezes era o medicamento de referência. A título de exemplo, deparei-me com a indisponibilidade do medicamento de referência, sugerindo ao utente optar pelo genérico, ao qual o utente respondeu que preferia tomar o medicamento de referência que tinha em casa com a validade expirada, do que optar pelo medicamento genérico.

O caso supracitado revela que ainda muito trabalho tem de ser feito para a desmitificação dos medicamentos genéricos, tendo o farmacêutico um papel ativo neste sentido. O farmacêutico é constantemente confrontado com a questão de se o medicamento de referência é igual ao medicamento genérico e temos de estar conscientes da nossa resposta e que eventuais diferenças acabam por ser tidas como responsabilidade do farmacêutico, levando ao aumento da desconfiança.

6.3. Local de venda de MNSRM adjacente

Ao lado da FHL existe um supermercado onde são vendidos MNSRM. Para além do que é habitualmente discutido relacionado com o fator competitivo que estes representam, a meu ver o mais preocupante é o facto de a venda de MNSRM se ter banalizado ao longo do tempo, verificando-se atualmente uma automedicação irresponsável. Esta é motivada porque nesta situação em específico não há aconselhamento farmacêutico na escolha do medicamento mais indicado para uma dada situação, e muito menos, relativamente à toma do mesmo. Por vezes, os utentes vinham pedir o aconselhamento na farmácia e iam de seguida comprar no supermercado, pois o preço era mais vantajoso. Este tipo de situações é um pouco frustrante para quem faz o aconselhamento.

6.4. Variação de preços

Outro aspeto que constituí uma ameaça e gera desconfiança é o preço dos medicamentos. Primeiramente, quanto ao preço que vem sugerido em parte das receitas, muitos utentes ainda levantam problemas com a frase “Esta prescrição custa-lhe, no máximo, x €, a não ser que opte por um medicamento mais caro”, penso esta devia ser reformulada para um melhor entendimento. Por outro lado, a mudança de preços dos medicamentos ou atualização das comparticipações também são outros fatores de desconfiança.

6.5. Dispensa de MSRM

Praticamente todos os dias fui abordada para ceder MSRM, sem a respetiva receita médica. O que pretendiam, na grande parte das vezes, era a medicação crónica que já faziam há muito tempo, ou porque apenas tinham consulta no mês seguinte, ou porque o médico estava de férias, eram múltiplas as justificações. Ainda mais complicado era no caso de MSRS que não são comparticipados, os utentes queixavam-se de ter de pagar uma consulta para obter uma receita do medicamento que nem sequer é comparticipado. Foi um pouco difícil gerir estas situações, perante a minha negação, apercebia-me que os utentes sentiam que era má vontade da minha parte.

CASOS CLÍNICOS

Durante o estágio deparei-me com atendimentos muito variados, gostaria então de destacar dois atendimentos que confirmaram que uma das capacidades mais importantes que o farmacêutico deve desenvolver é a escuta ativa e de questionamento do utente de modo a prestar o melhor atendimento possível.

Caso Clínico I

A senhora A. B. dirige-se à farmácia para levantar a medicação habitual do seu marido.

No decorrer do atendimento, à medida que vou colocando os medicamentos em cima do balcão, a utente refere que, de vez em quando, costuma tomar um dos comprimidos do marido quando tem insónias, apontando para a caixa de Aspirina GR[®] 100 mg⁵. Perante esta situação, alertei a utente para o facto de que não deve utilizar a medicação que é prescrita para outra pessoa, além de que o medicamento não era indicado nessa situação. A utente reconheceu que possivelmente estaria a fazer confusão e pediu-me para então lhe aconselhar algo que auxiliasse a dormir melhor. Questionei quando tinham sido o início dos sintomas, se era uma situação pontual, se associava a insónia ou a algum estado de ansiedade, se tinha por hábito tomar bebidas com cafeína e se se encontrava a fazer algum tipo de medicação. A utente referiu que era uma situação que acontecia algumas vezes e que possivelmente estaria associada a ansiedade. Aconselhei então o Holon Plus Valeriana e Passiflora[®], pelas suas propriedades promoção e regularização do sono e redução de estados de ansiedade. Recomendei algumas medidas de higiene do sono, como procurar sempre deitar-se e acordar à mesma hora, mesmo durante o fim-de-semana, estabelecer uma rotina relaxante antes de se deitar (tomar um banho quente, beber uma bebida quente, ler um pouco, ouvir música), criar um ambiente tranquilo no quarto, fazer refeições leves próximo da hora de deitar e evitar estimulantes à noite. Referi ainda que caso após duas semanas não fosse eficaz para consultar o médico.

Caso Clínico II

Uma jovem, dirige-se à farmácia para adquirir um teste de gravidez, referindo que tinha ocorrido uma relação sexual desprotegida, na noite anterior, desejando saber se estaria grávida. Perante o sucedido, explico que não valia a pena realizar o teste, pois o resultado seria negativo, uma vez que a concentração de hormona gonadotrofina coriónica seria insuficiente para ser detetada. Visto que seria uma gravidez não desejada, aconselho então a utilização da contraceção oral de emergência (COE). Questionei se tomava contraceptivos orais, se tinha algum problema de saúde, se tomava algum tipo de medicação e se alguma vez tinha tomado a COE, sendo todas as respostas negativas.

Quanto à última menstruação, a utente referiu que tinha sido há duas semanas atrás, estando por isso possivelmente no período de ovulação.

Cedi-lhe a Norlevo[®] (1,5 mg de levonorgestrel)⁶ e informei-a da sua toma única e que o fizesse o mais rápido possível. Alertei a utente para possíveis efeitos secundários, tais como as náuseas, tonturas ou dores pélvicas assim como perturbações menstruais, que são muito frequentes, podendo antecipar ou atrasar a menstruação seguinte. Adverti também para o fato de que se ocorressem vômitos nas três horas após a toma que seria necessário tomar outro comprimido de imediato. Reforcei que a COE atua inibindo ou atrasando a ovulação, e que caso a ovulação ocorra antes de uma relação sexual não protegida, a COE já não seria eficaz, não sendo por isso, eficazes a 100%.

Por fim, salientei que a COE não deve substituir um método contraceptivo de uso regular e que não previne a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis. Sugeri que consultasse um médico caso desejasse iniciar a terapêutica de contraceção hormonal regular.

CONCLUSÃO

Este estágio representou para mim uma experiência muito enriquecedora enquanto futura farmacêutica. Grande parte do conhecimento advém da aplicação em contexto real e com a experiência adquirida, sendo por isso uma mais valia na ponte de transição da universidade para o mercado de trabalho.

Pude compreender melhor o contexto atual das farmácias comunitárias, além de consolidar e ter alargado os meus conhecimentos, contactando com inúmeros produtos, utentes, situações e experiências no atendimento.

Não queria deixar de mencionar a oportunidade que tive de participar em diversos projetos de intervenção farmacêutica e promoção para a saúde, que considero essencial para o papel ativo que o farmacêutico deve ter na comunidade. A intervenção farmacêutica é um mundo de oportunidades e penso que a valorização do farmacêutico no futuro passará pela implementação de serviços de acompanhamento farmacoterapêutico, como as que já se observam noutros países da Europa.

Numa perspetiva futura e face à evolução tecnológica que temos presenciado a vários níveis, que inclusivamente é cada vez mais transposta para a área da saúde (*eHealth*), o papel do farmacêutico em farmácia comunitária, irá enfrentar alguns desafios em demonstrar a importância e valor da nossa profissão na saúde pública. Por exemplo, atualmente já se nota uma geração de utentes cada vez mais informados que confrontam o farmacêutico com o *Dr. Google*, dando a entender que tem mais credibilidade que um farmacêutico. O setor farmacêutico tem de estar preparado para a evolução e munir-se de ferramentas que o preparem para a mudança.

Uma nota final de agradecimento a toda a equipa da FHL por toda a disponibilidade, apoio e amizade, que fizeram deste estágio uma experiência única.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Grupo Holon. - **Universo Holon** [Acedido a 04 agosto de 2017] disponível em: http://www.grupo-Holon.pt/pt/public/universo_Holon
- 2 - WINPHAR. - **A gestão inteligente da farmácia.** Winphar. [Acedido a 20 de agosto 2017], disponível em <http://www.winphar.pt>.
- 3 - INFARMED. - **Regras de prescrição e dispensa de medicamentos** – Disposições transitórias. [Acedido a 05 de agosto 2017], disponível em: <http://www2.acss.min-saude.pt/Portals/0/Circular%20Informativa%20Conjunta%20N%C2%BA%2001-INFARMED-ACSS.pdf>
- 4 - Cartão Saúda [Acedido a 06 de agosto 2017], disponível em: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/saуда>
- 5 – INFARMED, I.P. - **Resumo das Características do Medicamento – Aspirina GR® 100 mg.** [Acedido a 10 de agosto 2017], disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=29131&tipo_doc=rcm
- 6 – INFARMED, I.P. - **Resumo das Características do Medicamento – Norlevo® 1,5 mg comprimido.** [Acedido a 11 de agosto 2017], disponível em: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=29587&tipo_doc=rcm

ANEXO I – Projetos e Atividades Holon

Corrida “Vamos Dar Corda aos Sapatos”



Dia da Criança



Shop On



PARTE II

**ASSOCIATION OF GENE DELIVERY
STRATEGIES AND STEM CELLS FOR
CARTILAGE REPAIR**

ABBREVIATIONS

ADAMTS-5	A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs 5
AD-MSCs	Adipose-derived mesenchymal stem cells
ALP	Alkaline phosphatase
BM-MSCs	Bone marrow MSCs
BMP	Bone morphogenetic protein
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
ECM	Extracellular cartilage matrix
FGF	Fibroblast growth factor
FLSs	Fibroblast-like synoviocytes
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
IGFBPs	IGF-I binding proteins
IHH	Indian hedgehog
IL	Interleukin
LV	Lentiviral vector
MMPs	Matrix metalloproteinases
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
NO	Nitric Oxide
OA	Osteoarthritis
POC	Primary ossification center
SOC	Secondary ossification center
PGE ₂	Prostaglandin E2
PGs	Prostaglandins
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
ROS	Reactive Oxygen Species
Runx2	Runt-related transcription factor
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
Smad	Sma and Mad Related Family
S-MSCs	Synovial MSCs
SOX	Sex-determining region Y-type high-mobility group box
TD-MSCs	Tendon-derived mesenchymal stem cells
TGF- β	Transforming Growth Factor β

TNF α	Tumor necrosis factor α
UC-MSCs	Umbilical cord MSCs
VEGF	Vascular endothelial growth factor

RESUMO

A cartilagem articular apresenta reduzida capacidade de regeneração, sendo atualmente um grande desafio reproduzir uma estrutura hialina semelhante à original com as mesmas propriedades biomecânicas.

As células estaminais mesenquimais são providas de propriedades únicas como a capacidade de auto-renovação e a capacidade de se diferenciarem em condrócitos. Desta forma, estas células poderão ser geneticamente modificadas para melhorar os processos de reparação após transplante para o local da lesão. São, por isso, uma alternativa promissora no tratamento de lesões resultantes de traumas, assim como relacionadas com a progressão de doenças articulares como a osteoartrite. No entanto, ainda não foi possível obter cartilagem hialina semelhante à nativa utilizando estas células, pelo que a sua modificação através da introdução de genes específicos é atualmente encarada como uma estratégia mais promissora.

As células estaminais derivadas da medula óssea são as mais utilizadas, seguidas pelas células estaminais do tecido adiposo, sinoviais e derivadas do perióstio. Na maioria das vezes, estas são modificadas para expressar fatores de crescimento e/ou fatores de transcrição, entre outros.

Nesta monografia, pretende-se apresentar resumidamente as estratégias de reparação ou regeneração da cartilagem que utilizam a associação da terapia génica e células estaminais mesenquimais, bem como as dificuldades que lhe estão associadas e as perspetivas de desenvolvimento dessas estratégias.

Palavras-chave: Reparação da cartilagem articular, Células estaminais mesenquimais, Condrogênese, Transferência de genes, Terapia génica.

ABSTRACT

Adult articular cartilage has a low capacity for self-renewal. Reproduction of the original hyaline structure with alike biomechanical functional integrity in damaged cartilage remains a major clinical challenge. Approaches based on the transfer of genetically modified cells to sites of injury may be a promising alternative to treat articular cartilage lesions resulting from trauma or related to the progression of osteoarthritis (OA).

Mesenchymal stem cells (MSCs) have notable properties such as self-renewal capacity, multipotency and chondrogenic differentiation potential, making them an attractive source of cells for cartilage regeneration/repair. They may be modified by gene transfer protocols to reinforce their potency and consequently, to enhance the healing processes in damaged tissue following transplantation in sites of cartilage injury. However, it has not yet been possible to obtain hyaline cartilage similar to the native one using these cells, so its modification through the introduction of specific genes is currently regarded as a more promising strategy.

Bone marrow-derived stem cells are the most used, followed by adipose stem cells, synovial and periosteum-derived MSCs. They are modified mostly to express growth factors and/or regulatory transcription factors, among others.

This monograph intends to briefly present the strategies of repair or regeneration of cartilage combining gene therapy and mesenchymal stem cells, as well as the difficulties associated with it and the perspectives of development of these strategies.

Keywords: Articular cartilage regeneration/repair, mesenchymal stem cells, chondrogenic differentiation, gene transfer, gene therapy.

I. INTRODUCTION

The articular cartilage is a specialized connective tissue present in the articulating extremities of bones such as in the knee, hand and hip, providing joint mobility and load transmission. Due to the lack of innervation, vascularization and despite the presence of some cells with chondroregenerative potential, once articular cartilage is injured it has limited a capacity of self-regeneration. ¹

Many situations can lead to cartilage loss or damage, such as trauma and development of post traumatic joint diseases.² On the other hand, cartilage deterioration may happen in response to inappropriate mechanical stress related to high impact sports practice, like football, that is associated with the development of sport-related articular cartilage damage of the knee, which if not treated may cause early OA, the most common degenerative joint disease with central concern among the different types of arthritis.³

The 2010 Global Burden of Disease Study reports that musculoskeletal diseases are growing as the elderly population increases worldwide. Currently are the largest group of chronic diseases and a major cause of disability on the working part of our population. According to the United Nations, 130 million people will suffer from OA by 2050. ⁴

The EpiReumaPt survey reports that OA is also common among the portuguese population, particularly knee OA, with a prevalence of 12.4%, followed by hand OA (8.7%) and hip OA (2.9%). In addition, it has a huge impact in terms of health and social resources. ⁵

Although many clinical options have been developed to treat cartilage damage, currently none of them totally allow for an effective and full regeneration of the original hyaline cartilage structure made of type II collagen. Instead, it can lead to the formation of a disorganized fibrocartilaginous tissue made of type I collagen, with reduced biomechanical properties, challenging for the development of new therapeutic options.

Recent studies demonstrated promising results regarding a therapy using stem cells genetically modified to deliver factors that allows for the durable production of therapeutic factors in sites of cartilage lesions. ⁶

This monograph intends to briefly present the strategies of repair or regeneration of cartilage combining gene therapy and mesenchymal stem cells, as well as the difficulties associated with it and the perspectives of development of these strategies.

2. ARTICULAR CARTILAGE

Cartilage is an essential structural component of the human body. There are three different types of cartilage tissue: hyaline, elastic, and fibrocartilage, of which hyaline cartilage is the most abundant type in adults. Hyaline cartilage plays an important role in the development of skeleton during fetal development thereafter replaced by solid bones (endochondral ossification). In adults, it is present in the respiratory system (trachea), costal cartilages and covering the articular surfaces of bones (articular cartilage).

Articular cartilage is a complex thin layer of specialized connective tissue that covers articular surfaces in diarthrodial joints. The chondrocytes are the only cell population present in articular cartilage, responsible for synthesis and maintenance of a dense extracellular cartilage matrix (ECM).⁷

Articular cartilage is mainly composed of water (70%-80%) which binds to ECM components such as proteoglycans (20-30%) mainly aggrecan; collagen fibrils (75%) mostly type II collagen but also type VI, IX, XI and XIV; and other minor proteins such as cartilage oligomeric matrix protein (COMP), link protein, fibromodulin, fibronectin, decorin and tenascin.¹

2.1 ARTICULAR CARTILAGE FORMATION

For a better understanding of the complexity of articular cartilage, the knowledge on the processes of cartilage formation and growth during skeletal development and respective implicated pathways is fundamental. Also, it allows for a better comprehension of the mechanisms of cartilage damage and repair.

Embryogenesis is responsible for the formation of three germ layers of cells: mesoderm, ectoderm and endoderm. During limb development, mesenchymal stem cells, derived from mesoderm, are involved in the process of endochondral ossification through different steps: MSC condensation, differentiation to mature chondrocytes, terminal differentiation to hypertrophy and finally bone formation (Fig.1).⁷

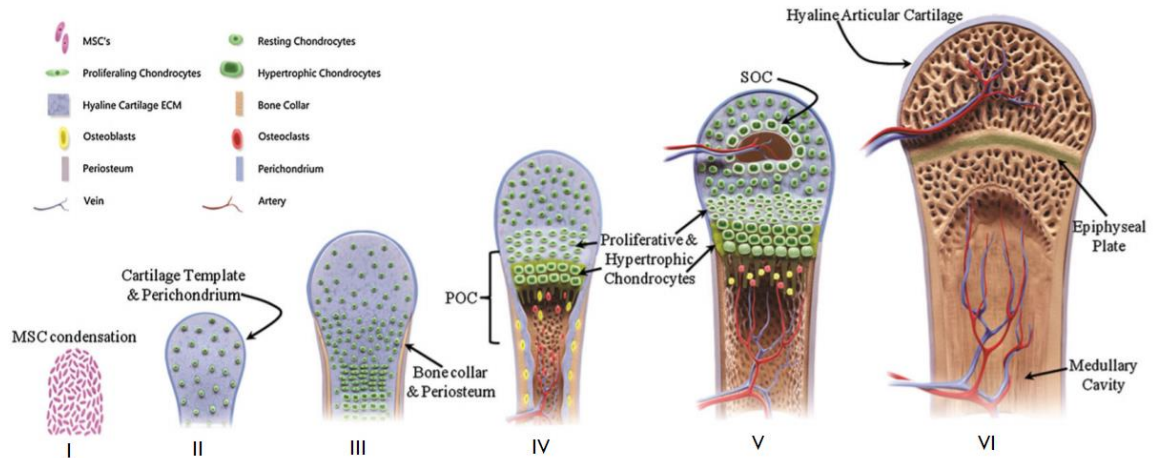


Fig.1 – Endochondral ossification: (I) Mesenchymal stem cells condense and (II) undergo chondrogenic differentiation to form the hyaline cartilage template of future long bones; MSCs located on the periphery form the perichondrium. (III) Cells in the middle of the template undergo hypertrophy, as cells situated on the periphery undergo direct osteoblastic differentiation to form an encircling bone collar. (IV) Hypertrophic cells initiate mineralization of the cartilage. The diaphysis is invaded by blood vessels and cells, resulting in the formation of the primary ossification center (POC). Osteoclasts are responsible for remodeling of the calcified cartilage template, while osteoblasts lay down the osteoid of developing bone. (V) The epiphyses, are invaded by blood vessels, and the secondary ossification center (SOC) is formed, (VI) the periphery maintains a stable cartilage phenotype, resulting in hyaline articular surfaces present in joints. The epiphyseal growth plate between the POC and SOC is the site responsible for longitudinal bone growth followed by ossifying process in adulthood. Reproduced from reference 8.

MSCs initially undergo cell proliferation and clustering, increasing in cell volume, based on cell-matrix and cell-cell interactions via cell adhesion molecules including N-Cadherin (Ca^{2+} -dependent) and neural cell adhesion molecule (N-CAM). At this point, the cells produce ECM molecules such as type-I collagen and fibronectin. Transforming growth factor β (TGF- β) is responsible for the beginning of the MSC condensation process.⁸

MSCs next experience important changes in their patterns of ECM production (shift from type-I collagen to type-II, type-IX, type-XI collagen, aggrecan and hyaluronan production) assuming the rounded shape that is typical of differentiated chondrocytes. These processes are mostly controlled by TGF- β and transcription factors of the cartilage-specific sex-determining region Y-type high-mobility group box family (SOX9, SOX5, SOX6 - together referred to as the SOX trio).⁹

After this stage, cells differentiate into two lineages: resting chondrocytes that form articular cartilage and proliferating chondrocytes which undergo further phases of differentiation that lead to matrix calcification and ossification whereby the hypertrophic cartilage is replaced by bone.¹⁰

Therefore, proliferating cells undergo hypertrophy and terminal differentiation, leading to matrix calcification and ossification. There is a replacement of type-II by type-X collagen and expression of matrix metalloproteinase (MMP)-13, alkaline phosphatase (ALP), and calcium-dependent hydroxyapatite deposition (mineralization). These processes are mostly regulated by the parathyroid-hormone related protein (PTHrP)/Indian hedgehog (IHH) axis and by the bone-specific runt-related transcription factor 2 (Runx2).⁹

The last steps of endochondral ossification include additional ECM remodeling (expression of type-I collagen, osteocalcin, osteopontin), apoptosis of hypertrophic chondrocytes, expression of the angiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF) required for invasion by newly formed blood vessels, additional expression of MMPs and, finally, action of osteoclasts and osteoblasts which convert the nonvascularized and hypoxic tissue into bone. These processes are mostly controlled by the Wnt/ β -catenin pathway and Runx2.⁹

2.2 ARTICULAR CARTILAGE STRUCTURE

Articular cartilage has a highly organized structure of matrix proteins that vary from superficial to deep layers. Among the several zones, the chondrocyte shape, the orientation of type II collagen fibrils and the ECM composition differ. This layered structure can be divided into 4 zones: the superficial or tangential zone, the middle or transitional zone, the deep or radial zone, and the calcified zone (Fig. 2).¹

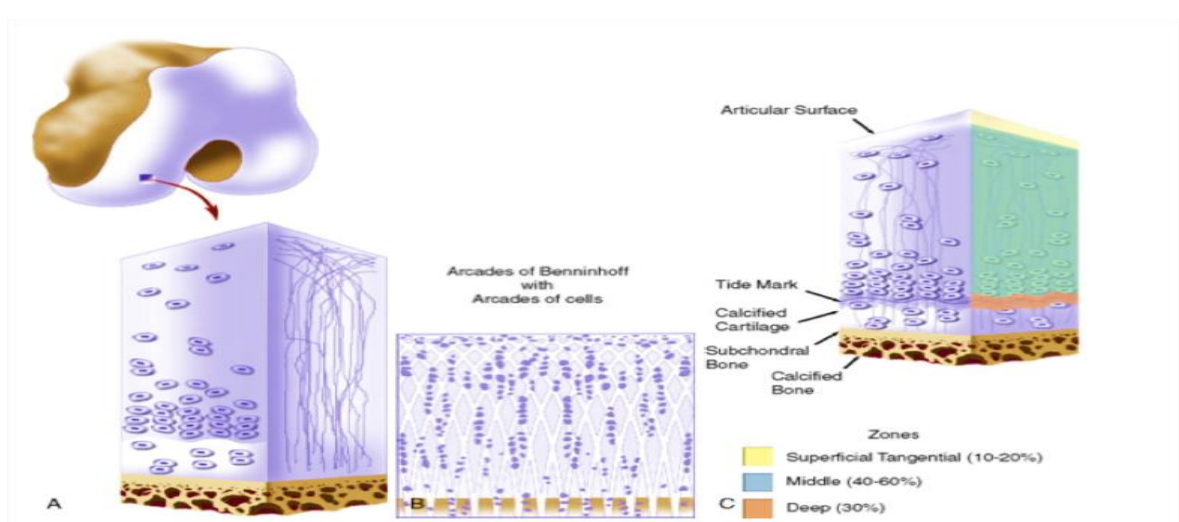


Fig.2 – Articular cartilage structure: (A)Hyaline articular cartilage is divided in (C) superficial, middle, and deep zones limited by the tidemark and a calcified zone connecting the tissue with the subchondral bone. (B) Orientation of the collagen layers and the cells within the cartilaginous matrix in Benninghoff's 'arch' or 'arcade'-like alignment. Reproduced from⁴³

The superficial zone (10%-20% of cartilage thickness) is the thinnest layer, contains chondrocytes and collagen fibrils with small diameters, aligned parallel to the surface and densely packed. Proteoglycans concentration is low, consequently, the permeability of the tissue here is higher than in the other zones. ⁸

In the middle zone (40-60% of the cartilage thickness) lower cell densities are present, chondrocytes are round and surrounded by type II collagen fibrils arranged into arcades linked with other randomly oriented small fibrils. In this zone, the proteoglycan content is the highest of all zones. Chondrocytes produce large amounts of collagen II and proteoglycans such as aggrecan. ⁷

The deep zone (30% of the cartilage thickness) contains chondrocytes with a spherical shape, in columnar arrangement vertical and perpendicular to the subchondral bone, with collagen fibrils presenting maximal diameters. ⁹

The tidemark is a thin mark that divides the deep zone from the calcified cartilage. The underlying calcified zone acts as an interface between soft cartilage and hard subchondral bone and is characterized by the presence of chondrocytes with a hypertrophic phenotype. ^{1,7}

A thin pericellular matrix is secreted by the chondrocytes, that is rich in proteoglycans and collagens (type-II but especially type-VI collagen), surrounds the chondrocytes, mediating interactions with membrane receptors working as sensors of mechanical and biochemical stimuli to adapt the cartilage to physiological alterations. This structure is organized radially and together with the chondrocyte forms an entity that is called the chondron.^{9,7}

3. MECHANISMS OF ARTICULAR CARTILAGE DESTRUCTION

Cartilage defects, depending on the depth can be classified in chondral, involving only the cartilage layer, or osteochondral, when penetrating the subchondral bone. Chondral defects do not penetrate the vascularized subchondral bone, thus, as circulation is a crucial part of the regular healing process, the absence of a blood supply in cartilage may suppress the normal responses associated with healing. Adult cartilage faces the additional problem of containing fewer cells and the chondrocytes are stuck in lacunae, thus cannot migrate to injured parts and initiate repair processes. ¹¹

The synthesis of new ECM in damaged cartilage is a slow process, the chondrocytes in adult cartilage are frequently quiescent and keep the matrix in a low turnover state. Cartilage aging, inflammatory stress, oxidative stress and inappropriate mechanical signals can lead to chondrocyte phenotypic modulation, reprogramming them both to an increase of inflammatory mediators and proteolytic enzymes expression and hypertrophic differentiation, which is followed by matrix damage and articular cartilage degradation.¹²

Until now, much is known about the molecular changes and mechanisms underlying degenerative joint diseases, particularly in OA, although there are still many unknown aspects whose understanding is essential for identifying new targets and effective therapeutic strategies.¹⁰

3.1. INFLAMMATORY MEDIATORS AND CARTILAGE DEGRADATION

Regarding the most prevalent degenerative joint disease, OA, it is known to have an important chronic inflammatory component that is the effector of the development and progression of joint destruction. This inflammation is generally low-grade since it usually presents minor clinical signs with little or no leukocyte infiltration, although there can be episodes of clinical exacerbation, and the presence of increased concentrations of inflammatory mediators (cytokines, prostaglandins (PGs), nitric oxide (NO)) in the patients' synovial fluid.

What is known at present is that any stress (mechanical, metabolic, aging) results in the activation of inflammatory signaling pathways that result in the production of inflammatory mediators including cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, and multiple chemokines), PGs and NO, both by chondrocytes and synovial fibroblasts. These signaling pathways and the produced mediators also activate catabolic (with production of MMPs, aggrecanases and other proteases) and pro-apoptotic pathways that lead to the destruction of cartilage. In addition, the same mediators and signaling pathways are also responsible for the induction of the hypertrophic process and subsequent matrix calcification. Mediators produced in response to various types of stress also include chemokines (IL-8, GM-CSF, CXCL5, etc.) that attract leukocytes and thus some leukocyte infiltration occurs in OA.¹³

Fibroblast-like synoviocytes (FLSs) increase in arthritic conditions, mediating synovial recruitment of inflammatory cells, cartilage destruction and pathogenesis. Collagen released

from damaged cartilage further stimulates FLSs to promote MMP secretion, exacerbating enzymatic degradation of cartilage.¹⁴

Through progressive deterioration of the cartilage, catabolism replaces anabolism. Proteolytic degradation of cartilage matrix proteins caused by dysfunctional chondrocyte behavior, conduce to an increased production of proteolytic enzymes, mainly MMP-13 and A Disintegrin And Metalloproteinase with a ThromboSpondin motif-5 (ADAMTS-5) or aggrecanase-2, that cleave type II collagen and aggrecan, respectively. In addition, other matrix degrading enzymes, such as serine and cysteine proteinases, can be found in osteoarthritic joints. ¹⁴

Acquisition of an autolytic phenotype by the chondrocytes is also an issue, resulting in the destruction of the adjacent cartilage. The exact activation mechanism of chondrocytes is not understood.¹¹

In summary, the various types of stress activate the catabolic processes through inflammatory and catabolic mediators and inhibit the anabolic pathways, causing an imbalance between the processes of synthesis and degradation of the matrix with predominance of the last and consequent effective loss of cartilage.¹¹

3.2. CHONDROCYTE HYPERTROPHY AND OSTEOPHYTOSIS

In normal conditions, hyaline cartilage does not go through terminal differentiation. However, the standard route of chondrocyte differentiation is terminal differentiation through hypertrophy and apoptosis leading to osteophyte formation and matrix calcification. Studies in *in vivo* models showed that osteophyte formation results from chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in the periosteum overlying the bone at the junction between cartilage and bone, which the final product is bone instead of cartilage.

The loss of the phenotype and progression to hypertrophy are a consequence of the activation of the same signaling pathways that lead to the production of proteolytic enzymes and the inhibition of the synthesis of the matrix components, showing a behavior similar to terminal differentiating chondrocytes (hypertrophy-like).

Several markers of hypertrophic chondrocytes can be used, including the most referenced type X collagen and MMP13. Furthermore, osteopontin, osteocalcin, IHH, Runx2, VEGF, HtrA1 and transglutaminase-2 are all related to chondrocyte hypertrophy (Fig.3).¹⁵

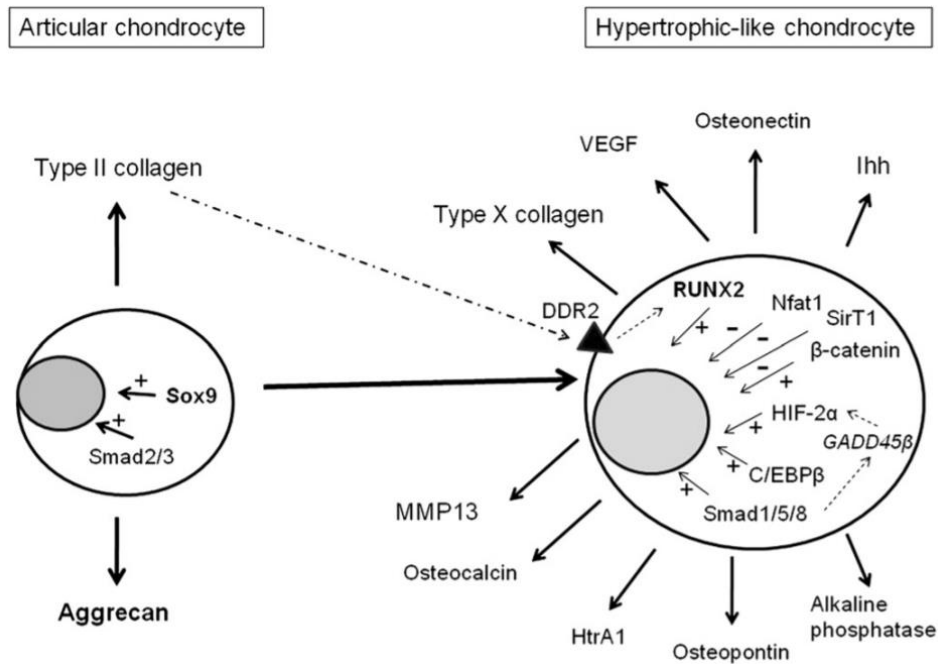


Fig. 3 – Factors regulating chondrocyte hypertrophic-like changes. Hypertrophy-like chondrocytes produce many proteins that are responsible for tissue remodeling and calcification. Many factors regulate the differentiation from a normal articular chondrocyte to a terminal differentiated chondrocyte. Reproduced from reference 16.

As exposed, hypertrophy is a complex process as it is controlled at various levels by different signaling pathways.

PTHrP and IHH are main factors regulating the balance between chondrocyte differentiation and hypertrophy. As PTHrP is an anti-hypertrophic factor and IHH is a pro-hypertrophic factor, the chondrocytes stay in a mature state as long as PTHrP expression is higher than that of IHH but experience hypertrophy when IHH expression increases. PTHrP signaling also avoids chondrocyte hypertrophy by blocking Runx2 expression.

Wnt/ β -catenin pro-hypertrophic pathway is responsible for intracellular transport of canonical Wnts (Wnt4, Wnt8, Wnt9) avoiding proteasomal degradation of β -catenin that subsequently induce Runx2 expression. Non-canonical Wnts (Wnt5a, Wnt11) have two functions, are pro-hypertrophic at the beginning by induction of calcium release (Wnt/ Ca^{2+} pathway) and anti-hypertrophic later by inhibiting Runx2 expression.

TGF- β is a fundamental inducer of chondrogenesis; interestingly, studies with aged chondrocytes showed a switch in TGF- β signaling from the classic transforming growth factor beta receptor I (TGFBR1, commonly known as ALK5) to the activin receptor-like kinase I (ACVRL1, commonly known as ALK1). Subsequently, signaling via specific members of the Sma and Mad Related Family (Smad1/5/8) will interact with AKL-1 leading to the

induction of MMP13 expression, which could convert this growth factor into a hypertrophy-promoting factor. ¹⁶

Bone morphogenetic proteins (BMPs -2, -4, -5, -6, -7, -9) are factors that act through Smad1/5/8 leading to Runx2 expression and hypertrophy.

Signaling via members of the fibroblast growth factor family (FGF) and their receptors is another important factor in the regulation of chondrocyte proliferation and the initiation of chondrocyte hypertrophy. ¹⁷

Like other growth factors, the insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates matrix production and chondrocyte proliferation, but also activates the terminal differentiation process, i.e, hypertrophy and calcification, by inducing the expression of type-X collagen, ALP, and Runx2. It seems that the activation of cellular proliferation is the trigger for resting chondrocytes to undergo the "normal" course of differentiation, in which they progress to calcification, as observed in the process of endochondral ossification. ⁸

Taken together, the above data indicate that several cellular and molecular pathways converge in the degradation of cartilage during disease processes.

4. STEM CELLS

Stem cells are undifferentiated cells that have the capacity for proliferation, self-renewal and multilineage differentiation potential. During early life and post-natal growth, they give rise to several different cell types in the organism. Additionally, they are responsible for tissue and organ remodeling and regeneration during adult life. Due to their competences in self-expansion and multipotential differentiation, stem cells have been extremely explored for tissue repair and regeneration. ¹⁸

Stem cells can be classified in four types: embryonic stem cells, pluripotent stem cells, often collected from embryonic sources, such as the inner cell mass of blastocysts, and capable of developing into any type of cell in the body; induced pluripotent stem cells, generated from the patient's somatic cells and differentiated by reprogramming methods; fetal stem cells isolated from extra-embryonic and fetal tissues; and adult stem cells, multipotent and capable of developing into a more limited variety of cell types. ¹⁹

Concerning adult stem cells, many types can be considered, such as hematopoietic stem cells, that give rise to blood cells through the process of haematopoiesis, and mesenchymal stem cells (MSCs), that can differentiate into distinct types of connective tissue cells. ²⁰

4.1 MESENCHYMAL STEM CELLS

Adult MSCs are a heterogeneous subset of stromal cells with multilineage differentiation potential or multipotency, a natural ability to differentiate into mature mesenchymal phenotypes, as well as the capacity of regenerating themselves.

MSCs have been firstly isolated from the bone marrow, but nowadays they can be obtained from a wide range of adult tissues. The main principles for their identification are: ability to adhere to cell culture plastic, fibroblast-like morphology, prolonged capacity for proliferation in supportive medium and the ability to differentiate *in vitro* into cells of mesodermal lineage (chondrocytes, adipocytes and osteocytes) originating specialized connective tissues.¹⁸

Recent studies have shown that MSCs not merely repair injured tissues, but interact with immune cells, conducing to the modulation of a number of effector functions. MSCs can migrate to injury sites, and through secretion of matrix molecules and trophic factors modulate tissue regeneration, as well as inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines which potentiate the regenerative process.²¹

Phenotypically, no specific markers of MSCs are available, although the combined identification of a large number of cell surface proteins or markers is used, such as the expression of CD44, CD73, CD90, CD105 and absence of CD45, CD34 and CD14²²

4.2 SOURCES OF MESENCHYMAL STEM CELLS

MSCs have been identified in and can be isolated from a wide range of adult tissues, including the bone marrow, skeletal muscle, adipose tissue, perichondrium/periosteum, synovium, tendons, umbilical cord, peripheral blood and other connective tissues, namely articular cartilage.¹²

Bone marrow MSCs (BM-MSCs) can be isolated from the bone marrow in relatively high concentration, from trabecular and compact bone and from non-hematopoietic bone marrow sites, such as the femoral head. They are easy to harvest and to be induced to differentiate to many lineages under defined culture conditions. Thus, bone marrow is still a commonly used source of MSCs.²³

Adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) can be found and isolated from adipose tissue, one of the richest sources of MSCs. Recently this source has become an alternative to BM-MSCs, due to the ease of tissue access, high initial cell harvests and strong *in vitro* proliferative capacity. Additionally, adipose tissue is easier to collect in higher

volumes, and yield additional stem cells compared to bone marrow, about 50 times more stem cells in 1 g of fat when compared to 1 g of aspirated bone marrow. AD-MSCs are able to differentiate *in vitro* to the osteogenic, adipogenic, myogenic, and chondrogenic lineages.

21

Synovial MSCs (S-MSCs) can be isolated from synovial fluid or from synovial membrane. S-MSCs can be induced to differentiate *in vitro* towards the chondrogenic, osteogenic, myogenic, and adipogenic lineages. An advantage for clinical practice is that synovium can be reached arthroscopically, without causing complications to the donor. Thus, during joint surgical procedures, synovium could be an attractive source of MSCs.²⁴

Tendon-derived mesenchymal stem cells (TD-MSCs), are found in tendons within the interfibrillar spaces. These cells show affinity for extracellular tendon matrix, and *in vivo* spontaneously regenerate tendon-like tissue structures. Concerning multilineage potential they can differentiate into tenogenic, osteogenic, chondrogenic, and adipogenic lineages.

The umbilical cord MSCs (UC-MSCs) can be obtained from the umbilical cord tissue, have more embryonic characteristics than other adult MSCs. These cells can be isolated from Wharton's jelly, from tissue surrounding the umbilical vessels, from umbilical cord blood, and from the subendothelium of umbilical vein. They can be induced to form adipose tissue, bone, cartilage, skeletal muscle cells, cardiomyocyte-like cells, and neural cells.²¹

4.3 MESENCHYMAL STEM CELLS FOR CARTILAGE REPAIR AND REGENERATION

MSCs have promising applications in regenerative medicine and tissue engineering, representing an attractive option for articular cartilage repair and regeneration. MSCs have been used both for repair and for the regeneration of cartilage lesions including injuries resulting from trauma, such as those associated with sports, and from degenerative diseases such as OA.

It is not evident which adult tissues MSCs should be obtained from.¹¹ The best cell type option for cartilage repair will depend on cell availability and chondrogenic differentiation potential. Currently, bone marrow-derived stem cells are the most used, followed by adipose stem cells, synovial and periosteum-derived MSCs.¹⁹

However, it has also been revealed that MSC-based therapies have some limitations. Although MSCs can undergo extensive cell division, this capacity is not unlimited. MSCs enter senescence after innumerable cell divisions, which is known as irreversible growth arrest. On the other hand, the property of differentiation along diverse mesenchymal cell

lineages highly depends on the tissue source, donor and experimental variations. Furthermore, the cells do not retain their proliferative and multilineage differentiation capacities after prolonged *ex vivo* expansion, probably due to cellular senescence.²¹

Another issue is bone formation within repair tissue after the implantation of BM-MSCs into chondral defects, suggesting that osteogenic differentiation of MSCs can occur *in vivo* during cartilage repair. Therefore, it is crucial to improve the repair quality of MSC-based therapies in order to move towards tissue regeneration.²⁴

5. GENETIC MODIFICATION OF MSCs AS A STRATEGY TO ENHANCE ARTICULAR CARTILAGE REGENERATION/REPAIR

In vitro expansion of MSCs for cartilage repair or regeneration is essential to obtain the large number of cells required. Nonetheless, *in vitro* proliferation reduces the differentiation potential of MSCs and/or promotes the progression of differentiated cells towards the hypertrophic phenotype and consequent calcification upon transplantation or the formation of fibrocartilage. To overcome these problems, several strategies have been developed, including the administration of growth factors to promote cartilage matrix synthesis. Besides the other problems associated with the use of MSCs identified above, the administration of growth factors has significant limitations especially due to their short half-life within the joint. Thus, genetic modification of MSCs or cells differentiated thereafter through the introduction of genes that can arrest progression to hypertrophy and fibrocartilage formation or that promote a sustained expression of anabolic growth factors that induce cartilage matrix synthesis is being developed as a potential strategy to overcome those limitations.²⁵

Therefore, gene therapy is a promising technique to improve the processes of cartilage repair by delivering chondroreparative genes encoding cartilage growth factors, pro-regenerative mediators and inflammatory inhibitors specifically to the site of damage. This approach proposes to achieve prolonged expression of factors that otherwise show short pharmacological half-lives and reduce the frequency of invasive methods of delivery.²⁶

6. TARGET GENES FOR MSCs MODIFICATION

Frequently, the families of factors overexpressed by modified MSC are growth factors and regulatory transcription factors, nevertheless adhesion molecules, ECM components and signaling molecules can also be used.

Considering growth factors, the superfamily of transforming growth factors TGF- β , including BMPs, are the main targets to influence MSC differentiation into chondrocyte phenotypes. They are responsible for expression of collagen type II, proteoglycans and other components of ECM.²⁶

The insulin-like growth factor-I (IGF-I) is assumed to play a critical role improving MSCs chondrogenic induction and maintaining the chondrocyte phenotype since it has been shown to influence MSCs chondrogenesis by increasing expression of collagen type II and Sox 9 without detectable increase of the hypertrophic or osteogenic phenotype.²⁴

As discussed before, one of the main reasons for the failure of cartilage tissue engineering would be that several anabolic and catabolic factors are involved in cartilage healing, thus, one or a few chondrogenic growth factors is unlikely to sufficiently modulate the healing process for a long period. Instead, genes encoding regulatory transcription factors are other good candidates for the induction of chondrogenesis by MSCs.²⁷

Various transcription factors have been reported to play a role in cartilage homeostasis and chondrocyte differentiation. Among these, members of the sex determining region Y-box (Sox) family of transcription factors are especially relevant as they are key in promoting the early stages of chondrogenesis and maintaining the differentiated chondrocyte phenotype preventing hypertrophy, namely by inducing the expression of the cartilage matrix-specific gene, collagen II. Among the various genes tested, the combination of Sox 5, 6 and 9, known as “Sox trio”, showed the best results.²⁸

Regarding runt-related transcription factor family proteins, RUNX2 is another candidate as it is essential for chondrocyte maturation and osteoblast differentiation, and removal of RUNX2 results in a complete absence of bone formation. RUNX2 enhances subchondral bone formation during the healing of osteochondral defects. RUNX3 controls chondrocyte differentiation and promotes cartilage formation during fracture healing.²⁷

7. STRATEGIES FOR GENE DELIVERY

Various gene transfer vectors have been used in the field of cartilage research, such as non-viral systems: electroporation, liposomes, nanoparticles, and viral vectors: adenoviruses, retroviruses, lentiviruses and adeno-associated virus (AAV).

Generally, two ways of intra-articular gene delivery can be considered (Fig.4), a direct *in vivo* approach and an indirect *ex vivo* approach. The direct *in vivo* strategy consists in applying the vector directly into the joint space, normally by intra-articular injection, while the *ex vivo* approach involves exogenous genetic modification of the cells and their transplantation into the body.²⁹

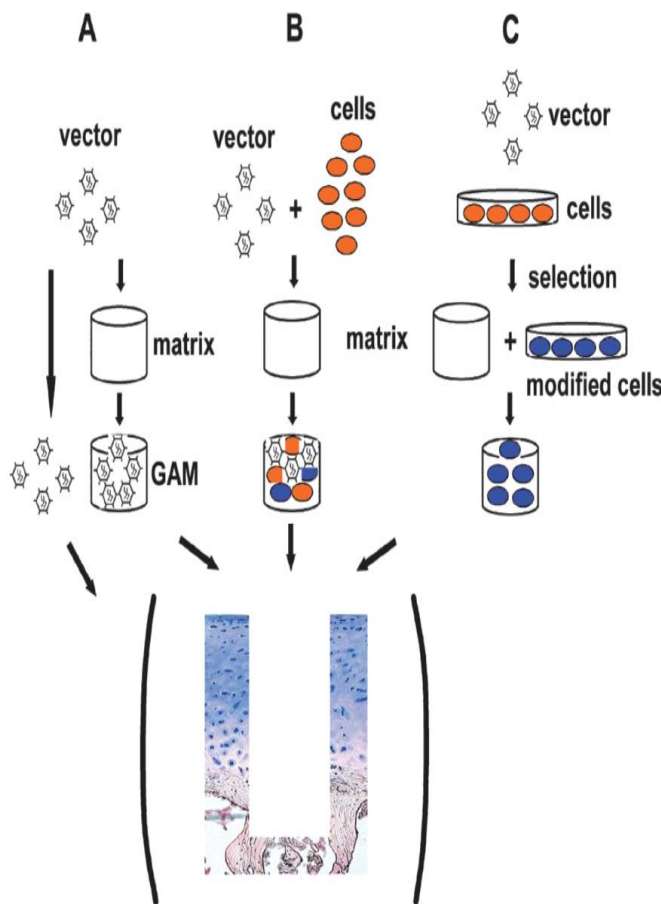


Fig. 4 – Gene transfer for cartilage repair

(A) For *in vivo* gene transfer, free vector can be injected directly into the joint or incorporated into a matrix before implantation into a cartilage defect (gene activated matrix (GAM) implantation). Resident cells that encounter the vector acquire the desired gene, and genetically modified cells secrete the transgene products that influence the regeneration of articular cartilage.

(B) *Ex vivo* genetically enhanced tissue engineering to treat cartilage defects. A vector is incorporated into the matrix together with cells that are harvested at the same operative setting, such as MSCs.

(C) *Ex vivo* tissue engineering for cartilage repair involves the harvest and expansion of target cells *in vitro*, which are subsequently infected with the desired vector. The transduced cells then may be selected and seeded into a biological matrix before the construct is transplanted into a cartilage defect.

In all approaches, local transgene expression is induced by the genetically modified cells, and the gene products could improve cartilage repair.²⁹

Nonviral vectors are considered safer as they avoid the risk of acquiring replication competence, but usually outcomes are poor due to short-term transgene expression.

Viral vectors have advantages but also specific limitations for cartilage therapy. Adenoviral vectors may preserve the capacity of inducing immune responses. Furthermore, while very effective allowing for direct *in vivo* approaches, adenoviral vectors have a quite limited duration of action. Expression from retro-/lentiviral vectors may be accomplished for long periods of time by integration in the host genome, but there is a risk of insertional mutagenesis.

AAV is a non-pathogenic, replication-defective human single-strand DNA (ssDNA) parvovirus, that can be altered to produce recombinant constructs after removal of all viral coding sequences, then replaced by a therapeutic gene. Small recombinant AAV (rAAV) vectors (~ 20 nm) are highly effective and can also be used in direct in vivo settings through the ECM. Due to the complete removal of AAV sequences in the recombinant genome, they are much less immunogenic than adenoviral vectors and allow sustained transgene expression.³⁰

Nonviral vectors are safer but less effective while viral vectors are potentially more effective vector but with many safety concerns. In this regard, rAAV revealed to be the best candidate although still under study.³⁰

Among recent studies (see table I), the lentivirus-mediated IGF-I gene transfer to human S-MSC shows to promote chondrogenic differentiation capacity of the cells without stimulating either the hypertrophic or osteogenic phenotype, and thus, may have enhanced potential for cartilage repair.²⁵

Co-delivery could be also an alternative, since therapeutic gene delivery of TGF- β 3 and BMP2 and subsequent expression of the transgenes promoted collagen type II production when the two genes were delivered in combination, but calcification and collagen type X deposition when these genes were delivered separately.³¹

Combination of different viral vectors is another strategy for the control of transgene expression and enhanced chondrogenesis, such as the combination of lentiviral and adenoviral vectors to modulate the expression of TGF- β 3 and shRNA-targeting Col I in S-MSCs which could be applied in future studies of gene expression control and cartilage tissue engineering.³²

Table I – Examples of Recent Studies using genetically modified MSCs.

Cell Source	Vector	Biomaterial	Gene	Period	Results	Ref
Human M-MSCs	rAAV	-	Sox 9	28 days	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	33
Sheep BM-MSCs	rAAV	-	TGF- β	6 months	Improved cartilage repair <i>in vivo</i>	34
Human BM-MSCs	rAAV	-	TGF- β	12 weeks	Improved cartilage repair <i>in vivo</i>	35
Human BM-MSCs	rAAV	-	TGF- β	21 days	Increase both proliferative and anabolic activities of hMSCs <i>in vitro</i>	36
Human PB-MSCs	rAAV	-	TGF- β	63 days	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	37
Human BM-MSCs	rAAV	-	TGF- β and SOX 9	21 days	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	38
Pig S-MSCs	rAAV LV	-	TGF- β and Col I-targeting shRNA	30 days	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	32
Human UC-MSCs	Liposome	-	Sox9	2 weeks	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	39
Pig BM-MSCs	Nanohydroxyapatite	Alginate hydrogels	TGF- β 3 BMP2	28 days	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	31
Human BM-MSCs	rAAV	PEO-PPO copolymers	Sox 9	21 days	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	40
Human BM-MSCs	rAAV	-	IGF-I	21 days	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	41
Human S-MSCs	LV	-	IGF-I	14 days	Enhanced chondrogenesis <i>in vitro</i>	24

8. CONCLUSION

Many studies reported the advantages of the association of gene therapy and MSC's approaches for articular cartilage repair/regeneration, but complete restoration of normal hyaline cartilage remains difficult to achieve. Up to now, no trial has allowed the formation of the original, fully functional repair tissue in sites of cartilage damage. Moreover, the duration of pre-clinical studies is in general relatively small, so that long term efficacy and safety are still largely unknown. Therefore, more research is required not only to identify the best combination of MSCs and target gene to modify those cells, but also to determine the safety of the procedure which is even more important as cartilage lesions are not life-threatening.

A design of sophisticated gene delivery vectors with lesser safety concern and more persistent gene expression/protein release is desired for a highly efficient regulation of cell differentiation with minimal hypertrophy/ossification and host immune responses. On the other hand, although forcing the expression of a gene is relatively simple, the process could not be easy to control.

Looking into the future, recent studies have proposed the use of RNA interference (iRNA) approaches, such as short hairpin RNAs (siRNAs), as they play regulatory roles in osteogenic differentiation and bone formation. The use of siRNAs to silence genes involved in the inflammatory and catabolic response and the anti-anabolic response is a recent and promising strategy.⁴²

The use of biomaterials combined with gene therapy seems to be a promising approach as well, since they could offer the potential of enhanced control of cell fate and functions allowing prolonged, sustained and localized in situ delivery of a protein of interest.

Despite the promising results of most studies and strategies tested, there are still many questions needing to be addressed. Besides the difficulties in maintaining the differentiated chondrocyte phenotype, there are also concerns regarding the long term effectiveness of the various strategies developed since, in general, the studies were performed for relatively short time periods.

Concluding, despite many difficulties, the current findings are promising, showing some degree of improvement and potential of combining gene therapy and MSCs for cartilage repair/regeneration, which in the future may lead to the development of an approach that can effectively restore the composition and functions of the damaged cartilage.

REFERENCES

1. CARBALLO, C.; YUSUKE, N.; ICHIRO, S.; SCOTT, A. - Basic Science of Articular Cartilage. **Clinics in Sports Medicine**. 36:3 (2017) 413–425.
2. SVOBODA, S - ACL Injury and Posttraumatic Osteoarthritis. **Clinics in sports medicine**. 33:2014 (2014) 633–640.
3. ANDRADE, R. *et al.* - Prevalence of Articular Cartilage Lesions and Surgical Clinical Outcomes in Football (Soccer) Players' Knees: A Systematic Review. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**. 32:7 (2016) 1466–1477.
4. WITTENAUER, R.; SMITH, L.; ADEN, K. - Priority Medicines for Europe and the World « A Public Health Approach to Innovation » Update on 2004 Background Paper Background Paper 6.12 Osteoarthritis. **World Health Organisation**. (2013) 1–31.
5. BRANCO, J. *et al.* - Prevalence of rheumatic and musculoskeletal diseases and their impact on health-related quality of life, physical function and mental health in Portugal: results from EpiReumaPt- a national health survey. **RMD open**. 2:1 (2016).
6. CUCCHIARINI, M. *et al.* - New trends in articular cartilage repair. **Journal of experimental orthopaedics**. 2:1 (2015) 8.
7. CAMARERO-ESPINOSA, S. *et al.* - Articular cartilage: from formation to tissue engineering. **Biomaterials science**. 4 (2016) 734–767.
8. TANG, Y; WANG, B - Gene- and stem cell-based therapeutics for cartilage regeneration and repair. **Stem cell research & therapy**. 6:1 (2015) 78.
9. FRISCH, J.; CUCCHIARINI, M. - Gene- and Stem Cell-Based Approaches to Regulate Hypertrophic Differentiation in Articular Cartilage Disorders. **Stem Cells and Development**. 25:20 (2016).
10. GOLDRING, M. - Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**. 4:4 (2012) 269–285.
11. MOBASHERI, A. *et al.* - Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. **Maturitas**. 78:3 (2014) 188–198.
12. PERS, Y. M. *et al.* - Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in

- osteoarthritis: State of the art and perspectives. **Osteoarthritis and Cartilage**. 23:11 (2015) 2027–2035.
13. LIU-BRYAN, R. ; TERKELTAUB, R. - Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**. 11:1 (2014) 35–44.
14. LI, Meihan *et al.* - Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**. (2017).
15. KRAAN, P.; VAN, D.; BERG, W. - Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: Role in initiation and progression of cartilage degeneration. **Osteoarthritis and Cartilage**. 20:3 (2012) 223–232.
16. PITSILLIDES, A.; BEIER, F. - Cartilage biology in osteoarthritis—lessons from developmental biology. **Nature Reviews Rheumatology**. 7:11 (2011) 654–663.
17. LI, J.; DONG, S. - The signaling pathways involved in chondrocyte differentiation and hypertrophic differentiation. **Stem Cells International**. (2016) 1–12.
18. TIZIANA, F.; COSIMO, B.- The potential role of adult stem cells in the management of the rheumatic diseases. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**. 8:4 (2017) 153 –156.
19. GOLDBERG, A. - The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**. 12:1 (2017) 39.
20. LONGO, U. - Stem cells and gene therapy for cartilage repair. **Stem Cells International**.(2012).
21. VIA, A; FRIZZIERO, A.; OLIVA, F. - Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. **Muscles, ligaments and tendons journal**. 2:3 (2012) 154–62.
22. PARK, J. *al.* - Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. **Methods**. (2015) 3–16.
23. FRISCH, J. *et al.* - Current Progress in Stem Cell-Based Gene Therapy for Articular Cartilage Repair. **Current stem cell research & therapy**.10:2 (2015) 121–31.
24. IKEDA, Y. *et al.* - IGF-1 Gene Transfer to Human Synovial MSCs Promotes Their Chondrogenic Differentiation Potential without Induction of the Hypertrophic Phenotype. **Stem Cells International**. (2017) 1–10.

25. TOH, W. *et al.* - Advances in Mesenchymal Stem Cell-based Strategies for Cartilage Repair and Regeneration. **Stem Cell Reviews and Reports**. 10:5 (2014) 686–696.
26. RAISIN, S.; BELAMIE, E.; MORILLE, M. - Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage. **Biomaterials**. 104 (2016) 223–237.
27. KENNETH, L.; JINXI, W. - Cell-Based Articular Cartilage Repair: The Link between Development and Regeneration. **NIH Public Access**. 23:3 (2015); 351–362.
28. IM, G. I.; KIM, H. J. - Electroporation-mediated gene transfer of SOX trio to enhance chondrogenesis in adipose stem cells. **Osteoarthritis and Cartilage**. 19:4 (2011) 449–457.
29. STEINERT, A.; NÖTH, U.; TUAN, R. - Concepts in gene therapy for cartilage repair. **Injury**. 39:1 (2008) 97–113.
30. CUCCHIARINI, Magali - New cell engineering approaches for cartilage regenerative medicine. **Bio-Medical Materials and Engineering**. 28:1 (2017) S201–S207.
31. GONZALEZ-FERNANDEZ, T. *et al.* - Gene Delivery of TGF-beta3 and BMP2 in a MSC Laden Alginate Hydrogel for Articular Cartilage and Endochondral Bone Tissue Engineering. **Tissue engineering. Part A**. 22 (2016) 776–787.
32. FENG, Z.; YONGCHANG, Y.; KAI SU, Y. - Co-transduction of lentiviral and adenoviral vectors for co-delivery of growth factor and shRNA genes in mesenchymal stem cells-based chondrogenic system. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**. 9 (2015) 1036–1045.
33. VENKATESAN, J. *et al.* - Impact of mechanical stimulation on the chondrogenic processes in human bone marrow aspirates modified to overexpress sox9 via rAAV vectors. **Journal of Experimental Orthopaedics**. 4:1 (2017) 22.
34. IVKOVIC, A. *et al.* - Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. **Gene therapy**. 17:6 (2010) 779–89.
35. PAGNOTTO, M. *et al.* - Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. **Gene therapy**. 14:10 (2007) 804–13.
36. FRISCH, J. *et al.* - Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor- β via recombinant adeno-associated viral vectors. **Human**

gene therapy. 25:12 (2014) 1050–60.

37. FRISCH, J. *et al.* - Genetic Modification of Human Peripheral Blood Aspirates Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Articular Cartilage Repair With a Focus on Chondrogenic Transforming Growth Factor- Gene Delivery. **Stem Cells Translational Medicine.** (2016) 1–12.

38. TAO, K. *et al.* - Co-overexpression of TGF- β and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy.** 7:1 (2016) 20.

39. WANG, Z. H. *et al.* - Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an in vitro model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 47:4 (2014) 279–286.

40. REY-RICO, A. *et al.* - PEO-PPO-PEO micelles as effective rAAV-mediated gene delivery systems to target human mesenchymal stem cells without altering their differentiation potency. **Acta Biomaterialia.** 27 (2015) 42–52.

41. FRISCH, J. *et al.* - Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy.** 5:4 (2014) 1–12.

42. LOLLI, A. *et al.* - Emerging potential of gene silencing approaches targeting anti-chondrogenic factors for cell-based cartilage repair. **Cellular and Molecular Life Sciences.** (2017) 1–15.

43. Articular Cartilage Structure [Online][Accessed 01/08/17] Available from: <http://tirico.com.br/novosite/wp-content/uploads/2012/04/Cartilagem1.png>

Frontpage Image - [Online][Accessed 10/09/17] Available from: <http://www.specificalignmentchiropractic.com/wp-content/uploads/2014/11/fullbodypain1A.jpg>