

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA DE ANTICORPOS À APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM EQUINOS**

ANDRÉ MASSAHIRO TERAMOTO KRIECK

Botucatu, São Paulo

Maio de 2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA

**RESPOSTA DE ANTICORPOS À APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM EQUINOS**

ANDRÉ MASSAHIRO TERAMOTO KRIECK

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Biotecnologia da Animal
para obtenção do Título de Mestre. Uni-
versidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” Faculdade De Medicina
Veterinária E Zootecnia

Orientadora: Prof^ª Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, maio de 2019.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Krieck, André Massahiro Teramoto.

Resposta de anticorpos à aplicação intra-articular de células tronco mesenquimais alogênicas em equinos / André Massahiro Teramoto Krieck. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501003

1. Células-tronco. 2. Histocompatibilidade. 3. Imunidade humoral. 4. Citotoxicidade imunológica. 5. Equino.

Palavras-chave: Células Precursoras; MHC; Microcitotoxicidade; Resposta Imune Humoral.

Autor: André Massahiro Teramoto Kriek

Data: 21 de maio de 2019.

Comissão Examinadora

Profª Dra. Ana Liz Garcia Alves

Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Profª Dra. Cristina O Massoco Salles Gomes

Membro

Departamento de Patologia

FMVZ, USP, São Paulo

Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Agradecimentos

Agradeço à Profª Dra. Ana Liz Garcia Alves por ter me aceito como orientado e por compartilhar seus conhecimentos principalmente em terapias regenerativas e engenharia de tecidos.

Aos colegas de pós-graduação por termos um ótimo convívio e sempre nos ajudarmos.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1	8
Introdução	8
Revisão de Literatura	9
Referências	14
CAPÍTULO 2	19
Abstract	20
1. Introdução	21
2. Material e Métodos	22
2.1. Delineamento Experimental	23
2.2. Seleção dos Animal	23
2.3. Cultivo de Células Tronco Mesenquimais	23
2.4. Caracterização e Diferenciação das Células Tronco Mesenquimais	24
2.5. Indução Experimental da Sinovite	25
2.6. Aplicação Intra-articular	25
2.7. Coleta de Amostras do Sangue dos Receptores	25
2.8. Ensaio de Microcitotoxicidade	26
2.9. Análise do líquido sinovial	26
2.10. Avaliação Clínica	26
2.11. Análise Estatística	27
3. Resultados	27
3.1. Caracterização das Células Tronco Mesenquimais	27
3.2. Avaliação Clínica	27
3.3. Avaliação Ultrasonográfica	28
3.4. Ensaio de Microcitotoxicidade	28
3.5. Avaliação do líquido sinovial	29
3.5.1. Proteína Total	29
3.5.2. Contagem de Leucócitos	29
3.5.3. Contagem de Neutrófilos	30
4. Discussão	30
5. Conclusão	33

6. Referências.....35

KRIECK A.M.T. Resposta de Anticorpos à Aplicação Intra-articular de Células Tronco Mesenquimais Alogênicas em Equinos. Botucatu, 2019. Dissertação de Mestrado. 42 Pág. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O transplante de células tronco mesenquimais (CTMs) em doenças articulares vem se demonstrando eficaz. O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta imune de repetidas aplicações intra-articulares de CTMs alogênicas e a imunogenicidade destas, utilizando ensaios de microcitotoxicidade para avaliar as respostas de anticorpos citotóxicos dependentes de complemento. Quinze equinos adultos foram distribuídos aleatoriamente entre três grupos. Seis animais no grupo ALO onde articulações híginas receberam CTMs alogênicas, seis no grupo ALO LPS em que as articulações foram previamente inflamadas, pela indução experimental da sinovite com 0,5ng de LPS e três animais no grupo AUTO que foi mantido como controle negativo e receberam CTMs autólogas. Foram realizadas 2 aplicações na mesma articulação de células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial com intervalo de 4 semanas. Foram colhidas amostras seriadas nos 3 dias após cada aplicação e a cada 7 dias por 8 semanas do líquido sinovial para análise e soro sanguíneo para os ensaios de microcitotoxicidade e exame ultrassonográfico para avaliar efusão articular através da distancia entre a superfície do talus e a capsula articular. Para análise estatística foi utilizado os testes Two Way Repeated Measures ANOVA e teste Turkey's. Foi evidenciada uma reação inflamatória moderada pelo aumento da celularidade do líquido sinovial após as aplicações. Também, foi observado que após a segunda aplicação alogênica, as articulações apresentaram efusão até 28 dias após aplicação quando comparada às aplicações autólogas e em relação à primeira aplicação alogênica. Foi observada a produção de anticorpos citotóxicos a partir de 7 dias em 2 animais do grupo ALO atingindo pelo menos 80% de morte celular e no grupo ALO LPS 3 animais. No grupo AUTO não foi observada a produção de anticorpos citotóxicos. Portanto os resultados demonstraram que as CTMs alogênicas foram capazes de desencadear respostas de anticorpos citotóxicos específicos contra as CTMs doadoras, além de elucidar o aumento do infiltrado celular nas articulações sinoviais, assim, as respostas imunes poderiam impactar negativamente na longevidade, na viabilidade e na eficácia celular sendo estes resultados relevantes para utilização das CTMs injetadas no ambiente articular. Desta forma, a terapia de CTMs alogênicas deve ser empregada com cautela, principalmente em repetidas aplicações na mesma articulação, para assim se obter melhor potencial biológico desta terapia.

Palavras-chave: Células Precursoras; MHC; Microcitotoxicidade; Resposta Imune Humoral.

KRIECK A.M.T. Antibody Response to the Intrarticular Application of Allogenic Mesenchymal Stem Cells in Horses. Botucatu, 2019. Master's Dissertation. Pages 42. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus Botucatu, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) in joint diseases has been shown to be effective. The objective of this study was to evaluate the immune response of repeated intra-articular applications of allogeneic MSCs and their immunogenicity using microcytotoxicity assays to evaluate complement dependent cytotoxic antibody responses. Fifteen adult horses were randomly assigned to three groups. Six animals in the ALO group where healthy joints received allogeneic MSCs, six in the ALO LPS group in which the joints were previously inflamed, by the experimental induction of synovitis with 0.5ng of LPS and three animals in the AUTO group that was maintained as negative control and received Autologous MSCs. Two applications were performed in the same articulation of mesenchymal stem cells derived from synovial membrane with interval of 4 weeks. Serial samples were taken 3 days after each application and every 7 days for 8 weeks of synovial fluid for analysis and blood serum for the microcytotoxicity and ultrasound examination to evaluate joint effusion through the distance between the surface of the talus and the joint capsule. Two-way ANOVA and Turkey's test were used for statistical analysis. A moderate inflammatory reaction was evidenced by increased synovial fluid cellularity after the applications. Also, it was observed that after the second allogeneic application, the joints presented effusion until 28 days after application when compared to the autologous applications and in relation to the first allogeneic application. The production of cytotoxic antibodies was observed from 7 days in 2 animals of the ALO group reaching at least 80% of cell death and in the ALO LPS 3 animal group. In the AUTO group, the production of cytotoxic antibodies was not observed. Therefore the results demonstrated that the allogeneic MSCs were capable of triggering specific cytotoxic antibody responses against the donor MSCs, in addition to elucidating the increase of the cellular infiltrate in the synovial joints, the immune responses could negatively impact longevity, viability and efficacy. These results are relevant for the use of MSCs injected in joint environment. Therefore allogeneic MSC therapy should be used with caution, especially in repeated applications in the same joint, in order to obtain a better biological potential of this therapy.

Keywords: Humoral Immune Response; Mesenchymal Stromal Cells; MHC; Microcytotoxicity.

CAPÍTULO 1

1. Introdução

As estratégias terapêuticas atuais para o tratamento de doenças articulares são focadas apenas na redução da dor, da inflamação e da lesão estrutural das articulações. A terapia celular tornou-se um importante campo de pesquisa focado no desenvolvimento de tratamentos efetivos em restabelecer a função das estruturas articulares (Ilic e Polak, 2012). As células tronco mesenquimais (CTMs) são estudadas como uma possível ferramenta para a terapia celular, não só pelo seu potencial de diferenciação, mas também por suas propriedades tróficas e imunomoduladoras (BARTHOLOMEW et al., 2002; ANKRUM et al., 2014). A secreção de fatores parácrinos é reconhecida como o mecanismo primário pelo qual as CTMs promovem um ambiente propício à reparação (MURPHY, MONCIVAIS, & CAPLAN, 2013). Estes fatores atenuam as respostas imunes, estimulam a angiogênese, reduzem a apoptose e promovem a diferenciação das células progenitoras locais. (DA SILVA MEIRELLES et al., 2009).

Estudos prévios demonstraram a eficácia de aplicações intra-articulares de CTMs derivadas de medula óssea em equinos e em outros modelos experimentais (FERRIS et al., 2013; AGUNG et al., 2006; MCILWRAITH et al., 2011). Entretanto, a utilização de CTMs provenientes de membrana sinovial mostra-se promissora para doenças articulares devido a seu alto potencial proliferativo e condrogênico (DE BARI et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2005) além de ser uma fonte celular mais específica e próxima dos condrócitos (O'CONNELL, 2000; SAKAGUCHI et al., 2005; SHIRASAWA et al., 2006)

Recentemente, foram realizados numerosos estudos para avaliar a segurança da segurança no transplante de células tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas em equinos em substituição às células autólogas (BRANDÃO et al., 2018, JOSWIG et al., 2017, OWENS et al., 2016, SCHNABEL et al., 2014, PEZZANITE et al., 2015; KOL et al., 2015). O transplante de CTMs alogênicas apresenta a vantagem de uma aplicação imediata em lesões agudas, com células de qualidade conhecida e quantidade suficiente, além de eliminarem a necessidade de aspiração de medula óssea, biópsia de membrana sinovial ou de tecido adiposo do próprio animal, evitando o atraso associado ao tempo de cultura e de expansão das células (ANKRUM et al., 2014).

As CTMs alogênicas já foram testadas sob diversas condições em equinos, sendo aplicadas uma única vez ou repetidas vezes (PIGOTT et al., 2013; BOONE, 2013; CARRADE et al., 2011). Embora tenha sido demonstrado que repetidas aplicações de CTMs podem ser benéficas em diferentes modelos de enfermidades e vias de administração (VAN VELTHOVEN et al., 2010; HATSUSHIKA et al., 2014) a reação humoral de repetidas administrações intra-articulares de CTMs alogênicas ainda não foi efetivamente avaliada. Portanto o presente estudo tem o objetivo de avaliar a segurança de repetidas aplicações intrarticulares alogênicas e sua imunogenicidade utilizando ensaios de microcitotoxicidade para medir as respostas de anticorpos citotóxicos.

2. Revisão de literatura

Inicialmente descobriram que as CTMs alogênicas eram capazes de inibir, *in vitro*, a proliferação de linfócitos em reações mistas de leucócitos com complexo histocompatibilidade maior incompatível (LE BLANC et al., 2003). Sabe-se que as CTMs produzem uma variedade de citocinas imunomoduladoras, incluindo fator de crescimento transformador- β 1, indoleamina-2,3-dioxigenase, síntese induzida de óxido nítrico e prostaglandina E2, que contribuem para a sua capacidade de modular as respostas imunes (DA SILVA MEIRELLES et al., 2009). Essa descoberta inicialmente indicou que as CTMs eram “imunoprivilegiadas” e subsequentemente consideradas seguras para uso em ambientes alogênicos, sem preocupação com a rejeição imunológica (LE BLANC et al., 2003).

Embora a terapia com CTM alogênica seja considerada segura (LALU et al., 2012), houve relatos de eventos clínicos incluindo aumento de celularidade sinovial e da contagem total de células nucleadas após injeção intra-articular de CTMs alogênicas em modelos equinos (JOSWIG et al., 2017; PIGOTT et al., 2013).

Além disso, estudos avaliando a compatibilidade de transplantes pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex - MHC*), observaram que as CTMs com MHC incompatíveis ao receptor induziram respostas imunes celular e humoral levando à rejeição dos transplantes (ELIOPOULOS & STAGG, 2005; NAUTA et al., 2006; PEZZANITE et al., 2015; ZANGI et al., 2009).

A ausência de uma resposta imune local não exclui uma resposta sistêmica e não mede se há uma resposta específica, portanto, apenas a avaliação local (calor, aumento de volume e infiltrado de células inflamatórias) não é suficientes para indicar uma resposta imune à aplicação de CTMs. Da mesma forma, sinais clínicos evidentes como febre ou anafilaxia não foram correlacionados com respostas imunes ou rejeição das CTMs alogênicas (OWENS et al., 2016; PEZZANITE et al., 2015)

A avaliação da resposta imune humoral pode ser realizada por ensaio de microcitotoxicidade, também chamado de ensaio de linfocitotoxicidade. Este teste foi originalmente desenvolvido para tipagem tecidual, mas também pode ser usado para detectar anticorpos citotóxicos no soro. O ensaio padrão de microcitotoxicidade de um ou dois estágios utilizam eosina ou corante fluorescente para detectar citotoxicidade dependente de complemento e mediada por anticorpos após a incubação de soros dos receptores com CTMs ou leucócitos do sangue periférico dos doadores acrescido de complemento de coelho (MCCLOSKEY et al., 1993; PEZZANITE et al., 2015). Devido à simplicidade deste ensaio, ele pode ser realizado utilizando células e soro de organismos que não possuam os reagentes comerciais disponíveis para humanos, como é o caso dos equinos. Esses anticor-

pos específicos podem também ser detectados incubando-se CTMs de doadores ou leucócitos com soro dos receptores marcados com anticorpos secundários anti-IgG ou anti-IgM para avaliar por citometria de fluxo (BADILLO et al., 2007). Entretanto, este ensaio não determina a funcionalidade dos anticorpos como ocorre no ensaio anterior.

O sucesso de qualquer transplante está na capacidade de controlar a resposta imune, permitindo a adaptação do transplante fim de evitar a sua rejeição. Os principais genes responsáveis pelo reconhecimento de antígenos externos no cavalo estão localizados no cromossomo 20 que também é chamado de Antígeno Leucocitário Equino (*Equine Leukocyte Antigen - ELA*). ELA é uma região do genoma de vertebrados que contém os genes que são transcritos e traduzidos para produzir a maioria das proteínas imunes do organismo. Essas moléculas produzidas medeiam as interações entre células imunes, células teciduais e patógenos. As mais conhecidas e proeminentes destas proteínas são as proteínas de superfície celular MHC classe I e classe II (ABBAS & LICHTMANN 2003).

As proteínas do MHC de classe I são apresentadas em todas as células saudáveis do corpo e agem para ajudar o organismo a diferenciar células saudáveis de células infectadas ou cancerosas. As proteínas de superfície de classe II do MHC são usadas por células imunes, mais especificamente linfócitos T, células dendríticas e macrófagos para reconhecer partículas estranhas, como proteínas ou antígenos (RODEY et al., 1997).

As CTMs derivadas de medula óssea de equinos são consideradas positivas para a expressão de MHC classe I, mas são heterogêneas para a expressão de classe II (GUEST et al., 2012; CARRADE et al., 2012; SCHNABEL et al., 2014). O MHC de classe II pode variar de acordo com o aspirado da medula óssea, o número de passagens e a exposição ao interferon gama. Portanto as CTMs negativas para MHC II poderiam potencialmente aumentar a expressão de MHC II se im-

plantadas em uma área de inflamação ativa, como demonstrado na estimulação *in vitro* com Interferon Gama (IFN- γ) (SCHNABEL et al., 2014).

A sinovite tem sido relacionada à ativação do sistema imune inato, causando liberação de citocinas como o IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (LAM et al., 2000; SUTTON et al., 2009). Desta forma a aplicação de CTMs alogênicas em articulações inflamadas podem alterar a expressão de MHC II e por consequência a resposta imune, já que as CTMs de MHC II positivas estimulam a proliferação de células T *in vitro* via sistema de reações de leucócitos (SCHNABEL et al., 2014).

Em equinos as aplicações de CTMs alogênicas incompatíveis, ou seja, que apresentam haplótipo de ELA diferentes, propiciam a formação de anticorpos específicos contra as CTMs do doador (OWENS et al., 2016), mesmo em aplicações de CTMs negativas para MHC II (PEZZANITE et al., 2015). Embora o reconhecimento imune por anticorpos possa prejudicar as CTMs transplantadas, diminuindo o tempo de sobrevivência e reduzindo a eficácia terapêutica, atualmente não há dados na literatura para afirmar que ocorra da mesma forma no ambiente articular saudável ou inflamado.

Porém, há evidências que em camundongos as CTMs alogênicas de MHC incompatíveis são induzidas à destruição pelo sistema imune do destinatário e não persistam no organismo do receptor, enquanto as CTMs alogênicas de MHC compatíveis ou autólogas persistem (ZANGI et al 2009; ELIOPOULOS et al 2005). Adicionalmente, em ensaios de microcitotoxicidade, as CTMs alogênicas incompatíveis não foram capazes de se proteger de uma resposta imune humoral direcionada e podem ser potencialmente mortas por essa resposta de anticorpos citotóxicos.

Os estudos atuais em equinos sustentam que as CTMs alogênicas são rejeitadas *in vivo*, com isso estratégias para reduzir a imunogenicidade e aumentar a capacidade das CTMs de evitar res-

postas imunes devem ser investigadas para aumentar a sobrevivência celular (BERGLUND & SCHNABEL, 2016). A compreensão do complexo de resposta imune à aplicação intra-articular de CTMs alogênicas em articulações hígidas e inflamadas é fundamental, já que a articulação sinovial é uma estrutura única, com composição imunológica diferente e barreira distinta de revestimento sinovial.

Referências

- ABBAS A, LICHTMANN A. **Cellular And Molecular Immunology**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003.
- AGUNG M, OCHI M, YANADA S, ADACHI N, IZUTA Y, YAMASAKI T, TODA K. . Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intra-articular injection and their contribution to tissue regeneration. **Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.** 14, 1307–1314. 2006
- ANKRUM JA, ONG JF, KARP JM. “Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged,” *Nature Biotechnology*, vol. 32, no. 3, pp. 252–260, 2014.
- BADILLO AT, BEGGS KJ, JAVAZON EH, TEBBETS JC, FLAKE AW. Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. **Biol Blood Marrow Transplant** ;13(4):412–22. 2007.
- BARTHOLOMEW A, STURGEON C, SIATSKAS M, FERRER K, MCINTOSH K, PATIL S, HARDY W, DEVINE S, UCKER D, DEANS R, ET AL. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology** ;30(1):42–8. 2002.
- BERGLUND AK, SCHNABEL LV. Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-major histocompatibility complex antibodies. **Equine Veterinary Journal**. Vol 49, issue 4, pp 403–555. doi: 10.1111/evj.12647. 2017.
- BOONE L. Intra-articular administration of allogeneic equine bone marrow derived mesenchymal stem cells. **Athens, Georgia: University of Georgia**; 2013.
- BRANDÃO, J. S., ALVARENGA, M. L., PFEIFER, J. P. H., DOS SANTOS, V. H., FONSECA-ALVES, C. E., RODRIGUES, M., ... ALVES, A. L. G. Allogeneic mesenchymal stem cell

transplantation in healthy equine superficial digital flexor tendon: A study of the local inflammatory response. **Research in Veterinary Science**, 118, 423–430. doi:10.1016/j.rvsc.2018.03.012. 2018

CARRADE DD , LAME MM, KENT MS, CLARK KC, WALKER NJ, BORJESSON DL. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. **Cell Med.**;4:1–11. 2012.

DA SILVA MEIRELLES L, FONTES AM, COVAS DT, CAPLAN AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine and Growth Factor Reviews**; 20, 419–427. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.002>

DE BARI C, DELL'ACCIO F, TYLZANOWSKI P, LUYTEN FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum.** 2001;44: 1928-42.

ELIOPOULOS N, STAGG J, LEJEUNE L, POMMEY S, GALIPEAU J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. **Blood.** 106, 4057-4065. 2005.

FERRIS DJ, FRISBIE DD, KISIDAY JD, MCILWRAITH CW, HAGUE BA, MAJOR MD, SCHNEIDER RK, ZUBROD CJ, KAWCAK CE, GOODRICH LR. Clinical Outcome After Intra-Articular Administration of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in 33 Horses With Stifle Injury. **Veterinary Surgery** 43 255–265. 2014.

GUEST D`J, OUSEY JC, SMITH MRW. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Cloning**.;1:1–9. 2008.

HARE JM, FISHMAN JE, GERSTENBLITH G ET AL., “Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: e POSEIDON randomized trial,” **Journal of the American Medical Association**, vol. 308, no. 22, pp. 2369–2379, 2012.

HATSUSHIKA D, MUNETA T, NAKAMURA T, HORIE M, KOGA H, NAKAGAWA Y, TSUJI K, HISHIKAWA S, KOBAYASHI E, SEKIYA I. Repetitive allogeneic intraarticular injections

of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. **Osteoarthritis Cartilage**. 2014;22(7):941–50.

- ILIC D, POLAK J. Stem cell based therapy—where are we going? **Lancet**.;379(9819):877–8. 2012.
- JOSWIG AJ, MITCHELL A, CUMMINGS KJ, LEVINE GJ , GREGORY CA, SMITH III R, WATTS AE. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. **Stem Cell Research & Therapy** 8:42 DOI 10.1186/s13287-017-0503-8. 2017.
- KISSMEYER-NIELSEN, F. et al. Hyperacute Rejection Of Kidney Allografts, Associated With Pre-existing Humoral Antibodies Against Donor Cells. **The Lancet**, v. 288, n. 7465, p. 662-665. ISSN 0140-6736. 1966
- KOL A , WOOD JA, HOLT DDC, GILLETTE JA, BOHANNON-WORSLEY LK, PUCHALSKI SM, WALKER NJ, CLARK KC, WATSON JL, BORJESSON DL. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. **Stem Cell Research & Therapy** 6:73 DOI 10.1186/s13287-015-0050-0. 2015.
- LALU, M. M., MCINTYRE, L., PUGLIESE, C., FERGUSSON, D., WINSTON, B. W., MARSHALL, J. C., ... STEWART, D. J. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. **PLoS ONE**, 7(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559> . 2012
- LE BLANC K, TAMMIK C, ROSENDAHL K, ZETTERBERG E, RINGDÉN O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, 31(10), 890–896. [http://doi.org/10.1016/S0301-472X\(03\)00110-3](http://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00110-3)
- MCCLOSKEY, DJ, BROWN J, N. C. Serological Typing of HLA-A, -B, -C Antigens. In B. J. Hui KM (Ed.), *Handbook of HLA Typing Techniques* (pp. 175–248). Boca Raton: CRC Press. 1993.

- MCILWRAITH, CW, FRISBIE DD, RODKEY WG, KISIDAY JD, WERP NM, KAWCAK CE, STEADMAN JR. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. **Arthroscopy** 27, 1552–1561. 2011.
- MURPHY, M. B., MONCIVAIS, K., & CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & Molecular Medicine**, 45(11), e54. <http://doi.org/10.1038/emm.2013.94>. 2013
- NAUTA A J, WESTERHUIS G, KRUISSELBRINK AB, LURVINK EGA, WILLEMZE R, FIBBE WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, 108, 2114–2120. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-11-011650>. 2006.
- O’CONNELL JX. Pathology of the synovium. **Am J Clin Pathol**. 2000;114(5):773–84.
- OWENS SD, KOL A, WALKER NJ, BORJESSON DL. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Induces Specific Alloantibodies in Horses. **Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International**. Vol 2016, Article ID 5830103, pp 8. DOI: 10.1155/2016/5830103. 2016
- PEZZANITE LM, FORTIER LA, ANTCZAK DF ET AL., “Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo,” **Stem Cell Research and Therapy**, vol. 6, no. 1, article 54, 2015.
- PIGOTT JH, ISHIHARA A, WELLMAN ML, DUNCAN S, RUSSELL DS, BERTONE AL. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 156 ;99–106 .2013.
- RODEY GE, REVELS K, FULLER TC. Epitope specificity of HLA class I alloantibodies: II. Stability of cross-reactive group antibody patterns over extended time periods. **Transplantation**, v. 63, n. 6, p. 885-893. ISSN 00411337, 1997.
- SAKAGUCHI Y, SEKIYA I, YAGISHITA K, MUNETA T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. **Arthritis**

Rheum. 2005;52(8):2521–9.

SCHNABEL LV, PEZZANITE LM, ANTCZAK DF, FELIPPE MJ , FORTIER LA. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. **Stem Cell. Res. Ther.** 5, 13, 2014.

SHIRASAWA S, SEKIYA I, SAKAGUCHI Y, YAGISHITA K, ICHINOSE S, MUNETA T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. **J Cell Biochem.** 2006;97(1):84–97.

SUNDIN M, RINGDE´NO, SUNDBERG B, NAVA S, GOTHERSTROM C, LE BLANC K. “No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients,” **Haematologica**, vol. 92, no. 9, pp. 1208–1215, 2007.

TSENG CT, MILLER D, CASSANO J, BAILEY E, ANTCZAK DF. Identification of equine major histocompatibility complex haplotypes using polymorphic microsatellites. **Anim Genet.**;41 Suppl 2:150–3. 2010.

VAN VELTHOVEN CTJ, KAVELAARS A, VAN BEL F, HEIJNEN CJ. Repeated Mesenchymal Stem Cell Treatment after Neonatal Hypoxia-Ischemia Has Distinct Effects on Formation and Maturation of New Neurons and Oligodendrocytes Leading to Restoration of Damage, Corticospinal Motor Tract Activity, and Sensorimotor Function. **Journal of Neuroscience.** 2010;30(28):9603–11.

ZANGI L, MARGALIT R, REICH-ZELIGER S, BACHAR-LUSTIG E, BEILHACK A, NEGRIN R, REISNER Y. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. **Stem Cells.** 27, 2865-2874. 2009

CAPÍTULO 2

Artigo científico a ser submetido ao periódico Research In Veterinary Science

RESPOSTAS IMUNE À APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALÔGENICAS EM EQUINOS

(sob as normas vigentes - disponível <https://www.journals.elsevier.com/research-in-veterinary-science>)

IMUNE RESPONSES TO THE INTRATICULAR APPLICATION OF ALLOGENIC MESENCHYMAL STEM CELLS IN HORSES

ANDRÉ MASSAHIRO TERAMOTO KRIECK¹; GUSTAVO DOS SANTOS ROSA¹, ENRICO TOPAN PADULA¹, MARIANA CORREA ROSSI¹, JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER¹; JAQUELINE SOUZA BRANDÃO¹, ROBERTA MARTINS BASSO², FERNANDA DE CASTRO STIEVANI¹, MARJORIE DE ASSIS GOLIM³, ANA LIZ GARCIA ALVES^{1*}.

1. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. UNESP – Botucatu, SP- Brasil
2. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. UNESP – Botucatu, SP- Brasil
3. Hemocentro, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. UNESP – Botucatu, SP- Brasil

*autor para correspondência: ana.liz@unesp.br

ABSTRACT

Transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) in joint diseases has been shown to be effective. The objective of this study was to evaluate the immune response of repeated intra-articular applications of allogeneic MSCs and their immunogenicity using microcytotoxicity assays to evaluate complement dependent cytotoxic antibody responses. Fifteen adult horses were randomly assigned to three groups. Six animals in the ALO group where healthy joints received allogeneic MSCs, six in the ALO LPS group in which the joints were previously inflamed, by the experimental induction of synovitis with 0.5ng of LPS and three animals in the AUTO group that was maintained as negative control and received Autologous MSCs. Two applications were performed in the same articulation of mesenchymal stem cells derived from synovial membrane with interval of 4 weeks. Serial samples were taken 3 days after each application and every 7 days for 8 weeks of synovial fluid for analysis and blood serum for the microcytotoxicity and ultrasound examination to evaluate joint effusion through the distance between the surface of the talus and the joint capsule. Two-way ANOVA and Turkey's test were used for statistical analysis. A moderate inflammatory reaction was evidenced by increased synovial fluid cellularity after the applications. Also, it was observed that after the second allogeneic application, the joints presented effusion until 28 days after application when compared to the autologous applications and in relation to the first allogeneic application. The production of cytotoxic antibodies was observed from 7 days in 2 animals of the ALO group reaching at least 80% of cell death and in the ALO LPS 3 animal group. In the AUTO group, the production of cytotoxic antibodies was not observed. Therefore the results demonstrated that the allogeneic MSCs were capable of triggering specific cytotoxic antibody responses against the donor MSCs, in addition to elucidating the increase of the cellular infiltrate in the synovial joints, the immune responses could negatively impact longevity, viability and efficacy. These results are relevant for the use of MSCs injected in joint environment. Therefore allogeneic MSC therapy should be used with caution, especially in repeated applications in the same joint, in order to obtain a better biological potential of this therapy.

Keywords: Humoral Immune Response; Mesenchymal Stromal Cells; MHC; Microcytotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

As estratégias terapêuticas atuais para o tratamento de doenças articulares atuais estão focadas na redução da dor, da inflamação e da deterioração estrutural das articulações. A terapia celular tornou-se um importante campo de pesquisa focado no desenvolvimento de tratamentos efetivos para estas doenças (Ilic e Polak, 2012). As células tronco mesenquimais (CTMs) são estudadas como uma possível ferramenta para a terapia celular, não só pelo seu potencial de diferenciação, mas também por suas propriedades tróficas e imunomoduladoras (Bartholomew et al., 2002; Ankrum et al., 2014).

Recentemente foram realizados numerosos estudos para avaliar a segurança do transplante de células tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas em equinos em substituição às células autólogas (Joswig et al., 2017; Owens et al., 2016; Schnabel et al., 2014; Pezzanite et al., 2015; Gol et al., 2015). As CTMs alogênicas já foram testadas sobre diversas condições em equinos, sendo aplicadas uma única vez ou repetidas vezes. (Brandão et al., 2018; Pigott et al., 2013; Boone, 2013; Carrade et al., 2012). Embora tenha sido demonstrado que repetidas aplicações de CTMs podem ser benéficas em diferentes modelos de enfermidades e vias de administração (Van Velthoven et al., 2010; Hatsushika et al., 2014) a reação humoral de repetidas administrações de CTMs alogênicas em articulações híginas e inflamadas não foi avaliada.

As CTMs de equinos são consideradas positivas para a expressão de MHC classe I, mas são heterogêneas para a expressão de MHC classe II (Schnabel et al., 2014; Carrade et al., 2012; Guest et al., 2008). A expressão do MHC de classe II pode variar de acordo com o aspirado da medula óssea, o número de passagens e a exposição ao interferon gama. Nesse sentido, as CTMs negativas para MHC II poderiam potencialmente aumentar sua expressão se implantadas em uma área de in-

flamação ativa, como demonstrado na estimulação *in vitro* com Interferon Gama (IFN- γ) (Schnabel et al., 2014).

A sinovite tem sido relacionada à ativação do sistema imune inato, causando liberação de citocinas como o IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Lam et al 2000; Berglund e Schnabel, 2017). Desta forma o estudo da aplicação de CTMs alogênicas em articulações inflamadas se faz importante uma vez que esta inflamação pode alterar a expressão de MHC II celular e consequentemente a resposta imune.

Em aplicações de CTMs alogênicas em equinos já se evidenciou a formação de anticorpos específicos contra CTMs do doador (Owens et al., 2016; Pezzanite et al., 2015), mesmo as células do doador sendo negativas para a expressão de MHC II, uma vez que foi evidenciada a produção de anticorpos pelo receptor (Pezzanite et al., 2015).

Há relatos atuais que sustentam que as CTMs alogênicas são rejeitadas *in vivo*, o que faz com que estratégias para reduzir a imunogenicidade e aumentar a capacidade das CTMs de evitar respostas imunes sejam investigadas a fim de aumentar a sobrevivência celular (Berglund e Schnabel, 2017). A compreensão da resposta imune à aplicação intra-articular de CTMs alogênicas em articulações inflamadas e híginas é fundamental uma vez que a articulação sinovial é uma estrutura única, com uma composição imunológica diferente e uma barreira distinta em seu revestimento sinovial. Portanto o presente estudo tem o objetivo de avaliar a segurança de repetidas aplicações intrarticulares alogênicas e sua imunogenicidade utilizando ensaios de microcitotoxicidade para mensurar as respostas de anticorpos citotóxicos.

2. Material e métodos

Este experimento foi conduzido de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética e Uso Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Protocolo 0240/2017

2.1. Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em que células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial de três doadores hígidos foram aplicadas na articulação tibiotársica de 15 equinos divididos em 3 grupos, em um grupo aplicou-se CTMs alogênicas em articulações saudáveis (grupo ALO), em outro grupo aplicou-se em articulações inflamadas (grupo ALO LPS). Neste, a sinovite foi induzida 8 horas antes do tratamento, com LPS, 0,5 ng em 2 mL. Adicionalmente, realizou-se um grupo controle negativo, onde os três cavalos doadores receberam aplicações de células tronco mesenquimais autólogas em articulações saudáveis (grupo AUTO). As aplicações de células tronco ocorreram em 2 momentos, no momento zero e após 4 semanas. Foram coletadas amostras de líquido sinovial imediatamente antes da aplicação, após 24 horas, 72 horas e a cada 7 dias após cada aplicação para análise citológica. As amostras de sangue dos cavalos receptores foram colhidas antes da aplicação e a cada 7 dias, durante 8 semanas. Cada amostra foi processada para colher o soro, que foi usado em ensaios de microcitotoxicidade para determinar os títulos de anticorpos citotóxicos para cada animal.

2.2. Seleção dos animais

Este estudo utilizou 15 animais machos castrados pesando média de 340kg. Antes da inclusão no estudo, os animais foram declarados saudáveis com base no exame físico e laboratoriais (hemograma e bioquímico completo), ausência de claudicação, de derrame articular e de alterações no exame radiográfico e ultrassonográfico da articulação tibiotársica. Além de não terem sido submetidos à aplicações de células tronco ou transfusões sanguíneas anteriores. Foram selecionados

três cavalos que foram os doadores de CTMs e também receptores autólogos e 12 cavalos receptores de CTMs alogênicas estes foram divididos nos 2 grupos ALO e ALO LPS.

2.3. Cultivo de células tronco mesenquimais

As CTM foram cultivadas a partir de membrana sinovial dos equinos doadores, coletadas por artroscopia, da articulação radiocárpica de acordo com a técnica descrita por McIlwraith et al. (2011). A amostra foi submetida a sucessivas lavagens com Knockout™ DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) e sofreu fragmentação mecânica com auxílio da lâmina de bisturi e dissociação enzimática com 2mg/mL de colagenase tipo I (Gibco, Grand Island, NY, USA) diluída em meio Knockout™ DMEM. A solução foi homogeneizada e levada à estufa em ambiente controlado à 37°C e 5,0% de CO₂, por 3 horas e após este período foi adicionado o mesmo volume de meio Knockout™ DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, USA). Este material foi centrifugado a 696 x g durante 10 minutos. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e foi adicionado o meio de cultivo para posterior centrifugação. Novamente foi removido o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em meio de cultivo. As CTMs foram cultivadas em garrafas de cultivo de 75cm² (TPP-Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) a uma concentração de 10 x 10⁴ células/cm² em meio contendo meio de cultura Knockout™ DMEM, e 10% de soro fetal bovino. As placas foram mantidas em estufa em 37°C e 5,0% de CO₂. Após atingirem 80% de confluência nas placas de cultivo foi realizada passagem para garrafas de cultivo de 175cm² (TPP-Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) até P4 para então serem utilizadas.

A suplementação do meio de cultivo foi alterada, removendo o componente do soro fetal bovino 48 horas antes da sua utilização, desta forma durante a última troca, utilizou-se um meio de cultivo DMEM sem a adição de 10% de soro fetal bovino. Após isso foram retiradas das garrafas de

cultivo com solução de tripsina 0,025% de EDTA para dissociação das células em seguida lavadas com meio contendo SFB para inativação da tripsina e lavadas três vezes com solução PBS. As CTMs foram utilizadas para aplicação intra-articular e para os ensaios de microcitotoxicidade.

2.4. Caracterização das células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial

As CTMs foram imunofenotipadas para níveis de expressão de MHC classe I, MHC classe II e um painel de marcadores positivos para CD73 e CD90, e negativo para CD11b, CD34 e CD45 usando citometria de fluxo. Além da comprovação da multipotência através de ensaios de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica 1 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) (Dos Santos et al., 2019).

2.5. Indução experimental da sinovite

O procedimento de indução da sinovite foi realizado em 6 animais (grupo ALO LPS) 8 horas antes do transplante de CTMs. Com o animal em posição quadrupedal, em tronco de contenção, o tarso aleatoriamente escolhido foi submetido à tricotomia e antisepsia cirúrgica. Imediatamente antes da indução experimental, foi realizada a artrocentese tibiotársica com agulha 21G na face dorso-medial medial à veia safena. Então infiltrado 2 mL de solução estéril de PBS contendo 0,5 ng de LPS proveniente de *Escherichia coli* 6, segundo protocolo previamente descrito por Williams et al. (2016). O procedimento foi repetido após quatro semanas nos mesmos 6 animais.

2.6. Aplicação intra-articular de CTMs

A face medial de cada articulação tibiotársica foi assepticamente preparada imediatamente antes da injeção de CTMs. Uma agulha de calibre 21G, foi inserida na articulação, na face dorso-medial medial à veia safena da articulação tibiotársica e 2 mL de fluido sinovial foram coletados e transferidos para tubos contendo EDTA para análise citológica. Após a coleta de líquido sinovial, a injeção CTMs foi realizada. As articulações foram injetadas com aproximadamente 10×10^6 CTMs

em 2 ml de PBS. Foram realizadas aplicações em 6 animais de cada grupo e repetidas após 4 semanas.

2.7. Coleta de amostras de sangue dos receptores

As amostras de sangue foram coletadas via punção asséptica da veia jugular dos cavalos receptores antes da aplicação, a cada 7 dias durante 4 semanas após cada aplicação de CTMs. A cada coleta dois tubos de 10 mL de sangue foram coletados com agulhas Vacutainer® com tubos para coleta de soro. Os tubos de soro foram então centrifugados a 800 xg durante 10 minutos a 4 °C. O soro foi separado em alíquotas e congelado para posterior utilização nos ensaios de microcitotoxicidade para determinar os títulos de anticorpos citotóxicos para cada cavalo receptor contra as CTMs do doador.

2.8. Ensaio de microcitotoxicidade

O teste padrão de exclusão de corante de microcitotoxicidade em duas fases foi utilizado para detectar anticorpos citotóxicos, no entanto as CTMs foram utilizadas como células alvo, no lugar de leucócitos do sangue periférico tradicionais como descrito por BERGLUND e SCHNABEL (2017). As CTMs foram testadas contra soros diluídos em série do receptor das CTMs. Um microlitro de soro do receptor diluído e 1 µL de suspensão CTMs doadora foi incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente sob óleo em poços de placas Terasaki, seguindo-se 5 µL de complemento de coelho (durante mais 1 hora). Os poços foram corados com 2 µL de corante de eosina a 5% e fixados com 5 µL de formalina a 10% (pH entre 7,2 e 7,4). O título de anticorpo citotóxico foi determinado pela diluição mais elevada de cada antissoro que resultou na morte de pelo menos 80% dos CTMs doadoras.

2.9. Análise do líquido sinovial

As avaliações do líquido sinovial coletado foram a concentração de proteína total através de refractometria, contagem de células nucleadas totais e diferencial de células nucleadas totais. A partir destes números, foram calculados números absolutos de neutrófilos e células mononucleares.

2.10. Avaliação clínica

Os cavalos foram monitorados diariamente por exame físico de rotina avaliando parâmetros vitais e exame locomotor atribuindo o escore de claudicação segundo AAEP durante todo experimento. Além disso foi realizado exame ultrassonográfico da articulação tratada durante todos os momentos. O exame foi realizado com um aparelho Logiq e ;GE com transdutor linear utilizando uma frequência de 10 MHz onde foi avaliada a ecogenicidade do líquido sinovial, a proliferação de membrana sinovial e a efusão sinovial. Através da mensuração da distância entre a superfície do talos e a cápsula articular.

2.11. Análise estatística

Para análise dos dados não paramétricos obtidos no estudo, foi realizada análise estatística utilizando os testes Two Way Repeated Measures ANOVA para comparações nos tempos de avaliação e Turkey's para todos os procedimentos de comparação múltipla pairwise. Todas as avaliações serão consideradas no nível de 5% de significância ($p < 0.05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism versão 7.0.

3. Resultados

3.1. Caracterização das células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial

As CTMs derivadas de membrana dos três cavalos doadores foram isoladas e expandidas com sucesso. Os *clusters* de células isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide e plasticidade. A capacidade de diferenciação foi confirmada usando meios de diferenciação comercialmente disponíveis (Gibco, Grand Island, NY, EUA). A coloração com *Oil Red* marcou as gotículas lipídicas nas células do meio de indução adipogênico. A diferenciação osteogênica foi confirmada com a coloração de *Alizarin Red* das células diferenciadas, evidenciando a deposição de cálcio, formada durante a diferenciação osteogênica. O potencial de diferenciação condrogênica foi avaliado pelo sistema de cultura em *pellet*. Células submetidas a diferenciação condrogênica foram coradas com *Alcian Blue*

evidenciando a matriz extracelular condral. Os cultivos de controle não exibiram diferenciação. A análise por citometria de fluxo revelou a expressão de CD90, CD73 e MHC I em todas as passagens avaliadas. No entanto não revelou reação evidente de CD11b, CD45, CD34 e MHC Classe II .

3.2. Avaliação clínica

Os parâmetros do exame físico se mantiveram dentro dos padrões fisiológicos de referência, sendo que nenhum animal apresentou alteração da frequência cardíaca, respiratória, motilidade intestinal ou aumento da temperatura retal. No entanto no grupo ALO LPS os animais apresentaram efusão sinovial e sinais de dor à palpação local no momento do tratamento e 24 horas depois nas 2 aplicações. Já o grupo ALO os animais apresentaram efusão e sinais de dor local leve, o que também ocorreu no grupo AUTO. Porém no grupo ALO os animais apresentaram maiores sinais de efusão sinovial.

Os animais manifestaram também claudicação grau 2 e 3 no dia seguinte à aplicação reduzindo progressivamente até o 14º dia depois de cada aplicação.

3.3. Avaliação ultrassonográfica

Os achados ultrassonográficos foram compatíveis com sinovite leve transitória em todos animais tratados. Apresentando aumento da ecogenicidade do líquido sinovial nos momentos M1, M3, M35 e M42 apresentando também proliferação da membrana sinovial e distensão sinovial (Fig. 1). Os sinais ultrassonográficos de sinovite diminuíram 14 dias após a primeira aplicação, no entanto após a segunda aplicação apresentaram efusão sinovial até o M56 em todos os grupos. O grupo AUTO não apresentou diferença estatística em nenhum dos momentos entre as duas aplicações. O grupo ALO apresentou diferença entre as duas aplicações, entre os momentos M0 e M28, M1 e M29, M3 e M31, M7 e M35, M14 e M42. Apresentando aumento na segunda aplicação ($P < 0.005$). O grupo ALO LPS apresentou diferença estatística entre as aplicações, entre os momentos M0 e M28; e M3 e M31 (Fig. 3D). Apresentando aumento na segunda aplicação ($P < 0.05$).

3.4. Ensaios de microcitotoxicidade

A incubação dos soros dos animais do grupo controle autólogo não resultou em morte celular (<10% de morte celular) em qualquer momento ou em qualquer diluição indicando a ausência de anticorpos. Todos animais no momento imediatamente antes das aplicações (M0), não apresentaram morte celular significativa após incubação com soros no dia 0. No grupo ALO apenas dois animais apresentaram morte de pelo menos 80% das CTMs na concentração pura em dois momentos M28 e M49, no grupo Alo LPS 3 animais atingiram morte celular significativa um animal partir do M7 até M56, outro animal do M21 ao M35 e outro apenas no M21. Nas diluições subsequentes (1:2 e 1:16) encontrou-se resultados semelhantes que demonstram uma tendência correspondente aos momentos, mas com microcitotoxicidade reduzida (Tabela 1). Na comparação das médias da diluição pura entre os grupos, apenas o grupo AUTO apresentou diferença estatística ($p < 0,0001$) com os demais em todos momentos. A avaliação das médias ao longo dos momentos houve apenas diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre M0 e os demais momentos nos grupos ALO e ALO LPS. Já na comparação da médias das diluições 1:2 e 1:16 entre os grupos, apenas o grupo Auto apresentou diferença estatística ($p < 0,0001$) com os demais em todos momentos. Na análise ao longo dos momentos houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) M0 e M7 com os demais momentos nos grupos Alo e Alo LPS.(Fig. 2).

3.5. Avaliação do líquido sinovial

3.5.1. Proteína Total

A proteína total do líquido sinovial apresentou aumento transitório dos valores em todos os grupos. Não foi evidenciadas diferenças significativas nos valores de proteína total entre a primeira e segunda aplicação nos grupos. No entanto, houve diferença estatística entre o grupo ALO LPS e os demais no M0 e M28 ($P < 0.0001$). Entre os grupos AUTO e ALO no M1, M3, M28 e M31 também existiram diferenças estatísticas ($p < 0.05$) (Fig.3A). O maior aumento de proteína total foi detectado 24 horas após as aplicações. Em todos os casos, a proteína total diminuiu progressivamente,

atingindo valores considerados normais de referência (<2gr/dL) sendo que o grupo ALO apresentou uma diminuição com evolução lenta.

3.5.2. Contagem de Leucócitos

Foi observado um aumento moderado na contagem de leucócitos em todas as articulações tratadas, não havendo entretanto diferença estatística entre a primeira e a segunda aplicação em nenhum dos grupos. O aumento foi estatisticamente significativo nos dias 1 e 3 após cada aplicação, ou seja, M1, M3, M29 e M31 apresentaram diferença estatística em relação aos demais momentos. Sendo que houve diferença estatística no M0 e M28 entre grupo ALO LPS e os demais grupos (Fig. 3B). Os valores de leucócitos diminuíram para os de referência normal em todos os casos em até 7 dias.

3.5.3. Contagem de neutrófilos

Foi evidenciado um pico na contagem de neutrófilos em M1 e M29 em todas aplicações sem haver diferença estatística entre a primeira e a segunda aplicação em nenhum dos grupos. O aumento em articulações tratadas foi evidente no dia seguinte às aplicações, sendo estatisticamente significativas para as duas aplicações (Fig.3C). Esse incremento de neutrófilos teve diminuição repentina 3 dias após a aplicação e permaneceu baixo até atingir a faixa de referência normal .

4. Discussão

Estudos recentes compararam a resposta imune após injeções intra-articulares de células-tronco mesenquimais autólogas e alogênicas em equinos, tanto em articulações híidas (Pigott et al., 2013; Carrade et al., 2012) quanto em articulações inflamadas (Williams et al., 2016). No entanto, a resposta imune humoral não foi avaliada nesses estudos.

O presente estudo avaliou a resposta de anticorpos citotóxicos a repetidas aplicações de CTMs alogênicas derivadas de membrana sinovial em articulações híidas e inflamadas. Sabe-se que as citocinas inflamatórias presentes no tecido lesado, como o interferon- γ , regulam positivamente a expressão de MHC em CTMs de equinos (Schnabel et al., 2014), o que pode provocar uma

resposta imune a fim de que as CTMs sejam reconhecidas e rejeitadas, podendo levar a morte celular precoce. As respostas imunes às aplicações alogênicas podem ocorrer por meio de várias vias que envolvem a imunidade inata e adaptativa.

Embora frequentemente citadas com grande capacidade imunomoduladora e consideradas imuno privilegiadas *in vitro*, as CTMs alogênicas são agora consideradas imuno-evasivas *in vivo* (Ankrum et al., 2014). Isso se deve à persistência reduzida de CTMs alogênicas a longo prazo (El-Sawy et al., 2005; Grabie et al., 2003; Huang et al., 2010; Eliopoulos et al., 2005; Nauta et al., 2006) ao aumento da produção de anticorpos (Isakova et al., 2010), ao aumento de infiltrados celulares (El-Sawy et al., 2005; Grabie et al., 2003) e às respostas imunológicas celular e humoral (Poncelet et al., 2007; Badillo et al., 2007) que ocorrem após administração de CTMs alogênica em comparação com o transplante autólogo. Assim, as respostas imunes poderiam impactar negativamente a longevidade, a viabilidade e a eficácia celular (Ankrum et al., 2014; Pezzanite et al., 2015; Berglund e Schnabel, 2017).

Os resultados deste estudo demonstram que aplicações de CTMs alogênicas derivadas de membrana sinovial equina geraram resposta de anticorpos séricos tanto aplicados em articulações hígidas quanto em articulações inflamadas sem diferenças significativas entre elas. No entanto os grupos de aplicações alogenicis apresentou diferença estatística em relação ao grupo AUTO. Além de demonstrar que a incubação das CTMs do doador com o soro do receptor contendo anticorpos e o complemento resultou na morte celular. Este achado corrobora com relatos anteriores, de que estes anticorpos possam ser direcionados a antígenos específicos presentes na superfície das CTMs (Berglund e Schnabel, 2017; Owens et al., 2016)

Apesar das citocinas do ambiente inflamado como o IFN- γ , terem demonstrado *in vitro* que regulam positivamente a expressão de MHC em CTMs de equinos (Schnabel et al., 2014), fato que poderia tornar mais precoce o reconhecimento e a rejeição das CTMs por uma resposta imune, neste experimento

não foi demonstrado diferença estatística entre o grupo ALO e o grupo ALO LPS, o que indica a ausência de interferência direta na produção de anticorpos citotóxicos.

Além disso as taxas de microcitotoxicidade foram inferiores a um estudo que utilizou células tronco derivadas de medula óssea aplicadas pela via intradérmica (Berglund e Schnabel, 2017). A via de aplicação em tecidos menos vascularizados pode ser um dos fatores responsáveis por esta variação já que apresentam diferenças no influxo de células imunes. Outro fator seria a origem das CTMs uma vez que as derivadas de membrana sinovial seriam oriundas de tecido mais próximo ao local de aplicação reduzindo assim efeitos adversos. Além disso o estudo anterior utilizou concentração maior de células por aplicação, fator que pode também interferir na resposta imune. No entanto, ainda não está elucidado como o local do transplante, a origem das CTMs ou a dosagem das células possam afetar à intensidade da resposta humoral.

Neste estudo, foram observados achados importantes. Primeiro, a produção de anticorpos citotóxicos após aplicações alogênicas. Segundo, reações inflamatórias moderadas após a aplicação de CTMs alogênicas e autólogas (Williams et al., 2016; Ardanaz et al., 2016). Terceiro, após as segundas aplicações alogênicas com CTMs do mesmo doador os animais apresentaram efusão prolongada em comparação com as aplicações autólogas e em relação à primeira aplicação. Sugerindo assim, que repetidas aplicações alogênicas podem sensibilizar o receptor e, apesar de não gerarem reações inflamatórias exacerbadas, podem causar reações leves prolongadas, podendo de fato interferir ou até reduzir a eficácia da CTMs.

Embora a causa específica da inflamação produzida pela injeção CTMs derivadas de membrana sinovial ainda seja desconhecida (Carrade et al., 2012), existem diferentes fatores que podem ser considerados. Alguns pesquisadores apontam que qualquer injeção intra-articular pode causar uma leve sinovite, ou mesmo pode causar reação após a aplicação articular de qualquer tipo de produto (Stashak, 2006). Outros pesquisadores sugerem que a resposta inflamatória após a administração de CTMs pode ser devida à sensibilidade das articulações equinas hípidas à introdução de cito-

cinas pró-inflamatórias que podem estar presentes no cultivo de células, ou mesmo a substâncias químicas biologicamente ativas presentes no meio de cultivo utilizado (Carrade et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado que as CTMs alogênicas de equinos são capazes de desencadear respostas de anticorpos *in vivo*, que podem reagir a doadores de MHC diferentes (Pezzanite et al., 2015). Podendo ser um dos fatores responsáveis por esta resposta inflamatória.

Uma limitação deste estudo foi que o haplótipo antígeno leucocitário equino (ELA) do MHC dos grupos é desconhecido, ou seja não foi realizada a determinação sorológica por tipagem de microssatélites do DNA dos equinos doadores e receptores como realizado por Pezzanite et al. (2015), desta forma não podemos afirmar a real incompatibilidade entre os doadores e os receptores. Pezzanite et al. (2015) demonstraram que cavalos que eram negativos para o antígeno ELA-A2 e receberam CTMs de doadores ELA-A2 positivos desenvolveram anticorpos específicos do ELA-A2, o que sugere que as CTMs expressam ELA-A2 (Pezzanite et al., 2015). No entanto, ainda não foram determinados quais antígenos específicos de CTMs são os mais imunogênicos. Outra limitação seria a não confirmação da depuração dos componentes xenogênicos do meio de cultivo principalmente os componentes do soro fetal bovino, pois mesmo após as 48h em cultivo sem soro fetal bovino existe ainda a possibilidade de permanecerem resíduos de seus componentes, podendo assim esses componentes serem responsáveis por parte da reação inflamatória transitória. Desta forma o estudo sustenta e corrobora para o entendimento do estado da arte da ação imunogênica das CTMs alogênicas destinadas ao transplante em articulações híidas e inflamadas. Sendo assim, até que a resposta imune *in vivo* contra CTMs alogênicas seja melhor compreendida, estratégias devem ser estudadas e desenvolvidas para prevenir a rejeição, principalmente no ambiente articular, já que a articulação sinovial é uma estrutura única, com mecanismo o imunológicos diferentes e barreira distinta em seu revestimento sinovial.

5. Conclusão

Este estudo investigou a resposta imune ao transplante articular de CTMs alogênicas derivadas de membrana sinovial em equinos. Os resultados demonstraram que as CTMs alogênicas foram capazes de desencadear respostas de anticorpos citotóxicos específicos contra as CTMs doadoras, além de elucidar o aumento do infiltrado celular nas articulações sinoviais, sendo estes resultados relevantes para a persistência das CTMs injetadas no ambiente articular. Portanto, a terapia de CTMs alogênicas pode ser empregada com cautela, principalmente em repetidas aplicações na mesma articulação, para assim se obter melhor potencial biológico desta terapia.

6. Referências

- Ankrum, J.A, Ong, J.F, Karp, J.M., 2014. “Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged,” Nature Biotechnology, vol. 32, no. 3, pp. 252–260.
- Ardanaz, N., Vázquez, F.J., Romero, A., et al., 2016. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. BMC Vet Res., v.12, p.65. doi:10.1186/s12917-016-0692-x.
- Badillo, A.T., Beggs, K.J., Javazon, E.H., Tebbets, J.C., Flake, A.W., 2007. Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. Biol Blood Marrow Transplant ;13(4):412–22.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., Mcintosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker D., Deans, R., et al., 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Experimental Hematology.;30(1):42–8.
- Berglund, A.K., Schnabel, L.V., 2017. Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-major histocompatibility complex antibodies. Equine Veterinary Journal. Vol 49, issue 4, pp 403–555. doi: 10.1111/evj.12647.
- Boone, L., 2013. Intra-articular administration of allogeneic equine bone marrow derived mesenchymal stem cells. Athens, Georgia: University of Georgia
- Brandão, J. S., Alvarenga, M. L., Pfeifer, J. P. H., Dos Santos, V. H., Fonseca-Alves, C. E., Rodrigues, M., ... Alves, A. L. G. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy equine superficial digital flexor tendon: A study of the local inflammatory response. **Research in Veterinary Science**, 118, 423–430. doi:10.1016/j.rvsc.2018.03.012. 2018
- Carrade, D.D., Lame, M.M., Kent, M.S., Clark, K.C., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2012. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. Cell Med.;4:1–11.
- Dos Santos, V. H., Pfeifer, J. P. H., De Souza, J. B., Stievani, F. D. C., Hussni, C. A., Golim, M. D. A., ... & Alves, A. L. G. (2019). Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses. *Research in veterinary science*, 124, 38-45.
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S., Galipeau, J., 2005. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. Blood. 106, 4057-4065.

- El-Sawy, T., Belperio, J.A., Strieter, R.M., Remick, D.G., Fairchild, R.L., 2005. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte-mediated graft damage synergizes with short-term costimulatory blockade to prevent cardiac allograft rejection. *Circulation.*;112(3):320–31.
- Grabie, N., Hsieh, D.T., Buono, C., Westrich, J.R., Allen, J.A., Pang, H., Stavrakis, G., Lichtman, A.H., 2003. Neutrophils sustain pathogenic CD8+ T cell responses in the heart. *Am J Pathol.*163(6):2413–20.
- Guest, D.J., Ousey, J.C., Smith, M.R.W.,2008. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Cloning.*;1:1–9.
- Hatsushika, D., Muneta, T., Nakamura, T., Horie, M., Koga, H., Nakagawa, Y., Tsuji, K., Hishikawa, S., Kobayashi, E., Sekiya, I., 2014. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage.* ;22(7):941–50.
- Huang, X.P., Sun, Z., Miyagi, Y., McDonald Kinkaid, H., Zhang, L., Weisel, R.D., Li, R.K., 2010. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation.*122(23):2419–29.
- Ilic, D., Polak, J., 2012. Stem cell based therapy—where are we going? *Lancet.*;379(9819):877–8.
- Isakova, I.A., Dufour, J., Lancelos, C., Bruhn, J., Phinney, D.G., 2010. Cell-dose-dependent increases in circulating levels of immune effector cells in rhesus macaques following intracranial injection of allogeneic MSCs. *Exp Hematol.* 38(10):957–67.
- Joswig, A.J., Mitchell, A., Cummings, K.J., Levine, G.J., Gregory, C.A., Smith III, R., Watts, A.E.,2017. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research & Therapy* 8:42 DOI 10.1186/s13287-017-0503-8.
- Kol, A., Wood, J.A., Holt, D.D.C., Gillette, J.A., Bohannon-Worsley, L.K., Puchalski, S.M., Walker, N.J., Clark, K.C., Watson, J.L., Borjesson, D.L., 2015. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Research & Therapy* 6:73 DOI 10.1186/s13287-015-0050-0.
- Lam, J. et al., 2000. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest.*, v. 106, p. 1481-8.

McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Rodkey, W.G., Kisiday, J.D., Werp, N.M., Kawcak, C.E., Steadman, J.R., 2011. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 27, 1552–15.

Nauta, A. J., Westerhuis, G., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E.G.A., Willemze, R., Fibbe, W.E., 2006. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*, 108, 2114–2120. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-11-011650>.

Owens, S.D., Kol, A., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2016. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Induces Specific Alloantibodies in Horses. *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International*. Vol 2016, Article ID 5830103, pp 8. DOI: 10.1155/2016/5830103.

Pezzanite, L.M., Fortier, L.A., Antczak, D.F., Cassano, J.M., Brosnahan, M.M., Miller, D., Schnabel, L.V., 2015. Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem Cell Res. Ther.*, v. 6, p. 54. DOI: 10.1186/s13287-015-0053-x.

Pigott, J.H., Ishihara, A., Wellman, M.L., Duncan, S., Russell, D.S., Bertone, A.L., 2013. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 156 ;99–106 .

Poncelet, A.J., Vercruyse, J., Saliez, A., Gianello, P., 2007. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*. 83:783–90.

Schnabel, L.V., Pezzanite, L.M., Antczak, D.F., Felipe, M.J., Fortier, L.A., 2014. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell. Res. Ther.*, 5(1), 13. <http://doi.org/10.1186/scrt402>

Stashak, T.D., 2006. *Claudicação em equinos*. 5^a.ed. São Paulo: Roca.

Sutton, S. et al., 2009. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J.*, v.179, p. 10-24. DOI:10.1016/j.tvjl.2007.08.013.

Van Velthoven, C.T.J., Kavelaars, A., Van Bel, F., Heijnen, C.J., 2010. Repeated Mesenchymal Stem Cell Treatment after Neonatal Hypoxia-Ischemia Has Distinct Effects on Formation and Maturation of New Neurons and Oligodendrocytes Leading to Restoration of Damage, Corticospinal Motor Tract Activity, and Sensorimotor Function. *Journal of Neuroscience*.;30(28):9603–11.

Williams, L.B., Koenig, J.B., Black, B., Gibson, T.W.G., Sharif, S., Koch, T.G. , 2016. Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an lipopolysaccharide induced synovitis model. *EVJ.*, v. 48, p. 619–25. ISSN 0425-1644. DOI: 10.1111/evj.12477.

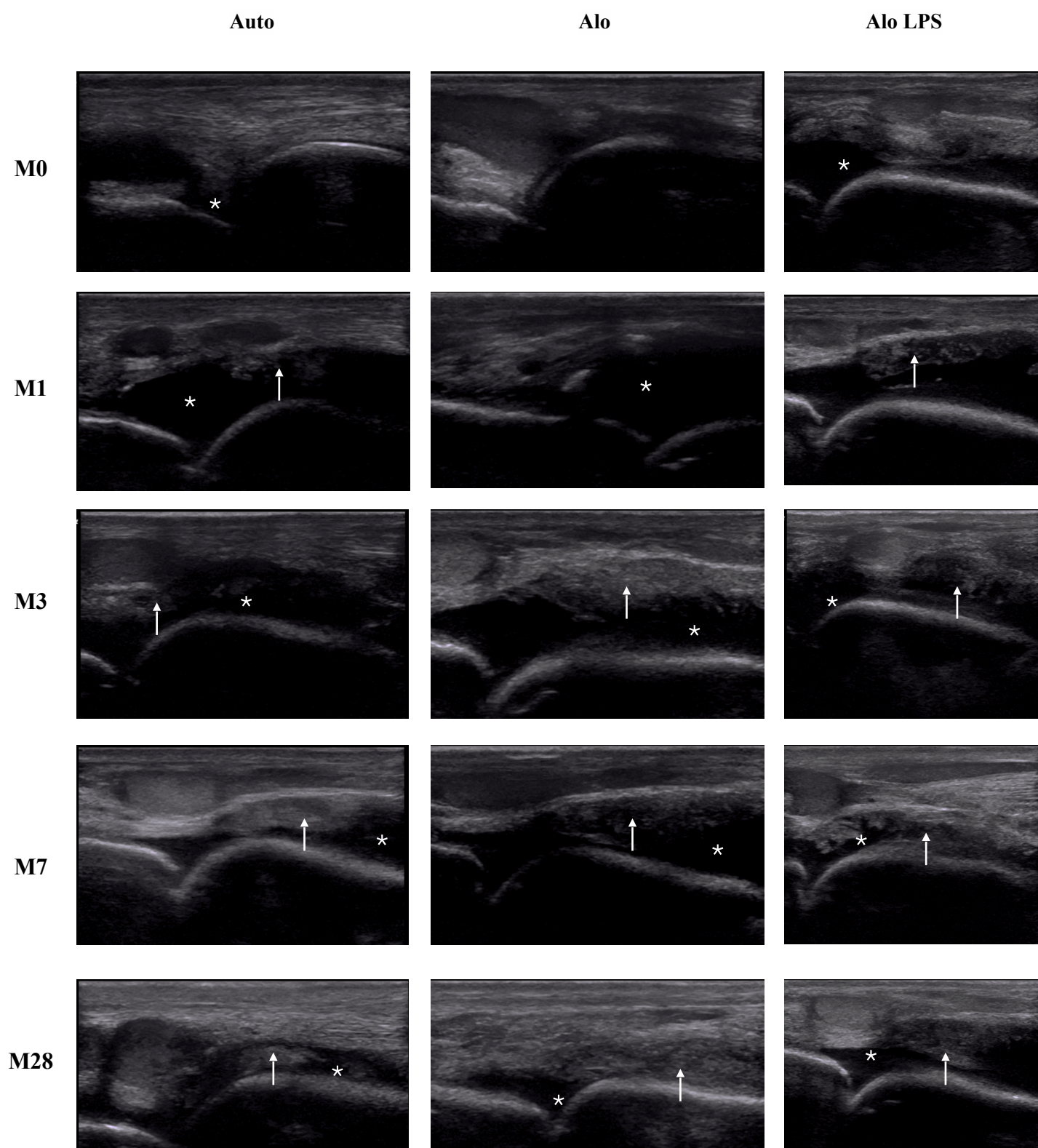


FIG. 1 Imagens ultrassonográficas da articulação tibiotársica após aplicação de CTMs nos momentos 0, 1, 3, 7 e 28. Apresentando aumento do líquido sinovial(*) e proliferação da membrana sinovial (seta). A distância entre o talus e a capsula articular foi medida em todos os momentos. Os sinais de sinovite foram bem evidentes nos dias 1 e 3 e reduziram progressivamente.

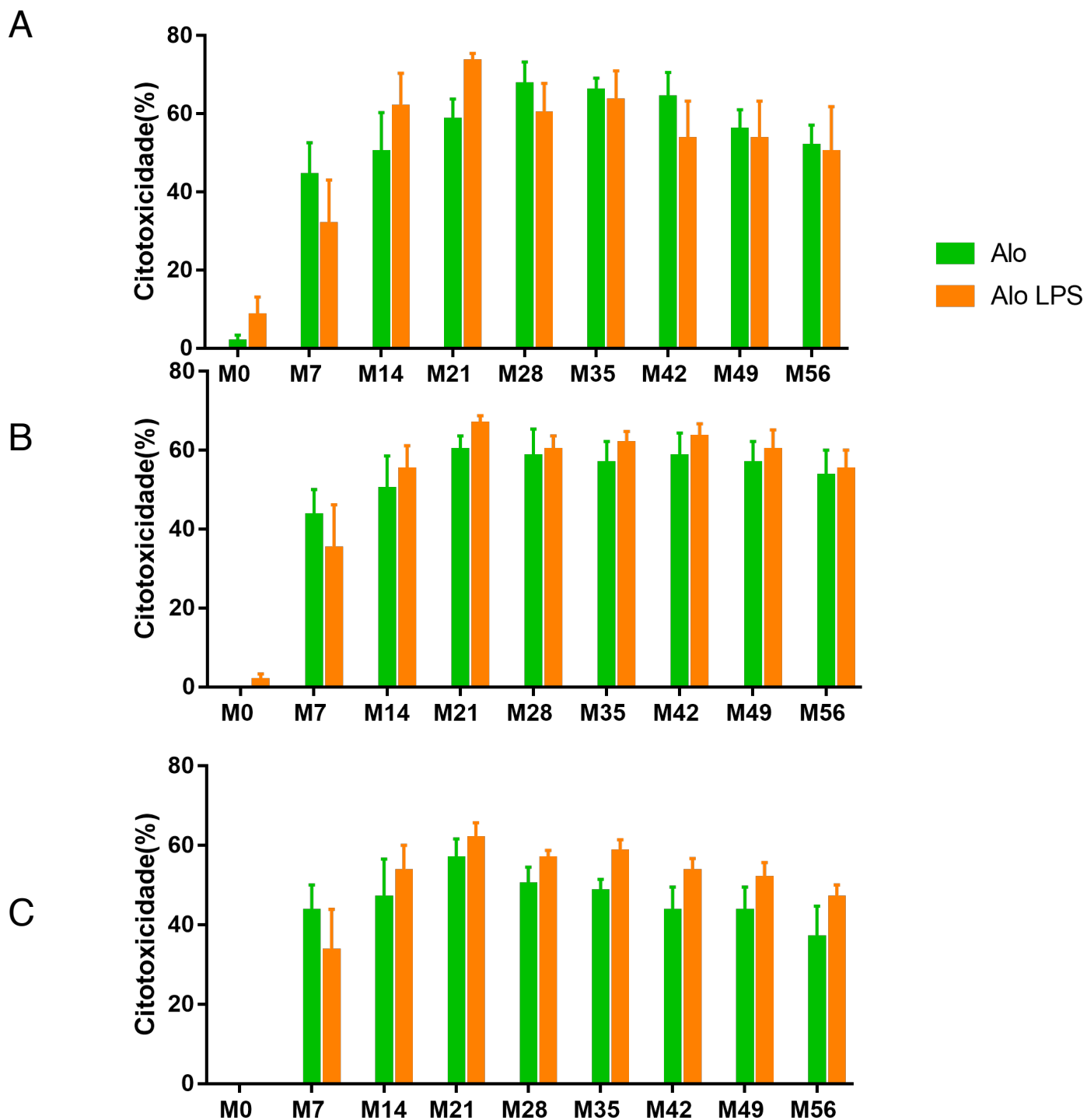


FIG. 2. A. Média \pm desvio padrão da porcentagem de citotoxicidade diluição puro. Diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os momentos apenas do M0 com os demais momentos nos grupos ALO e ALO LPS. B. Média \pm desvio padrão da porcentagem de citotoxicidade diluição 1:2. C. Média \pm desvio padrão da porcentagem de citotoxicidade diluição 1:16. B. e C. Diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os momentos no M0 e M7 no grupo ALO e ALO LPS. Comparando as médias da diluição puro entre os grupos, apenas o grupo Auto apresentou diferença estatística ($p < 0,0001$) com os demais em todos momentos.

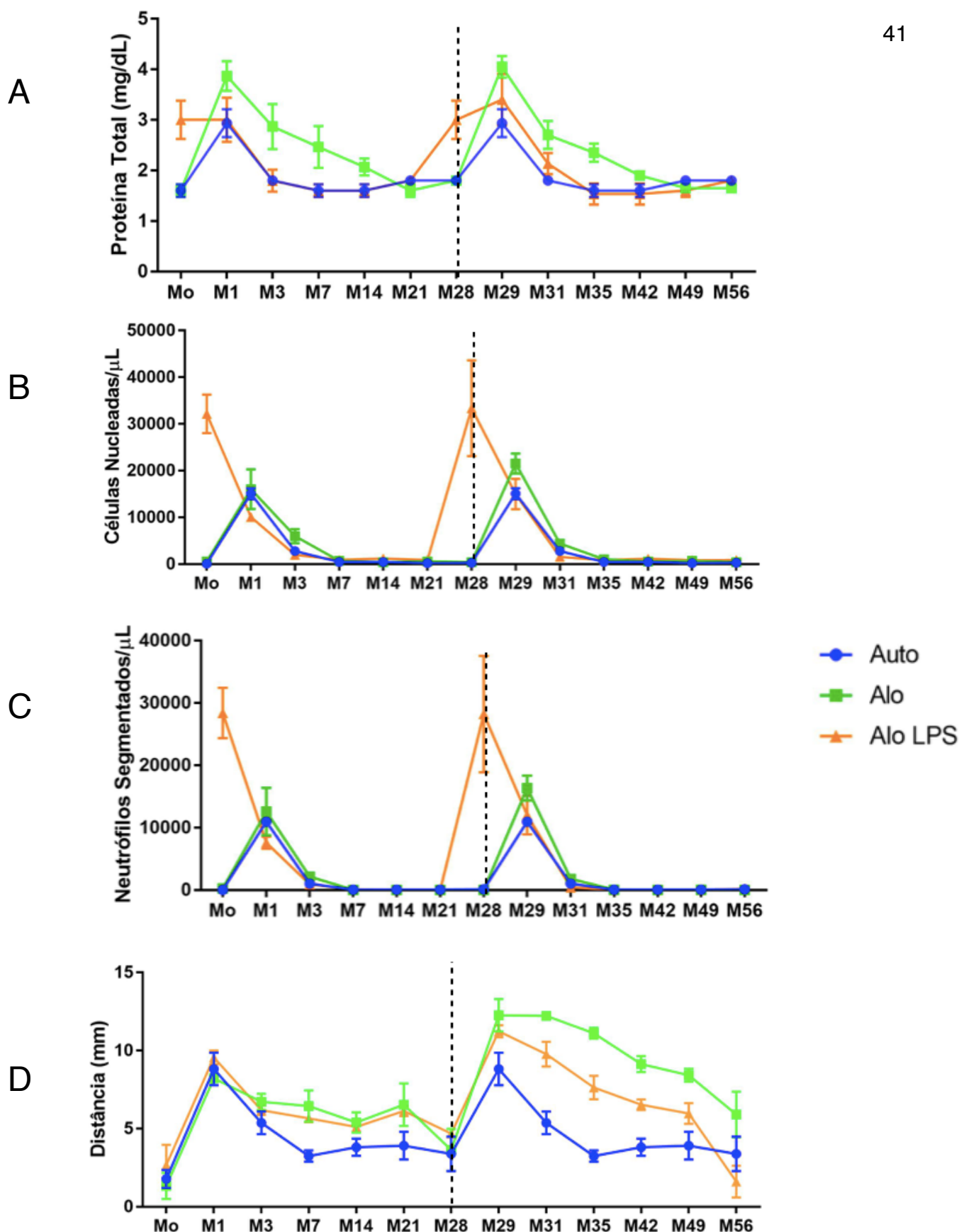


FIG. 3 A. Média \pm desvio padrão da proteína total do líquido sinovial. Diferença estatística entre o grupo ALO LPS e os demais grupos no M0 e M28 ($P < 0.0001$). Diferença estatística entre os grupos AUTO e ALO no M1, M3, M29 e M31. B. Média \pm desvio padrão da contagem de células nucleadas do líquido sinovial. C. Média \pm desvio padrão da contagem de neutrófilos segmentados do líquido sinovial. B. e C. Não apresentaram diferenças estatísticas entre a primeira e a segunda aplicação em nenhum dos grupos. O aumento foi estatisticamente significativo após a aplicação em M1, M3, M29 e M31. Sendo que houve diferença estatística no M0 e M28 entre o grupo ALO LPS e os demais. D. Média \pm desvio padrão da distância entre a superfície óssea do talus até a cápsula articular. O Grupo ALO apresentou diferença entre M0 e M28, M1 e M29, M3 e M31, M7 e M35, M14 e M49. Apresentando aumento na segunda aplicação ($P < 0.005$). O grupo ALO LPS apresentou diferença estatística entre as aplicações, ou seja entre M0 e M28 e M3 e M31. Apresentando aumento na segunda aplicação. Foi considerado diferença estatística quando $P < 0.05$.

Tabela 1 Resultados do ensaio de microcitotoxicidade

Animal Receptor	Grupo	Dia/Momento	Diluição do soro do animal receptor		
			Puro	. 1:2	. 1:16
A	Alo	0	0	0	0
A	Alo	7	40	40	40
A	Alo	14	50	50	40
A	Alo	21	50	50	50
A	Alo	28*	70	70	50
A	Alo	35	70	60	50
A	Alo	42	50	40	50
A	Alo	49	40	40	50
A	Alo	56	40	40	30
B	Alo	0	0	0	0
B	Alo	7	20	20	20
B	Alo	14	30	30	30
B	Alo	21	40	50	40
B	Alo	28*	40	40	40
B	Alo	35	50	40	40
B	Alo	42	40	40	30
B	Alo	49	40	40	30
B	Alo	56	40	30	10
C	Alo	0	0	0	0
C	Alo	7	20	30	30
C	Alo	14	20	20	10
C	Alo	21	50	60	50
C	Alo	28*	70	70	50
C	Alo	35	70	70	50
C	Alo	42	70	70	50
C	Alo	49	60	70	50
C	Alo	56	40	50	50

Tabela 1 Resultados do ensaio de microcitotoxicidade (continuação)

D	Alo	0	0	0	0
D	Alo	7	60	60	60
D	Alo	14	70	70	70
D	Alo	21	70	70	70
D	Alo	28*	70	40	50
D	Alo	35	70	40	50
D	Alo	42	70	60	50
D	Alo	49	60	60	50
D	Alo	56	60	60	50
E	Alo	0	10	0	0
E	Alo	7	60	60	60
E	Alo	14	70	70	70
E	Alo	21	70	70	70
E	Alo	28*	80	80	70
E	Alo	35	70	70	60
E	Alo	42	75	70	60
E	Alo	49	70	70	60
E	Alo	56	60	70	60
F	Alo	0	0	0	0
F	Alo	7	10	50	50
F	Alo	14	65	60	60
F	Alo	21	70	60	60
F	Alo	28*	70	40	40
F	Alo	35	75	60	40
F	Alo	42	65	70	20
F	Alo	49	80	70	20
F	Alo	56	65	70	20
G	Alo LPS	0	30	0	0
G	Alo LPS	7	70	60	50
G	Alo LPS	14	70	70	60
G	Alo LPS	21	80	70	70
G	Alo LPS	28*	80	70	60
G	Alo LPS	35	80	70	60
G	Alo LPS	42	70	70	60
G	Alo LPS	49	70	70	60
G	Alo LPS	56	70	60	60

Tabela 1 Resultados do ensaio de microcitotoxicidade (continuação)

H	Alo LPS	0	0	0	0
H	Alo LPS	7	40	40	40
H	Alo LPS	14	70	50	50
H	Alo LPS	21	80	70	60
H	Alo LPS	28*	70	60	60
H	Alo LPS	35	70	60	60
H	Alo LPS	42	70	60	60
H	Alo LPS	49	70	60	60
H	Alo LPS	56	70	60	50
I	Alo LPS	0	40	10	0
I	Alo LPS	7	80	70	70
I	Alo LPS	14	80	70	70
I	Alo LPS	21	80	60	70
I	Alo LPS	28*	80	60	60
I	Alo LPS	35	80	60	60
I	Alo LPS	42	80	70	60
I	Alo LPS	49	80	70	60
I	Alo LPS	56	80	60	50
J	Alo LPS	0	0	0	0
J	Alo LPS	7	0	0	0
J	Alo LPS	14	20	30	30
J	Alo LPS	21	70	60	50
J	Alo LPS	28*	40	50	50
J	Alo LPS	35	40	50	50
J	Alo LPS	42	20	50	50
J	Alo LPS	49	20	50	50
J	Alo LPS	56	10	40	40
K	Alo LPS	0	10	0	0
K	Alo LPS	7	30	10	10
K	Alo LPS	14	60	50	40
K	Alo LPS	21	70	70	50
K	Alo LPS	28*	70	70	50
K	Alo LPS	35	40	70	50
K	Alo LPS	42	30	70	50
K	Alo LPS	49	30	70	40
K	Alo LPS	56	20	70	40

Tabela 1 Resultados do ensaio de microcitotoxicidade (continuação)

L	Alo LPS	0	10	0	0
L	Alo LPS	7	50	30	30
L	Alo LPS	14	60	60	70
L	Alo LPS	21	70	70	70
L	Alo LPS	28*	70	50	60
L	Alo LPS	35	40	60	70
L	Alo LPS	42	30	60	40
L	Alo LPS	49	30	40	40
L	Alo LPS	56	20	40	40
M	Auto (Controle)	0	0	0	0
M	Auto (Controle)	7	0	0	0
M	Auto (Controle)	14	0	0	0
M	Auto (Controle)	21	0	0	0
M	Auto (Controle)	28*	0	0	0
M	Auto (Controle)	35	0	0	0
M	Auto (Controle)	42	0	0	0
M	Auto (Controle)	49	0	0	0
M	Auto (Controle)	56	0	0	0
N	Auto (Controle)	0	0	0	0
N	Auto (Controle)	7	0	0	0
N	Auto (Controle)	14	0	0	0
N	Auto (Controle)	21	0	0	0
N	Auto (Controle)	28*	0	0	0
N	Auto (Controle)	35	0	0	0
N	Auto (Controle)	42	0	0	0
N	Auto (Controle)	49	0	0	0
N	Auto (Controle)	56	0	0	0
O	Auto (Controle)	0	0	0	0
O	Auto (Controle)	7	0	0	0
O	Auto (Controle)	14	0	0	0
O	Auto (Controle)	21	0	0	0
O	Auto (Controle)	28*	0	0	0
O	Auto (Controle)	35	0	0	0
O	Auto (Controle)	42	0	0	0
O	Auto (Controle)	49	0	0	0
O	Auto (Controle)	56	0	0	0

Dados relatados como a porcentagem de morte das CTMs doadoras. (*) Momento da segunda aplicação.