

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/05/2021.

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<sup>a</sup> 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
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	8
<b>Introdução</b> .....	8
<b>Revisão de Literatura</b> .....	9
<b>Referências</b> .....	14
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	19
<b>Abstract</b> .....	20
<b>1. Introdução</b> .....	21
<b>2. Material e Métodos</b> .....	22
<b>2.1. Delineamento Experimental</b> .....	23
<b>2.2. Seleção dos Animal</b> .....	23
<b>2.3. Cultivo de Células Tronco Mesenquimais</b> .....	23
<b>2.4. Caracterização e Diferenciação das Células Tronco Mesenquimais</b> .....	24
<b>2.5. Indução Experimental da Sinovite</b> .....	25
<b>2.6. Aplicação Intra-articular</b> .....	25
<b>2.7. Coleta de Amostras do Sangue dos Receptores</b> .....	25
<b>2.8. Ensaio de Microcitotoxicidade</b> .....	26
<b>2.9. Análise do líquido sinovial</b> .....	26
<b>2.10. Avaliação Clínica</b> .....	26
<b>2.11. Análise Estatística</b> .....	27
<b>3. Resultados</b> .....	27
<b>3.1. Caracterização das Células Tronco Mesenquimais</b> .....	27
<b>3.2. Avaliação Clínica</b> .....	27
<b>3.3. Avaliação Ultrasonográfica</b> .....	28
<b>3.4. Ensaio de Microcitotoxicidade</b> .....	28
<b>3.5. Avaliação do líquido sinovial</b> .....	29
<b>3.5.1. Proteína Total</b> .....	29
<b>3.5.2. Contagem de Leucócitos</b> .....	29
<b>3.5.3. Contagem de Neutrófilos</b> .....	30
<b>4. Discussão</b> .....	30
<b>5. Conclusão</b> .....	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- $\beta$ 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- $\gamma$ ) (SCHNABEL et al., 2014).

A sinovite tem sido relacionada à ativação do sistema imune inato, causando liberação de citocinas como o IFN- $\gamma$  e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (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