

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/06/2021.

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

**SINOVITE EM EQUINOS: EFEITO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
SOBRE A INFLAMAÇÃO ARTICULAR**

GUSTAVO DOS SANTOS ROSA

Botucatu, São Paulo  
Junho de 2019.

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

**SINOVITE EM EQUINOS: EFEITO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
SOBRE A INFLAMAÇÃO ARTICULAR**

GUSTAVO DOS SANTOS ROSA

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Biotecnologia da Animal  
para obtenção do Título de Mestre.  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho” Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, São Paulo

Junho de 2019.

**Autor:** Gustavo dos Santos Rosa

**Data:** 25 de Junho 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

Rosa, Gustavo dos Santos.

Sinovite em equinos : efeito das células tronco mesenquimais sobre a inflamação articular / Gustavo dos Santos Rosa. - 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. Equino - Doenças. 2. Sinovite. 3. Membrana sinovial. 4. Proloterapia.

Palavras-chave: inflamação sinovial; membrana sinovial; terapia regenerativa.

## **Comissão Examinadora**

### **Profª Dra. Ana Liz Garcia Alves**

Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

### **Profª Dra. Elenice Deffune**

Membro

Hemocentro de Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu

FMB, UNESP, Botucatu

### **Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca-Alves**

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

## Agradecimentos

Agradeço à Profª Dra. Ana Liz Garcia Alves por me aceitar como orientado e por compartilhar seus conhecimentos, principalmente em terapias regenerativas e engenharia tecidual.

Aos demais professores e funcionários do Serviço de Cirurgia de Grandes Animais, por toda a ajuda.

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

À CAPES e à FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e FAPESP – processo número 2017/01369-9.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografia dos ensaios de diferenciação, em objetiva de 20x. Figuras A, C, E, G e I representam os grupos-controle. Figura B: grupo diferenciação adipogênica; Figuras D, F e H: diferenciação condrogênica corada em Azul de Toluidina, Hematoxilina/Eosina e Alcian Blue, respectivamente. As setas indicam as células diferenciadas. Figura J: grupo diferenciação osteogênica.....20
- Figura 2. Resultados da citometria de fluxo. Nota-se positividade para os marcadores CD90 e CD73, e negatividade para CD34, CD11b, CD45 e MHC classe II. ....21
- Figura 3. Análise da celularidade do líquido sinovial no momento inicial, 4, 8, 24, 72 horas e 7 dias após a indução da sinovite. Os tratamentos foram realizados após a coleta do momento 8h.....24
- Figura 4. Quantificação da concentração sinovial de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>. \* indica diferença estatística (P=0,0467). ....25

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
1. Introdução e Justificativa .....	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
Referências .....	8
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>13</b>
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
2.1 Delineamento Experimental.....	15
2.2 Otenção e Cultivo das CTMms .....	16
2.3 Indução experimental da sinovite e tratamento .....	17
2.4 Análises subsequentes e acompanhamento clínico .....	17
2.3 ELISA.....	18
2.6 Análise estatística .....	18
3. RESULTADOS .....	19
3.1 Caracterização celular.....	19
3.2 Exame físico e exame do sistema locomotor .....	22
3.3 Análise do líquido sinovial .....	22
3.4 Concentração sinovial de TGF $\beta$ e PGE $_2$ .....	23
4. DISCUSSÃO .....	26
4.1 Células nucleadas totais e neutrófilos.....	28
4.2 Linfócitos e Macrófagos .....	29
4.3 TGF $\beta$ e PGE $_2$ .....	31
5. CONCLUSÃO .....	34
Referências .....	35



ROSA, G.S. Sinovite em equinos: efeito das células tronco mesenquimais sobre a inflamação articular. Botucatu, 2019. Dissertação de Mestrado. 40 páginas. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, câmpus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

A alta exigência do sistema locomotor de equinos atletas resulta em pequenas lesões articulares que, cumulativamente, provocam inflamação sinovial e liberação de diversos mediadores inflamatórios no microambiente articular, resultando no desenvolvimento da osteoartrite (OA). A utilização de células tronco mesenquimais (CTMs) nestes casos visa modificar a progressão desta enfermidade. O objetivo do presente trabalho foi verificar o comportamento das CTMs alogênicas derivadas da membrana sinovial (CTMms) frente aos eventos inflamatórios em casos de sinovite aguda em equinos. A sinovite foi induzida utilizando 0,5ng de LPS via intra-articular (IA) e os animais foram tratados 8 horas após a indução. O grupo controle recebeu como tratamento 2 ml de PBS IA, enquanto o grupo tratado recebeu  $10^7$  CTMms IA. Foram realizados, de maneira seriada, exames físicos, exames do aparelho locomotor, análise citológica do líquido sinovial e a determinação da concentração sinovial de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>. Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à claudicação e parâmetros do exame físico. A análise citológica revelou diminuição significativa de linfócitos e macrófagos no grupo tratado (P= 0,0059 e P= 0,0003, respectivamente) que também apresentou menores níveis de TGF- $\beta$  (P= 0,0467) no momento 24h. Os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa em nenhum momento. Os dados avaliados sugerem que a inflamação aguda tenha inicialmente causado inibição da capacidade imunomoduladora das CTMs, que foi retomada após 24h, com o declínio da inflamação articular, e que a interação das CTMs com os mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial está diretamente relacionada à condição inflamatória articular no momento da aplicação. Para a otimização do potencial imunomodulador das CTMs, os autores sugerem a adoção de estratégias para o controle da inflamação local antes de sua administração.

**Palavras-chave:** terapia regenerativa; membrana sinovial; inflamação sinovial.

ROSA, G.S. Synovitis in horses: effect of mesenchymal stem cells on the articular inflammation. Botucatu, 2019. Master's Thesis. 40 pages. School of Veterinary Medicine and Animal Science, campus Botucatu, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho".

## **ABSTRACT**

The high requirement of the locomotor system of equine athletes often results in small joint injuries that can cause synovial inflammation and release of several inflammatory mediators in the articular microenvironment, leading to the development of osteoarthritis (OA). Mesenchymal stem cells (MSCs) are used in these cases to modify the progression of this disease. This study aimed to verify the behavior of allogeneic synovial membrane derived MSCs (MSCsm) against inflammatory events in acute equine synovitis. Synovitis was induced by the intra-articular (IA) administration of 0.5 ng of LPS and the subjects were treated 8 hours post-induction. The control group received 2 ml of PBS IA as treatment, while the treated group received  $10^7$  MSCsm IA. Physical exams, lameness evaluations, cytological analysis of synovial fluid and determination of synovial concentrations of TGF- $\beta$  and PGE<sub>2</sub> were performed. No differences were observed in lameness and physical exam parameters between the groups. Cytological analysis revealed a significant decrease in lymphocytes and macrophages in the treated group ( $P = 0.0059$  and  $P = 0.0003$ , respectively), which also had lower levels of TGF- $\beta$  ( $P = 0.0467$ ) at 24 h. The other parameters did not present significant difference at any time. Our data suggest that acute inflammation initially caused inhibition of the immunomodulatory capacity of MSCs, which was resumed after 24h with the decline of joint inflammation, and that the interaction of MSCs with the inflammatory mediators present in the synovial fluid is directly related to the condition inflammatory at the time of application. To optimize the immunomodulatory potential of MSCs, the authors suggest the adoption of strategies to control local inflammation prior to its administration.

**Keywords:** regenerative therapy; synovial membrane; synovial inflammation.

## **5. CONCLUSÃO**

A análise dos dados obtidos aponta uma interação entre o ambiente articular inflamado e as CTMs, causando diminuição de sua ação após sua administração intra-articular. Após a diminuição do pico inflamatório as CTMs apresentaram redução do número e regulação da atividade de linfócitos e macrófagos. Os resultados ainda indicam que a interação das CTMs com os mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial é diretamente relacionada à condição inflamatória articular no momento da aplicação. Por fim, a exploração de diferentes estratégias de controle da inflamação ou proteção das CTMs para que estas possam exercer plenamente seu efeito biológico é uma área potencial para estudos subsequentes que busquem explorar seu potencial imunomodulador sob diferentes condições.

## Referências

- AFRAZI, A. et al. Toll-like receptor 4-mediated endoplasmic reticulum stress in intestinal crypts induces necrotizing enterocolitis. **J Biol Chem.**, v.289, n.14, p.9584–9599, 2014. doi:10.1074/jbc.M113.526517
- ANDREASSEN, S.M et al. Changes in concentrations of haemostatic and inflammatory biomarkers in synovial fluid after intra-articular injection of lipopolysaccharide in horses. **BMC Veterinary Research**, v.13, p.182, 2017.
- ARDANAZ, N. et al. 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, 2016. doi:10.1186/s12917-016-0692-x
- BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.36, p. 568–84, 2004.
- BARTHOLOMEW, A. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, Volume 30, v.1, p.42-48, 2002.
- BROECKX, S.Y. et al. Evaluation of an osteochondral fragment–groove procedure for induction of metacarpophalangeal joint osteoarthritis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.80, n.3, p.246-258, 2019. <https://doi.org/10.2460/ajvr.80.3.246>
- BROSSI, P.M. et al. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. **BMC Vet Res.**, v.11, p.98, 2015. DOI 10.1186/s12917-015-0403-z.
- CAMPEBELL, R.C. et al. Effects of lidocaine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56 n.3, 2004.
- CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J Cell Physiol.**, v. 213, n. 2, p.341-7, 2007.
- CARVALHO, A.M. et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 65, n. 4, p. 939-945, 2013.

CASSANO, J.M. et al. Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. **Stem Cell Research & Therapy.**, v.9, p.82, 2018. DOI 10.1186/s13287-018-08402.

COKELAERE, S.M. et al. Sustained intra-articular release of celecoxib in an equine repeated LPS synovitis model. **Eur J Pharm Biopharm** , v.128, p.327-336, 2018. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.05.001.

COLBATH, A.C. et al. Equine models for the investigation of mesenchymal stem cell therapies in orthopaedic disease. **Oper Tech Sports Med**, v.25, p.41-49, 2018. DOI 10.1053/j.otsm.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.50, n.4, p. 434-447, Aug. 2010.

DAVIES, P. et al. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation, **Annu. Rev. Immunol.**, v.2, p.335 – 357, 1984.

De BARI, C. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum.**v.44, p.1928-42, 2001.

DHODAPKAR, K.M. et al. Natural immunity to pluripotency antigen OCT4 in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A** , v.107, p.8718–23, 2010.. doi:10.1073/pnas.0915086107

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p.315–317, 2006. doi: 10.1080/14653240600855905.

FINNISON, K.W. et al. TGF- $\beta$  signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. **Front Biosci (Schol Ed)**. v.4, p.251-68, 2012.

FRISBIE, D.D. et al. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis Cartilage**. v.16,n.10,p.1196-204, 2008 doi: 10.1016/j.joca.2008.03.008.

GAO, F. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death & Disease** v.7, p2062, 2016.

IYER S, ROJAS M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. **Expert Opin Biol Ther**; v. 8, p.569–582, 2008.

KAUNDAL U. et al. Immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells: a potential key to successful solid organ transplantation. **J Transl Med.**, v.16, n.1, p.31, 2018. Feb 15. doi:10.1186/s12967-018-1403-0

KAWCAK, C.E. Cap. 24 - Tarsus. In: McILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E.; VAN WEEREN, P.R. **Joint Disease In The Horse**, 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier: St. Louis, Missouri p. 340-353

KIM, Y. I. et al. Overexpression of TGF- $\beta$ 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.450, n4, p1593–1599, 2014.

KUMAR, V. et al. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 9<sup>th</sup> edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2015.

LU, Y. et al. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, Volume 42, n.2, p. 145-151, 2008. ISSN 1043-4666.

MARINO, J. et al. Allorecognition by T lymphocytes and allograft rejection. **Front Immunol**, v. 7, p. 582, 2016. doi:10.3389/fimmu.2016.00582

MCILWRAITH, C.W. et al. **Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse**. 4 ed. Mosby-Elsevier, 2015. 464p. ISBN: 978-0-7234-3693-5

MEULYZER M. et al. Joint inflammation increases glucosamine levels attained in synovial fluid following oral administration of glucosamine hydrochloride. **Osteoarthritis Cartilage**. v.17, n.2, p.228-34, 2009. doi: 10.1016/j.joca.2008.06.018.

MICHAEL, S. et al. Inflammation Shapes Stem Cells and Stemness during Infection and Beyond. **Front Cell Dev Biol**.v.4, p.118, 2016. doi:10.3389/fcell.2016.00118

MOLCANYI, M. et al. Trauma-Associated Inflammatory Response Impairs Embryonic Stem Cell Survival and Integration after Implantation into Injured Rat Brain. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 4, p. 625-637, 2007. doi:10.1089/neu.2006.0180

OLIVEIRA, P.G.G. et al . Avaliação da migração das células progenitoras após terapia da tendinite equina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 66, n. 4, p. 1033-1038, Aug. 2014 .

PALMER, J.L.; BERTONE, A.L. Experimentally-induced synovitis as a model for acute synovitis in the horse. **Equine vet. J.**, v.26, n. 6, p.492-495, 1994.

RIEKSTINA, U. et al. Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. **Stem Cell Rev and Rep**, v.5, p. 378, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9>

ROSS, T.N. et al. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthr. Cartil.**, v.20, p. 1583-90, 2012.

SAKAGUCHI, Y. et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. **Arthritis Rheum.** , v. 52, p. 2521-9, 2005.

SANTOS, V.H. et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. **BMC Vet Res.**, v. 14, p.114, 2018. DOI 10.1186/s12917-018-1425-0.

SCANZELLO, C.R.; GOLDRING, S.R. The Role of Synovitis in Osteoarthritis pathogenesis. **Bone.**, v. 51, n. 2, p. 249–57, 2012. DOI:10.1016/j.bone.2012.02.012.

SCHNABEL, L.V. et al. 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.**, v.5, n.1,p.13, 2014. <http://doi.org/10.1186/scrt402>

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 6, n.11, p. 625-35, 2010. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.159.

SELMANI, Z. et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. **Stem Cells**, v. 26, p.212–222, 2008.

SILVA- CARVALHO A.E. et al. Mesenchymal stem cells immunomodulation: The road to IFN- $\gamma$  licensing and the path ahead. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2019. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.05.006 ISSN 1359-6101.

SOUSA, E.B. et al. Osteoarthritic Synovial Fluid Modulates Cell Phenotype and Metabolic Behavior In Vitro. **Stem Cells International**, v.2019, Article ID 8169172, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/8169172>

SPAGGIARI, G.M. et al. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. **Blood**; v.113, p. 6576–6583, 2009.

STASHAK, T.D. **Adams and Stashak's lameness in horses**. 6<sup>th</sup> ed. Iowa, USA, Wiley-Blackwell publishing, 2011.

TAKAYAMA, K. et al. Prostaglandin E2 suppresses cytokine production in human macrophages through the EP4 receptor, **J. Biol. Chem.**, v.277, 2002.

TANG, H.C. et al. Differentiation Effects of Platelet-Rich Plasma Concentrations on Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells from Pigs Cultivated in Alginate Complex Hydrogel. **Int. J. Mol. Sci.**, v.16, p. 18507-21, 2015.

ULMER A.J. et al. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). **Toxicology**, v.152, p. 37–45, 2000.

Van der HARST, M. et al. Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. **J Rheumatol.**, v.33, n. 8, p. 1662-7, 2006.

VINATIER, C. et al. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. **Trends Biotechnol.** v. 27, n. 5, p. 307-14, 2009. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.02.005

WILLIAMS, L.B. et al. 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, 2016. ISSN 0425-1644. DOI: 10.1111/evj.12477

YAMADA, A.L.M. **Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e**



**células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em eqüinos.** 2011. 111p. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

YAN, H. et al. Priming of Toll-like receptor 4 pathway in mesenchymal stem cells increases expression of B cell activating factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 448, n.2, p.212-217, 2014. ISSN 0006-291X,