

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**POTENCIAL DO ÁCIDO HIALURÔNICO E
TRIANCINOLONA ACETONIDA, ISOLADOS E
COMBINADOS, NA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**

PABLO EDUARDO OCAMPO ORTIZ

Botucatu, SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**POTENCIAL DO ÁCIDO HIALURÔNICO E
TRIANCINOLONA ACETONIDA, ISOLADOS E
COMBINADOS, NA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**

PABLO EDUARDO OCAMPO ORTIZ

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção
do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Titular Sheila
Canevese Rahal

Botucatu, SP

2018

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

Ortiz, Pablo Eduardo Ocampo.

Potencial do ácido hialurônico e triancinolona
acetonida, isolados e combinados, na diferenciação
condrogênica de células tronco mesenquimais / Pablo
Eduardo Ocampo Ortiz. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Sheila Canavese Rahal

Capes: 50501003

1. Células-tronco. 2. Hormônios adrenocórticos. 3.
Viscossuplementação. 4. Osteoartrite. 5. Condrogênese.

Palavras-chave: Células-tronco; Corticoides;
Osteoartritis; Viscossuplementação; condrogenese.

Nome do autor: Pablo Eduardo Ocampo Ortiz

TÍTULO: POTENCIAL DO ÁCIDO HIALURÔNICO E TRIANCINOLONA ACETONIDA, ISOLADOS E COMBINADOS, NA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Sheila Canevese Rahal
Presidente e orientadora
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. DRARV
FMVZ – UNESP - BOTUCATU

Dra. Amanda Jeronimo Listoni
Membro
Farmacêutica Autônoma

AGRADECIMENTOS

Nesta etapa, total gratidão aos meus pais, duas pessoas que sem interesse nenhum, deram tudo deles, para que me tornasse uma pessoa de bem. Sem eles, nada disto teria acontecido. Os amo “cuchos”.

Com o mesmo agradecimento que o anterior, mas com um sentimento totalmente diferente, agradeço a oportunidade de me reencontrar com Viviana Vallejo e a tornar ela minha parceira. Com ela, este processo virou, além de uma etapa pessoal, o sucesso mais relevante na minha vida; por isso e pelo que vem, te amo.

À minha família, que sempre tiveram palavras de incentivo nos momentos críticos.

Ao “nano”, que chegou para me treinar como pai, ocupação que estou curtindo bastante.

Aos meus amigos, Carol, Marcos, Kelry, Fernando por sempre estar aí dando a mão.

À minha orientadora Sheila Canevese Rahal, por ter me brindado a oportunidade de orientar-me sem nem sequer me conhecer.

À professora Fernanda da Cruz Landim e a equipe de trabalho do laboratório LANÇA, que me permitiram desenvolver o experimento.

Ao Mauricio Montoya Florez e à Professora Noeme Sousa Rocha, que fizeram do meu trabalho um fato.

Ao professor Sérgio Luís Felisbino, que me permitiu fazer as análises em seu laboratório.

Ao Jones Fabiano Pinto, pelo fornecimento dos fármacos utilizados.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Generalidades sobre a cartilagem articular.....	4
2.2 Histogênese da cartilagem.....	5
2.3 Patogênese da osteoartrite.....	5
2.4 Tratamento.....	8
2.4.1 Ácido hialurônico.....	8
2.4.2 Corticosteroides.....	10
2.4.3 Ácido hialurônico e corticosteroides.....	12
2.5 Células tronco.....	12
2.5.1 Células tronco mesenquimais.....	13
2.5.2 Obtenção e caracterização.....	14
2.5.3 Diferenciação condrogênica.....	15
OBJETIVO GERAL.....	16
Objetivos específicos.....	16
HIPOTESE.....	16
3 REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2.....	25
TRABALHO CIENTÍFICO 1: Cartilagem articular, patogênese e tratamento da osteoartrite.....	26
CAPÍTULO 3.....	37
TRABALHO CIENTÍFICO 2: Potencial do ácido hialurônico e triancinolona acetonida, isolados e combinados, na diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de tratamentos em culturas de células-tronco mesenquimais equinas, conforme o período de avaliação.....	43
Tabela 2. Avaliações imunohistoquímicas no 14º dia (celularidade, marcação e intensidade), conforme grupos de tratamento.....	51
Tabela 3. Método semiquantitativo para a obtenção da marcação imunohistoquímica de cada grupo experimental, aos 14 dias de tratamento.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Curva de crescimento celular com células-tronco mesenquimais equinas em duas concentrações; 2.000 células/poço e 10.000 células/poço, por um tempo de incubação de 12 dias. A concentração celular foi determinada a cada 48 horas.....	46
Figura 2 Vista macroscópica e microscópica (10X) do pellet obtido a partir da concentração de 5×10^5 células após 2 dias de cultivo com meio de manutenção.....	47
Figura 3 Células aos 14 dias de tratamento: (A) Grupo controle, mostrando a presença de matriz extracelular (MEC) entre células de aspecto fibroblastóide e poucas com forma arredondada; (B) Grupo triancinolona, com aumento da celularidade e presença de algumas células arredondadas com citoplasma eosinofílico e abundante MEC; (C) Grupo ácido hialurônico, com discreta quantidade celular e MEC. As células apresentam estrutura arredondadas dentro de lacunas; (D) Grupo ácido hialurônico-triancinolona com pouca MEC e células redondas dentro de algumas lacunas. H&E.....	48
Figura 4 Células aos 14 dias de tratamento: (A) Grupo controle com produção de glicosaminoglicanos na matriz extracelular; (B) Grupo triancinolona com produção moderada de glicosaminoglicanos na matriz extracelular; (C) Grupo ácido hialurônico negativo para glicosaminoglicanos; (D) Grupo ácido hialurônico-triancinolona com produção leve de glicosaminoglicanos na matriz extracelular. Alcian Blue.	49
Figura 5 Células aos 14 dias de tratamento: (A) Grupo controle com produção de glicosaminoglicanos na matriz extracelular; (B) Grupo triancinolona com produção moderada de glicosaminoglicanos na matriz extracelular; (C) Grupo ácido hialurônico negativo para glicosaminoglicanos; (D) Grupo ácido hialurônico-triancinolona com produção leve de glicosaminoglicanos na matriz extracelular. Azul de Toluidina.....	50

Figura 6 imunohistoquímica dos grupos para colágeno tipo II na marcação citoplasmática. (A) Grupo controle com moderada porcentagem de marcação (B) Grupo triancinolona com algumas células intensamente marcadas, (C) Grupo ácido hialurônico com leve porcentagem de células de marcadas (D) e, Grupo ácido hialurônico-triancinolona considerado como não marcado..... 52

Figura 7 Imunohistoquímica para os grupos em maior aumento para colágeno tipo II na marcação citoplasmática. (A) Grupo controle com moderada porcentagem de marcação (B) Grupo triancinolona com células intensamente marcadas, (C) Grupo ácido hialurônico com leve porcentagem de células de marcadas, e (D) Grupo ácido hialurônico-triancinolona considerado como não marcado..... 53

Figura 8 Imunohistoquímica dos grupos comparando a intensidade da marcação na matriz extracelular (MEC) para colágeno tipo II. (A) Grupo controle com marcação leve na MEC, (B) Grupo triancinolona com marcação leve na MEC, (C) Grupo ácido hialurônico com marcação moderada na MEC, (D) Grupo triancinolona-ácido hialurônico com marcação intensa na MEC..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Ácido Hialurônico
AH/TA	Ácido Hialurônico/Triancinolona Acetonida
CT	Célula-Tronco
CTMs	Célula-Tronco Mesenquimal
GAGs	Glicosaminoglicanos
FDA	Food and Drugs Administration
FNT- α	Fator de necrose tumoral
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzível
iPs	Células pluripotentes induzidas
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LIF	Fator inibidor de leucemia
MEC	Matriz Extracelular
MO	Medula Óssea
OA	Osteoartrite
OARSI	Osteoartrite Research Society International
TA	Triancinolona Acetonida
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α

OCAMPO, P.E. Potencial do ácido hialurônico e triancinolona acetona, isolados e combinados, na diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais. Botucatu, 2018. 60p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O estudo foi dividido em duas abordagens. Na primeira efetuou-se uma revisão sobre alguns aspectos da cartilagem articular (generalidades e histogênese), patogênese da osteoartrite, bem como algumas possibilidades de tratamentos intra-articulares. Na segunda foi desenvolvido estudo experimental que teve por objetivos avaliar o comportamento do ácido hialurônico (AH) e da triancinolona acetona (TA), utilizados de forma isolada ou combinada, no processo de diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais (CTMs) *in vitro*. Foram utilizadas CTMs equinas pertencentes a um banco celular em terceira passagem. Os pellets de CTMs foram divididos equitativamente, sendo estabelecidos quatro grupos, cada um com três amostras: Controle, AH, TA e AH/TA. O cultivo foi mantido por 14 dias. O potencial de diferenciação condrogênica foi analisado mediante avaliação histomorfologica, produção de GAG e imunohistoquímica. Histomorfologicamente o grupo AH/TA e, mais especificamente no AH, as células apresentaram características semelhantes ao tecido articular. A produção de GAG foi intensa para o Grupo Controle, moderada para o AH/TA, e mínima para os grupos TA e AH. Nos grupos controle e TA as células não apresentaram morfologia similar a condrocito. No dia 14, nenhum grupo teve marcação superior para colágeno tipo II quando comparada com o controle. A matriz extracelular dos grupos AH e AH/TA teve marcação mais intensa para colágeno tipo II do que os grupos TA e controle. De uma forma geral, foi possível concluir pela análise histologica que o AH estimulou morfologia similar a condrocito nos diferentes grupos, porém com baixa expressão de moléculas específicas de cartilagem; a TA potencializou a formação de uma matriz extracelular mais compacta e organizada com maior porcentagem de células marcadas para colágeno tipo II.

Palavras-chave: Condrócitos, corticosteroides, viscosuplementação, Osteoartrite

OCAMPO, P.E. Potential of hyaluronic acid and triamcinolone acetate isolated or combined in chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Botucatu, 2018. 60p. [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista]

SUMMARY

The study was divided into two approaches. In the first approach, a review about some aspects of articular cartilage (generalities and histogenesis), pathogenesis of osteoarthritis was done, as well as some possibilities of intra-articular treatments. In the second approach, an experimental study was carried out to evaluate the behavior of hyaluronic acid (HA) and triamcinolone acetate (TA), isolated or combined, during in vitro process for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). Equine MSCs from a cell banking were used at third passage. The CTM pellets were divided equally and four groups were established, each with three samples: Control, HA, TA and HA/TA. The total time of culture was 14 days. The culture was maintained for 14 days. The potential for chondrogenic differentiation was investigated through histological and immunohistochemical evaluations. Histomorphologically the HA/TA group and, more specifically in HA, the cells presented similar characteristics to the joint tissue; In the control and TA groups the cells had no chondrocyte-like morphology. The GAG production was intense for the Control Group, moderate for the HA / TA, and minimal for the TA and HA groups. On day 14, no group showed an intense staining for type II collagen when compared to the control. The extracellular matrix of the HA and HA/TA groups showed more intense staining than TA and control groups. In general, it was possible to conclude from histological analysis that HA stimulated chondrocyte-like morphology in the different groups, but with low expression of cartilage-specific molecules; TA increased the formation of a more compact and organized extracellular matrix with a higher percentage of cells marked for type II collagen.

Key words: Chondrocytes, corticosteroids, viscosupplementation, osteoarthritis

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Osteoartrite (OA), também denominada doença articular degenerativa (DJD, da sigla em inglês), é um processo caracterizado por dor e claudicação, associado às alterações dos tecidos das articulações sinoviais, incluindo a perda de cartilagem articular (SANDERSON et al., 2009). Esta doença não é entidade específica, mais sim uma sequela comum a várias formas de lesão articular e envolve interação entre fatores biológicos e mecânicos sobre a cartilagem articular, osso subcondral e líquido sinovial (MAXIE, 2015).

A OA tem impacto mundial, com significativa perda econômica tanto sobre a população animal, em especial nos equinos e cães, como também humana (FOX, 2009; MCILWRAITH et al., 2012). Aproximadamente 20% de cães com mais de um ano de idade serão afetados pela afecção (SANDERSON et al., 2009).

Em humanos, a doença é considerada multifatorial, com risco para a susceptibilidade no nível individual (idade, sexo, obesidade, genética, raça, dieta, metabolismo ósseo) e articular (injúria, atividade, ocupação, articulação/osso, força, alinhamento) (NEOGI e ZHANG, 2013). Por exemplo, a obesidade é considerada um dos principais fatores de risco, em especial na OA do joelho (COOPER et al., 2013; NEOGI e ZHANG, 2013). Por sua vez, em cães há maior incidência nos mais idosos, em especial naqueles com sobrepeso ou obesos (FOX, 2009; MAXIE, 2015). Até o momento não há cura, por isso os tratamentos visam reduzir o desconforto e a melhora da mobilidade articular (SOUZA, 2016).

Com objetivo de obter resultados mais efetivos e rápidos, muitas vezes são empregadas combinações de terapias, tais como anti-inflamatórios, analgésicos, nutracêuticos (administradas de forma oral, parenteral ou intra-articular), dietas funcionais, terapias físicas e alternativas; ou mesmo o tratamento cirúrgico com o intuito de diminuir a progressão da doença, ou para substituir a articulação (SANDERSON, 2009). Uma outra modalidade terapêutica é a viscosuplementação, com o uso intra-articular de ácido hialurônico (AH), com ou sem corticosteroides (REZENDE e CAMPOS, 2012).

O AH tem sido avaliado em análises *in vivo* ou *in vitro*, as quais demonstraram o potencial benéfico da medicação (SUCCAR et al., 2016;

OSTALOWSKA et al., 2017). No entanto, um estudo de meta-análise em pacientes humanos com OA, concluiu que o AH intra-articular está associado a benefício clínico irrelevante, com risco de eventos adversos (RUTJES et al., 2012). Por sua vez, há também pesquisas sobre as sequelas após a aplicação intra-articular dos corticosteróides e outros destacando os efeitos benéficos, porém com ação temporária de 1 a 4 semanas (TEHRANZADEH et al., 2005). Em estudo *in vitro* com células mesenquimais equinas foi observado, que a triancinolona acetonida (TA) reduziu a viabilidade celular (EDMONDS et al., 2016).

Embora inúmeras pesquisas sobre OA tenham propiciado melhor compreensão com relação à estrutura, processos bioquímicos e metabolismo da cartilagem, ainda são necessários estudos com base nas opções de tratamento existentes e suas combinações (GOODRICH e NIXON, 2006).

O cultivo celular é um dos métodos de escolha para avaliar diferentes tratamentos, pelas suas vantagens no controle do microambiente, a possibilidade de caracterização e a homogeneidade das amostras, o baixo custo, escala e mecanização e o modelamento *in vitro* de condições *in vivo* (FRESHNEY, 2010). Um dos métodos para avaliação de condrogênese é mediante o cultivo de células mesenquimais de medula óssea, que tem características importantes, tais como a capacidade de aderência ao plástico, o perfil imunofenotípico definido e o mais importante, a habilidade para se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos (CIUFFREDA et al., 2016).

Considerando a importância em aprofundar a compreensão da evolução do tratamento da OA, o presente estudo se justificou visto ter avaliado o comportamento do AH e da TA no processo de diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs) equinas *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Generalidades sobre a cartilagem articular

A cartilagem é um tecido conjuntivo avascular, com células dispersas, cujas características bioquímicas refletem principalmente a composição da matriz extracelular (MEC) (LANZER e KOMENDA, 1990). Dependendo da localização no corpo e composição da MEC, a cartilagem é classificada em hialina, elástica e fibrocartilaginosa (FOX, 2009). No entanto, há predomínio da forma hialina (UMLAUF et al., 2010), da qual a articulação é formada (FOX et al., 2009).

A cartilagem articular e o líquido sinovial têm papel mecânico importante nas articulações diartrodiais e, conseqüentemente, no funcionamento do corpo, cumprindo funções importantes, tais como: 1) prover superfície lisa e lubrificada entre os ossos adjacentes, minimizando o desgaste; 2) amortecer e distribuir as forças aplicadas nas extremidades durante as atividades do indivíduo (SANCHEZ-ADAMS et al., 2014).

Entre os principais componentes da cartilagem articular, 1% do volume total do tecido é formado pelos condrócitos, o único tipo celular presente (KISIDAY et al., 2004). Os condrócitos são células altamente diferenciadas com capacidade limitada de proliferação e migração (CARRANZA et al., 2000), que se localizam em lacunas no interior da cartilagem e sintetizam os compostos necessários para a manutenção da MEC, além de a estabilizarem (SILVA et al., 2015). A nutrição do condrócito ocorre em condições de anaerobiose (HAUSELMANN et al., 1994) por meio de uma barreira de difusão, levando substâncias oriundas dos capilares do tecido conjuntivo fibroso, localizado no pericôndrio. Estas características fazem do condrócito uma célula com baixo potencial de reparação (BORRELLI e RICCI, 2004; SILVA et al., 2015).

Os 99% restante da cartilagem articular é constituído pela MEC, altamente especializada e composta por: colágeno tipo II, proteoglicanos, proteínas não colagenosas, glicoproteínas, água e eletrólitos dissolvidos (KISIDAY et al., 2004; McGEADY et al., 2017). O colágeno tipo II é o composto mais abundante e o principal na MEC (80-90%), proporcionando resistência à tração (EYRE e WU, 1995), ao passo que os proteoglicanos proporcionam resistência à compressão (HAUSELMANN et al., 1994). Além disso, existem

também subunidades de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs) (AN e MARTIN, 2003).

Segundo Rezende et al. (2000), para manter estável a cartilagem articular é necessária a regulação do ambiente interno; esta regulação mantém o balanço, de forma a não ocorrer ganho ou perda do tecido. Dois são os fatores de crescimento que ajudam neste processo, o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Ambos estimulam a síntese de agreganos e de colágeno, além das citocinas como, interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), que estimulam a degradação da matriz.

2.2. Histogênese da cartilagem

Para conhecer as características da cartilagem é essencial ter claro o processo histogênico deste órgão. A formação da cartilagem ocorre principalmente no processo de embriogênese, tendo alguns processos de reparação em adultos (PITSILLIDES e BEIER, 2011). Na gestação, células mesenquimais provenientes do mesoderma (SEKIYA et al. 2002; KOZHEMYAKINA et al., 2015) são condensadas nas regiões onde irá se formar a futura articulação, denominada de interzona (DECKER et al., 2014; LONGOBARDI et al., 2015; McGEADY et al., 2017). Nesta região, as células mesenquimais irão se diferenciar em condroblastos e posteriormente em tecido cartilaginoso ou ósseo, dependendo do caso (SEKIYA et al., 2002; PACIFICI et al., 2005; KOZHEMYAKINA et al., 2015; McGEADY et al., 2017). Todos estes mecanismos são controlados por moléculas de sinalização, fatores de crescimento, fatores de transcrição e outras moléculas regulatórias expressadas pela cartilagem (KOZHEMYAKINA et al., 2015; McGEADY et al., 2017).

2.3. Patogênese da osteoartrite

A OA é a causa mais comum de incapacidade motora e afeta até 15% da população humana com mais de 60 anos. Segundo as Nações Unidas (2004), para o ano 2050 essa cifra aumentara a 20%, ou seja, 130 milhões de pessoas irão sofrer OA (WHO, 2013). Em cães, aproximadamente 20% daqueles com mais de 12 meses de idade são diagnosticados com OA

(SANDERSON et al., 2009). A afecção é classificada como doença articular não inflamatória, porém com presença de componente inflamatório, reconhecido por meio de sintomas como dor, edema e rigidez articular (GOLDRING e OTERO, 2011; GOLDRING, 2012).

A doença tem múltiplas interações bioquímicas e biomecânicas, podendo ser classificada como primária ou secundária (FOX, 2009). A primária ocorre predominantemente em animais idosos, devido ao desgaste natural pela idade (DeCAMP et al., 2016). Os condrócitos na cartilagem idosa possuem atividade enfraquecida, com evidente fenótipo secretório de senescência e aumento de produtos finais da glicação, que se encontram associados as vias de sinalização desreguladas, atividade sintética alterada e aumento da síntese de citocinas e quimiocinas, as quais desencadeiam a expressão de metaloproteinases e outros mediadores inflamatórios (GOLDRING e OTERO, 2011). Para neutralizar esse efeito os condrócitos têm mecanismo de proteção denominado autofagia; no entanto, o mecanismo encontra-se ausente em células que completaram o ciclo, razão pela qual, a idade está relacionada com a morte celular e o desenvolvimento da OA (FOX, 2009; GOLDRING e OTERO, 2011).

A OA desenvolve-se secundariamente a doenças conhecidas que afetam a articulação e as estruturas de suporte, sendo esta o tipo de OA mais observada em pequenos animais (DeCAMP et al., 2016). É consequência de forças anormais em articulações normais (trauma, instabilidade), ou forças normais em articulações anormais (displasias, alterações no desenvolvimento), resultando ambas em forças biomecânicas anormais e mau alinhamento (FOX, 2009; GOLDRING, 2012). A obesidade é outro fator de risco importante para o desenvolvimento e progressão desta doença (FOX, 2009; GOLDRING e OTERO, 2011). O tecido adiposo sistêmico e o infrapatelar secretam substâncias ativas denominadas adipocinas, as quais contribuem para o estado inflamatório de baixo grau do paciente obeso, podendo afetar diretamente a homeostase da cartilagem (GOLDRING e OTERO, 2011).

A OA afeta toda a articulação (cartilagem, membrana sinovial, meniscos, tendões, ligamentos e ossos), porém a cartilagem é considerada o tecido alvo e sua quebra é a maior característica da doença (KAPOOR et al., 2011). A degradação do colágeno tipo II é o evento inicial que determina a progressão

irreversível da doença (GOLDRING e OTERO, 2011). Uma vez que o colapso da cartilagem ocorre, os condrócitos responsáveis por manter os componentes da matriz em equilíbrio não conseguem manter os agreganos e, por conseguinte a água, proporcionando ambiente mecanicamente instável (MALDONADO e NAM, 2013). Com a degeneração da cartilagem articular há fibrilação da matriz, presença de fissura, ulceração macroscópica e perda da espessura total da superfície articular (REZENDE et al., 2000; MARTEL-PELLETIER, 2004). Além disso, se pode observar degradação da cartilagem articular, espessamento do osso subcondral, formação de osteócitos, grau variável de inflamação do líquido sinovial, degeneração de ligamentos e meniscos, e hipertrofia da cápsula articular (LOESER et al., 2012).

A progressão da doença é dividida em três etapas: estágio 1 – quebra proteolítica da matriz cartilaginosa, estágio 2 – fibrilação e erosão da superfície cartilaginosa com liberação de produtos no fluído sinovial, estágio 3 – inflamação sinovial com produção de proteases e citocinas pró-inflamatórias (MARTEL-PELLETIER, 2004). Contudo, a sequência exata dos eventos não está clara, ou seja, a relação temporal entre dano do osso subcondral, inflamação crônica do tecido sinovial e erosão da cartilagem são ainda desconhecidos (KAPOOR et al., 2011).

Segundo Martel-Pelletier (2004), estudos citam as metaloproteases como as responsáveis pela digestão da matriz. Dentro desta família, a collagenase é responsável pela degradação do colágeno, a estromelisina pela degradação do proteoglicano, e a agreganase pela fragmentação do proteoglicano. Além disso, o balanço anabólico e catabólico das citocinas determina a integridade do tecido articular, sendo a interleucina 1 β (IL-1 β) e o TNF- α responsáveis pelo processo catabólico (REZENDE et al., 2000; MARTEL-PELLETIER, 2004; KAPOOR et al., 2011). Contudo, outras citocinas pró-inflamatórias podem também estar envolvidas, incluindo a IL-6, fator inibidor de leucemia (LIF), IL-17, IL-8 e IL-18 (MARTEL-PELLETIER, 2004).

A IL-1 β e o TNF- α induzem, de acordo com Kapoor et al. (2011), a produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente óxido nítrico e ânion superóxido, que contribuem para a degradação da cartilagem. Isso se torna um processo com ciclo vicioso, já que o aumento de óxido nítrico ativa a produção

de metaloproteases, as quais inibem a síntese de proteoglicano e colágeno, gerando apoptose e degradação da cartilagem.

2.4 Tratamentos

As medicações que atuam no processo de OA teoricamente deveriam ter a capacidade de modificar a doença, seja na prevenção, retardo, reversão ou estabilização (REZENDE e GOBBI, 2009).

LOHMANDER, e TUGWELL (2008), citaram que, segundo a OARSI (Sociedade internacional de investigação para a OA), de 51 modalidades de tratamento descritas para o tratamento da OA do joelho e quadril em pacientes humanos, 21 foram recomendadas. Dessas, 12 foram não farmacológicas, oito farmacológicas e cinco eram modalidades cirúrgicas. Das modalidades farmacológicas foram citados o acetaminofeno, os anti-inflamatórios não esteroidais seletivo e não seletivo da ciclooxigenase-2, os anti-inflamatórios não esteroidais tópicos e capsaicina, injeções intra-articulares de corticosteróides e hialuronatos, glucosamina e/ou sulfato de condroitina para alívio de sintomas; sulfato de glucosamina, sulfato de condroitina e diacereína para possíveis efeitos modificadores da estrutura e o uso de analgésicos opióides para o tratamento de dor refratária.

2.4.1 Ácido hialurônico

O AH possui várias funções, como viscoelasticidade para o fluido articular e lubrificação dos tecidos moles intra-articulares, além de ser um importante componente da matriz cartilaginosa articular e sintetizado localmente pelos condrócitos (GOODRICH e NIXON, 2006).

O líquido sinovial na OA apresenta redução na sua viscoelasticidade, possivelmente devido à alteração estrutural oxidativa do AH presente na matriz extracelular (BASTOW et al., 2008). Desta forma, segundo Rezende e Gobbi (2009), a diminuição da mobilidade articular e dor podem estar associadas a diminuição do efeito protetor do meio viscoelástico nos receptores dolorosos do tecido sinovial. Por isso, a alta viscoelasticidade é essencial para que ocorra lubrificação e proteção das células e tecidos articulares.

O exato mecanismo do AH em nível celular permanece desconhecido, com sugestões de ação anti-inflamatória (GOODRICH e NIXON, 2006). Wang

et al. (2006) avaliaram o efeito do AH na expressão gênica de 16 citocinas e enzimas associadas a OA, por meio de estudo com sinoviócitos como fibroblastos obtidos de joelhos de 15 pacientes humanos no estágio inicial da afecção. Segundo os autores, o AH tem efeito modificador da estrutura pela regulação da agrecanase-2 e também efeito anti-inflamatório pela regulação da TNF- α , IL-8 e óxido nítrico sintetase (iNOS), os quais podem ser mediados pela interação do AH com o CD44.

Há também citações que o AH reduz a dor por meio de seus efeitos nos receptores da dor periférica tão bem quanto no impacto do tecido sinovial, além do papel em aumentar as propriedades viscoelásticas do fluido sinovial (GOLDBERG e GOLDBERG, 2010).

Do ponto de vista econômico, é cada vez maior o número de trabalhos demonstrando que, se incorporada ao tratamento da OA em pacientes humanos, a viscosuplementação pode apresentar boa relação custo-efetividade, sendo inclusive capaz de retardar a realização de uma prótese total da articulação (TORRANCE et al., 2002). Um estudo em 250 pacientes humanos com OA do joelho, mostrou que a adição de 1 ml de hexacetonida de triancinolona à viscosuplementação (Hylan GF-20) melhorou os sintomas e o escore funcional só na primeira semana, e, aparentemente, não aumentou a probabilidade de efeitos adversos nos 24 meses de observação (DE CAMPOS et al., 2013).

Há no comércio vários tipos de preparados de AH, com diferentes pesos moleculares como, por exemplo, o Hylan G-F 20 (6×10^6 k daltons) considerado de alto peso molecular e o hialuronato de sódio classificado como de baixo peso molecular (500-730k daltons) (REZENDE e GOBB, 2009). Entre as preparações injetáveis do AH aprovadas pela FDA (do inglês Food and Drugs Administration) para tratamento da OA do joelho em pacientes humanos estão: Synvisc, Hyalgan, Supartz, Orthovisc e Euflexxa (GOLDBERG e GOLDBERG, 2010).

Conforme Goodrich e Nixon (2006), existem controvérsias sobre a efetividade de acordo como o peso molecular, com hipóteses que os de maior peso molecular seriam mais efetivos. Contudo, outros pesquisadores rebatem essas premissas, afirmando que a atividade é mediada farmacologicamente mais do que fisicamente.

O AH entre 0,5 e 1×10^6 Da é considerado de baixo peso molecular (Exemplos: Suplasyn, Polireumin, Fermathron e Suprahyal), entre 1 e $1,8 \times 10^6$ Da é de peso molecular intermediário (Exemplos: Osteonil, Orthovisc e Viscoseal) e 6×10^6 Da de alto peso molecular (Exemplo: Synvisc) (REZENDE e CAMPOS, 2012).

2.4.2 Corticosteroides

Os corticosteroides, também denominados glicocorticoides, possuem ação anti-inflamatória e imunossupressora, com mecanismo complexo (PEKAREK et al., 2011). O uso intra-articular oferece alta concentração do medicamento no sítio da lesão, interferindo com diversas funções imunológicas locais (ZULIAN et al., 2003). Entre os efeitos benéficos dos corticosteroides na cartilagem articular, têm sido citados: a inibição da degradação das metaloproteinases, o aumento do conteúdo total de glicosaminoglicanos, a diminuição dos níveis da ciclo-oxigenase 2 e a supressão de mediadores inflamatórios (SOUZA, 2016).

Cinco corticosteroides injetáveis têm aprovação pela FDA, para o uso intrarticular em pacientes humanos: acetato de metilprednisolona, triancinolona acetona (TA), acetato de betametasona e fosfato sódico de betametasona, hexacetona de triancinolona e dexametasona (PEKAREK et al., 2011). Em equinos, os mais usados são a TA, o acetato de metilprednisolona e mais raramente o acetato de betametasona (SOUZA, 2016).

O uso de corticosteroides é controverso, com vários relatos mostrando seus efeitos deletérios na cartilagem, incluindo diminuição do tamanho dos condrócitos, necrose de condrócitos, hipocelularidade, perda e diminuição da síntese de glicosaminoglicanos, inibição da síntese de proteoglicanos, entre outros (GOODRICH e NIXON, 2006). Deve-se ainda considerar que a qualidade inadequada dos ensaios e a heterogeneidade dos resultados dificultam a análise clara dos benefícios clínicos dos corticosteroides (NÜESCH et al., 2010). Tem sido sugerido que doses altas enfraquecem a bioquímica cartilaginosa e contribuem para a quebra da cartilagem, porém doses modestas a protegem, visto diminuírem a inflamação que é prejudicial a cartilagem (PEKAREK et al., 2011).

Segundo McIlwraith (2010), diferentes produtos podem variar com relação aos efeitos benéficos e deletérios. Por exemplo, em equinos aparentemente os ésteres de betametasona não apresentam efeitos deletérios, a TA é considerada condroprotetora e pode favorecer a recuperação da cartilagem, ao passo que, o acetato de metilprednisolona tem mostrado consistentemente efeitos deletérios. Desta forma, é inadequado a generalização dos efeitos nocivos, precisando ser melhor definidos. Por outro lado, há os que não recomendam o uso rotineiro até que os benefícios sejam melhor esclarecidos (JÜNI et al., 2015).

Zulian et al. (2003) compararam tanto a eficácia como a segurança, por um período de até 24 meses, da hexacetonida de triancinolona e TA, aplicadas de forma intra-articular em uma população homogênea de crianças com artrite idiopática juvenil oligoarticular. Segundo os autores, a hexacetonida de triancinolona foi mais efetiva tanto na avaliação mais precoce como na tardia, independentemente do tempo da afecção ou grau de inflamação local ou sistêmica, isso devido à liberação lenta da hexacetonida de triancinolona que aumenta o tempo de permanência na articulação.

Por meio de estudo de metanálise, Bellamy et al. (2006), avaliaram a eficácia, a efetividade e a segurança do uso de corticosteroides intrarticulares, no tratamento da OA do joelho em pacientes humanos. Os autores concluíram que os corticosteroides foram superiores ao placebo, sendo a resposta rápida, porém sem sustentação a longo prazo. A hexacetonida de triancinolona foi superior a betametasona na redução da dor até quatro semanas após a injeção. Por sua vez, os produtos com AH, enquanto mais vagarosos no início da ação, aparentemente propiciaram benefício mais sustentado. Sendo assim, os autores recomendaram que se há sinais de inflamação, uma preparação com corticosteroides oferece o alívio da inflamação e dor, ao passo que em outros casos os produtos com AH (Hylan G-F 20, Hyalgan, Orthovisc) podem oferecer resposta mais durável com melhora da dor e função do que a propiciada pelo corticosteroide.

Para avaliar a toxicidade da bupivacaína e TA, Syed et al. (2011) realizaram cultura de condrócitos multicamadas, a partir de cartilagem obtida de três pacientes humanos que foram submetidos à artroplastia. A TA induziu condrotoxicidade no “plug” articular e na cultura de monocamada, ao passo que

a bupivacaína induziu condrotoxicidade apenas na cultura de monocamada. Por sua vez, a combinação bupivacaína e TA não propiciou a morte adicional de condrócitos.

2.4.3 Ácido hialurônico e corticosteroides

Em equinos com artrite traumática e OA tem sido frequentemente utilizado o AH e a TA por aplicação intra-articular, com o objetivo de proporcionar efeito anti-inflamatório potente imediato pelo corticosteroide aliado ao efeito benéfico do AH como fármaco osteoatrítico modificador de doença (McILWRAITH et al., 2012).

Zhang et al. (2016), compararam os efeitos do tratamento do hidrogel de AH pré-combinado, com ou sem dexametasona, em modelo de OA induzida por ruptura do ligamento cruzado cranial em ratos, por meio de avaliações radiográficas, coloração da superfície articular com tinta da índia, coloração de Safranina-O e Fast Green, imunohistoquímica, H-E da membrana sinovial, PCRq-reversa para detectar mudanças na expressão gênica. Os autores concluíram que a combinação hidrogel de AH com dexametasona apresentou os melhores efeitos, tanto condroprotetor como anti-inflamatório.

Euppaya et al. (2016), examinaram os efeitos da degradação da cartilagem pela TA em condrócitos caninos normais e de cães com OA, bem como os efeitos da degradação da cartilagem pela TA em combinação com AH de baixo peso molecular. A TA reduziu a viabilidade dos condrócitos, normais e osteoatríticos, de maneira concentração-dependente. Em explantes de cartilagem a TA aumentou a severidade do dano estrutural da cartilagem, com perda de condrócitos e de proteoglicano na cartilagem osteoartrítica. O acréscimo de AH diminuiu a condrotoxicidade da TA apenas nos condrócitos normais, verificada pela viabilidade dos condrócitos. Segundo os autores, o uso de TA sozinha ou em combinação com AH em condições de OA é preocupante, uma vez que pode levar à destruição da cartilagem.

2.5 Células-tronco

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas, não especializadas, com capacidade de auto-replicação e auto-renovação, ou seja, podem ser mantidas em culturas em estado indiferenciado por longos períodos de tempo

(DAVILA et.al., 2004; LI e XIE, 2005). Essas células dão origem a uma grande população semelhantes e podem se diferenciar em células especializadas de múltiplas linhagens (BYDLOWSKI et al., 2009; DAHLGREN, 2009; GATTEGNO-HO et al., 2012). A capacidade de auto-replicação ocorre por dois tipos de divisão celular: divisão simétrica (cada CT origina duas células-filhas idênticas) e assimétrica (cada CT origina uma célula filha idêntica, e uma célula progenitora) (TAYLOR et al., 2007; KOCH et al., 2008; GATTEGNO-HO et al., 2012).

Segundo Mingroni-Netto e Dessen (2006) e Koch et al. (2008), a classificação pode ser dividida com base no grau de potencialidade, ou habilidade para diferenciação em: totipotentes (capacidade de criar um indivíduo inteiro), pluripotentes (capacidade de se diferenciar em células do mesoderma, endoderma e ectoderma), multipotentes e onipotentes (capacidade de se diferenciar em um número limitado de linhagens). Quanto ao local de origem podem ser classificadas em embrionárias, adultas e pluriropotencias induzidas (GATTEGNO-HO et al., 2012):

- As embrionárias têm capacidade de se transformar em qualquer tipo de célula adulta, sendo encontradas no interior do embrião, quando ele está no estágio conhecido como blastocisto.
- As adultas têm capacidade de se dividir e gerar tanto uma nova célula idêntica e com o mesmo potencial, como outra diferenciada, são obtidas principalmente, no tecido adiposo, na medula óssea (MO), no sangue do cordão umbilical e além de outras.
- Pluripotenciais induzidas (iPs) são células que sofrem um processo de reprogramação pela inserção de um vírus contendo 4 genes (oct-4, sox-2, Klf-4 e c-Myc) ou peptideos. Estes se inserem no DNA da célula adulta (por exemplo da pele) e reprogramam o código genético. Com este novo programa, as células voltam ao estágio de uma célula-tronco embrionária e possuem características de auto-renovação e a capacidade de se diferenciarem em qualquer tecido.

2.5.1 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTMs ou do inglês, Mesenchymal Stem Cells - MSCs) que são classificadas como CT adultas provenientes do

mesoderma e apresentam uma grande plasticidade fenotípica (NARDI e MEIRELLES, 2006). Devido as propriedades plástico-aderentes possuem a habilidade de adotar morfologia fibroblastoide e, sob condições especiais, podem se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos (DOMINICI et al., 2006).

Essas células multipotentes foram principalmente isoladas de MO, porém como o número e a capacidade de diferenciação diminuem com a idade, o potencial terapêutico também declina com o tempo (MUELLER, 2001). Devido a esta limitação outras fontes foram identificadas, sendo possível isolar CTMs em tecidos de origens fetal e adulto, tais como: tecido adiposo (ZUK et al., 2001), sangue de cordão umbilical (BIEBACK et al., 2004), sangue periférico (KUZNETSOV et al., 2001), tecido de conexão da derme (JIANG et al., 2002) e músculo esquelético (BIANCO et al., 2008).

Em cultura o desempenho das CTMs é mais conhecido comparado com *in vivo*, tendo como principais propriedades: 1) auto-renovação e plasticidade, 2) capacidade quimiotática e migração para os locais de lesão e inflamação, 3) secreção de mediadores parácrinos e fatores tróficos, 4) propriedades imunomoduladoras, 5) propriedade antigênica, 6) papel de regulação durante reações inflamatórias locais (MEIRELLES e NARDI, 2009; MASTRI et al., 2014).

As características das CTMs, a disponibilidade em grande número, a facilidade de isolamento e purificação, a expansão sem indução espontânea de diferenciação, bem como a capacidade de diferenciação em qualquer tipo de célula especializada de origem mesodermal, fornece aos pesquisadores células de valor inestimável, que podem servir para o estudo e o desenvolvimento do reparo tissular, com o objetivo de corrigir lesões provocadas por doenças congênitas ou degenerativas (MATIKAINEN et al., 2005; AMORIN et al., 2012).

2.5.2 Obtenção e caracterização

A obtenção das CTMs pode ser da MO, tecido adiposo, (ZUK et al., 2001), sangue do cordão umbilical (BIEBACK et al., 2004), sangue periférico (KUZNETSOV et al., 2001), tecido de conexão da derme (JIANG et al., 2002), músculo esquelético (BIANCO et al., 2008) entre outros.

Para a caracterização das CTMs, a Sociedade internacional de terapia celular (SITC do inglês International Society for Cellular Therapy) propôs três critérios básicos para que se possa definir uma célula como sendo CTMs. Assim, as células devem ser: (1) plástico-aderentes, caso sejam mantidas em condições básicas de cultura; (2) com padrão fenótipo positivas para CD73, CD90 e CD105, e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 e HLA-DR; e (3) capazes de se diferenciar em fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e condroblastos, quando expostas *in vitro* às linhagens correspondentes (DOMINICI et al., 2006).

2.5.3 Diferenciação condrogênica

A capacidade das CTMs de se diferenciarem em condições *in vitro* em diversos tecidos, tais como osso, cartilagem (condrócitos), gordura (PITTENGER et al., 1999), músculo (FERRARI et al., 1998) e hepatócitos (PETERSEN et al., 1999), varia segundo a presença específica de determinadas moléculas já bem conhecidas.

Para a diferenciação em condrócitos, as CTMs devem ser cultivadas sem a presença de soro fetal ou adulto (de origem animal ou humana) (BARRY et al., 2004), ou em baixas concentrações (BERTINI, 2009). O formato do cultivo deve ser tridimensional e conter um meio nutritivo com alguns dos membros da família do TGF- β (transforming growth factor – β). De acordo com Lee et al. (2004), o TGF- β 2 e o TGF- β 3 são os mais efetivos na promoção da condrogênese, além de TFN-3, IGF-1, BMP-2 e BMP-6, insulina, transferrina, piruvato. Recentes estudos têm demonstrado que TGF e outros fatores como BMP-2 e GDF-5 (fator de crescimento e diferenciação) induzem rapidamente a expressão de colágeno do tipo II, sugerindo um papel crítico na sinalização da superfamília TGF na expressão de genes específicos de condrócitos.

Quando cultivadas nestas condições, as CTMs rapidamente perdem a morfologia fibroblastóide e começam a desenvolver uma multicamada com matriz extracelular, que expressa componentes específicos da cartilagem, tais como proteoglicano e glicosaminoglicanos (BARRY e MURPHY 2004). Em culturas de 10 a 14 dias, as células passam a produzir colágeno, característico da cartilagem articular. Do mesmo modo, apresentam marcadores de superfície positivos para condrócitos, como colágeno tipo II (MUSUMECI et al., 2014),

Sox-9 (LIAO et al., 2014) e agrecan (MAGALHÃES et al., 2014), os quais confirmam a indução da condro-diferenciação, além de se observar por microscopia ótica a formação de lacunas celulares típicos (McGEADY et al., 2017).

OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento do AH e TA isolados e combinados, no processo de diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs) equinas *in vitro*.

Objetivos específicos

- Determinar a produção de GAG no dia 14 de cultivo.
- Determinar a produção de Colageno tipo II no dia 14 de cultivo.
- Avaliar qual tratamento promove histomorfologicamente características condrogenicas.

HIPOTESE

A aplicação de AH e TA promove melhor diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais equinas *in vitro*, quando comparadas com o controle.

3 REFERÊNCIAS¹

AMORIN, B.; VALIM, V.D.S.; LEMOS, N.E.; MORAES JÚNIOR, L.; SILVA, A. M.P.D.; SILVA, M.A.L.D.; SILLA, L.M.D.R. Células-tronco mesenquimais: caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. **Revista HCPA**, v.32, n.1, p.71-81, 2012.

AN, Y.H.; MARTIN, K.L. **Handbook of histology methods for bone and cartilage**. New York: Springer Science & Business Media, 2003. 588p.

BARNES, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v.94, n.6, p. 557-572, 1998.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, n.4, p.568-584, 2004.

BASTOW, E.R.; BYERS, S.; GOLUB, S.B.; CLARKIN, C.E.; PITSILLIDES, A. A.; FOSANG, A.J. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n.3, p.395-413, 2008.

BELLAMY, N.; CAMPBELL, J.; ROBINSON, V.; GEE, T.; BOURNE, R.; WELLS, G. Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee (Review). **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.19, n.2, p.1-21, 2006.

BERTINI, M.A.H.; ARAUJO, F.S. Biologia e uso clínico das células-tronco mesenquimais: uma revisão concisa. **Revista Investigação**, v.9, n. 2/3, p.105-110, 2009.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v.2, n.4, p.313-319, 2008.

BIEBACK, K.; KERN, S.; KLUTER, H.; EICHLER, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, v.22, n.4, p.625-34, 2004.

BORRELLI Jr., J.; RICCI, W.M. Acute effects of cartilage impact. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.423, p.33-39, 2004.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p.25-35, 2009.

CARRANZA-BENCANO, A.; GARCÍA-PAINO, L.; ARMAS, P.Jr., A.; CAYUELA, D.A. Neochondrogenesis in repair of full-thickness articular cartilage defects

¹ Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002.

using free autogenous periosteal grafts in the rabbit. A follow-up in six months. **Osteoarthritis Cartilage**, v.8, n.5, p.351-358, 2000.

CIUFFREDA, M.C.; MALPASSO, G.; MUSARÒ, P.; TURCO, V.; GNECCHI, M. Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. **Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols**, n.1416, p.149-158, 2016.

COOPER, C.; DENNISON, E.; EDWARDS, M.; LITWIC, A. Epidemiology of osteoarthritis. **Medicographia**, v.35, p.145-151, 2013.

DAHLGREN, L. A. Stem cell therapy. In: ROBINSON, N.E.; SPRAYBERRY, K. A. **Current Therapy in Equine Medicine**. 6.ed. St. Louis: Saunders, 2009. chap.199, p.908-911.

DAVILA, J.C.; CEZAR, G.; THIEDE, M.; STROM, S.; MIKI, T.; TROSKO, J. Use and application of stem cells in toxicology. **Toxicological Science**, v.79, p.214-223, 2004.

DeCAMP, C.E.; JOHNSTON, S.A.; DÉJARDIN, L.M.; SCHAEFER, S.L. **Handbook of small animal orthopedics and fracture repair**. 5.ed. St. Louis: Elsevier, 2016. 868p.

DE CAMPOS, G.C.; REZENDE, M.U.; PAILO, A.F.; FRUCCHI, R.; CAMARGO, O.P. Adding triamcinolone improves viscosupplementation: a randomized clinical trial. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.471, n.2, p.613-620, 2013.

DECKER, R.S.; KOYAMA, E.; PACIFICI, M. Genesis and morphogenesis of limb synovial joints and articular cartilage. **Matrix Biology**, v.39, p.5-10, 2014.

DOMINICI, M.; Le BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p.315-317, 2006.

EDMONDS, R.E.; GARVICAN, E.R.; SMITH, R.K.; DUDHIA, J. Influence of commonly used pharmaceutical agents on equine bone marrow-derived mesenchymal stem cell viability. **Equine Veterinary Journal**, v.49, n.3, p.352-357, 2017.

EUPPAYO, T.; SIENGDEE, P.; BUDDHACHAT, K.; PRADIT, W.; CHOMDEJ, S.; ONGCHAI, S.; NGANVONGPANIT, K. In vitro effects of triamcinolone acetate and in combination with hyaluronan on canine normal and spontaneous osteoarthritis articular cartilage. **In Vitro Cell & Developmental Biology Animal**, v.52, n7, p.723-735, 2016.

EYRE, D.R.; WU, J.J. Collagen structure and cartilage matrix integrity. **Journal of Rheumatology Supplement**, v.43, p.82-85, 1995.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v.279, p.1528- 1530, 1998.

FOX, S.M. **Chronic pain in small animal medicine**. Boca Raton: CRC Press, 2009. 256p.

FRESHNEY, R. **Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications**. 7.ed, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 728p.

GATTEGNO-HO, D.; ARGYLE, S.A.; ARGYLE, D.J. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. **The Veterinary Journal**, v.191, p.19-27, 2012.

GOLDRING, M.B. Articular cartilage degradation in osteoarthritis. **HSS Journal**, v.8, p.7–9, 2012.

GOLDRING, M.B.; OTERO, M. Inflammation in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v.23, n.5, p.471–478, 2011.

GOLDBERG, V.M.; GOLDBERG, L. Intra-articular hyaluronans: the treatment of knee pain in osteoarthritis. **Journal of Pain Research**, v.3, p.51-56, 2010.

GOODRICH, L.R.; NIXON, A.J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse. – A review. **Veterinary Journal**, v.171, p.51–69, 2006.

HAUSELMANN, H.J.; FERNANDES, R.J.; MOK, S.S.; SCHMID, T.M.; BLOCK, J.A.; AYDELOTTE, M.B.; KUETTNER, K.E.; THONAR, E.J. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. **Journal of Cell Science**, v.107, n.1, p.17-27, 1994.

JIANG, Y.; VAESSEN, B.; LENVIK, T.; BLACKSTAD, M.; REYES, M.; VERFAILLIE, C.M. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. **Experimental Hematology**, v.30, n.8, p.896-904, 2002.

JÜNI, P.; HARI, R.; RUTJES, A.W.; FISCHER, R.; SILLETTA, M.G.; REICHENBACH, S.; DA COSTA, B.R. Intra-articular corticosteroid for knee osteoarthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.22, n.10, CD005328, 2015.

KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J.P.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v.7, n.1, p.33-42, 2011.

KISIDAY, J.D.; JIN, M.; DIMICCO, M.A.; KURZ, B.; GRODZINSKY, A.J. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. **Journal Biomechanics**, v.37, n.5, p.595-604, 2004.

KOCH, T.G.; BERG, L.C.; BETTS, D.H. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. **Canadian Veterinary Journal**, v.49, p.1009-1017, 2008.

KOZHEMYAKINA, E.; LASSAR, A.B.; ZELZER, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. **Development**, v.142, n.5, p. 817-831, 2015.

KUZNETSOV, S.A.; MANKANI, M.H.; GRONTHOS, S.; SATOMURA, K.; BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Circulating skeletal stem cells. **The Journal of Cell Biology**, v.153, n.5, p.1133-1140, 2001.

LANZER, W. L.; KOMENDA, G. Changes in articular cartilage after meniscectomy. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.252, p.41-48, 1990.

LEE, S.J.; JEON, H.B.; LEE, J.H.; YOO, J.S.; CHUN, J-S.; YOO, Y.J. Identification of proteins differentially expressed during chondrogenesis of mesenchymal cells. **FEBS Letters**, v.536, p.35-40, 2004.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.21, p.605-631, 2005.

LIAO, J.; HU, N.; ZHOU, N.; LIN, L.; ZHAO, C.; YI, S.; XU, W. Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits BMP2-induced osteogenic differentiation. **PloS One**, v.9, n.2, e89025, 2014.

LOESER, R.F.; GOLDRING, S.R.; SCANZELLO, C.R.; GOLDRING, M.B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. **Arthritis & Rheumatology**, v.64, n.6, p.1697-1707, 2012.

LOHMANDER, L.S.; TUGWELL, P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.16, n.2, p.137-162, 2008.

LONGOBARDI, L.; LI, T.; TAGLIAFIERRO, L.; TEMPLE, J.D.; WILLCOCKSON, H.H.; YE, P.; ESPOSITO, A.; XU, F.; SPAGNOLI, A. Synovial joints: from development to homeostasis. **Current Osteoporosis Reports**, v.13, n.1, p.41-51, 2015.

MAGALHÃES, J.; LEBOURG, M.; DEPLAINE, H.; GÓMEZ RIBELLES, J.L.; BLANCO, F.J. Effect of the physicochemical properties of pure or chitosan-coated poly (L-lactic acid) scaffolds on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteoarthritic patients. **Tissue Engineering Part A**, v.21, n.3-4, p.716-728, 2014.

MALDONADO, M.; NAM, J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-10, 2013.

MARTEL-PELLETIER, J. Pathophysiology of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.12, p. S31–S33, 2004.

MASTRI, M.; LIN, H.; LEE, T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. **World Journal of Stem Cells**, v.6, p.82-93, 2014.

MATIKAINEN, T.; LAINE, J. Placenta-an alternative source of stem cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.207, n.2, p.544-549, 2005.

MAXIE, G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals**. 6.ed. St. Louis: Saunders Ltd., 2015. 2456p.

MCGEADY, T.A.; QUINN, P.J.; FITZPATRICK, E.S.; KILROY, D.; RYAN, M.T.; LONERGAN, P. **Veterinary Embryology**. 2.ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2017. 400p.

McILWRAITH, C.W. The use of intra-articular corticosteroids in the horse: What is known on a scientific basis? **Equine Veterinary Journal**, v.42, n.6, p.563-571, 2010.

McILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. **Bone & Joint Research**, v.1, n.11, p.297-309, 2012.

MEIRELLES, L.D.A.S.; NARDI, N.B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Frontiers in Bioscience**, v.14, p.4281-4298, 2009.

MINGRONI-NETTO, R.C.; DESSEN, E.M.B. Células-tronco: o que são e o que serão. **Genética na Escola**, v.1, p.12-15, 2006.

MUELLER, S.M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.82, n.4, p.583-590, 2001.

MUSUMECI, G.; MOBASHERI, A.; TROVATO, F. M.; SZYCHLINSKA, M. A.; GRAZIANO, A. C. E.; FURNO, D. L.; CARDILE, V. Biosynthesis of collagen I, II, RUNX2 and lubricin at different time points of chondrogenic differentiation in a 3D in vitro model of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. **Acta Histochemica**, v.116, n.8, p.1407-1417, 2014.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cells: isolation in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.174, p.249-282, 2006.

NEOGI, T.; ZHANG, Y. Epidemiology of osteoarthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.39, p.1–19, 2013.

NÜESCH, E.; TRELLE, S.; REICHENBACH, S.; RUTJES, A.W.; TSCHANNEN, B.; ALTMAN, D.G.; JÜNI, P. Small study effects in meta-analyses of osteoarthritis trials: meta-epidemiological study. **The BMJ**, v.341, p.c3515, 2010.

OSTALOWSKA, A.B.; SŁAWOMIR, Ś.; BOGDAN, K.; TOMASZ, S.; DARIUSZ, N.; MARTA, S.; EWA, B.; SŁAWOMIR, K. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. **Annales Academiae Medicae Silesiensis**, v.71, p.38–45, 2017.

PACIFICI, M.; KOYAMA, E.; IWAMOTO, M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today**, v.75, n.3, p.237-248, 2005.

PEKAREK, B.; OSHER, L.; BUCK, S.; BOWEN, M. Intra-articular corticosteroid injections: A critical literature review with up-to-date findings. **The Foot**, v.21, n.2, p.66-70, 2011.

PETERSEN, B.E.; BOWEN, W.C.; PATRENE, K.D.; MARS, W.M.; SULLI-VAN, A.K.; MURASE, N.; BOGGS, S.S.; GREENBERGER, J.S.; GOFF, J.P. Bone marrow as a source of hepatic oval cells. **Science**, v.284, p.1168- 1170, 1999.

PITSILLIDES, A.A.; BEIER, F. Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology. **Nature Reviews Rheumatology**, v.7, p.654–663, 2011.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; GRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p.143-147, 1999.

REZENDE, M.U.; HERNANDEZ, A.J.; CAMANHO, G.L.; AMATUZZI, M.M. Articular cartilage and osteoarthritis. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.8, n.2, p.100-104, 2000.

REZENDE, M.U.; GOBBI, R.G. Drug therapy in knee osteoarthritis. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.44, n.1, p.14-9, 2009.

REZENDE, M.U.; CAMPOS, G.C. Viscosupplementation. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.47, n.2, p.160-164, 2012.

RUTJES, A.W.; JÜNI, P.; DA COSTA, B.R.; TRELLE, S.; NÜESCH, E.; REICHENBACH, S. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee. A systematic review and meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v.157, n.3, p.180-191, 2012.

SANCHEZ-ADAMS, J.; LEDDY, H.A.; MCNULTY, A.L.; O'CONOR, C.J.; GUILAK, F. The mechanobiology of articular cartilage: bearing the burden of osteoarthritis. **Current Rheumatology Reports**, v.16, n.10, p.451, 2014.

SANDERSON, R.O.; BEATA, C.; FLIPO, R-M.; GENEVOIS, J-P.; MACIAS, C.; TACKE, S.; VEZZONI, A.; INNES, J.F. Systematic review of the management of canine osteoarthritis. **Veterinary Record**, v.164, p.418-424, 2009.

SEKIYA, I.; VUORISTO, J.T.; LARSON, B.L.; PROCKOP, D.J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.7, p.4397-4402, 2002.

SILVA, E. F.; MACAGNAN, K. L.; FERRÚA, C. P.; SEVERO, R. F.; DEMARCO, F. F.; NEDEL, F. Engenharia tecidual de cartilagem articular com ênfase em odontologia. **RFO UPF**, v. 20, n.3, p.372-379, 2015.

SOUZA, M.V. Osteoarthritis in horses – Part 2: a review of the intra-articular use of corticosteroids as a method of treatment. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.59, p.1-10, 2016.

SUCCAR, P.; MEDYNSKYJ, M.; BREEN, E.J.; BATTERHAM, T.; MOLLOY, M. P.; HERBERT, B.R. Priming adipose-derived mesenchymal stem cells with hyaluronan alters growth kinetics and increases attachment to articular cartilage. **Stem Cells international**, v.2016, p.1-13, 2016.

SYED, H.M.; GREEN, L.; BIANSKI, B.; JOBE, C.M.; WONGWORAWAT, M.D. Bupivacaine and triamcinolone may be toxic to human chondrocytes. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.469, n.10, p.2941-2947, 2011.

TAYLOR, S.E.; SMITH, R.K.W.; CLEGG, P.D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? **Equine Veterinary Journal**, v.39, p.172–180, 2007.

TEHRANZADEH, J.; BOOYA, F.; ROOT, J. Cartilage metabolism in osteoarthritis and the influence of viscosupplementation and steroid: a review. **Acta Radiologica**, v.46, n.3, p.288-296, 2005.

TORRANCE, G.W.; RAYNAULD, J.P.; WALKER, V.; GOLDSMITH, C.H.; BELLAMY, N.; BAND, P.A.; SCHULTZ, M.; TUGWELL, P. A prospective, randomized, pragmatic, health outcomes trial evaluating the incorporation of hylan G-F 20 into the treatment paradigm for patients with knee osteoarthritis (Part 2 of 2): economic results. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.10, n.7, p.518-527, 2002.

UMLAUF, D.; FRANK, S.; PAP, T.; BERTRAND, J. Cartilage biology, pathology, and repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, n.24, p.4197-4211, 2010.

WANG, C.T.; LIN, Y.T.; CHIANG, B.L.; LIN, Y.H.; HOU, S.M. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients

with early osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.14, n.12, p.1237-47, 2006.

WHO. World health organization. Osteoarthritis (2013). Disponível em: https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjfzV3MXWAhWGkZAKHRRaA1IQFggnMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fmedicines%2Fareas%2Fpriority_medicines%2FCh6_12Osteo.pdf&usg=AFQjCNFgCFiCaQtMaKgJwSP3JA7gBwh6nQ. Acessado em 15 de janeiro de 2017.

ZHANG, W.; MOSKOWITZ, R.W.; NUKI, G.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R.D.; ARDEN, N.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.; BRANDT, K.D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, M.; HUNTER, D.J.; KWOH, K.; ZHANG, Z.; WEI, X.; GAO, Z.; ZHAO, Y.; ZHAO, Y.; GUO, L.; CHEN, C.; DUAN, Z.; LI, P.; WEI, L. Intra-articular injection of cross-linked hyaluronic acid-dexamethasone hydrogel attenuates osteoarthritis: an experimental study in a rat model of osteoarthritis. **International Journal Molecular Sciences**, v.17, n.411, p.1-14, 2016.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAÏM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

ZULIAN, F.; MARTINI, G.; GOBBER, D.; AGOSTO, C.; GIGANTE, C.; ZACCHELLO, F. Comparison of intra-articular triamcinolone hexacetonide and triamcinolone acetate in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. **Rheumatology**, v.42, p.1254-1259, 2003.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO 1

CARTILAGEM ARTICULAR, PATOGÊNESE E TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE

Artigo redigido segundo as normas da Revista Veterinária e Zootecnia

<http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/about/submissions#authorGuidelines>

RESUMO

A osteoartrite caracteriza-se por dor e claudicação, sendo considerada processo não específico, mais sim uma sequela comum a várias formas de lesão articular, com envolvimento de fatores biológicos e mecânicos. Desta forma, o objetivo da presente revisão foi discorrer sobre alguns aspectos da cartilagem articular (generalidades, histogênese), patogênese da osteoartrite, bem como algumas possibilidades de tratamentos intra-articulares para a osteoartrite. A cartilagem articular, juntamente com o líquido sinovial, têm papel mecânico importante nas articulações diartrodiais. Os condrócitos estão entre os principais componentes da cartilagem articular e são apontados como células altamente diferenciadas com capacidade limitada de proliferação e migração. O outro componente é a matriz extracelular constituída de colágeno tipo II, proteoglicanos, proteínas não colagenosas, glicoproteínas, água e eletrólitos. A osteoartrite é classificada como doença articular não inflamatória, com múltiplas interações bioquímicas e biomecânicas. Todos os componentes da articulação podem ser comprometidos, porém a cartilagem é considerada o tecido alvo. A afecção pode ser classificada como primária, que ocorre predominantemente em animais idosos, e secundária, decorrente de doenças que afetam a articulação e as estruturas de suporte. Entre os tratamentos intra-articulares para a osteoartrite estão a viscosuplementação com ácido hialurônico, o uso de corticosteroides, e a combinação de ácido hialurônico e corticosteroides. Contudo, há ainda várias controvérsias quanto à eficácia.

Palavras-chave: articulação, dor, doença.

INTRODUÇÃO

A osteoartrite, também denominada doença articular degenerativa, é um processo caracterizado por dor e claudicação, associado às alterações dos tecidos das articulações sinoviais, incluindo a perda de cartilagem articular (47). Esta doença não é entidade específica, mais sim uma sequela comum a várias formas de lesão articular e envolve interação entre fatores biológicos e mecânicos sobre a cartilagem articular, osso subcondral e líquido sinovial (33).

Em humanos, a afecção é considerada multifatorial, com risco para a susceptibilidade no nível individual (idade, sexo, obesidade, genética, raça, dieta, metabolismo ósseo) e articular (injúria, atividade, ocupação, articulação/osso, força, alinhamento) (37). Por exemplo, a obesidade é considerada um dos principais fatores de risco para a osteoartrite do joelho (37;8). Por sua vez, em cães há maior incidência nos mais idosos, em especial naqueles com sobrepeso ou obesos (14; 33). Até o momento

não há cura, por isso os tratamentos visam reduzir o desconforto e a melhora da mobilidade articular (50).

Diversas pesquisas têm propiciado melhor compreensão com relação à estrutura, processos bioquímicos e metabolismo da cartilagem, que são importantes para o manejo e prevenção da osteoartrite. Sendo assim, o objetivo da presente revisão foi discorrer sobre alguns aspectos da cartilagem articular (generalidades, histogênese), patogênese da osteoartrite, bem como algumas possibilidades de tratamentos intra-articulares para a osteoartrite.

ASPECTOS DA CARTILAGEM ARTICULAR

Generalidades sobre a cartilagem articular

O sistema esquelético é formado principalmente por osso e cartilagem que fornece suporte e proteção para os órgãos internos; a maioria deste sistema está composta de osso, porém existe uma pequena parte de cartilagem localizada nas conexões entre ossos na traqueia, laringe e orelha (36). A formação e localização espacial das articulações sinoviais no corpo são criticamente importantes durante a evolução do indivíduo permitindo-se adaptar a uma variedade de situações de forma satisfatória (30).

A cartilagem é um tecido conjuntivo avascular, com células dispersas, cujas características bioquímicas refletem principalmente a composição da matriz extracelular (27). Dependendo da localização no corpo e composição da matriz extracelular, a cartilagem é classificada em hialina, elástica e fibrocartilaginosa (14). No entanto, há predomínio da forma hialina (54), da qual a articulação é formada (14).

A cartilagem articular e o líquido sinovial têm papel mecânico importante nas articulações diartrodiais e, conseqüentemente, no funcionamento do corpo, cumprindo funções importantes, tais como, prover superfície lisa e lubrificada entre os ossos adjacentes, minimizando o desgaste e amortecendo e distribuindo as forças aplicadas nas extremidades durante as atividades do indivíduo (46).

Entre os principais componentes da cartilagem articular, 1% do volume total do tecido é formado pelos condrócitos, o único tipo celular presente (24). Os condrócitos são células altamente diferenciadas com capacidade limitada de proliferação e migração (7), que se localizam em lacunas no interior da cartilagem e sintetizam os compostos necessários para a manutenção da matriz extracelular, além de a estabilizarem (49). A nutrição do condrócito ocorre em condições de anaerobiose (20) por meio de uma barreira de difusão, levando substâncias oriundas dos capilares do tecido conjuntivo fibroso, localizado no pericôndrio. Estas características fazem do condrócito uma célula com baixo potencial de reparação (5, 49).

Os 99% restante da cartilagem articular é constituído pela matriz extracelular, altamente especializada e composta por: colágeno tipo II, proteoglicanos, proteínas não colagenosas, glicoproteínas, água e eletrólitos dissolvidos (24; 36). O colágeno tipo II é o composto mais abundante e o principal na matriz extracelular (80-90%), proporcionando resistência à tração (13), ao passo que os proteoglicanos proporcionam resistência à compressão (20). Além disso, existem também subunidades de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs) (1).

Segundo Rezende (45), para manter estável a cartilagem articular é necessária a regulação do ambiente interno; esta regulação mantém o balanço, de forma a não ocorrer ganho ou perda do tecido. Dois são os fatores de crescimento que ajudam neste processo, o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Ambos estimulam a síntese de agreganos e de

colágeno, além das citocinas como, interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), que estimulam a degradação da matriz.

Histogênese da cartilagem

Para conhecer as características da cartilagem é essencial ter claro o processo histogênico deste órgão. A formação da cartilagem ocorre principalmente no processo de embriogênese, tendo alguns processos de reparação em adultos (4). Na gestação, células mesenquimais provenientes do mesoderma (26) são condensadas nas regiões onde irão se formar a futura articulação, denominada de interzona, bem como o esqueleto (11, 30, 36). A formação do osso endocondral consiste na condensação de células mesenquimais indiferenciadas originadas do platô lateral do mesodermo e formam um andaime cartilaginoso ou "molde" (26).

Numerosos estudos têm sido feitos na procura de moléculas de sinalização, fatores de crescimento, fatores de transcrição e outras moléculas regulatórias expressadas na interzona, tais como: o GDF-5 que em estágios iniciais estimula o recrutamento e diferenciação das células condrogênicas e em estágios tardios promove função celular e desenvolvimento da articulação (52); o Wnt-14, que é um fator anticondrogênico; os BMP (proteína morfogenética de osso) antagonistas denominados Chordin e Noggin; fatores de crescimento FGF-2 FGF-4 e FGF-13; membros da família do fator de crescimento fibroblástico e fatores de transcrição Cux1 e ERG (2, 6, 19, 21, 28, 51).

As células mesenquimais são importantes para a formação da cartilagem, sendo ativadas pelo Pax 1 e Scleraxis, fatores de transcrição de origem mesodermal que ativam genes específicos de cartilagem (26, 36). No sítio onde a formação da cartilagem ocorre, chamado interzona, as células mesenquimais formam agregados, permanecendo unidas por uniões GAP (40), e se diferenciam em condroblastos. O processo de agregação é promovido por fatores BMP, por meio da regulação de N-caderinas, ao passo que a diferenciação dos condroblastos é promovida por fatores BMPs, que mantêm a expressão de fatores de transcrição Sox9, dando origem a primórdios de cartilagem (26, 36). As BMPs regulam uma vasta gama de processos biológicos, além da osteogênese, e as BMPs 2, 4, 6, e 7 e o GDFs (fatores de crescimento/diferenciação) têm sido ligadas ao processo de diferenciação condrogênica (39). Apesar do amplo reconhecimento da importância da interzona na formação da articulação, há ainda limitada informação sobre o ambiente de expressão gênica (30).

Continuando o processo de diferenciação, as células mesenquimais que se encontram nas regiões centrais dos primórdios da cartilagem, perdem seus processos citoplasmáticos e se tornam arredondadas produzindo a matriz extracelular da cartilagem, composta de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e fibras de colágeno tipo II (36). Posteriormente, haverá hipertrofia, apoptose com invasão de vasos sanguíneos e aparição de osteoblastos, que sintetizam a matriz óssea, resultando em formação das extremidades dos ossos longos, e outros componentes, incluindo ligamentos (26, 36, 40).

PATOGÊNESE DA OSTEOARTRITE

A osteoartrite é a causa mais comum de incapacidade motora e afeta até 15% da população humana com mais de 60 anos. Segundo as Nações Unidas (2004), para o ano 2050 essa cifra aumentara até 20%, ou seja, 130 milhões de pessoas irão sofrer osteoartrite (57). Em cães, aproximadamente 20% daqueles com mais de 12 meses de idade são diagnosticados com osteoartrite (47). A afecção é classificada como doença

articular não inflamatória, porém com presença de componente inflamatório, reconhecido por meio de sintomas como dor, edema e rigidez articular (16, 17).

A doença tem múltiplas interações bioquímicas e biomecânicas, podendo ser classificada como primária ou secundária (14). A primária ocorre predominantemente em animais idosos, devido ao desgaste natural pela idade (10). Os condrócitos na cartilagem idosa possuem atividade enfraquecida, com evidente fenótipo secretório de senescência e aumento de produtos finais da glicação, que se encontram associados as vias de sinalização desreguladas, atividade sintética alterada e aumento da síntese de citocinas e quimiocinas, as quais desencadeiam a expressão de metaloproteínas e outros mediadores inflamatórios (17). Para neutralizar esse efeito os condrócitos têm mecanismo de proteção denominado autofagia; no entanto, o mecanismo encontra-se ausente em células que completaram o ciclo, razão pela qual, a idade está relacionada com a morte celular e o desenvolvimento da osteoartrite (14, 17).

A osteoartrite desenvolve-se secundariamente a doenças conhecidas que afetam a articulação e as estruturas de suporte, sendo o tipo de osteoartrite mais observada em pequenos animais (10). É consequência de forças anormais em articulações normais (trauma, instabilidade), ou forças normais em articulações anormais (displasias, alterações no desenvolvimento), resultando ambas em forças biomecânicas anormais e mau alinhamento (14; 16). A obesidade é outro fator de risco importante para o desenvolvimento e progressão desta doença (14, 17). O tecido adiposo sistêmico e o infrapatelar secretam substâncias ativas denominadas adipocinas, as quais contribuem para o estado inflamatório de baixo grau do paciente obeso, podendo afetar diretamente a homeostase da cartilagem (17).

A osteoartrite afeta toda a articulação (cartilagem, membrana sinovial, meniscos, tendões, ligamentos e ossos), porém a cartilagem é considerada o tecido alvo e sua quebra é a maior característica da doença (23). A degradação do colágeno tipo II é o evento inicial que determina a progressão irreversível da doença (17). Uma vez que o colapso da cartilagem ocorre, os condrócitos responsáveis por manter os componentes da matriz em equilíbrio não conseguem manter os agregados e, por conseguinte a água, proporcionando ambiente mecanicamente instável (31). Com a degeneração da cartilagem articular há fibrilação da matriz, presença de fissura, ulceração macroscópica e perda da espessura total da superfície articular (32, 45). Além disso, se pode observar degradação da cartilagem articular, espessamento do osso subcondral, formação de osteócitos, grau variável de inflamação do líquido sinovial, degeneração de ligamentos e meniscos, e hipertrofia da cápsula articular (2).

A progressão da doença é dividida em três etapas: estágio 1 – quebra proteolítica da matriz cartilaginosa, estágio 2 – fibrilação e erosão da superfície cartilaginosa com liberação de produtos no fluido sinovial, estágio 3 – inflamação sinovial com produção de proteases e citocinas pró-inflamatórias (32). Contudo, a sequência exata dos eventos não está clara, ou seja, a relação temporal entre dano do osso subcondral, inflamação crônica do tecido sinovial e erosão da cartilagem são ainda desconhecidos (23).

Segundo Martel-Pelletier (32), estudos citam as metaloproteases como as responsáveis pela digestão da matriz. Dentro desta família, a collagenase é responsável pela degradação do colágeno, a estromelisina pela degradação do proteoglicano, e a agreganase pela fragmentação do proteoglicano. Além disso, o balanço anabólico e catabólico das citocinas determina a integridade do tecido articular, sendo a interleucina 1 β (IL-1 β) e o TNF- α responsáveis pelo processo catabólico (23, 32, 45). Contudo, outras citocinas pró-inflamatórias podem também estar envolvidas, incluindo a IL-6, fator inibidor de leucemia (LIF), IL-17, IL-8 e IL-18 proteoglicano (32).

A IL-1 β e o TNF- α induzem, de acordo com Kapoor et al. (23), a produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente óxido nítrico e ânion superóxido, que contribuem para a degradação da cartilagem. Isso se torna um processo com ciclo vicioso, já que o aumento de óxido nítrico ativa a produção de metaloproteases, as quais inibem a síntese de proteoglicano e colágeno, gerando apoptose e degradação da cartilagem.

TRATAMENTOS INTRA-ARTICULARES DA OSTEOATRITE

As medicações que atuam no processo de osteoartrite teoricamente deveriam ter a capacidade de modificar a doença, seja na prevenção, retardo, reversão ou estabilização (44).

Zhang et al. (58) citaram que, segundo a OARSI (Sociedade internacional de investigação para a OA), de 51 modalidades de tratamento descritas para o tratamento da osteoartrite do joelho e quadril em pacientes humanos, 21 foram recomendadas. Dessas, 12 foram não farmacológicas, oito farmacológicas e cinco eram modalidades cirúrgicas. Das modalidades farmacológicas foram citados o acetaminofeno, os anti-inflamatórios não esteroidais seletivo e não seletivo da ciclooxigenase-2, os anti-inflamatórios não esteroidais tópicos e capsaicina, injeções intra-articulares de corticosteroides e hialuronatos, glucosamina e/ou sulfato de condroitina para alívio de sintomas; sulfato de glucosamina, sulfato de condroitina e diacereína para possíveis efeitos modificadores da estrutura e o uso de analgésicos opióides para o tratamento de dor refratária.

Viscossuplementação

A viscossuplementação é a injeção intra-articular de ácido hialurônico (AH) e foi aprovada pela FDA como um dispositivo médico (56). O AH, componente normal do líquido sinovial e da MEC, é um polissacarídeo pertencente ao grupo dos GAGs com peso molecular aproximado entre 4000 e 5000 kDa (25, 56). O AH possui várias funções, como viscoelasticidade para o fluído articular e lubrificação dos tecidos moles intra-articulares, além de ser um importante componente da matriz cartilaginosa articular e sintetizado localmente pelos condrócitos (18).

O líquido sinovial na osteoartrite apresenta redução na sua viscoelasticidade, possivelmente devido à alteração estrutural oxidativa do AH presente na matriz extracelular (3). Desta forma, segundo Rezende e Gobbi (44), a diminuição da mobilidade articular e dor podem estar associadas a diminuição do efeito protetor do meio viscoelástico nos receptores dolorosos do tecido sinovial. Por isso, a alta viscoelasticidade é essencial para que ocorra lubrificação e proteção das células e tecidos articulares.

O exato mecanismo do AH em nível celular permanece desconhecido, com sugestões de ação anti-inflamatória (18). Wang et al. (55) avaliaram o efeito do AH na expressão gênica de 16 citocinas e enzimas associadas a osteoartrite, por meio de estudo com sinoviócitos como fibroblastos obtidos de joelhos de 15 pacientes humanos no estágio inicial da afecção. Segundo os autores, o AH tem efeito modificador da estrutura pela regulação da agreganase-2 e também efeito anti-inflamatório pela regulação da TNF- α , IL-8 e óxido nítrico sintetase (iNOS), os quais podem ser mediados pela interação do AH com o CD44. Há também citações que o AH reduz a dor por meio de seus efeitos nos receptores da dor periférica tão bem quanto no impacto do tecido

sinovial, além do papel em aumentar as propriedades viscoelásticas do fluido sinovial (15).

Do ponto de vista econômico, é cada vez maior o número de trabalhos demonstrando que, se incorporada ao tratamento da osteoartrite em pacientes humanos, a viscosuplementação pode apresentar boa relação custo-efetividade, sendo inclusive capaz de retardar a realização de uma prótese total da articulação (53). Um estudo em 250 pacientes humanos com osteoartrite do joelho, mostrou que a adição de 1 ml de hexacetonida de triancinolona à viscosuplementação (Hylan GF-20) melhorou os sintomas e o escore funcional na primeira semana, mas não além e, aparentemente, não aumentou a probabilidade de efeitos adversos nos 24 meses de observação (9).

Há no comércio vários tipos de preparados de AH, com diferentes pesos moleculares como, por exemplo, o Hylan G-F 20 (6×10^6 k daltons) considerado de alto peso molecular e o hialuronato de sódio classificado como de baixo peso molecular (500-730k daltons) (44). Entre as preparações injetáveis do AH aprovadas pela FDA (do inglês Food and Drugs Administration) para tratamento da osteoartrite do joelho em pacientes humanos estão: Synvisc, Hyalgan, Supartz, Orthovisc e Euflexxa (15).

Conforme Goodrich e Nixon (18), existem controvérsias sobre a efetividade de acordo como o peso molecular, com hipóteses que os de maior peso molecular seriam mais efetivos. Contudo, outros pesquisadores rebatem essas premissas, afirmando que a atividade é mediada farmacologicamente mais do que fisicamente. O AH entre 0,5 e 1×10^6 Da é considerado de baixo peso molecular (Exemplos: Suplasyn, Polireumin, Fermathron e Suprahyal), entre 1 e $1,8 \times 10^6$ Da é de peso molecular intermediário (Exemplos: Osteonil, Orthovisc e Viscoseal) e 6×10^6 Da de alto peso molecular (Exemplo: Synvisc) (43).

Corticosteroides

Os corticosteroides, também denominados glicocorticoides, possuem ação anti-inflamatória e imunossupressora, com mecanismo complexo (41). O uso intra-articular oferece alta concentração do medicamento no sítio da lesão, interferindo com diversas funções imunológicas locais (60). Entre os efeitos benéficos dos corticosteroides na cartilagem articular, têm sido citados: a inibição da degradação das metaloproteinases, o aumento do conteúdo total de glicosaminoglicanos, a diminuição dos níveis da ciclo-oxigenase 2 e a supressão de mediadores inflamatórios (50).

Cinco corticosteroides injetáveis têm aprovação pela FDA, para o uso intrarticular em pacientes humanos: acetato de metilprednisolona, triancinolona acetona (TA), acetato de betametasona e fosfato sódico de betametasona, hexacetonida de triancinolona e dexametasona (41). Em equinos, os mais usados são a TA, o acetato de metilprednisolona e mais raramente o acetato de betametasona (50).

O uso de corticosteroides é controverso, com vários relatos mostrando seus efeitos deletérios na cartilagem, incluindo diminuição do tamanho dos condrócitos, necrose de condrócitos, hipocelularidade, perda e diminuição da síntese de glicosaminoglicanos, inibição da síntese de proteoglicanos, entre outros (18). Deve-se ainda considerar que a qualidade inadequada dos ensaios e a heterogeneidade dos resultados dificultam a análise clara dos benefícios clínicos dos corticosteroides (38). Tem sido sugerido que doses altas enfraquecem a bioquímica cartilaginosa e contribuem para a quebra da cartilagem, porém doses modestas a protegem, visto diminuírem a inflamação que é prejudicial a cartilagem (41).

Segundo McIlwraith (35), diferentes produtos podem variar com relação aos efeitos benéficos e deletérios. Por exemplo, em equinos aparentemente os ésteres de betametasona não apresentam efeitos deletérios, a TA é considerada condroprotetora e

pode favorecer a recuperação da cartilagem, ao passo que o acetato de metilprednisolona tem mostrado consistentemente efeitos deletérios. Desta forma, é inadequado a generalização dos efeitos nocivos, precisando ser melhor definidos. Por outro lado, há os que não recomendam o uso rotineiro até que os benefícios sejam melhor esclarecidos (22).

Zulian et al. (60) compararam tanto a eficácia como a segurança, por um período de até 24 meses, da hexacetonida de triancinolona e TA, aplicadas de forma intra-articular em uma população homogênea de crianças com artrite idiopática juvenil oligoarticular. Segundo os autores, a hexacetonida de triancinolona foi mais efetiva tanto na avaliação mais precoce como na tardia, independentemente do tempo da afecção ou grau de inflamação local ou sistêmica.

Por meio de estudo de revisão sistemática pela metodologia Cochrane, Bellamy et al. (4) avaliaram a eficácia, a efetividade e a segurança do uso de corticosteroides intrarticulares, no tratamento da osteoartrite do joelho em pacientes humanos. Os autores concluíram que os corticosteroides foram superiores ao placebo, sendo a resposta rápida, porém sem sustentação a longo prazo. A hexacetonida de triancinolona foi superior a betametasona na redução da dor até quatro semanas após a injeção. Por sua vez, os produtos com AH, enquanto mais vagarosos no início da ação, aparentemente propiciaram benefício mais sustentado. Sendo assim, os autores recomendaram que se há sinais de inflamação, uma preparação com corticosteroides oferece o alívio da inflamação e dor, ao passo que em outros casos os produtos com AH (Hylan G-F 20, Hyalgan, Orthovisc) podem oferecer resposta mais durável com melhora da dor e função do que a propiciada pelo corticosteroide.

Para avaliar a toxicidade da bupivacaína e TA, Syed et al. (48) realizaram cultura de condrócitos multicamadas, a partir de cartilagem obtida de três pacientes humanos que foram submetidos à artroplastia. A TA induziu condrotoxicidade no “plug” articular e na cultura de monocamada, ao passo que a bupivacaína induziu condrotoxicidade apenas na cultura de monocamada. Por sua vez, a combinação bupivacaína e TA não propiciou a morte adicional de condrócitos.

Ácido hialurônico e corticosteroides

Em cavalos com artrite traumática e osteoartrite, tem sido frequentemente utilizado o AH e a TA por aplicação intra-articular, com o objetivo de proporcionar efeito anti-inflamatório potente imediato pelo corticosteroide aliado ao efeito benéfico do AH como fármaco osteoatrítico modificador de doença (34).

Zhang et al. (59) compararam os efeitos do tratamento do hidrogel de AH pré-combinado, com ou sem dexametasona, em modelo de osteoartrite induzida por ruptura do ligamento cruzado cranial em ratos, por meio de avaliações radiográficas, coloração da superfície articular com tinta da índia, coloração de Safranina-O e Fast Green, imunohistoquímica, H-E da membrana sinovial, PCRq-reversa para detectar mudanças na expressão gênica. Os autores concluíram que a combinação hidrogel de AH com dexametasona apresentou os melhores efeitos, tanto condroprotetor como anti-inflamatório.

Euppaya et al. (12) examinaram os efeitos da degradação da cartilagem pela TA em condrócitos caninos normais e de cães com osteoartrite, bem como os efeitos da degradação da cartilagem pela TA em combinação com AH de baixo peso molecular. A TA reduziu a viabilidade dos condrócitos, normais e osteoatríticos, de maneira concentração-dependente. Em explantes de cartilagem a TA aumentou a severidade do dano estrutural da cartilagem, com perda de condrócitos e de proteoglicano na cartilagem osteoartrítica. O acréscimo de AH diminuiu a condrotoxicidade da TA

apenas nos condrócitos normais, verificada pela viabilidade dos condrócitos. Segundo os autores, o uso de TA sozinha ou em combinação com AH em condições de osteoartrite é preocupante, uma vez que pode levar à destruição da cartilagem.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cartilagem articular, juntamente com o líquido sinovial, têm papel mecânico importante nas articulações diartrodiais. Os condrócitos estão entre os principais componentes da cartilagem articular e são apontados como células altamente diferenciadas com capacidade limitada de proliferação e migração. O outro componente é a matriz extracelular constituída de colágeno tipo II, proteoglicanos, proteínas não colagenosas, glicoproteínas, água e eletrólitos. A osteoartrite é classificada como doença articular não inflamatória, com múltiplas interações bioquímicas e biomecânicas. Todos os componentes da articulação podem ser comprometidos, porém a cartilagem é considerada o tecido alvo. A afecção pode ser classificada como primária, que ocorre predominantemente em animais idosos, e secundária, decorrente de doenças que afetam a articulação e as estruturas de suporte. Entre os tratamentos intra-articulares para a osteoartrite estão a viscosuplementação com ácido hialurônico, o uso de corticosteroides, e a combinação de ácido hialurônico e corticosteroides. Contudo, há ainda várias controvérsias quanto à eficácia.

REFERÊNCIAS

1. An YH, Martin KL. Handbook of histology methods for bone and cartilage. New York: Springer Science & Business Media; 2003. 588p.
2. Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. Birth Defects Res C Embryo Today. 2003;69:144-155.
3. Bastow ER, Byers S, Golub SB, Clarkin CE, Pitsillides AA, Fosang AJ. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. CMLS. 2008;3:395-413.
4. Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. Cochrane Database Syst Rev. 2006; 2:CD005328.
5. Borrelli Jr J, Ricci WM. Acute effects of cartilage impact. Clin Orthop Relat Res. 2004;423:33-39.
6. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. Science. 1998;280:1455-1457.
7. Carranza-Bencano A, García-Paino L, Armas PJr A, Cayuela DA. Neochondrogenesis in repair of full-thickness articular cartilage defects using free autogenous periosteal grafts in the rabbit. A follow-up in six months. Osteoarthr Cartil. 2000;8:351-358.

8. Cooper C, Dennison E, Edwards M, Litwic A. Epidemiology of osteoarthritis. *Medicographia*. 2013;35:145-151.
9. De Campos GC, Rezende MU, Pailo AF, Frucchi R, Camargo OP. Adding triamcinolone improves viscosupplementation: a randomized clinical trial. *Clin Orthop Relat Res*. 2013;471:613-620.
10. DeCamp CE, Johnston SA, Déjardin LM, Schaefer SL. *Handbook of small animal orthopedics and fracture repair*. St. Louis: Elsevier; 2016.
11. Decker RS, Koyama E, Pacifici M. Genesis and morphogenesis of limb synovial joints and articular cartilage. *Matrix Biol*. 2014;39:5-10.
12. Euppayo T, Siengdee P, Buddhachat K, Pradit W, Chomdej S, Ongchai S, et al. In vitro effects of triamcinolone acetonide and in combination with hyaluronan on canine normal and spontaneous osteoarthritis articular cartilage. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016;52:723-735.
13. Eyre Dr, Wu JJ. Collagen structure and cartilage matrix integrity. *J Rheumatol Suppl*. 1995;43:82-85.
14. Fox SM. *Chronic pain in small animal medicine*. Boca Raton: CRC Press; 2009.
15. Goldberg VM, Goldberg L. Intra-articular hyaluronans: the treatment of knee pain in osteoarthritis. *J Pain Res*. 2010;3:51-56.
16. Goldring MB. Articular cartilage degradation in osteoarthritis. *HSS J*. 2012;8:7–9.
17. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23:471–478.
18. Goodrich LR, Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse—a review. *Vet J*. 2006;171:51-69.
19. Hartmann C, Tabin CJ. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*. 2001;104:341-351.
20. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci*. 1994;107:17-27.
21. Iwamoto M, Higuchi Y, Koyama E, Enomoto-Iwamoto M, Kurisu K, Yeh H, et al. Transcription factor ERG variants and functional diversification of chondrocytes during limb long bone development. *J Cell Biol*. 2000;150:27-40.
22. Jüni P, Hari R, Rutjes AW, Fischer R, Silleta MG, Reichenbach S, et al. Intra-articular corticosteroid for knee osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;22: CD005328.

23. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7:33-42.
24. Kisiday JD, Jin M, Dimicco MA, Kurz B, Grodzinsky AJ. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. *J Biomech*. 2004;37:595-604.
25. Kogan G, Šoltés L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*. 2007;29:17-25.
26. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development*. 2015;142:817-831.
27. Lanzer WL, Komenda G. Changes in articular cartilage after meniscectomy. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;252:41-48.
28. Lizarraga G, Lichtler A, Upholt WB, Kosher RA. Studies on the role of Cux1 in regulation of the onset of joint formation in the developing limb. *Dev Biol*. 2002;243:44-54.
29. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:1697-1707.
30. Longobardi L, Li T, Tagliafierro L, Temple JD, Willcockson HH, Ye P, et al. A. Synovial joints: from development to homeostasis. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13:41-51.
31. Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1-10.
32. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2004;12:S31–S33.
33. Maxie G. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. St. Louis: Saunders Ltd.; 2015.
34. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res*. 2012;1:297-309.
35. McIlwraith CW. The use of intra-articular corticosteroids in the horse: What is known on a scientific basis? *Equine Vet J*. 2010;42:563-571.
36. Mcgeady TA, Quinn PJ, Fitzpatrick ES, Kilroy D, Ryan MT, Lonergan P. *Veterinary Embryology*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2017.
37. Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013; 39:1–19.

38. Nüesch E, Trelle S, Reichenbach S, Rutjes AW, Tschannen B, Altman DG, et al. Small study effects in meta-analyses of osteoarthritis trials: meta-epidemiological study. *BMJ*. 2010;341:c3515.
39. Oshin AO, Stewart MC. The role of bone morphogenetic proteins in articular cartilage development, homeostasis and repair. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2007; 20:151-158.
40. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005;75:237-248.
41. Pekarek B, Osher L, Buck S, Bowen M. Intra-articular corticosteroid injections: a critical literature review with up-to-date findings. *Foot*. 2011; 21:66-70.
42. Pitsillides AA, Beier F. Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7:654–663.
43. Rezende MUD, Campos GCD. Viscosupplementation. *Rev Bras Ortop*. 2012;47:160-164.
44. Rezende MUD, Gobbi RG. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. *Rev Bras Ortop*. 2009;44:14-19.
45. Rezende UM, Hernandez AJ, Camanho GL, Amatuzzi MM. Articular cartilage and osteoarthrosis. *Acta Ortop Bras*. 2000;8:100-104.
46. Sanchez-Adams J, Leddy HA, McNulty AL, O'Connor CJ, Guilak F. The mechanobiology of articular cartilage: bearing the burden of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2014;16:451.
47. Sanderson RO, Beata C, Flipo R-M, Genevois J-P, Macias C, Tacke S, et al. Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet Rec*. 2009;164:418-424.
48. Syed HM, Green L, Bianski B, Jobe CM, Wongworawat MD. Bupivacaine and triamcinolone may be toxic to human chondrocytes: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res*. 2011; 469:2941-2947.
49. Silva EF, Macagnan KL, Ferrúa CP, Severo RF, Demarco, FF, Nedel F. Engenharia tecidual de cartilagem articular com ênfase em odontologia. *RFO UPF*. 2015;20:372-379.
50. Souza MV. Osteoarthritis in horses – Part 2: a review of the intra-articular use of corticosteroids as a method of treatment. *Braz Arch Biol Technol*. 2016;59:1-10.
51. Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGFβ-superfamily. *Nature*. 1994;368:639-643.

52. Storm EE, Kingsley DM. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol.* 1999;209:11-27.
53. Torrance GW, Raynauld JP, Walker V, Goldsmith CH, Bellamy N, Band PA. A prospective, randomized, pragmatic, health outcomes trial evaluating the incorporation of hylan GF 20 into the treatment paradigm for patients with knee osteoarthritis (Part 2 of 2): economic results. *Osteoarthr Cartil.* 2002;10:518-527.
54. Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:4197-4211.
55. Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14:1237-1247.
56. Watterson JR, Esdaile JM. Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000; 8:277-284.
57. WHO. World health organization. Osteoarthritis (2013). Disponível em: https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjejfzV3MXWAhWGkZAKHRRaA1IQFggnMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fmedicines%2Fareas%2Fpriority_medicines%2FCh6_12Osteo.pdf&usg=AFQjCNFgCFIcAQtMaKgJwSP3JA7gBwh6nQ. Acessado em 15 de janeiro de 2017.
58. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15: 981-1000.
59. Zhang Z, Wei X, Gao J, Zhao Y, Zhao Y, Guo L. Intra-articular injection of cross-linked hyaluronic acid-dexamethasone hydrogel attenuates osteoarthritis: an experimental study in a rat model of osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2016;17:411.
60. Zulian F, Martini G, Gobber D, Agosto C, Gigante C, Zacchello F. (). Comparison of intra-articular triamcinolone hexacetonide and triamcinolone acetonide in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology.* 2003;42:1254-1259.

CAPÍTULO 3

Trabalho científico 2

Artigo redigido segundo as normas da Cell Biology International.

<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/%28ISSN%291095-8355/homepage/ForAuthors.html>

POTENCIAL DO ÁCIDO HIALURÔNICO E TRIANCINOLONA ACETONIDA, ISOLADOS E COMBINADOS, NA DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Potential of hyaluronic acid and triamcinolone acetate isolated or combined in chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells

Ocampo Pablo E¹, Vallejo Viviana H², Montoya Luis M⁴, Rocha Noeme S³, Landim-Alvarenga Fernanda da C², Rahal Sheila C¹.

1. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu, SP, Brasil.
2. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu, SP, Brasil.
3. Departamento de Clínica Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu, SP, Brasil.
4. Departamento de Salud Animal - Universidad de Caldas - Manizales, Colombia.

Título abreviado: Ácido hialurônico e triancinolona acetona na diferenciação condrogênica

Dados de correspondência: Sheila Canavese Rahal - Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n. Bairro: Unesp Campus de Botucatu - Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária- FMVZ - UNESP - Botucatu, SP, Brasil. Tel: +5514981581327. E-mail: sheilacr@fmvz.unesp.br

Palavras-chaves: Condrócitos, corticosteroides, osteoartrite, viscosuplementação

List of abbreviations:

AH	Ácido Hialurônico
AH/TA	Ácido Hialurônico/Triancinolona Acetonida
CTMs	Célula-Tronco Mesenquimal
GAGs	Glicosaminoglicanos
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
MEC	Matriz Extracelular
OA	Osteoartrite
TA	Triancinolona Acetonida
TNF	Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

O presente estudo teve por objetivos avaliar o comportamento do ácido hialurônico (AH) e da triancinolona acetona (TA), utilizados de forma isolada ou combinada, no processo de diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais (CTM) *in vitro*. Para isso foram utilizadas CTMs equinas na terceira passagem. Os pellets de CTMs foram divididos equitativamente, sendo estabelecido quatro grupos, cada um com três amostras: Controle, AH, TA e AH/TA. O cultivo foi mantido por 14 dias. O potencial de diferenciação condrogênica foi avaliado por meio de avaliações histológica e imunohistoquímica. Histomorfologicamente o grupo AH/TA e, mais especificamente no AH, as células apresentaram características semelhantes às do condrocito, porém o grupo TA apresentou matriz extracelular compacta e organizada. Nos grupos controle, TA/AH e TA as células não apresentaram morfologia similar a condrocito. A produção de GAG foi intensa para o Grupo Controle, moderada para o AH/TA e TA, e mínima para o grupo AH. No dia 14, nenhum grupo teve marcação superior para colágeno tipo II quando comparada com o controle, porém as células marcadas do grupo TA tiveram uma porcentagem maior que os outros grupos de células intensamente marcadas. A matriz extracelular dos grupos TA teve marcação mais intensa para colágeno tipo II do que os grupos HA, TA/AH e controle, sendo o grupo TA o mais intensamente marcado. Foi possível concluir pela análise histológica que o AH estimulou morfologia similar a condrocito nos diferentes grupos, porém com baixa expressão de moléculas específicas de cartilagem; a TA potencializou a formação de uma matriz extracelular mais compacta e organizada com maior porcentagem de células marcadas para colágeno tipo II.

Palavras-chaves: Condrócitos, corticosteroides, viscosuplementação, Osteoartrite

Introdução

A Osteoartrite (AO) tem impacto mundial, com significativa perda econômica tanto sobre a população animal, em especial nos cães e equinos, como também humana (Goodrich and Nixon, 2006; Fox, 2010; McIlwraith et al., 2012). Aproximadamente 20% de cães com mais de um ano de idade são afetados pela afecção (Sanderson et al., 2009). A doença se caracteriza pela degeneração da cartilagem articular com presença de fibrilação da matriz, fissura, ulceração e perda da espessura, porém outros tecidos articulares, como a membrana sinovial e o osso subcondral, participam na progressão da

OA (Martel-Pelletier, 2004; Kapoor et al., 2011; McIlwraith et al., 2012). A AO é considerada uma artropatia não inflamatória, visto a ausência de neutrófilos no líquido sinovial, porém com um componente inflamatório representado por desconforto, edema e rigidez articular, que são indicadores da sinovite (Goldring and Otero, 2011).

A etiologia da OA é considerada múltipla, com mecanismo bioquímicos, mecânicos e fatores genéticos, particularmente em pacientes humanos (Martel-Pelletier, 2004; Goldberg and Goldberg, 2010; Neogi and Zhang, 2013). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença podem ser citados o envelhecimento, com os condrócitos apresentando um fenótipo secretório senescente, e a obesidade, visto que as adipocinas contribuem para o estado inflamatório de baixo grau alterando a homeostase da cartilagem (Goldring and Otero, 2011; Neogi and Zhang, 2013). Em equinos jovens, o trauma e a sinovite concomitante são fatores importantes na etiologia da doença (Goodrich and Nixon, 2006). Há hipóteses que o desenvolvimento da AO inclui a quebra da matriz cartilaginosa pelas enzimas proteolíticas, tais como metaloproteinases e agreganases, produzidas pelos condrócitos (Martel-Pelletier, 2004; Goldring and Otero, 2011). Com isso são observadas quantidades aumentadas de fragmentos de matriz dentro do fluído sinovial, que levam a inflamação da membrana pela síntese de mediadores, tais como as citocinas pró-inflamatórias, em particular IL-1 β , TNF e IL-6 (Martel-Pelletier, 2004; Kapoor et al., 2011).

O tratamento da OA é desafiador, já que precisa controlar a inflamação e prevenir o dano, ou promover o reparo da cartilagem, minimizando as mudanças degenerativas, de forma a obter as propriedades da cartilagem original (Goodrich and Nixon, 2006; Goldring, 2012). Visto no momento não existir uma terapêutica curativa, as metas são o controle da dor e a melhora da função articular (Kapoor et al., 2011; McIlwraith et al., 2012).

Entre as opções de tratamento farmacológico podem ser citados os anti-inflamatórios não esteroidais, os analgésicos e a administração local de corticosteroides e ácido hialurônico (viscossuplementação) (Goldberg and Goldberg, 2010; Kapoor et al., 2011). Os corticosteroides intra-articulares são considerados potentes agentes anti-inflamatórios que suprimem a resposta imune, porém seu uso em animais, particularmente nos equinos, como em pacientes humanos, ainda é bastante controverso, visto os possíveis efeitos deletérios na cartilagem (Goodrich and Nixon, 2006; McIlwraith, 2010; Pekarek et al., 2011; McIlwraith et al., 2012).

Por sua vez, o uso intra-articular do ácido hialurônico (AH) na articulação osteoartrítica tem aumentado (Goodrich and Nixon, 2006; Goldberg and Goldberg, 2010;

Legré-Boyer, 2015). O exato mecanismo de ação a nível celular não é totalmente conhecido (Goodrich and Nixon, 2006; Goldberg and Goldberg, 2010), porém há redução da dor pelos efeitos nos receptores de dor periférica, impacto no tecido sinovial e propriedades viscoelásticas do fluído sinovial (Goldberg and Goldberg, 2010). Há citações de efeito anti-inflamatório pela quimiotaxia reduzida e fagocitose de neutrófilos ativados pela interação do AH e receptores celulares CD44, além da síntese aumentada de AH de alto peso molecular pelos sinoviócitos (Goodrich and Nixon, 2006). Adicionalmente, existem propostas de uso combinado do corticosteroides e AH, com o intuito de obter a ação anti-inflamatória imediata do corticosteroide e o efeito condroprotetor a longo prazo do AH (McIlwraith, 2010; McIlwraith et al., 2012; Legré-Boyer, 2015).

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivos avaliar o comportamento do AH e da TA, utilizados de forma isolada ou combinada, no processo de diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais (CTM) *in vitro*.

A hipótese é que a aplicação de AH e TA promove melhor diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais equinas *in vitro*, quando comparadas com o controle.

Material e método

A metodologia adotada no presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu, protocolo número CEUA 0049/2017.

Obtenção de células-tronco mesenquimais

Foram utilizadas CTMs equinas de um só animal, pertencentes ao banco celular do Laboratório de Terapia Celular e Fertilização *in Vitro* (LANÇA-UNESP-FMVZ-Botucatu, SP) previamente caracterizadas por citometria de fluxo utilizando um citometro FACS Calibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) com os seguintes anticorpos: CD90-FITC, CD34-FITC, CD105-FITC, CD44 e MHC II. Como marcador secundário foi usado IgG-FITC. Os protocolos usados foram descritos pelos fabricantes.

Descongelamento e cultivo das células

As CTMs foram rapidamente descongeladas a temperatura de 37,5°C. Um tubo falcon de 15mL, contendo 9 mL de meio de manutenção, foi previamente aquecido e o conteúdo do criotubo foi adicionado. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 600xG durante

5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuspendido em 2 mL de meio de manutenção. Após determinar a concentração e a viabilidade utilizando Tripan blue 0,4%, as células foram semeadas em garrafas de 250mL (175 cm²), contendo aproximadamente 1×10^6 células por garrafa. Por ultimo 15 ml de meio de manutenção foram adicionados nas garrafas e levadas na a estufa.

Avaliação do tamanho do “pellet” e curva de crescimento

Para determinar se o tamanho do “pellet” final é suficiente para as posteriores análises, foram adicionadas duas concentrações diferentes de células, 1×10^5 e 5×10^5 CTMs, por microtubos de 1,5mL. O volume foi ajustado com meio de manutenção até completar 250uL e as amostras foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, durante dois dias. Após 48 horas, o pellet foi fixado e cortado para análises histológicas.

A curva de crescimento foi realizada com CTMs em P3 e foi feita para determinar o dia adequado para começar a diferenciação condrogenica. Estas células foram tripsinizadas, lavadas e a concentração foi determinada. Em duas placas de 6 poços (Sarstedt, USA) foram semeadas duas concentrações diferentes de células. Na primeira placa foi adicionada concentração de 2.000 células por poço e na segunda concentração de 10.000 células por poço, preenchendo em cada placa todos os poços. O volume de cada poço foi ajustado com meio de manutenção até obter 1,5mL. As células foram então cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 12 dias, realizando troca de meio a cada 48 horas. Para a obtenção da curva foi realizada a contagem de dois poços (um de cada concentração) a cada dois dias, utilizando a prova de viabilidade e concentração celular com coloração Azul de Tripan na câmara de Neubauer. Este procedimento foi feito igualmente até terminar com o último poço aos 12 dias de cultivo. Os dados obtidos foram anexados em um gráfico de crescimento, no programa Excel, para avaliar o comportamento celular durante este período.

Diferenciação condrogênica 3D em micro tubo

As CTMs/P3 foram adicionadas em 12 micros tubos na concentração de 5×10^5 cel/microtubo. O dia zero (D0) foi o momento que foi adicionado o meio de diferenciação ao pellet. Foram estabelecidos quatro grupos, cada um com três amostras, que foram cultivadas por 14 dias: Grupo Controle (C), Grupo Ácido hialurônico (AH), Grupo Triancinolona acetônida (TA), Grupo Ácido hialurônico e Triancinolona acetônida (AH/TA)

(Tabela 1). As concentrações dos fármacos foram baseadas em estudos previos (Siengdee et al., 2015; Wernecke et al., 2015).

As CTMs/P3 já divididas nos 12 microtubos (5×10^5 cel/microtubo), foram cultivadas por 48 horas com meio de manutenção e após esse tempo esse meio foi trocado por meio de diferenciação condrogênica StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco™ A1007101 Lifetech/Invitrogen), contendo StemPro® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium e o StemPro® Chondrogenesis Supplement. A preparação 9:1, respectivamente, foi realizada segundo recomendações do fabricante. Além disso, foi suplementado com anfotericina B 1,2% e penicilina/estreptomicina 1,5%, juntamente com os respectivos tratamentos.

Tabela 1 Grupos de tratamentos efetuados em culturas de células-tronco mesenquimais equinas, conforme o período de avaliação.

Grupos*	Dia 14
Controle	Meio de diferenciação (MD)
Ácido hialurônico	MD+ 2,5 mg/mL (Siengdee et al., 2015)
Ácido hialurônico + Triancinolona	MD+ 2,5 mg/mL (Siengdee et al., 2015)+ 0,2 mg/mL (Wernecke et al., 2015)
Triancinolona	MD + 0,2 mg/mL (Wernecke et al., 2015)

*Triplicata em cada grupo

A cada microtubo foi adicionada uma concentração de 5×10^5 células para 500 μ L de meio de diferenciação e seu respectivo tratamento. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 600xG, posteriormente levadas para incubação na estufa (ThermoFisher) com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. O tempo de incubação foi de 14 dias. O meio de diferenciação com os tratamentos foi trocado a cada 72 horas. O procedimento de diferenciação e troca de meio foi realizado em condições de pouca luz, devido à sensibilidade do meio.

Avaliação histológica e imunohistoquímica

Terminado o tempo de incubação dos grupos, foi realizada a fixação de cada “pellet”. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi fixado em 1,5 mL de formalina tamponada, durante três horas a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi eliminado e o “pellet” adicionado em álcool 70% por um período de 24 horas. As amostras foram submetidas ao processo de desidratação em sucessivas diluições crescentes de etanol, diafanização, parafinização e corte no micrótomo com uma espessura de 3 μ m. Para a

técnica imunohistoquímica foram utilizadas lâminas carregadas (Knittel glass). Os cortes foram submetidos às colorações de Hematoxilina-eosina, Alcian blue e Azul de Toluidina, bem com a imunohistoquímica para colágeno tipo II.

Hematoxilina-eosina

Primeiro os cortes foram desparafinizados e hidratados, deixados em hematoxilina entre 5 e 15 min, lavados em água corrente por 10min e mergulhados em eosina por 5 minutos. Posteriormente foi feita uma lavagem em água e desidratados em álcool 70%. Os núcleos das células em geral se coram de azul pela hematoxilina e o citoplasma de cor rosa em diferentes intensidades.

Alcian blue

Se utilizaram duas soluções, a solução de Alcian Blue e a solução de descoloração. Na primeira solução foi dissolvido 10 gramas de Alcian Blue em uma mistura de 60 ml de etanol absoluto e 40 ml de ácido acético. Na segunda solução foi misturado 120 ml de etanol absoluto com 80 ml de ácido acético. As lâminas com os cortes histológicos de cada grupo foram submetidas a uma lavagem cuidadosamente com PBS; após isso foi adicionado 10% de formalina e deixados 1 hora em temperatura ambiente. Foram lavadas com água destilada e a solução Alcian Blue foi adicionada até cobrir as amostras e deixadas “overnight” em temperatura ambiente no escuro. No dia seguinte a solução Alcian Blue foi retirada e as amostras lavadas duas vezes com solução de descoloração por 20 minutos. Cuidadosamente foi retirada a solução e 1 ml de PBS foi colocado. Os agregados de cartilagem se coram em azul.

Azul de toluidina

Os cortes foram fixados, desidratados e colocados em lâminas. Uma vez fixados em lâmina, foram corados por 30 segundos com Azul de Toluidina para avaliar a produção de matriz extracelular, com ajuda de microscopia de luz. A matriz extracelular se cora de roxo.

Imunohistoquímica

O potencial condrogênico foi avaliado usando o anticorpo para colágeno II, mediante técnica imunohistoquímica. Pelas instruções do fabricante esse marcador permite identificar colágeno tipo II no nível citoplasmático e na MEC (Anti-Collagen II

ab34712, Abcam). Lâminas carregadas contendo as células foram desparafinizadas na estufa a 60°C por 30 minutos. Após esta etapa, foram submetidas a uma bateria de hidratação, passando por xilol até álcool em diferentes concentrações por 5 minutos, e lavadas com água. Para a recuperação antigênica e o bloqueio da peroxidase endógena, foi utilizado tampão citrato com pH 6. Este foi colocado no micro-ondas até ferver e, em seguida, adicionado nas lâminas e deixado até obter a temperatura ambiente. Uma vez esfriado, foram lavadas por 10 minutos no escuro com uma solução de 3% de peróxido e após lavadas com PBS. Para o bloqueio da interação inespecífica, as amostras foram refrigeradas “overnight” numa solução a 3% de leite desnatado.

No dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo primário, numa diluição já testada de 1:100 com BSA. As lâminas foram colocadas em câmara úmida com 100 µl da diluição do anticorpo, ou até cobrir completamente as amostras, para não sofrer o “efeito de borda”; as lâminas foram refrigeradas por 12 horas. No terceiro dia foram feitas 3 lavagens com PBS por 5 minutos. Após foi adicionado o anticorpo secundário (goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2030) na diluição 1:300 e deixados na geladeira por 1 hora e 30 minutos. Uma vez passado esse tempo foram lavadas 3 vezes com PBS. No escuro foi colocado peróxido de hidrogênio para magnificar a reação junto com Diaminobenzidina (DAB DAKO K3468® Carpintería EU), e lavadas com água destilada. Este processo foi feito lâmina por lâmina para garantir o tempo da revelação. Por último foi feita a contra coloração com Hematoxilina de Meyer, deixando as lâminas mergulhadas por 4 minutos nesse colorante. O último passo foi a montagem das lâminas, para a análise microscópica.

As amostras foram avaliadas por método semiquantitativo da seguinte forma: 1 = < 25% de células marcadas; 2 = 26-50 %; 3 = 51-75 % e 4 = >75 %; que respectivamente foram considerados como, 1 = não marcado; 2 = marcação levemente; 3 = marcação moderado, e 4 = marcação intensa. Para isso foi contado o total de células de 5 campos avaliados aleatoriamente (Tabela 3). As imagens foram capturadas com o microscópio óptico Carl Zeiss, LAb A1, Germany, na objetiva 40X, utilizando o software AxioVision 4.8. Em todos os casos a avaliação imunohistoquímica foi realizada de forma independente por dois avaliadores e os dados apresentados com o total das observações.

Análise Estatística

Para análise estatística dos dados, inicialmente foi verificada a confiabilidade das medidas realizadas em duplicata pelos avaliadores, empregando-se o teste t de Student

não pareado. Para comparação entre os quatro grupos do estudo empregou-se a análise de variância (ANOVA One way) para amostras independentes. As distribuições foram avaliadas pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Foi considerado o nível de significância de 5%. Para todas as estatísticas realizadas foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

Descongelamento e cultivo das células

Após descongelamento, a viabilidade médias das amostras foi superior a 80%, a aderência ao plástico da garrafa foi observada às 48 horas. A morfologia fibroblastóide das células foi visualizada em média com $4,8 \pm 1,30$ dias do cultivo e a confluência de 80% nas garrafas foi alcançada aos 11 dias de cultivo após congelamento.

Avaliação de “pellet” e curva de crescimento

No cultivo em placas, foi observado um crescimento exponencial do grupo que teve 2.000 células/poço até o sexto dia, quando atingiu uma fase de replicação mais lenta. No grupo de 10.000 células/poço o crescimento foi mais lento, com uma taxa de replicação mais rápida entre o sexto e décimo dia, sendo o pico de crescimento 12º dia (Figura 1).

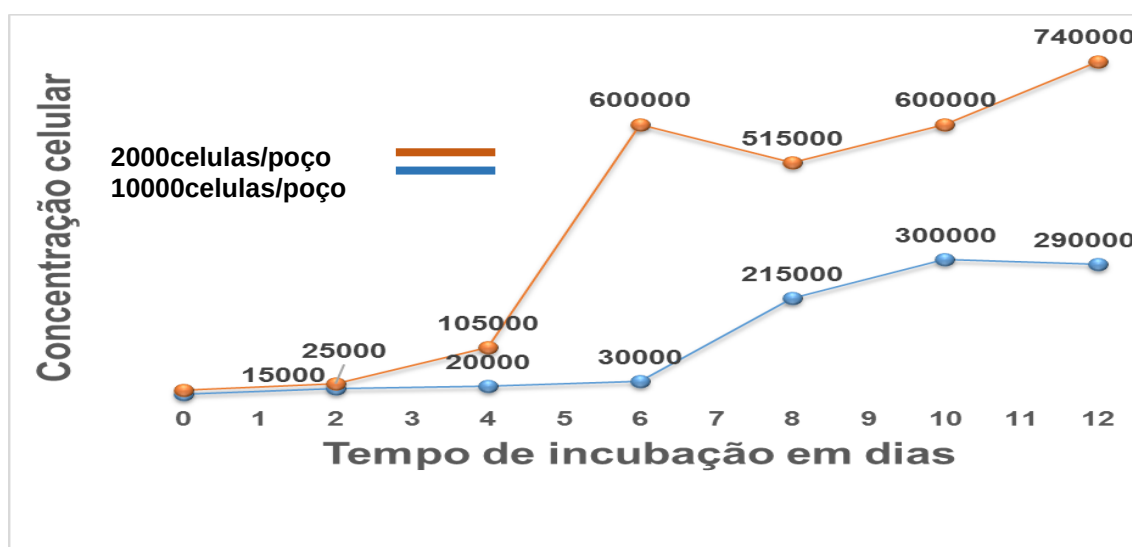


Figura 1 Curva de crescimento celular com células-tronco mesenquimais equinas em duas concentrações; 2.000 células/poço e 10.000 células/poço, por um tempo de incubação de 12 dias. A concentração celular foi determinada a cada 48 horas.

A formação de “pellet” em microtubos com concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 de CTMs foi avaliada macroscopicamente. Foi observado “pellet” difuso de aproximadamente 2 mm na primeira concentração, e “pellet” consistente de aproximadamente 4 mm na segunda concentração (Figura 2).

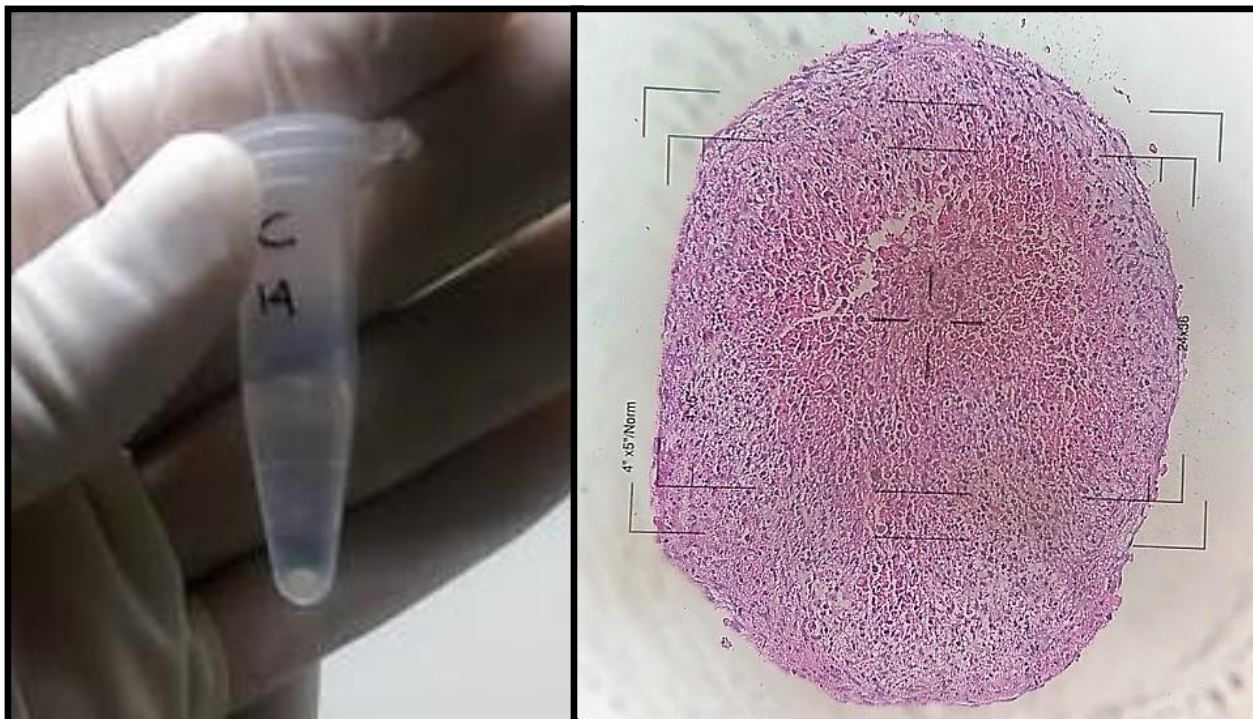


Figura 2 Vista macroscópica e microscópica (10X) do pellet obtido a partir da concentração de 5×10^5 células após 2 dias de cultivo com meio de manutenção.

Avaliação macroscópica da diferenciação condrogênica 3D em micro tubo

Nos grupos tratados com AH (AH e AH/TA) se evidenciou perda da conformação do “pellet”, que se espalhou no fundo do microtubos. No entanto, o grupo controle e o grupo TA mantiveram a formação compacta e homogênea do “pellet”. A partir do momento que foi iniciada a diferenciação não foi observado crescimento do “pellet” em nenhum grupo.

Avaliações histológica e imunohistoquímica

Histomorfologia

Foi possível detectar que a combinação AH/TA levou a um aumento na celularidade (Tabela 2) comparado com os outros grupos experimentais e controle. As células dos grupos controle e TA não apresentaram a morfologia similar a condrócito. No entanto, no grupo AH/TA e, mais especificamente no AH, as células mostraram características específicas de tecido articular, ou seja, células redondas presente dentro de uma lacuna. O formato redondo do núcleo predominou nas células dos grupos. A

matriz extracelular compacta e homogênea estava presente em maior quantidade nos grupos não tratados com HA (Figura 3).

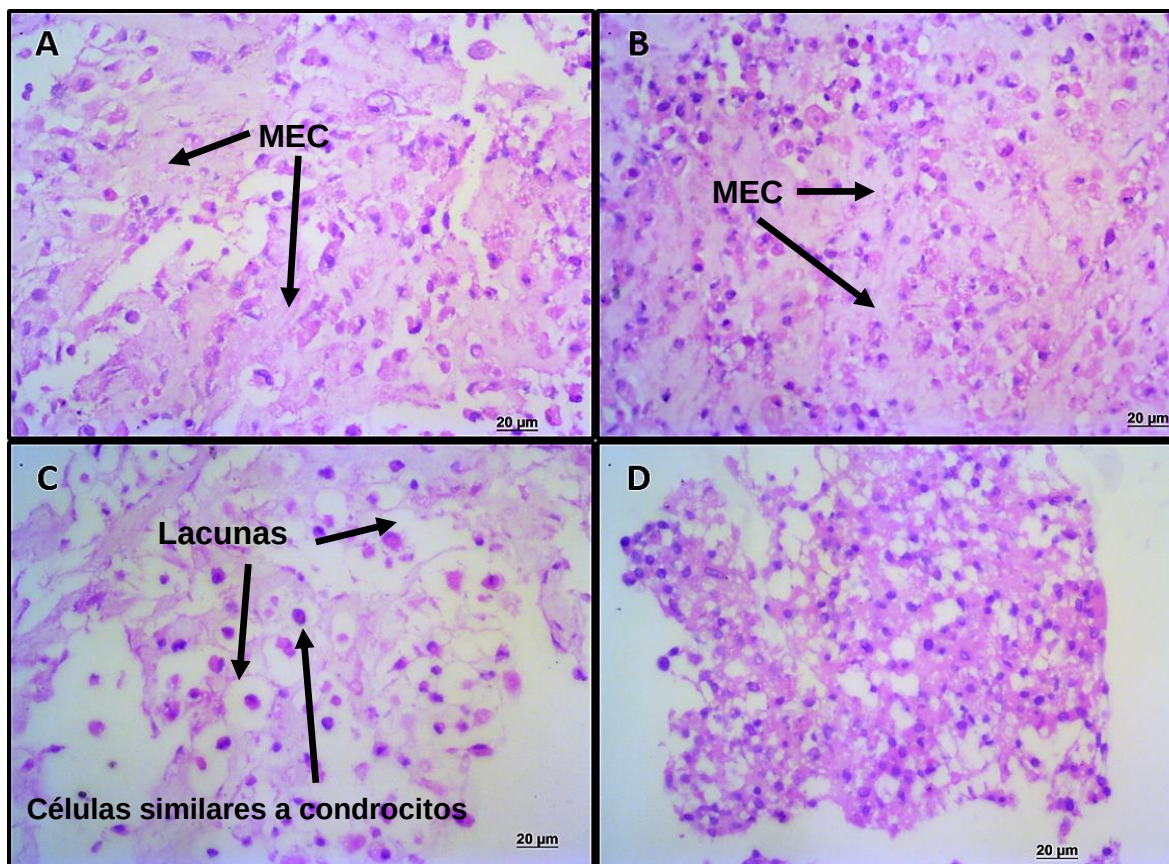


Figura 3 Células aos 14 dias de tratamento: (A) Grupo controle, mostrando a presença de matriz extracelular (MEC) entre células de aspecto fibroblastóide e poucas com forma arredondada; (B) Grupo triancinolona, com aumento da celularidade e presença de algumas células arredondadas com citoplasma eosinofílico e abundante MEC; (C) Grupo ácido hialurônico, com discreta quantidade celular e MEC. As células apresentam estrutura arredondadas dentro de lacunas; (D) Grupo ácido hialurônico-triancinolona com pouca MEC e células redondas dentro de algumas lacunas. H&E.

Glicosaminoglicanos

O grupo TA apresentaram produção moderada de glicosaminoglicanos (GAG) pelas duas colorações, quando comparado com o grupo controle. Os grupos experimentais TA/AH tiveram produção leve de GAG e o grupo AH não apresentou marcação para GAG. Por sua vez, o grupo controle reagiu intensamente para esta coloração, sugerindo presença de GAG ao redor das células. (Figura 4 e 5).

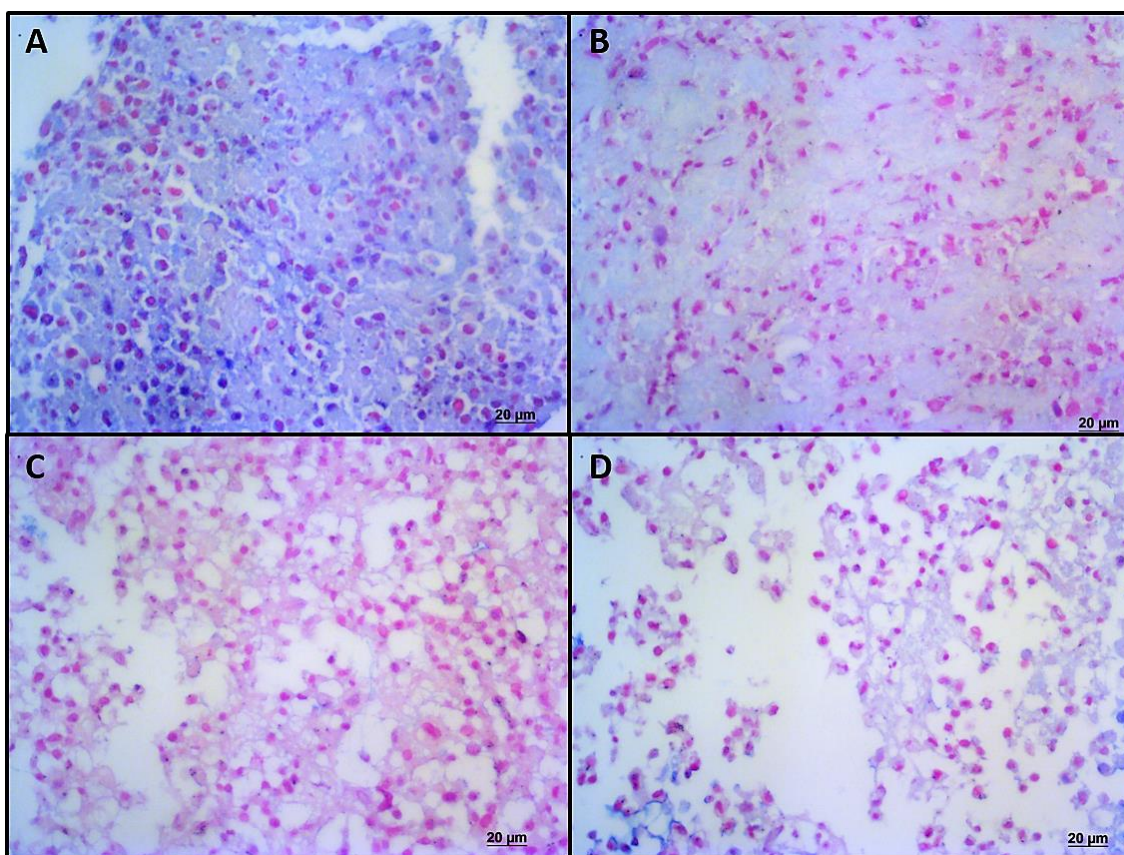


Figura 4 Células aos 14 dias de tratamento: (A) Grupo controle com produção de glicosaminoglicanos na matriz extracelular; (B) Grupo triancinolona com produção moderada de glicosaminoglicanos na matriz extracelular; (C) Grupo ácido hialurônico negativo para glicosaminoglicanos; (D) Grupo ácido hialurônico-triancinolona com produção leve de glicosaminoglicanos na matriz extracelular. Alcian Blue.

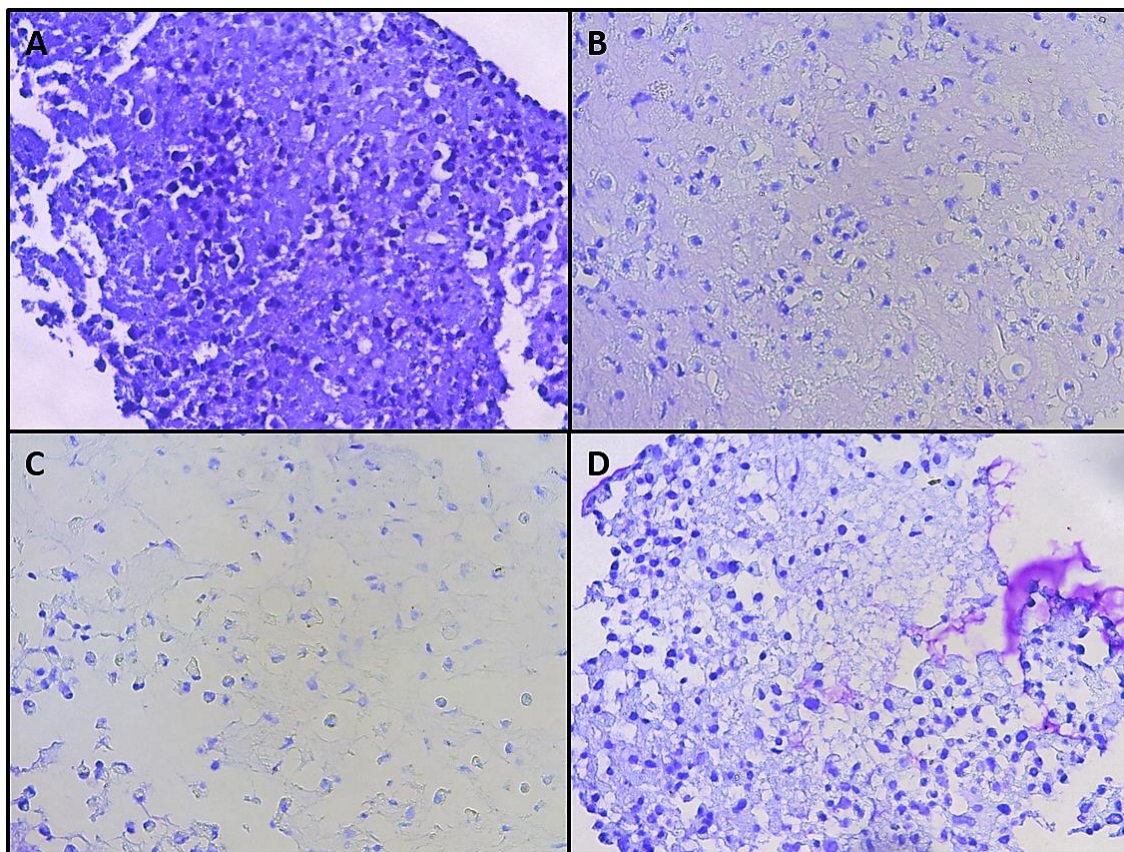


Figura 5 Células aos 14 dias de tratamento: (A) Grupo controle com produção de glicosaminoglicanos na matriz extracelular; (B) Grupo triancinolona com produção moderada de glicosaminoglicanos na matriz extracelular; (C) Grupo ácido hialurônico negativo para glicosaminoglicanos; (D) Grupo ácido hialurônico-triancinolona com produção leve de glicosaminoglicanos na matriz extracelular. Azul de Toluidina.

Imunohistoquímica

No dia 14, nenhum grupo experimental teve marcação intensa para colágeno tipo II no nível celular. No entanto, marcação leve foi observada no grupo TA e AH (Tabela 2). O grupo AH/TA foi considerado como não marcado (Tabela 3). De acordo com a quantidade de células marcadas, os grupos TA e AH tiveram um comportamento similar (Figura 6 e 7).. Das células marcadas para cada grupo o grupo TA teve a maior porcentagem de células marcadas intensamente quando comparado com os outros grupos.

A MEC dos grupos AH e AH/TA teve marcação mais intensa do que os grupos TA e controle, sendo o grupo TA intensamente marcado (Tabela 2 e Figura 8). Em todas as análises foi descartada marcação inespecífica.

Tabela 2 Avaliações imunohistoquímicas no 14º dia (celularidade, marcação e intensidade), conforme grupos de tratamento.

Grupos	Celularidade (#)	Marcação (%)		Intensidade da marcação (%)			Int. MEC 1: pouca 5: intensa
		(+)	(-)	Leve	Moderada	Intensa	
Controle	1041	51.2 (533.5)	48.7 (507.5)	28 (292.5)	16.9 (176)	6.2 (65)	2.3
Triancinolona	744.5	46.4 (346)	53.5 (398.5)	31.2 (232.5)	8.1 (61)	7 (52.5)	2.2
Ácido hialurônico	534.5	31 (166)	68.9 (368.5)	23.1 (124)	6.3 (34)	1.4 (8)	2.9
Ácido hialurônico +Triancinolona	1156	22.7 (262.5)	77.2 (893.5)	17.3 (200.5)	4.3 (50.5)	0.9 (11.5)	3.4

Int. MEC = intensidade da Matriz Extracelular

Tabela 3 Método semiquantitativo para a obtenção da marcação imunohistoquímica de cada grupo experimental, aos 14 dias de tratamento.

Grupos	% DE MARCAÇÃO	MARCAÇÃO
Controle	51.2 = 3 (51-75%)	Marcação moderada
Triancinolona	46.4 = 2 (26-50%)	Marcação leve
Ácido hialurônico	31 = 2 (26-50%)	Marcação leve
Ácido hialurônico +Triancinolona	22.7 = 1 (1-25%)	Não marcada

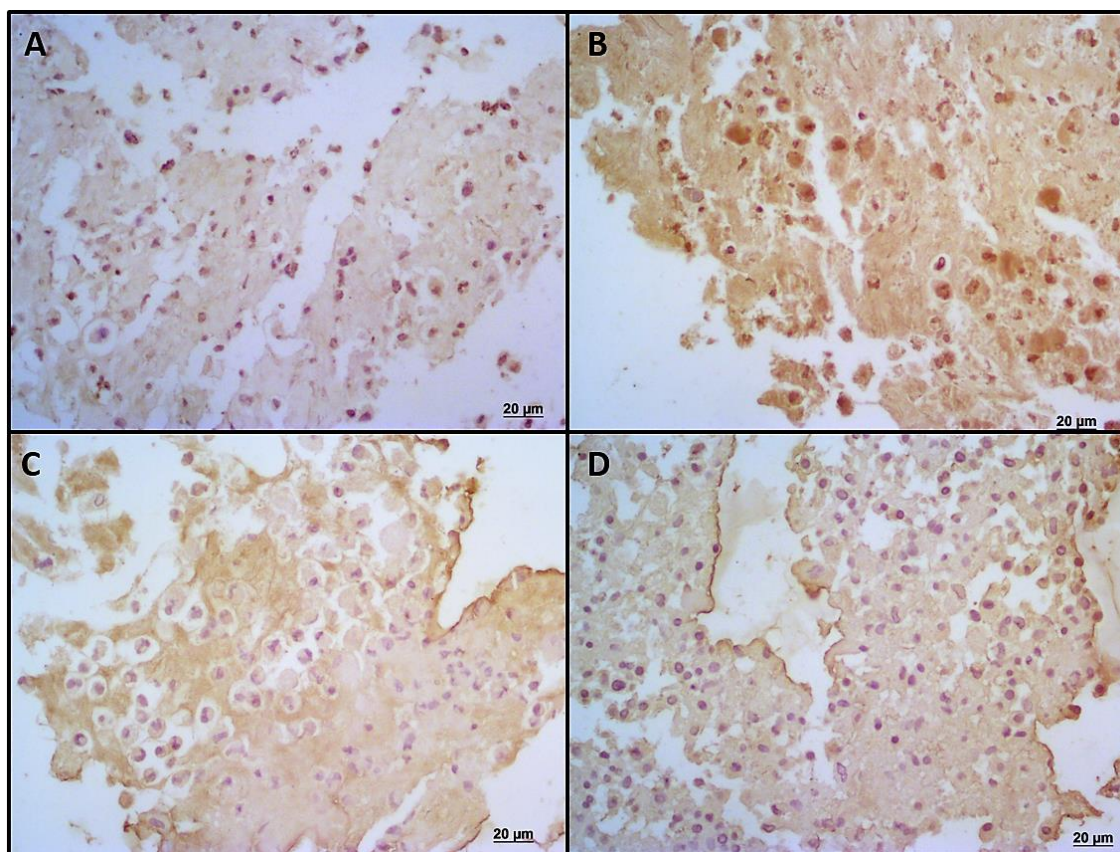


Figura 6 imunohistoquímica dos grupos para colágeno tipo II na marcação citoplasmática. (A) Grupo controle com moderada porcentagem de marcação (B) Grupo triancinolona com algumas células intensamente marcadas, (C) Grupo ácido hialurônico com leve porcentagem de células de marcadas (D) e, Grupo ácido hialurônico-triencinolona considerado como não marcado.

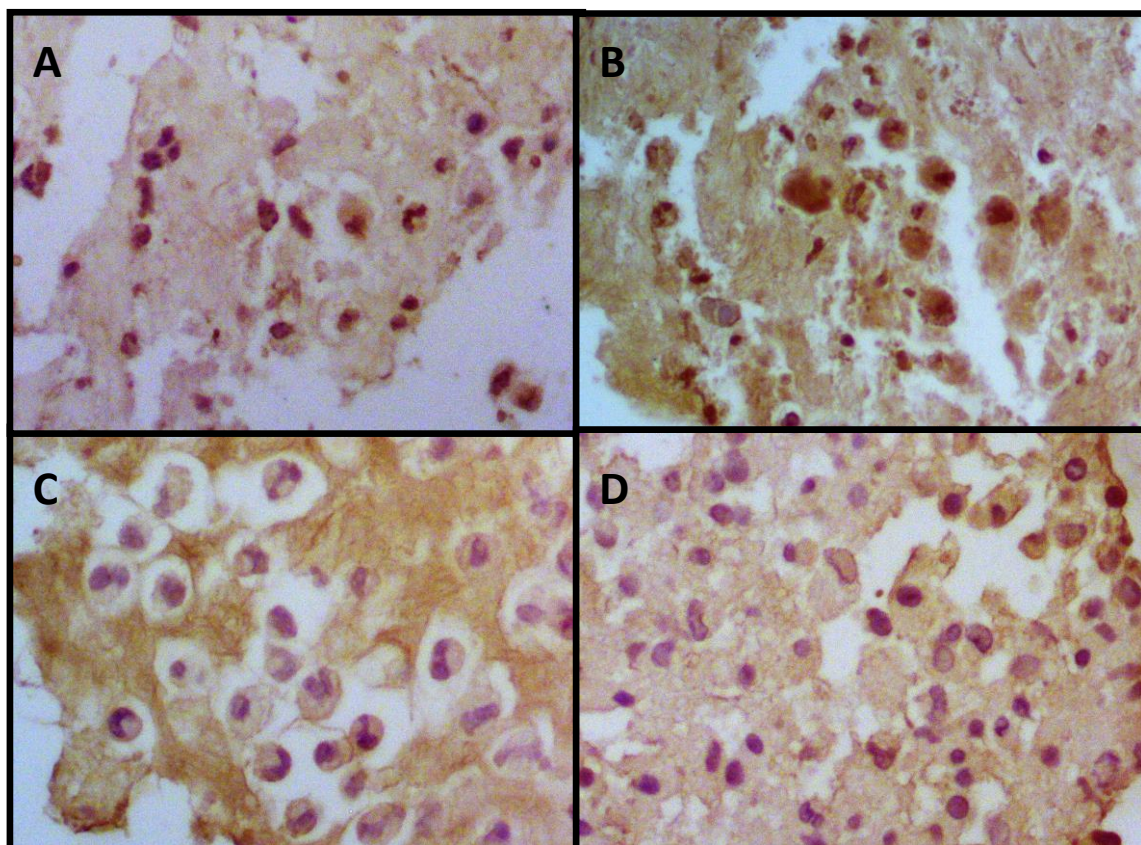


Figura 7 Imunohistoquímica para os grupos em maior aumento para colágeno tipo II na marcação citoplasmática. (A) Grupo controle com moderada porcentagem de marcação (B) Grupo triancinolona com células intensamente marcadas, (C) Grupo ácido hialurônico com leve porcentagem de células de marcadas, e (D) Grupo ácido hialurônico-triancinolona considerado como não marcado.

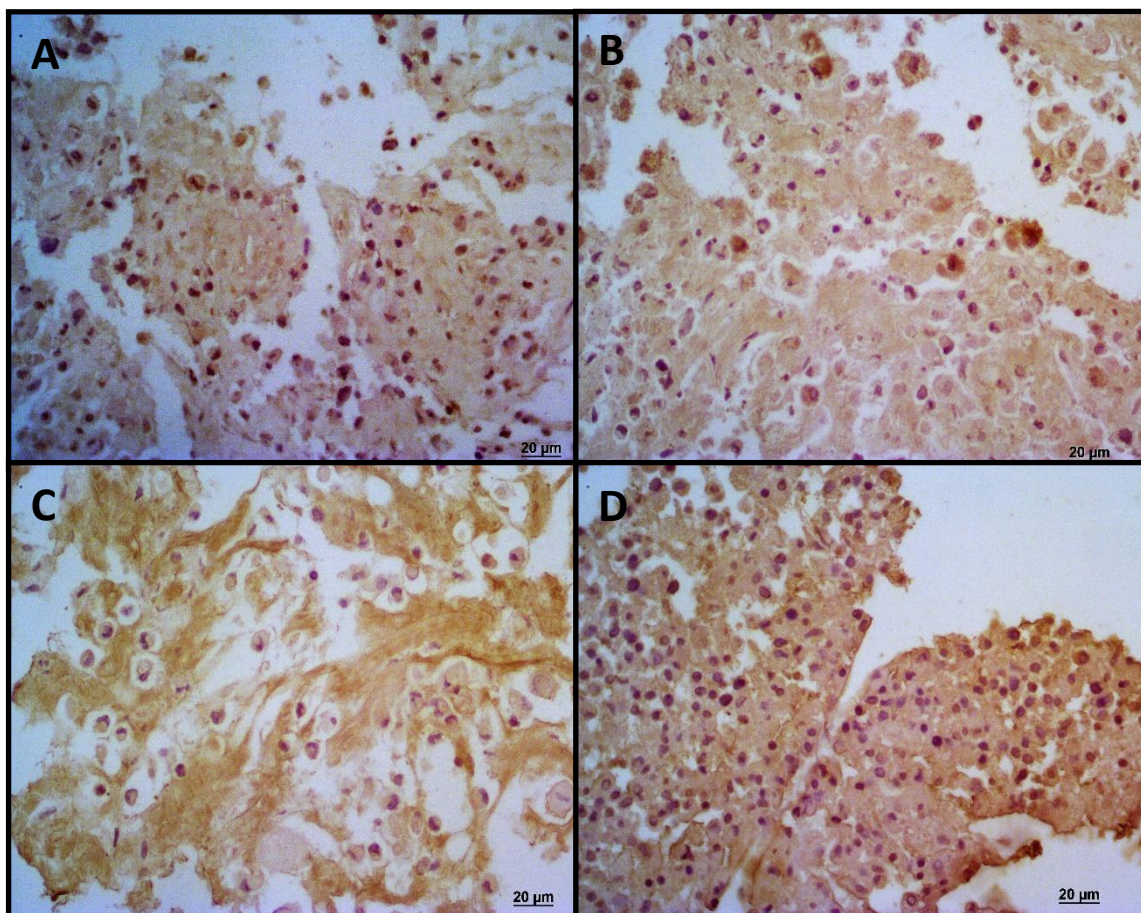


Figura 8 Imunohistoquímica dos grupos comparando a intensidade da marcação na matriz extracelular (MEC) para colágeno tipo II. (A) Grupo controle com marcação leve na MEC, (B) Grupo triancinolona com marcação leve na MEC, (C) Grupo ácido hialurônico com marcação moderada na MEC, (D) Grupo triancinolona-ácido hialurônico com marcação intensa na MEC.

Discussão

Há vários modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* para o teste de fármacos de uso intra-articular, cada qual com suas vantagens e desvantagens (Jo et al., 2014; Mak et al., 2016; Grodzinsky et al., 2017). No presente estudo optou-se pelo teste em cultivo celular em virtude da possibilidade do controle do microambiente, caracterização e homogeneidade das amostras, além do modelamento *in vitro* de condições *in vivo* (Freshney, 2010).

Com o intuito de obter tecidos com fenótipo semelhante ou igual ao tecido articular nativo, utilizou-se no atual estudo o sistema de cultura “pellet”, o qual permite interação célula-célula, semelhante à condensação pré-cartilagem durante o desenvolvimento embrionário (Yang et al., 2004), além de uma elevada eficiência de semeadura e formação de MEC rica em colágeno tipo II (Larson et al., 2002; Tallheden et al., 2005). Contudo, alguns autores afirmaram que as CTMs, quando cultivadas e diferenciadas em

sistema “pellet”, nem sempre apresentam fenótipo positivo para condrócitos, expresando marcadores de tecido hipertrofiado (Yang et al., 2004). O fato foi detectado no atual estudo, no qual apenas o Grupo AH apresentou fenótipo positivo. Apesar disso, o sistema “pellet” tem sido recomendado para uso clínico, após a diferenciação em condrócitos, e para elucidar incógnitas sobre a formação de cartilagem em estádios iniciais (Yang et al., 2004).

CTMs submetidas a diferenciação condrogênica em sistema “pellet”, em geral, apresentam uma taxa de proliferação diminuída (Garcia, 2013; Baksh et al., 2007). Desta forma, a alta concentração celular utilizada no presente estudo, conforme teste inicial de cultivo de “pellet”, teve por finalidade garantir o número suficiente de células para as avaliações. Concentração similar foi empregada em estudos que diferenciaram CTMs de diferentes fontes em condrócitos, adipócitos e osteócitos (Schurman et al., 2016; Lovati et al., 2011). Com a curva de crescimento foi decidido escolher o dia dois de cultivo para someter as células a diferenciação; houve replicação mais demorada das células da concentração maior, isso possivelmente devido ao espaço reduzido da placa para poder se-replicar.

Macroscopicamente, observou-se perda da integridade dos “pellets” nos grupos AH e AH/TA, sendo mais notório no primeiro, o que provavelmente esteja relacionado à consistência viscosa e densa do AH. Um fato a destacar é que no atual estudo o HA empregado é reticulado e tem peso molecular de 6000 kDa. Há heterogeneidade entre estudos nas estimativas da eficácia do ácido hialurônico, porém parece que os de alto peso molecular são considerados mais eficazes (Lo et al., 2003; Wang et al., 2004). Histologicamente, a morfologia dos grupos teve variações, porém nos grupos AH e AH/TA foi possível detectar formato celular típico de condrócitos, ou seja, formas ovaladas e redondas dentro de lacunas (McGeady et al., 2017). Acredita-se que o fato esteja relacionado à capacidade hidrofóbica do AH, que fornece uma consistência rígida e viscosa ao meio, o que favoreceu uma melhor diferenciação celular. Outros estudos têm mostrado que o uso de “scaffolds” compostos de AH favorece a diferenciação condrogênica de CTMs (Awad et al., 2004; Matsiko et al., 2015). Os Grupos Controle e TA apresentaram morfofologia celular não similar a condrocitos. Uma MEC organizada e algumas células redondas dentro de lacunas foi observado no grupo AH/TA. O grupo AH apresentou uma MEC escassa envolvendo uma grande quantidade de células redondas dentro de lacunas. Em estudo sobre compósitos de CTMs derivadas do cordão umbilical e quatro tipos de hidrogel foi também observado que a diferenciação condrogênica de

CTMs foi diminuída quando cultivadas em hidrogel sem AH ou com AH misturado com outros compostos (Chung et al., 2014).

A produção de GAG no 14º dia foi diminuída para todos os grupos, quando comparada com o controle, pela coloração de Alcian Blue. No grupo TA a resposta foi moderada e provavelmente influenciada pelo tempo de exposição ao fármaco. Também em estudo sobre condrócitos de cães expostos *in vitro* a TA, em diferentes tempos de cultivo, foi citado que a exposição contínua promoveu leve redução do GAG (14 dias), o que foi atribuído à diminuição da regulação dos receptores de corticosteroides (Jansen et al., 2016). Vale citar que os glicocorticoides são importantes na manutenção da homeostase da cartilagem (Derfoul et al., 2006), além de serem utilizados frequentemente para o processo de diferenciação condrogênica de CTMs *in vitro* (Derfoul et al., 2006; Florine et al., 2013; Randua et al., 2013; Jakobsen et al., 2014; Wang et al., 2015).

No Grupo AH/TA a resposta foi também moderada, porém negativa no Grupo HA. Por outro lado, em estudo sobre CTMs submetidas à diferenciação condrogênica em ambiente enriquecido com “scaffold” de AH, foi detectada marcação aumentada para GAGs, quando comparada com o controle no dia 9 de diferenciação (Wu et al., 2010). Também Zhu et al. (2016) obtiveram deposição de GAG dentro de hidrogéis de AH com CTMs. Entre os fatores que podem ter influenciado na produção de GAG no presente estudo, estão a forma de apresentação do HA, que foi líquida e não por “scaffold”, e o fato de não ter sido efetuada a centrifugação inicial das células. Salienta-se que em estudo sobre a formação de cartilagem *in vitro* de CTMs humanas, foi citado que a condrogênese pode ser induzida unicamente pela centrifugação inicial do “pellet” (Sekiya et al., 2002).

Na expressão de colágeno tipo II no nível citoplasmático pela imunohistoquímica, o controle marcou moderadamente, os grupos AH e TA tiveram marcação leve e o grupo AH/TA foi considerado como não marcado. Isso sugere que os medicamentos promoveram efeito negativo no colágeno tipo II, que pode ter relação com a concentração ou mesmo pela exposição contínua. Além disso outra hipótese, é que quando CTMs diferenciadas em um sistema “pellet” a expressão de marcadores de hipertrofia como colágeno tipo X são maiores (Yang et al., 2004) Vale referir, que estudo sobre os efeitos de vários glicocorticoides (dexametasona, prednisolona, triamcinolona) em condrócitos equinos, foi observado que esses fármacos afetam diferentes tipos de genes e que baixas doses podem causar efeitos negativos mínimos no processo degenerativo da MEC (Richardson and Dodge, 2003). Por outro lado, o uso de TA intrarticular em equinos

diminuiu a expressão de colágeno tipo II no líquido sinovial por 49 dias de avaliação (Knyh et al., 2016).

Por outro lado, a marcação de colágeno tipo II na MEC pela imunohistoquímica teve marcação positiva para todos os grupos, sendo intensa para o Grupo AH/TA, moderada para o Grupo AH, e leve para os demais Grupos. Também em estudo com AH foto-reticulado em cultivo de condrócitos humanos foi notada presença de células redondas, condrogênese aumentada e incrementada quantidade e distribuição de uma nova MEC positiva para colágeno tipo II, sugerindo ser o AH adequado para aplicação na engenharia de tecidos articulares (Levett et al., 2014).

O presente estudo apresentou algumas limitações, sendo a mais significativa a não avaliação do painel genético por PCR. Além disso, embora o objetivo inicial ter sido o teste de fármacos em suas formulações originais para a aplicação intra-articular, outra opção de teste seria a incorporação dos mesmos em algum tipo de “scaffold”.

Conclusão

De uma forma geral, o AH isolado foi o composto que a nível morfológico teve maior potencial condrogênico sobre as células, porém com baixa expressão de moléculas específicas de cartilagem; o grupo TA desenvolveu uma matriz extracelular mais compacta e organizada com maior porcentagem de células marcadas para colágeno tipo II.

Referências²

- Bhumiratana S, Eton RE, Oungoulia SR, Wan LQ, Ateshian GA, Vunjak-Novakovic G (2014) Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown in vitro by mesenchymal condensation. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(19):6940–45.
- Chung J, Song M, Ha CW, Kim JA, Lee CH, Park YB (2014) Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model. *Stem Cell Res Ther* 5(2):39.
- Fox SM (2010) *Chronic pain in small animal medicine*. London: Manson Pub.
- Freshney RI (2010) *Culture of animal cells: A manual of basic technique. and specialized applications*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Garcia SC (2013) Cultivo de células en 3D: la nueva dimensión de los cultivos celulares. *Dimension. Cuadernos del Tomás* 215-232.

² Referências organizadas de acordo com as normas da revista *Cell Biology International*, 2017.

- Goldberg VM, Goldberg L (2010) Intra-articular hyaluronans: the treatment of knee pain in osteoarthritis. *J Pain Res* 3:51–6.
- Goldring MB (2012). Articular cartilage degradation in osteoarthritis. *HSS J* 8(1):7–9.
- Goldring MB, Otero M (2011) Inflammation in Osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 23(5):471–78.
- Goodrich LR, Nixon JN (2006) Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* 171(1):51–69.
- Grodzinsky AJ, Wang Y, Kakar S, Vrahas MS, Evans CH (2017) Intra-articular dexamethasone to inhibit the development of post-traumatic osteoarthritis. *J Orthop Res* 35(3):406-11.
- He Z, Wang B, Hu C, Zhao J (2017) An overview of hydrogel-based intra-articular drug delivery for the treatment of osteoarthritis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 154:33–9.
- Jansen, I., Tellegen, A., Tryfonidou, M., Öner, C., Saris, D., Woike, N., ... & Creemers, L. (2016). Brief exposure to triamcinolone acetonide, but not its continuous presence, strongly inhibits cartilage regeneration by chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24, S337.
- Jo C. H, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai, JW, Jeong EC, Kim J, Shim H, Shin I, Ra JC, Oh S, Yoon K (2014) Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* 32(5):1254-66.
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J, Fahmi H (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7(1):33–42.
- Larson CM, Kelley SS, Blackwood AD, Banes AJ, Lee GM (2002) Retention of the native chondrocyte pericellular matrix results in significantly improved matrix production. *Matrix Biol* 21(4):349–59.
- Legré-Boyer V (2015) Viscosupplementation: techniques, indications, results. *Orthop Traumatol Surg Res* 101(1):S101-S8.
- Levett PA, Melchels FP, Schrobback K, Hutmacher DW, Malda J, Klein TJ (2014). A Biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Acta Biomater* 10(1):214–23.
- Lo GH, LaValley M, McAlindon T, Felson DT (2003) Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 290(23):3115-21.
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012). Osteoarthritis: a disease of

the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64(6):1697–707.

- Lovati AB, Corradetti B, Consiglio AL, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, Cremonesi F (2011) Comparison of equine bone marrow, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet Res Commun* 35(2):103–21.
- Mak J, Jablonski CL, Leonard CA, Dunn JF, Raharjo E, Matyas JR, Biernaskie J, Krawetz RJ (2016) Intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells improves cartilage repair in a mouse injury model. *Sci Rep* 6:(23076):1-12.
- Martel-Pelletier J (2004) Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 12(12A):S31–3.
- Mastri M, Lin H, Lee T (2014) Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World J Stem Cells* 6(2):82–93.
- Matsiko A, Levingstone TJ, Gleeson JP, O'brien FJ (2015) Incorporation of TGF-Beta 3 within collagen–hyaluronic acid scaffolds improves their chondrogenic potential. *Adv Healthc Mater* 4(8):1175-9.
- McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT, Kilroy D, Lonergan P (2017) *Veterinary Embryology*. Oxford, UK: J.W. & Sons.
- McIlwraith CW (2010) The use of intra-articular corticosteroids in the horse: what is known on a scientific basis? *Equine Vet J* 42(6):563–71.
- McIlwraith C. W, Frisbie DD, Kawcak CE (2012) The Horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res* 1(11):297–309.
- Meirelles LS, Nardi NB (2008) Methodology, Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:4281–98.
- Neogi T, Zhang Y (2013) Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 39(1):1–19.
- Pekarek B, Osher L, Buck S, Bowen M (2011) Intra-articular corticosteroid injections: a critical literature review with up-to-date findings. *Foot (Edinb)* 21(2):66–70.
- Sanderson RO, Beata C, Flipo RM, Genevois JP, Macias C, Tacke S, Vezzoni A, Innes JF (2009) Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet Rec* 164:418–24.
- Schuurman, W, Harimulyo EB, Gawlitta D, Woodfield TB, Dhert WJ, van Weeren PR, Malda J (2016) Three-dimensional assembly of tissue-engineered cartilage constructs results in cartilaginous tissue formation without retainment of zonal characteristics. *J Tissue Eng Regen Med* 10(4):315–24.
- Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ (2002) In Vitro cartilage formation by human

adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7):4397–402.

Siengdee P, Radeerom T, Kuanon S, Euppayo T, Pradit W, Chomdej S, Ongchai S, Nganvongpanit K (2015) Effects of corticosteroids and their combinations with hyaluronan on the biochemical properties of porcine cartilage explants. *BMC Vet Res* 11(1):1-11.

Tallheden, Tommi Brantsing C, Sjögren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, Brittberg M, Lindahl A (2005) Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther* 7(3):560–68.

Trounson A, McDonald C (2015) Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell* 17(1):11–22.

Vaca-González, JJ, Gutiérrez ML, Garzón-Alvarado DA (2017) Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de conceptos actuales. *Rev Colomb Ortop Traumatol* 31(4):202-10.

Wang CT, Lin J, Chang CJ, Lin YT, Hou SM (2004) Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am* 86(3):538-45.

Wernecke C, Braun HJ, Dragoo JL (2015) The Effects of intra-articular corticosteroids on articular cartilage. *Orthop J Sports Med* 3(5):2325967115581163.

Yang IH, Kim SH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ, Lee JW (2004) Comparison of phenotypic characterization between ‘alginate bead’ and ‘pellet’ culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* 45(5):891–900.

Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA (2004) Hyaline Cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat* 205(3):229–37.