

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 27/10/2024.

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

**AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES NO LÍQUIDO SINOVIAL DE  
OVINOS COM OSTEOARTRITE TRATADOS COM MEMBRANAS  
SINTÉTICAS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

GUSTAVO DOS SANTOS ROSA

Botucatu, São Paulo  
2022

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

**AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES NO LÍQUIDO SINOVIAL DE  
OVINOS COM OSTEOARTRITE TRATADOS COM MEMBRANAS  
SINTÉTICAS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

GUSTAVO DOS SANTOS ROSA

Tese apresentada junto ao  
Programa de Biotecnologia  
Animal para a obtenção do título de  
Doutor em Biotecnologia Animal.  
Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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

**Autor:** Gustavo dos Santos Rosa  
**Data:** 27 de outubro de 2022

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

Rosa, Gustavo dos Santos.

Avaliação dos biomarcadores no líquido sinovial de ovinos com osteoartrite tratados com membranas sintéticas e células-tronco mesenquimais / Gustavo dos Santos Rosa. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501003

1. Articulação. 2. Cartilagem. 3. Colágeno. 4. Matriz extracelular. 5. Polidioxanona.

Palavras-chave: Articulação; Cartilagem; Colágeno; Matriz extracelular; Polidioxanona.

## **Comissão Examinadora**

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

Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP

Botucatu, SP

### **Dra. Anna Paula Balesdent Barreira**

Membro

Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária Veterinária,

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Rio de Janeiro, RJ

### **Dr. Armando de Mattos Carvalho**

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Escola de Veterinária UFMG

Belo Horizonte, MG

### **Dra. Fernanda de Castro Stievani**

Membro

Departamento de Ciências Agrárias. Universidade de Taubaté Medicina

Veterinária, UNITAU,

Taubaté, SP

### **Dra. Thaís Sodré de Lima Machado**

Membro

Invitare Pesquisa Clínica

São Paulo, SP

## **Agradecimentos**

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Liz Garcia Alves por me aceitar como orientado no doutorado; por compartilhar seus conhecimentos em terapias regenerativas e engenharia tecidual durante todos esses anos; pelos conselhos dados e principalmente por todo o suporte para a viabilização da conclusão do doutorado.

À minha família, por todo o suporte e amor nas maiores adversidades, apesar de nossa distância física.

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

Aos colegas de pós-graduação, em especial João Pfeifer, Fernanda Stievani, Emanuel Appolonio e Vittoria Altheman, pelo companheirismo e apoio em meio à pandemia e durante o projeto, e também pelos momentos de descontração ao longo destes anos.

À equipe do Hospital Israelita Albert Einstein, em especial aos doutores Camila Cohen, Pedro de Bieux e Moisés Cohen, pela viabilização desta pesquisa e pela colaboração.

À CAPES, CNPq e FAPESP, pela viabilização da realização de todo o doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo n. 15915/2019-3 GM/GD. Processo FAPESP n. 2017/12815-0.

ROSA, G.S. Avaliação dos biomarcadores no líquido sinovial de ovinos com osteoartrite tratados com membranas sintéticas e células-tronco mesenquimais. Botucatu, 2022. Tese de Doutorado. 87 páginas. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## **RESUMO**

Devido ao baixo potencial de reparação apresentado pela cartilagem articular, as enfermidades articulares são causas frequentes de dor e diminuição de desempenho. Por seu caráter crônico, a osteoartrite representa um desafio aos tratamentos disponíveis. Assim, novas estratégias e abordagens são necessárias para aprimorar o reparo do tecido cartilaginoso. A engenharia tecidual se destaca neste sentido, valendo-se da associação entre biomateriais, células e fatores de crescimento, para promover um aporte biomecânico e celular potencialmente benéfico para a reparação condral. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os biomarcadores articulares após tratamento da osteoartrite experimental em 32 ovinos, utilizando diferentes membranas sintéticas associadas ou não a células-tronco mesenquimais. As membranas constituídas por polidioxanona apresentaram os resultados mais relevantes, incluindo maior concentração de biomarcadores de síntese e menor concentração de biomarcadores de degradação de matriz extracelular. A comparação dos resultados nos diferentes grupos indica que a associação de diferentes princípios da engenharia tecidual, como a inclusão de uma fonte celular em um arcabouço, é a estratégia que gera melhores parâmetros nos biomarcadores do metabolismo da matriz extracelular condral

**Palavras-chave:** articulação; cartilagem; colágeno; matriz extracelular; polidioxanona.

ROSA, G.S. Evaluation of ovine synovial fluid biomarkers in experimental osteoarthritis treated with synthetic membranes and mesenchymal stem cells. Botucatu, 2022. PhD Thesis. 87 pages. School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Brazil. São Paulo State University - UNESP.

## **ABSTRACT**

Due to the limited repair potential of articular cartilage, joint diseases are a common cause of pain and low performance. The chronic nature of osteoarthritis is a challenge for the current treatments. Thus, new strategies and approaches are required to improve cartilage repair. Tissue engineering rises as a potential treatment option, associating biomaterials, cells, and growth factors to provide biomechanical and cellular support for chondral repair. The aim of the present study was to evaluate joint biomarkers after treatment of experimental osteoarthritis in 32 sheep, using different synthetic membranes associated or not with mesenchymal stem cells. Membranes made of polydioxanone presented the most relevant results, including greater concentration of biomarkers of extracellular matrix synthesis and lower levels of biomarkers of extracellular matrix degradation. The comparison of the results in the different groups indicates that the association of different principles of tissue engineering, such as the inclusion of a cellular source in a scaffold, is the strategy that generates better parameters in the biomarkers of extracellular matrix metabolism.

**Keywords:** joint disease; cartilage; collagen; extracellular matrix; polydioxanone.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Organização estrutural das fibrilas colágenas, proposta por Benninghoff (1925).....p.17

**Figura 2.** . A molécula de procolágeno, produzida no citoplasma dos condrócitos, contém uma terminação amina (PIINP) e uma carboxila (CP-II). O procolágeno atinge o ambiente extracelular, onde é clivado pelas proteases N e C, dando origem à molécula de colágeno maduro. Adaptado de Peng et al. (2021).....p.19

**Figura 3.** Estrutura do agrecano e ilustração de sua ligação com as fibrilas colágenas. O epítipo 846 da cadeia de sulfato de condroitina do agrecano (CS-846) encontra-se destacado em vermelho no quadrante superior direito da imagem. Adaptado de GARNERO (2004) e WU et al. (2021).....p.21

**Figura 4.** Clivagem do colágeno maduro. A clivagem ocorre no sítio  $\frac{3}{4}$ , dando origem aos fragmentos de colágeno  $\frac{3}{4}$  e  $\frac{1}{4}$  de colágeno. O C2C é um neoepítipo componente do fragmento de colágeno  $\frac{3}{4}$ . Adaptado de Huebner et al. (2009).....p.24

### CAPÍTULO 2

**Figure 1.** Synovial concentration of Hyaluronan at initial time point (Before Surgery) and 6 months after the surgery. \* means  $P=0.022$ , whereas \*\* means  $P=0.042$ .....p.54

**Figure 2.** Synovial fluid concentrations of C2C before and 6 months after the OA induction, demonstrating lower C2C levels in V1MSC group compared to initial time point (\*\* indicates  $P=0.036$ ) and to the CG group (\*\*\*) indicates  $P=0.022$ ), as well as lower C2C levels in V2 group compared to CG group (\* indicates  $P=0.040$ ).....p.55

**Figure 3.** Results of CS846 synovial measurements at the initial time point (Before surgery) and after 6 months (all the other groups). There was a significantly higher

CS846 concentration in V1MSC group compared to the other groups. \* indicates  $P < 0.05$ .....p.56

**Figure 4.** Median concentrations of CP-II before and 6 months after the OA induction. No significant differences were observed.....p.57

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

|                        |           |     |            |         |     |      |  |
|------------------------|-----------|-----|------------|---------|-----|------|--|
| <b>Table</b>           | <b>1.</b> | PCR | sequencing | primers | for | MSCs |  |
| immunophenotyping..... |           |     |            |         |     | p.49 |  |

# Sumário

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| <b>CAPÍTULO 1</b>                                              | 11 |
| 1. Introdução                                                  | 12 |
| 1.1 Objetivo                                                   | 13 |
| 2. Revisão de Literatura                                       | 13 |
| REFERÊNCIAS                                                    | 33 |
| <b>CAPÍTULO 2</b>                                              | 46 |
| <b>ABSTRACT</b>                                                | 47 |
| 1. Introduction                                                | 48 |
| 2. Material and Methods                                        | 49 |
| 2.1 Animals                                                    | 49 |
| 2.2 Mesenchymal stem cells                                     | 50 |
| 2.3 Surgical induction of osteoarthritis                       | 52 |
| 2.4 Sample collection and molecular analyses                   | 55 |
| 2.5 Statistical Analysis                                       | 55 |
| 3. Results                                                     | 56 |
| 3.1 Culture and characterization of MSCs                       | 56 |
| 3.2 Synovial concentration of hyaluronan, C2C, CS846 and CP-II | 56 |
| 4. Discussion                                                  | 60 |
| 5. Conclusion                                                  | 64 |
| References                                                     | 65 |
| <b>ANEXO I</b>                                                 | 72 |
| <b>ANEXO II</b>                                                | 86 |

# **CAPÍTULO 1**

## 1. Introdução

As articulações apresentam características únicas de resistência e flexibilidade simultâneas, diferentemente de outros tecidos do organismo. Dentre os componentes das articulações, a cartilagem articular possui importantes peculiaridades. A ausência de vasos sanguíneos limita a perfusão de oxigênio e nutrientes para a cartilagem, tornando o acesso a essas moléculas mediado estritamente pelo contato com o líquido sinovial, produzido e absorvido pela membrana sinovial (SCANZELLO, 2022). Tal característica determina um ritmo metabólico reduzido, com baixa capacidade de reparação tecidual após lesões condrais (VAN WEEREN, 2016).

As lesões condrais podem decorrer de traumas físicos, estímulos químicos ou envelhecimento. O estresse biomecânico articular, aplicado de forma recorrente, pode predispor o desenvolvimento de microlesões no tecido articular, podendo gerar degradação da cartilagem articular (GOLDRING; GOLDRING, 2007).

Independente do fator promotor do desequilíbrio, a primeira estrutura articular afetada é a membrana sinovial. A inflamação tem início quando a membrana sinovial é exposta a moléculas sinalizadoras, que induzem a produção de mediadores inflamatórios que ativam o sistema imune e tornam a inflamação cíclica (ARLEEVSKAYA et al., 2019; LORENTE-SOROLLA et al., 2019), com destruição da cartilagem articular. Caso o estímulo persista, o quadro avançará para um estágio crônico de inflamação denominado osteoartrite, caracterizada pelo envolvimento não somente da cartilagem articular e da membrana sinovial, mas também das estruturas extra-articulares e do osso subcondral (MCILWRAITH, 2016). O diagnóstico das enfermidades articulares deve considerar

achados de exame clínico e complementares, como radiográficos, ultrassonográficos, tomografia computadorizada e ressonância magnética (KAWCAK, 2016). Análises moleculares revelam importantes dados sobre a articulação pela mensuração de biomarcadores capazes de indicar diferentes graus de síntese e degradação da cartilagem e a qualidade do líquido sinovial (GARNERO, 2004; AMEYE et al., 2007; PRINK et al., 2010).

A urina, o sangue e o líquido sinovial são os alvos mais comuns para a análise de biomarcadores. Destes, o líquido sinovial apresenta como vantagens a maior concentração e maior especificidade de biomarcadores locais (LAMBERT et al., 2021). Adicionalmente, a análise do líquido sinovial fornece informações sobre a real condição da articulação avaliada (MANDELL, 2022). Portanto, a mensuração de biomarcadores no líquido sinovial em situações experimentais é uma maneira objetiva de avaliar a resposta a diferentes tratamentos que visem promover a reparação da cartilagem articular.

### **1.1 Objetivo**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os biomarcadores de síntese e degradação da matriz extracelular condral após tratamento da osteoartrite experimental em ovinos, utilizando diferentes membranas sintéticas associadas ou não a células-tronco mesenquimais.

## **2. Revisão de Literatura**

## REFERÊNCIAS

1. AGUNG M, OCHI M, YANADA S, et al. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.**, v. 14, n. 12, p.1307–1314, 2006.
2. AMEYE, L.G., DEBERG, M., OLIVEIRA, M., LABASSE, A., AESCHLIMANN, J.M. AND HENROTIN, Y., The chemical biomarkers C2C, Coll2-1, and Coll2-1NO2 provide complementary information on type II collagen catabolism in healthy and osteoarthritic mice. **Arthritis Rheum**, v.56, p.3336-3346, 2007. <https://doi.org/10.1002/art.22875>
3. ANITUA E, TROYA M, TIerno R, ZALDUENDO M, ALKHRAISAT MH. The Effectiveness of Platelet-Rich Plasma as a Carrier of Stem Cells in Tissue Regeneration: A Systematic Review of Pre-Clinical Research. **Cells Tissues Organs**. v. 210, n.5-6, p.339-350, 2021. doi: 10.1159/000518994. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34551408.
4. ARLEEVSKAYA MI, LARIONOVA RV, BROOKS WH, BETTACCHIOLI E, RENAUDINEAU Y. Toll-Like Receptors, Infections, and Rheumatoid Arthritis. **Clin Rev Allergy Immunol.**, v.58, n. 2, p.172-181, 2020. doi: 10.1007/s12016-019-08742-z. PMID: 31144208.
5. ARMIENTO, A.R.; STODDART, M.J.; ALINI, M.; EGLIN, D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. **Acta Biomaterialia**, v. 65, p.1-20, 2018. ISSN 1742-7061. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.021>.
6. AUGUSTYNIAK, E.; TRZECIAK, T.; RICHTER, M.; KACZMARCZYK, J.; SUCHORSKA, W. The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a

- real hope for damaged cartilage regeneration. **Int. Orthop.**, v.39, n. 5, p. 995-1003, 2015.
7. BAKKER et al.: The relation between cartilage biomarkers (C2C, C1,2C, CS846, and CPII) and the long-term outcome of rheumatoid arthritis patients within the CAMERA trial. **Arthritis Res Ther**, v.13, R70, 2011.
  8. BANKS WJ: **Appl. Vet. Histology** (ed 3). St. Louis, MO, Mosby, 1993
  9. BARTL R., BARTL C. The Normal Joint. In: \_\_\_\_\_ **The Osteopor Man**. Springer, Cham. p. 491-493, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00731-7> Print ISBN 978-3-030-00730-0
  10. BENNINGHOFF, A. Form und Bau der Gelenkknorpel in Ihren Beziehungen zur Funktion. **Z. Zellforsch**, v. 2, p.783–862, 1925.
  11. BERTRAND, J., et al., Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis. **Int J Biochem Cell Biol**, v.42, n.10, p.1594-601, 2010.
  12. BUCKWALTER JA, MANKIN HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocytes-matrix interactions. **Instr Course Lect.**, v.47, p.477-486, 1998.
  13. CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J Cell Physiol.**, v. 213, n. 2, p.341-7, 2007.
  14. CLEGG PD, BURKE RM, COUGHLAN AR, et al. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. **Equine Vet J**. v.29, n.5. p.335–342, 1997.
  15. DAHLBERG L, BILLINGHURST RC, MANNER P, et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic

- cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). **Arthritis Rheum.**, v.43, n. 3, p. 673–682, 2000.
16. DE SOUZA JB, ROSA GS, ROSSI MC, STIEVANI FDC, PFEIFER JPH, KRIECK AMT, BOVOLATO ALDC, FONSECA-ALVES CE, BORRÁS VA AND ALVES ALG. In Vitro Biological Performance of Alginate Hydrogel Capsules for Stem Cell Delivery. **Front. Bioeng. Biotechnol**, v..9:674581, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.674581
  17. EYRE, D.R.; PAZ, M.A.; GALLOP, P.M. Cross-linking in collagen and elastin. **Annu Rev Biochem**, v.53, pp. 717, 1984.
  18. FOX, A.J.S.; BEDI, A.; RODEO, S.A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. **Sports Health**, v.1, pp. 461-468, 2009.
  19. FREEMONT AJ. Microscopic analysis of synovial fluid--the perfect diagnostic test? **Ann Rheum Dis.**, v.55, n.10, p.695-7, 1996.
  20. FRISBIE DD, RAY CS, IONESCU M, et al. Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. **Am J Vet Res**, v. 60, n.3, p.306-309, 1999. PMID: 10188811.
  21. FRISBIE, D.D. et al. Evaluation of topically administered diclofenac liposomal cream for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. **Am J Vet Res**.v.70, p.210-5, 2009a.
  22. FRISBIE, D.D. et al. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. **Am J Vet Res**.v.70, p. 203-9, 2009b

23. GARCÍA-CARVAJAL, Z. Y. , GARCIADIEGO-CÁZARES, D. , PARRA- CID, C. , AGUILAR-GAYTÁN, R. , VELASQUILLO, C. , CARMONA, C. I. J. S. C. . Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies. In: Andrades, J. A. , editor. **Reg Med Tis Eng**. London: IntechOpen; 2013
24. GARNERO, P. Biochemical Markers of Osteoarthritis. **Osteoarthritis**, 113–130, 2004. doi:10.1016/b978-0-323-03929-1.50013-6
25. GE, D., O'BRIEN, M.J., SAVOIE, F.H. et al. Human adipose-derived stromal/stem cells expressing doublecortin improve cartilage repair in rabbits and monkeys. **npj Regen Med**, v. 6, n. 82, p.1-16, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00192-6>
26. GOLDRING, M.B.; S.R. GOLDRING. Osteoarthritis. **J Cell Physiol**, v. 213, n.3, p. 626-34, 2007.
27. GRIMMER C, BALBUS N, LANG U, AIGNER T, CRAMER T, MÜLLER L, SWOBODA B, PFANDER D. Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels. **Am J Pathol.**, v.169, n. 2, p. 491-502, 2006. doi: 10.2353/ajpath.2006.050738. PMID: 16877351; PMCID: PMC1698781.
28. GUDMANN N., WANG J., HOIELT S., CHEN P., SIEBUHR A., HE Y., CHRISTIANSEN T., KARSDAL M., BAY-JENSEN A. Cartilage turnover reflected by metabolic processing of type II collagen: A novel marker of anabolic function in chondrocytes. **Int. J. Mol. Sci.** v.15, p.18789–18803, 2014. doi: 10.3390/ijms151018789.

29. GUILAK F, NIMS RJ, DICKS A, WU CL, MEULENBELT I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. **Matrix Biol.**, v.71-72, p.40-50, 2018. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.008.. PMID: 29800616; PMCID: PMC6146061.
30. HAN, E.; CHEN, S.; KLISCH, S.; SAH, R. Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage. **Biophys J**, v.101, p. 916-924, 2011.
31. HARDINGHAM TE, FOSANG AJ, DUDHIA J. Aggrecan, the chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan from cartilage. In: KUETTNER K, et al., editors. **Articular Cart Osteoart**. New York, NY, USA: Raven Press; 1992.
32. HOEMANN, C., KANDEL, R., ROBERTS, S., SARIS, D. B., CREEMERS, L., MAINIL-VARLET, P., MÉTHOT, S., HOLLANDER, A. P., & BUSCHMANN, M. D. International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. **Cartilage**, v. 2. n. 2, p. 153–172, 2011. <https://doi.org/10.1177/1947603510397535>
33. HRAHA, T.H.; DOREMUS, K.M.; MCILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D. Autologous conditioned serum: The comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. **Equine Vet. J.**, v.43, n.5, p. 516-21, 2011. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00321.x
34. JAY GD, WALLER KA. The biology of lubricin: near frictionless joint motion. **Matrix Biol.**, v. 39, p.17–24, 2014.
35. JOHNSON, S., BRECHUE, W., RUSSELL, A.; KONDRASHOV, P. CPII and C2C Biomarkers Favor Cartilage Degradation During Initial Progression of Osteoarthritis in Rats That Have

- Undergone Destabilization of the Medial Meniscus Surgery. **The FASEB Journal**, v. 34: p. 1-1, 2020. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.04213>
36. JOHNSTON, S. A. Osteoarthritis. **Vet Clin N Am: Small Animal Practice**, v.27, n.4, p.699–723, 1997. doi:10.1016/s0195-5616(97)50076-3.
37. JUNQUEIRA, L.C.U.. **Histologia básica: texto e atlas**. In: JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P (coord). – 13. ed. - [Reimpr.]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
38. KÄÄB , M. , AP GWYNN , I. & NÖTZLI , H. Collagen fiber arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species , **J. Anat.** , v. 193 (Pt 1) , p. 23 – 34, 1998.
39. KASHIWAGI M, TORTORELLA M, NAGASE H, ET AL. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAMTS-4) and aggrecanase 2 (ADAMTS-5). **J Biol Chem.** , v. 276, n.16, p. 12501–12504, 2001.
40. KAWCAK, C.E. Pathologic Manifestations of Joint Disease. In: C. WAYNE MCILWRAITH, DAVID D. FRISBIE, CHRISTOPHER E. KAWCAK, P. RENÉ VAN WEEREN (editores). **Joint disease in the horse**, Second edition. Elsevier: St Louis, Missouri, 2016. ISBN 978-1-4557-5969-9.
41. KEENAN, R.T. Biochemical Composition of Synovial Fluid in Health and Disease. In: MANDELL, B.F. (ed.), **Synovial Fluid Analysis and The Evaluation of Patients With Arthritis**. Springer: Cham, Switzerland, 2022. ISBN 978-3-030-99611-6 ISBN 978-3-030-99612-3 (eBook) <https://doi.org/10.1007/978-3-030-99612-3>
42. KIANI, C., CHEN, L., WU, Y. et al. Structure and function of aggrecan. **Cell Res**, v. 12, p.19–32, 2002. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290106>

43. LAMBERT, L.A., CONVILL, J., TAWY, G., BIANI, L.C. Biomarkers in Articular Cartilage Injury and Osteoarthritis. In: KRYCH, A.J., BIANI, L.C., GOMOLL, A.H., ESPREGUEIRA-MENDES, J., GOBBI, A., NAKAMURA, N. (eds) **Cartilage Injury of the Knee**. Springer, Cham, Switzerland, 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-78051-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-78051-7_2)
44. LANE, AR; HARKEY, MS; DAVIS, HC; LUC-HARKEY, BA; STANLEY, L; HACKNEY, AC; BLACKBURN, JT; PIETROSIMONE, B. Body Mass Index and Type 2 Collagen Turnover in Individuals After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. **J Athl Train**, v. 54, n. 3, p. 270–275, 2019. doi: <https://doi.org/10.4085/1062-6050-525-17>
45. LI, S.H.; WU, Q.F. MicroRNAs' target on cartilage extracellular matrix degradation of knee osteoarthritis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.25, p.1185-1197, 2021.
46. LORENTE-SOROLLA C., NETEA M.G., BALLESTAR E. Epigenetics in Autoinflammation. In: HASHKES P., LAXER R., SIMON A. (eds) **Textbook of Autoinflammation**. Springer, Cham, Switzerland, 2019
47. MANDELL, B.F. The Impact of Synovial Fluid Analysis on Clinical Practice – Introduction. In: MANDELL, B.F. (ed.), **Synovial Fluid Analysis and The Evaluation of Patients With Arthritis**. Springer: Cham, Switzerland, 2022. ISBN 978-3-030-99611-6 ISBN 978-3-030-99612-3 (eBook) <https://doi.org/10.1007/978-3-030-99612-3>
48. MAY, S.A.. HOOKE, R.E. AND LEES, P. Interleukin-1 stimulation of equine articular cells. **Res. vet. Sci.**, v. 52, p. 342-348, 1992. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90035-Z](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90035-Z)

49. MCILWRAITH, C.W. Traumatic Arthritis and Posttraumatic Osteoarthritis in the Horse. In: C. WAYNE MCILWRAITH, DAVID D. FRISBIE, CHRISTOPHER E. KAWCAK, P. RENÉ VAN WEEREN (editores). **Joint disease in the horse**, Second edition. Elsevier: St Louis, Missouri, 2016. ISBN 978-1-4557-5969-9.
50. MÖRGELIN, M., D. HEINEGÅRD, M. PAULSSON. The cartilage proteoglycan aggregate: assembly through combined protein-carbohydrate and protein-protein interactions. **Biophys. Chem.**, v.50, p.113–128, 1994.
51. MÜLLER G, MICHEL A, ALTENBURG E. COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) is Synthesized in Ligament, Tendon, Meniscus, and Articular Cartilage. **Connective Tis Res.** V.39, n. 4, p. 233–244, 1998.
52. NELSON F., DAHLBERG L., LAVERTY S., REINER A., PIDOUX I., IONESCU M. et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. **J Clin Invest.**, v. 102, p.2115-2125, 1998.
53. NIE, X; CHUAH, Y.J.; ZHU, W.; HE, P.; PECK, Y.; WANG, D.A. Decellularized tissue engineered hyaline cartilage graft for articular cartilage repair. **Biomaterials**, v. 235, n.119821, 2020, ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119821>.
54. PATTERSON ML, ATKINSON SJ, KNAUPER V, MURPHY G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. **FEBS Lett.**, v.503, p.158–162, 2001.
55. PENG, Z; SUN, H.; BUNPETCH, V.; KOH, Y.; WEN, Y.; WU, D.; OUYANG, H. The regulation of cartilage extracellular matrix homeostasis in joint cartilage degeneration and regeneration. **Biomaterials**; v. 268, n. 120555, 2021. ISSN 0142 9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120555>.

56. PRINK, A., HAYASHI, K., KIM, S.-Y., KIM, J.; KAPATKIN, A. Evaluation of a Collagenase Generated Osteoarthritis Biomarker in the Synovial Fluid from Elbow Joints of Dogs with Medial Coronoid Disease and Unaffected Dogs. **Vet Surgery**, v. 39, p. 65-70, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2009.00604.x>
57. RIEPPO J, HYTTINEN MM, HALMESMAKI E, RUOTSALAINEN H, VASARA A, KIVIRANTA I, et al. Changes in spatial collagen content and collagen network architecture in porcine articular cartilage during growth and maturation. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 17, n. 4, p.448-55, 2009.
58. RIESSEN R, FENCHEL M, CHEN H, AXEL DI, KARSCH KR, LAWLER J. Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.21, n.1, p.47–54, 2001.
59. RUSSO, E; CAPRNDIA, M; KRIZLIAK, P.; CONALDI, P. G.; BORLONGAN, C. V.; LA ROCCA, G. Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Regeneration Applications. [Stem Cells Int](https://doi.org/10.1155/2022/2454168), v. 2022, n. 2454168, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2454168>
60. SANTOS VHD, PFEIFER JPH, SOUZA JB, STIEVANI FC, HUSSNI CA, GOLIM MA, DEFFUNE E, ALVES ALG. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses. **Res Vet Sci.**, v. 124, p.38-45, 2019. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.02.005. Epub 2019 Feb 25. PMID: 30826587.
61. SCANZELLO, C.R. Synovial Structure and Physiology in Health and Disease. In: B. F. MANDELL (ed **Synovial Fluid Analysis and The Evaluation of Patients With Arthritis**. Springer: Cham, Switzerland, 2022. ISBN 978-3-030-99611-6 ISBN 978-3-030-99612-3 (eBook) <https://doi.org/10.1007/978-3-030-99612-3>

62. SCHNELLMANN, R. Chapter One - Advances in ADAMTS biomarkers. In: GREGORY S. MAKOWSKI (Editores). **Advances in Clinical Chemistry**, Elsevier, v. 106, p. 1-32, 2022 ISSN 0065-2423, ISBN 9780323988377. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2021.09.002>.
63. SEIDMAN AJ, LIMAIEM F. Synovial Fluid Analysis. **StatPearls**; 2022 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537114/>
64. SHUM, L., NUCKOLLS, G. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. **Arthritis Res Ther** , v.4, n.94, 2001. <https://doi.org/10.1186/ar396>
65. SIEGEL, R.C. Biosynthesis of collagen crosslinks: Increased activity of purified lysyl oxidase with reconstituted collagen fibrils. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, p. 4826-4830, 1974.
66. SMITH MD. The normal synovium. **Open Rheumatol J.**, v.5, p.100–6, 2011.
67. TAKAHASHI, I.; ONODERA, K.; BAE, J.-W.; MITANI, H. ; SASANO, Y.; MITANI, H. “Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats,” **J Mol Histology**, v. 36, n. 5, p. 355–366, 2005.
68. TAMER TM. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. **Interdiscip Toxicol.**, v. 6, n. 3, p.111–25, 2013.
69. TAN, A.R; HUNG, C.T. Concise review: mesenchymal stem cells for functional cartilage tissue engineering: taking cues from chondrocyte-based constructs. **Stem Cells Trans. Med.**, v. 6, n. 4, p. 1295-1303, 2017.

70. TCHETINA EV. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. **Arthritis**. V.2011, n.683970, 2011. doi: 10.1155/2011/683970. Epub 2010 Dec 29. PMID: 22046522; PMCID: PMC3199933.
71. TORTORELLA MD, LIU RQ, BURN T, NEWTON RC, ARNER E: Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4). **Matrix Biol**, v. 21, p.499-511, 2002.
72. VAN TURNHOUT, M. C. *et al.* Postnatal development of collagen structure in ovine articular cartilage. **BMC Dev. Bio**, v.10, p. 62, 2010.
73. VAN TURNHOUT, M., HAAZELAGER, M., GIJSEN, M., SCHIPPER, H., KRANENBARG, S., VAN LEEUWEN, J. Quantitative description of collagen structure in the articular cartilage of the young and adult equine distal metacarpus, **Anim Biology**, v.58, n.4, p. 353-370, 2008. doi: <https://doi.org/10.1163/157075608X383674>
74. VAN WEEREN, R. General Anatomy and Physiology of Joints. In: C. WAYNE MCILWRAITH, DAVID D. FRISBIE, CHRISTOPHER E. KAWCAK, P. RENÉ VAN WEEREN (editores). **Joint disease in the horse**, Second edition. Elsevier: St Louis, Missouri, 2016. ISBN 978-1-4557-5969-9.
75. VEALE DJ, FIRESTEIN GS. CHAPTER 2: Synovium. IN: FIRESTEIN GS, BUDD RC, GABRIEL SE, KORETSKY GA, MCINNES IB, O'DELL JR, editors. **Firestein and Kelley's textbook of rheumatology**. 11th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2021. p. 20–33.
76. WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

77. WU, C.-H.; KO, C.-S.; HUANG, J.-W.; HUANG, H.-J.; CHU, I.-M. "Effects of exogenous glycosaminoglycans on human chondrocytes cultivated on type II collagen scaffolds," **J Mat Sci: Materials in Medicine**, v. 21, n. 2, p. 725–729, 2010.
78. WU, Z; KORNTNER, SH; MULLEN, AM; ZEUGOLIS. DI. Collagen type II: From biosynthesis to advanced biomaterials for cartilage engineering. **Biomat and Biosystems**, v. 4, n. 100030, 2021.
79. WYNN TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol**. v.214, n.2, p.199–210, 2008.
80. XIE, X.; WANG, Y.; ZHAO, C.; GUO, S.; LIU, S.; JIA, W.; TUAN, R.S.; ZHANG, C. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p.7008-7018, 2012. ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.058>.
81. YAMAGATA, K., NAKAYAMADA, S. & TANAKA, Y. Use of mesenchymal stem cells seeded on the scaffold in articular cartilage repair. **Inflamm Regener**, v.38, n.4, 2018 <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0061-1>
82. YANG, G; SHAO, J; LIN, J; YANG, H; JIN, J; YU, C; SHEN, B; HU, X; SI, H; LI, X; NIU, Y; WU, Z. Transplantation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Cartilage Repair in a Rabbit Model. [BioMed Res Int](https://doi.org/10.1155/2021/6380141), v. 2021, n. 6380141, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6380141>
83. ZHU, M; ZHONG, W.; CAO, W.; ZHANG, Q.; WU, G. Chondroinductive/chondroconductive peptides and their-functionalized biomaterials for cartilage tissue engineering. **Bioactive Mat**, v. 9, p. 221-238, 2022 ISSN 2452-199X, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.07.004>.

84. ZUO H, JIANG L, QU N, WANG J, CUI X, YAO W . The Biomarkers Changes in Serum and the Correlation with Quantitative MRI Markers by Histopathologic Evaluation of the Cartilage in Surgically-Induced Osteoarthritis Rabbit Model. **PLoS ONE**, v.10, n.4, e0124717, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124717>

# **CAPÍTULO 2**

Artigo científico a ser submetido para o periódico **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**.

As normas para a publicação estão dispostas no ANEXO I, localizado após as referências bibliográficas ao final deste capítulo, e podem ser encontradas no endereço eletrônico:

<https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/for-authors/author-guidelines>