

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/04/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**POTENCIAL DE IMUNOMODULAÇÃO E REPARAÇÃO DAS
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA
MEMBRANA SINOVIAL E ENCAPSULADAS EM HIDROGEL DE
ALGINATO EM LESÕES ARTICULARES INDUZIDAS
EXPERIMENTALMENTE EM EQUINOS**

VITOR HUGO DOS SANTOS

BOTUCATU – SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**POTENCIAL DE IMUNOMODULAÇÃO E REPARAÇÃO DAS
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA
MEMBRANA SINOVIAL E ENCAPSULADAS EM HIDROGEL DE
ALGINATO EM LESÕES ARTICULARES INDUZIDAS
EXPERIMENTALMENTE EM EQUINOS**

VITOR HUGO DOS SANTOS

Tese de Doutorado a ser apresentada junto
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal para obtenção do
título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Liz Garcia
Alves

BOTUCATU – SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Vitor Hugo dos.

Potencial de imunomodulação e reparação das células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial e encapsuladas em hidrogel de alginato em lesões articulares induzidas experimentalmente em equinos / Vitor Hugo dos Santos. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Ana Liz Garcia Alves
Capes: 50501003

1. Equinos - Doenças. 2. Ortopedia. 3. Articulações.
4. Osteoartrite - Tratamento. 5. Células-tronco. 6. Terapia celular.

Palavras-chave: Articulação; Células tronco; Equinos; Ortopedia; Terapia celular.

Vitor Hugo dos Santos

“Potencial de imunomodulação e reparação das células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial e encapsuladas em hidrogel de alginato em lesões articulares induzidas experimentalmente em equinos”

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Liz Garcia Alves

Presidente e Orientadora

*Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ/UNESP - Botucatu-SP*

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Membro

*Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ/UNESP - Botucatu-SP*

Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe

Membro

*Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ/UNESP – Botucatu-SP*

Prof. Dr. Armando de Mattos Carvalho

Membro

*Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)*

Prof. Dra. Anna Paula Balesdent Barreira

Membro

*Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sua proteção constante em todos os momentos da minha vida. A presença Dele me enche de amor, harmonia, confiança no futuro e vontade de estar evoluindo sempre.

Aos meus pais, Edson Amaro e Roseli, que estiveram ao meu lado em todas as adversidades, me ensinando, me motivando e me amparando sempre. Se não fosse por vocês certamente eu não chegaria até aqui hoje. Ao meu irmão Bruno Cesar e minha cunhada Ana Paula que me auxiliou com sua amizade, atenção e carinho. Aos meus sobrinhos Isadora, João Pedro e Maria Júlia, pelo amor e carinho. À minha família, toda a gratidão.

A minha esposa Gabriela Dantas, agradeço imensamente pelo apoio e incentivo em todos os momentos nesses últimos sete anos. Sua companhia me confortou e me deu coragem e ânimo para obter sucesso nessa jornada, mesmo diante de tantas mudanças na sua vida. Obrigado por estar construindo essa trajetória comigo, com muito amor, alegria e companheirismo. Eu amo você!

A minha orientadora, Professora Ana Liz Garcia Alves, não somente pelos diversos ensinamentos e confiança depositados em mim e no meu trabalho, me apoiou e me incentivou na carreira mesmo que distante.

Aos meus amigos João Pedro, Antônio Guilherme, Gustavo Rosa, Emanuel Apolonio, Fernanda Stievani e Mariana Correa, pela amizade, apoio, auxílio na prática experimental e o companheirismo em todos os momentos.

Ao aluno de graduação Enrico pelo auxílio da prática experimental e manejo com os animais.

Ao Laboratório de Terapia Celular e ao de Cirurgia de Grandes Animais da FMVZ – UNESP Campus Botucatu/SP por todo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus alunos e colegas de trabalho do Centro Universitário Integrado e da Universidade Estadual de Londrina/PR.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio projeto 2017/14460-4.

Aos meus familiares e amigos que sempre me incentivaram.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
<i>CAPÍTULO 1</i>	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
3. JUSTIFICATIVA	22
4. OBJETIVOS	22
5. REFERÊNCIAS.....	24
<i>CAPÍTULO 2:</i>	31
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e métodos	34
Resultados	39
Discussão.....	46
<i>CAPÍTULO 3:</i>	61
Resumo.....	61
Abstract.....	62
Introdução	63
Material e métodos	64
Resultados	69
Discussão.....	74
Conclusão	79
ANEXOS	86

SANTOS, V. H. **Potencial de imunomodulação e reparação das células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial e encapsuladas em hidrogel de alginato em lesões articulares induzidas experimentalmente em equinos.** Botucatu, 2020, **90p**. Tese - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ - Campus de Botucatu.

RESUMO

A alta casuística e os desafios encontrado no tratamento da osteoartrite (OA) em equinos, tem impulsionado a comunidade científica na busca do tratamento mais efetivo. As células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial (CTM_{MS}) tem apresentado resultados promissores no tratamento de lesões articulares, especialmente por seu potencial de imunomodulação e reparação, mas que necessita de melhor compreensão. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características da imunomodulação e reparação após a aplicação intra-articular das CTM_{MS} livres e encapsuladas em hidrogel de alginato em lesões articulares induzidas em equinos. Lesões condrais foram realizadas na tróclea medial do talus em quinze cavalos. No dia da indução os animais foram divididos em três grupos. Os grupos foram divididos em CTM_{MS} encapsulada, CTM_{MS} livres e controle. Foram realizadas avaliações clínicas, análise citológica, química e dosagem de citocinas no líquido sinovial (IL-1, IL-10, IL-6, INF- γ , TNF α , Substância P, amilóide sérica A, TGF β , IGF e PGE2), antes do defeito e 24, 48, 96, 168 e 336 horas. Após 150 dias da instituição dos tratamentos, foram realizadas avaliação *in situ* através da cirurgia artroscópica utilizando os escores ICRS e coletamos material para análise histológica escore de O'Driscoll e imunohistoquímica para colágeno tipo II. O tratamento com CTM_{MS} seja ela livre ou encapsulada reduziu o processo inflamatório articular. O grupo CTM_{MS} encapsulada apresentou maior processo inflamatório inicial comparado com os demais grupos, em função do elevado número de neutrófilos, macrófagos, IL-6, IL-10, TNF α e INF- γ . Na avaliação *in situ* da reparação da cartilagem, foi observado diferença estatística na avaliação global de reparo no CTM_{MS} encapsulada. Na análise macroscópica coradas com hematoxilina-eosina e azul de toluidina, o CTM_{MS} encapsulada e CTM_{MS} livre, demonstraram diferentes graus da formação de fibrocartilagem, maior quantidade no CTM_{MS} livre, no entanto as características morfológicas foram semelhantes a cartilagem nativa. As CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato demonstram ter maior

potencial de imunomodulação por reduzir a contagem de linfócitos e macrófagos, aumentar a IL-10 e IL-6 no líquido sinovial, o que contribuiu de forma mais eficaz para o controle da inflamação e na reparação quando comparado ao grupo de CTM_{MS} livres, provavelmente devido ao maior tempo de permanência das células encapsuladas dentro da articulação.

Palavras-chave: cavalos; inflamação; osteoartrite; terapia celular; engenharia tecidual.

SANTOS, V. H. **Potential for immunomodulation and repair of the Mesenchymal Stem Cells derived from the synovial membrane and encapsulated in alginate hydrogel in experimentally induced joint lesions in equine.** Botucatu, 2020, **90p.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ - Campus de Botucatu.

ABSTRACT

The high casuistry and the challenges encountered in the treatment of osteoarthritis (OA) in horses has driven the scientific community in the search for the most effective treatment. Mesenchymal stem cells derived from synovial membrane (MSC_{SM}) have shown promising results in the treatment of joint lesions, especially for their potential for immunomodulation and repair, but need better understanding. Therefore, the objective of this work was to evaluate the characteristics of immunomodulation and repair after the intra-articular application of free and encapsulated MSC_{SM} in alginate hydrogel in equine induced joint lesions. Chondral lesions were performed in the medial trochlea of the talus in fifteen horses. On the day of induction the animals were divided into three groups. The groups were divided into encapsulated MSC_{SM}, free MSC_{SM} and control. Clinical evaluations, cytological analysis, chemistry and cytokine dosage in the synovial fluid (IL-1, IL-10, IL-6, INF- γ , TNF α , Substance P, amyloid serum A, TGF β , IGF and PGE2) were performed before the defect and 24, 48, 96, 168 and 336 hours. After 150 days from the institution of treatment, *in situ* evaluation was performed through arthroscopic surgery using the ICRS scores and we collected material for histological analysis O'Driscoll score and immunohistochemistry for collagen type II. The treatment with MSC_{SM}, either free or encapsulated, reduced the joint inflammatory process. The encapsulated MSC_{SM} group presented a greater initial inflammatory process compared to the other groups, due to the high number of neutrophils, macrophages, IL-6, IL-10, TNF α and INF- γ . In the *in situ* evaluation of the cartilage repair, a statistical difference was observed in the global evaluation of the encapsulated MSC_{SM} repair. In the macroscopic analysis stained with hematoxylin-eosin and toluidine blue, the encapsulated MSC_{SM} and free MSC_{SM} demonstrated different degrees of fibrocartilage formation, greater amount in free MSC_{SM}, however the morphological characteristics were similar to native cartilage. The MSC_{SM}

encapsulated in alginate hydrogel showed higher immunomodulation potential by reducing the lymphocyte and macrophage counts, increasing the IL-10 and IL-6 in the synovial fluid, which contributed more effectively to the control of inflammation and repair when compared to the group of free MSC_{SM}, probably due to the longer stay of the encapsulated cells inside the joint.

Keywords: horses; inflammation; osteoarthritis; cell therapy; bioengineering.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é a principal causa de baixo desempenho e a retirada precoce dos equinos das atividades esportivas (FRISBIE et al., 2007; FRISBIE, 2012; BROSSI et al., 2015; SOUZA, 2016; COLBATH et al., 2017). Acomete os componentes articulares, gerando grandes prejuízos econômicos para o mercado do cavalo atleta, por se tratar de uma doença altamente incapacitante e de tratamento complexo (FRISBIE et al., 2007; SUTTON et al., 2009; SCANZELLO; GOLDRING, 2012; MONTEIRO; BETTENCOURT; LEPAGE, 2015).

Nos últimos anos diversos pesquisadores estudaram as diferentes técnicas para obter eficácia no tratamento da osteoartrite (FRISBIE et al., 2007; YAMADA et al., 2016), incluindo a estimulação da medula óssea, alo enxertos, auto enxertos de cartilagem, juntamente com a bioengenharia tecidual. No entanto, os resultados obtidos não são completamente satisfatórios, por resultarem no desenvolvimento de fibrocartilagem que apresenta propriedades mecânicas inferiores ao tecido nativo (SCHMIDT; CHEN; LYNCH, 2006; HUEY; HU; ATHANASIOU, 2012; SATUÉ et al., 2019), mas reduz a dor e a destruição articular (YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015).

Diante disso, a utilização das células tronco mesenquimais (CTM) evidenciou resultados promissores na aplicação intra-articular (VINATIER et al., 2009). Atuando na diminuição da formação de fibrocartilagem e interrupção do ciclo inflamatório articular por liberar substâncias anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (IL 10, IL 1ra, TGF- β , PGE2, IL-6 e TNF α) (SHI et al., 2012; VAN LENT; VAN DEN BERG, 2013; YAMADA et al., 2013), resultados que corroboram com as técnicas cirúrgicas habituais atualmente disponíveis (MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012; YAMADA et al., 2013, 2016; ANDERSON et al., 2014).

Inúmeras fontes de CTMs são descritas, mas em especial as células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial (CTM_{MS}) demonstram superioridade no potencial de diferenciação condrôgenica, por ser considerada fonte tecidual específica além de apresentar comprovado potencial

condrogênico e de expansão, além de ser obtida por técnicas minimamente invasivas, o que faz dela uma excelente alternativa terapêutica (SAKAGUCHI et al., 2005; LEE et al., 2013).

O método de aplicação da CTM deve garantir o melhor desempenho das CTM no local da lesão (NÖTH; STEINERT; TUAN, 2008). O encapsulamento com hidrogel de alginato (HA) demonstrou capacidade de manter a integridade das células, e possibilitou a observação no local da lesão, por estar mais tempo no espaço articular (SANTOS et al., 2019). Este arcabouço, demonstrou resultados positivos na proliferação celular, viabilidade e produção de moléculas específicas de cartilagem como colágeno tipo II e proteoglicanos (HÄUSELMANN et al., 1994; DE CAMARGO BITTENCOURT et al., 2009; SANTOS et al., 2018).

Apesar de todo este potencial, ainda não existem estudos sobre a aplicação da técnica de microencapsulamento das CTM em HA para o reparo de lesões articulares, em equinos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a imunomulação e reparação das CTM_{MS} alogênicas encapsuladas e livres, administradas por via intra-articular o tratamento de lesões de cartilagem induzida experimentalmente em equinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Osteoartrite em equinos

A OA representa 35% das claudicações em equinos, e é considerada uma doença altamente incapacitante e de tratamento complexo por apresentar origem multifatorial, (YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015; MONTEIRO; BETTENCOURT; LEPAGE, 2015). Trata-se de enfermidade relevante dentro do mercado do cavalo atleta em função da solidez de sua instalação e das características degenerativas da doença, reduzindo o desempenho e valor dos animais (SCHLUETER; ORTH, 2004; STASHAK, 2006; MONTEIRO; BETTENCOURT; LEPAGE, 2015).

A OA foi descrita em 1909 (HUTCHEON, 1909), como a “doença das articulações” em equinos, definindo como crescimento ou alargamento dos ossos, decorrente do processo inflamatório, originado por concussões repetidas ou hereditária, seguida de erosões da superfície articular e conseqüentemente remodelamento e deposição óssea nas eminências articulares. Interessante

ressaltar, que na época já afirmavam que a doença instalada, todos os tratamentos iriam falhar, ilustrando assim a complexidade da reparação da cartilagem articular e da osteoartrite.

Os equinos diagnosticados com OA demonstram um desafio para a área médica, tanto clínica como cirúrgica, em virtude do potencial reduzido de reparação da cartilagem articular. Inúmeras pesquisas científicas buscam terapias capazes de modificar o desenvolvimento da enfermidade. Na rotina clínica o tratamento é baseado na utilização de anti-inflamatórios não-esteroidais, corticosteroides, glicosaminoglicanos polissulfatados (PSGAGs), ácido hialurônico (AH), e até mesmo uma combinação desses princípios ativos (FRISBIE et al., 2009a, 2009b; FRISBIE, 2012).

A Terapia com soro autólogo condicionado (ACS) e outras terapias como plasma rico em plaquetas e células tronco mesenquimais são utilizadas e, em casos graves, pode-se lançar mão da terapia cirúrgica através de métodos minimamente invasivos (FRISBIE et al., 2007, 2009b, 2009a; MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012).

A comunidade científica obteve grandes avanços nas abordagens minimamente invasivas e farmacológica, mas mesmo assim os desafios são grandes, principalmente devido ao microambiente articular decorrente da OA e da restrita capacidade de regeneração condral, decorrente de sua natureza avascular, que leva a reparação por meio da fibrose (YAMADA et al., 2013; MAZOR et al., 2014; REDDI; IWASA, 2019).

A reparação condral depende de processos intrínsecos, limitados ao baixo potencial mitótico dos condrócitos, e extrínsecos, restritos à migração das células progenitoras do osso subcondral (COLBATH et al., 2017), resultando em tecido de reparação abundante em tecido fibrocartilaginoso, composto de metade dos glicosaminoglicanos de uma cartilagem normal, o que restringe suas características morfofuncionais (COLEMAN et al., 2010; MAZOR et al., 2014; YAMADA et al., 2016).

Buscando superar os desafios do processo de reparação da cartilagem, diferentes terapias e novas abordagens tem sido estudadas na tentativa de restaurar as funções e componentes estruturais para a obtenção de uma cartilagem articular saudável.

2.2. Cápsulas de hidrogel de alginato

Nos últimos anos, a bioengenharia tecidual demonstrou grande avanço, na reparação estrutural e funcional dos tecidos em que estão sendo utilizadas. No entanto, a influencia dos biomateriais é significativa no crescimento e diferenciação das células (AWAD et al., 2004). Esses autores confirmaram essa hipótese de que em diferentes hidrogéis como alginato, agarose e suporte poroso de gelatina, as células do tecido adiposo foram positivas para a diferenciação condrogênica.

O encapsulamento das CTMs em hidrogel de alginato demonstrou que as cápsulas são capazes de produzir ambiente semelhante à cartilagem articular, sendo promissoras para o uso na engenharia de tecidos (FOCAROLI et al., 2016). Deve-se destacar que a técnica de encapsulamento é simples e facilmente reproduzível, não interferindo na viabilidade celular (FOCAROLI et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

A utilização da engenharia tecidual através do cultivo em três dimensões é necessária para as CTMs, pois somente nessa condição é possível de manter a morfologia e a produção dos componentes da matriz (YANG et al., 2004). Esse aspecto não é observado em monocamadas, pois as células aderem ao fundo da garrafa de cultura, passando pelo processo de desdiferenciação, apresentando morfologia atípica e iniciam a produção de matriz fibroblástica como colágeno tipo I (BENYA; SHAFFER, 1982; MANDL et al., 2004; YANG et al., 2004; CONNELLY; GARCÍA; LEVENSTON, 2007; NIMURA et al., 2008).

O cultivo em três dimensões atende as necessidades das CTMs, mantendo as células em uma matriz artificial, biodegradável, capaz de sustentar o crescimento por alguns meses, para posteriormente realização do implante no defeito condral, sabendo que a matriz se degrada em 8 a 10 semanas após o implante (YANG et al., 2004; CHEN; TUAN, 2008).

Inúmeros compostos estão sendo estudados para o cultivo de CTMs estimulando a diferenciação em condrócitos, sendo eles: gel de colágeno tipo I e II, esponjas de colágeno tipo II, ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídeos e alginato (WAKITANI et al., 1989; FRAGONAS et al., 2000; OCHI et al., 2001; PABBRUWE et al., 2009; PANSERI et al., 2012).

A matriz do arcabouço deve ser escolhida de acordo com a adaptação das células a sua composição (FRESHNEY, 2011). O alginato é um

polissacarídeo linear (n-ácido gulurônico–ácido manurônico), aniônico, capaz de gelatinizar-se de maneira reversível na presença de cálcio ou outros cátions divalentes (HÄUSELMANN et al., 1994). A matriz de alginato pode ser utilizada tanto em implantes como em estudos da condrogênese, com grande importância no entendimento da fisiologia do tecido cartilaginoso (FRAGONAS et al., 2000)(FRAGONAS et al., 2000). Uma das vantagens deste polissacarídeo polimerizado é a sua constituição atóxica, biocompatível e injetável em modelos animais (FRESHNEY, 2011).

O potencial condrogênico foi avaliado após o encapsulamento das CTMs em hidrogel de alginato, para posteriormente utilização na reparação de defeitos de cartilagem, em função da semelhança do arcabouço com a cartilagem articular (AWAD et al., 2004; FOCAROLI et al., 2016).

As CTMs atuam diretamente no local da lesão (SANTOS et al., 2019) agindo na modulação da resposta inflamatória articular, porém o grande desafio é manter as CTMs por mais tempo na articulação (YAMADA et al., 2013, 2016), pois o insucesso terapêutico pode ser justificado pelo rápido efluxo pela cavidade articular após administração. A cavidade articular pode parecer um compartimento isolado do organismo, onde o material celular ficará confinado. No entanto, deve-se considerar que existe um equilíbrio direto com a circulação sanguínea regional e sistêmica, fato observado na administração de antibióticos intraarticular em ratos, relatando padrão semelhante de absorção entre os diferentes antibióticos, seja por via intraarticular ou intramuscular (SCHURMAN; KAJIYAMA, 1985).

A utilização dos implantes encapsulados demonstrou maior permanência das células na articulação, diminuindo a migração para circulação corpórea (TER HUURNE et al., 2012; LEE et al., 2013; SANTOS et al., 2019). Alguns estudos demonstraram que as CTMs ficam aderidas a membrana sinovial, juntamente com os macrófagos após a aplicação (LEE et al., 2013; SANTOS et al., 2019). Outros estudos, descrevem o tropismo das CTMs para o local da lesão em função do processo inflamatório (TER HUURNE et al., 2012), confirmando a permanência das CTMs dentro do espaço articular.

2.3. Substâncias inflamatórias

As citocinas são compostos hidrossolúveis, quimicamente formadas por polipetídeos ou glicoproteínas extracelulares, são produzidas por células locais da lesão e células do sistema imunológico, não possuem habilidade de armazenamento e atuam de forma parácrina ou autócrina. (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; AKDIS et al., 2011; TURNER et al., 2014). São ainda capazes de influenciar a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células do sistema imune, podendo atuar de forma pró-inflamatória ou anti-inflamatória. Dentre as pró-inflamatórias temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e fator de necrose tumoral (TNF- α) e anti-inflamatórias as principais são IL-4, IL-10, IL-13 (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; ZHANG; AN, 2007).

A IL-6 é estimulada pelo TNF- α e IL-1 a ser produzida pelos macrófagos, monócitos, eosinófilos (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; ZHANG; AN, 2007). Considerada pró-inflamatória responsável pela maturação e ativação dos neutrófilos, maturação dos macrófagos e manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células matadoras naturais. (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; RAEBURN et al., 2002; AKDIS et al., 2011; KAPOOR et al., 2011).

IL-1 α é sintetizada por vários tipos celulares, em especial os monócitos, macrófagos e neutrófilos (TURNER et al., 2014) e está associada a membranas celulares, agindo através de contato celular (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; RAEBURN et al., 2002; ZHANG; AN, 2007). Classificada como pró-inflamatória, atua potencializando a proliferação, diferenciação e função celular de células imunes inatas, além de mediar muitas doenças inflamatórias, potencializando as respostas imunes e inflamatórias (AKDIS et al., 2011).

O TNF- α , conhecido como fator de necrose tumoral derivado de monócitos, é considerado potente mediador inflamatório com papel fundamental na ação inflamatória do sistema imune inato, incluindo a indução e produção de citocinas, ativação ou expressão de moléculas de adesão ao atuar no sistema imunológico inato (ROTHER et al., 1992; VANDENABEELE et al., 1995; LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001). Demonstra ser a citocina mais importante, mediando as respostas inflamatórias e imunes (TURNER et al., 2014), além de ser precoce e potente na resposta inflamatória (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; RAEBURN et al., 2002).

A IL-10 sintetizada por macrófagos e células B, atua de forma anti-inflamatória, por inibir $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6 e a função celular das células mononucleadas (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; ZHANG; AN, 2007; TURNER et al., 2014). Além disso, aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de $\text{IFN-}\gamma$ pelas células natural killer (NK) (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; ZHANG; AN, 2007).

A prostaglandina E2 (PGE2) atua suprimindo a geração e migração do $\text{TNF-}\alpha$, na proliferação de células T e atividade citolítica da célula natural killer (WANG; YUAN; XIE, 2018), atua na destruição da cartilagem através da liberação de metilmetaloproteinases como a colagenase (KAPOOR et al., 2011).

O fator de crescimento transformante ($\text{TGF-}\beta$) age em células T e B ativadas de forma inibir a proliferação celular, além de inibir a hematopoiese (TURNER et al., 2014), é produzido por células B e T (DEMBIC, 2015).

Amilóide A sérica (SAA) considerada uma proteína plasmática de fase aguda, altamente conservada, predominantemente produzida no fígado (EKLUND; NIEMI; KOVANEN, 2012), possui muitas propriedades pró-inflamatórias semelhante as citocinas. Ainda possui capacidade de promover a expressão de varias citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8 e $\text{TNF-}\alpha$ (SONG et al., 2009).

Substância P é produzida por macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas, atuam no processo inflamatório, melhorando a proliferação linfocitária, produção de imunoglobulinas, aumenta a secreção de citocina por linfócitos, monócitos e macrófagos, ainda é capaz de estimular mais o recrutamento de leucócitos, amplificando a resposta inflamatória (O'CONNOR et al., 2004).

Fator de crescimento dependente da insulina (IGF-1) produzido por células hepáticas, no entanto a maioria das células do corpo podem produzir (ESCRIBANO et al., 2009). Possui capacidade em aumentar a imunidade inata e adquirida através da regulação da proliferação dos linfócitos, aumento da produção do $\text{TNF-}\alpha$ e da células natural killer. Exerce efeitos na cartilagem, de forma induzir a produção de componentes da matriz cartilaginosa, dos quais proteoglicanos e colágeno tipo II são mais abundantes (GUENTHER, H.L., GUENTHER, H.E, FROESCH, E.R. AND FLEISCH, 1982).

Interferon gama (INF- γ) citocina produzida por células natural killer, macrófagos, células B e T, atuando em diversos tecidos, inibindo a ativação dos macrófagos, aumenta a função dos neutrófilos e monócitos, regula a expressão de MHC I e II (TURNER et al., 2014), também inibe o crescimento celular e apoptose, além de controlar a resposta imune por induzir a morte celular por ativação das células T (AKDIS et al., 2011).

2.4. Resposta inflamatória articular após o uso de CTMs

As CTMs, independente da fonte de tecido que são extraídas, autólogas ou alogênicas, apresentam grande potencial imunomodulador por não induzirem a proliferação de leucócitos na ausência de inativação *in vitro* (CARRADE et al., 2012). São consideradas anti-inflamatórias por inibirem a proliferação de linfócitos T quando estimulados *in vitro*, em primatas não humanos, cães, galinhas, coelhos, porcos, ovelhas e equinos (CARRADE; BORJESSON, 2013).

Os mediadores específicos produzidos pela CTMs podem variar de espécie para espécie e de acordo com a fonte tecidual (CARRADE; BORJESSON, 2013). Em especial as CTMs de equinos produzem diferentes mediadores, as derivadas da medula óssea, produzem oxido nítrico, enquanto as de tecido adiposo e cordão umbilical não produzem (CARRADE et al., 2012). Essas diferenças são desconhecidas *in vivo*, no entanto evidências surgiram através da diminuição do tempo de cicatrização em lesões tendíneas de equinos após a aplicação de CTMs derivadas do sangue do cordão umbilical, em comparação com as CTMs derivadas de outros tecidos, podendo afirmar que essas células provocam um aumento da produção de oxido nítrico, cursando com aumento da angiogênese *in vivo* (REN et al., 2009).

As CTMs são responsáveis pela produção de muitas citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e proteínas imunomoduladoras (SHI et al., 2012). Através desses mecanismos, elas podem induzir a angiogênese, estimular células intrínsecas a se regenerar e induzir apoptose (SINGER; CAPLAN, 2011). Ainda são capazes de induzir a apoptose de células T ativadas, diminuir a proliferação de células T e alterar o fenótipo das células T (PERONI; BORJESSON, 2011). Não é necessário o contato direto das CTMs com as células para desencadear esses efeitos. Sugere-se que os fatores solúveis

segregados ou vesículas extracelulares podem ser responsáveis por exercer esses efeitos (LAVOIE; ROSU-MYLES, 2013).

Nos últimos anos grande parte das pesquisas relatam as propriedades imunomoduladoras das CTMs (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008; JAKUB TOLAR, MD, PHD, KATARINA LE BLANC, MD, PHD, ARMAND KEATING, MD; R. BLAZAR, 2010; GUPTA et al., 2012; TER HUURNE et al., 2012). Esses estudos descrevem a capacidade das CTMs em modular o funcionamento do sistema imune adaptativo, como o linfócito T e B, estimular a expressão de IL-10, TGF- β e IL-1ra, diminuindo o processo inflamatório. Ainda descrevem que algumas citocinas próinflamatórias, como o interferon gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a IL-6 apresentam capacidade de amplificar o potencial imunomodulador das CTMs.

As CTMs quando estimuladas atuam expressando moléculas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β e IL-1ra, diminuem a proliferação e produção de anticorpos, secretando indolamina 2,3 – dioxigenase (IDO) (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008; SHI et al., 2012; VAN LENT; VAN DEN BERG, 2013; YAMADA et al., 2013), reduzindo significativamente o processo inflamatório (GUPTA et al., 2012; TER HUURNE et al., 2012). O potencial imunossupressor das CTMs pode ser acentuado através da presença das citocinas pró inflamatórias, como o INF- γ a IL- 6 e o TNF- α , tanto *in vitro* como *in vivo* (SHI et al., 2012).

Idealmente, as CTMs deveriam expressar baixas concentrações de MHC-I e não expressar MHC classe II (WANG; ZHAO, 2013), contribuindo para tolerância imunológica. As CTMs de equinos expressam MHC classe I e são negativas para a expressão de MHC II (BARBERINI et al., 2014). As CTMs demonstram grande variação na expressão de MHC II, a estimulação de CTMs negativas para MHC II com IFN- γ , aumentou a expressão de forma acentuada de MHC II, esses resultados sugerem que as CTMs devem ser confirmadas como MHC II negativas antes da aplicação alogênica. No entanto, deve-se considerar que mesmo as CTMs negativas para MHC classe II, são capazes de regular positivamente a expressão de MHC classe II se implantadas em áreas com processo inflamatório ativo, como demonstrado com a estimulação *in vitro* com IFN- γ (SCHNABEL et al., 2014). O MHC, quando positivo ou ativado, além de dar início à resposta imune, pode mediar a adesão celular, produção de

citocinas, expressão de moléculas coestimulatórias, proliferação e apoptose (LIU et al., 2011).

A produção de TGF- β 1 nas espécies animais apresenta variações de acordo com o tipo de tecido e ativação celular. Em cães e suínos as CTMs de medula óssea, e em equinos as CTMs de tecido adiposo, medula óssea, cordão umbilical e sangue do cordão umbilical, não aumentam a produção após a exposição de linfócitos ativados (CARRADE; BORJESSON, 2013).

Estudos descrevendo a resposta do uso das CTMs são controversos. Em osteoartrite induzida, seguida da aplicação de CTMs encapsuladas em hidrogel de alginato, os autores observaram melhora significativa no processo inflamatório, espessamento da membrana sinovial, diminuição dos osteófitos e entesófitos (TER HUURNE et al., 2012).

Há relatos que as CTMs também tem papel importante na indução dos mediadores pró-inflamatórios, atuando na apresentação de antígenos - características que as tornam imunogênicas, de acordo com as condições inflamatórias locais e o estímulo a que elas são submetidas (SHI et al., 2012).

A combinação dos efeitos parácrinos das CTMs e o contato direto das células possibilitam os efeitos imunomoduladores e regenerativos, cursando com um feedback negativo e impedindo assim as respostas inflamatória e imune excessivas produzidas em algumas doenças (PROCKOP et al., 2010).

O escasso número de estudos sobre os mediadores em fluidos e tecidos, no que se refere a cinética do processo inflamatório e as funções redundantes de muitos mediadores dificultam a interpretação das concentrações dos mediadores em momentos isolados (CARRADE; BORJESSON, 2013).

Pacientes com osteoartrite apresentam sinovite com predominância de macrófagos, que produzem altos níveis de fatores pró inflamatórios, principalmente as citocinas (IL-1), prostaglandina E₂ (PGE₂), propiciando a liberação das enzimas de degradação da cartilagem. Além disso, a presença de fragmentos livres dentro da articulação em conjunto com a exposição do osso subcondral fazem com que ocorra a manutenção da sinovite e estimulação continua dos macrófagos sinoviais, favorecendo o ciclo da osteoartrite (MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2012; VAN LENT; VAN DEN BERG, 2013).

A liberação de PGE₂ atua efetivamente na patogenia da osteoartrite, em função da degradação da matriz de colágeno (MCILWRAITH; FRISBIE;

KAWCAK, 2012). No entanto as CTMs também produzem PGE₂ em condições inflamatórias, mas nesse caso ocorre uma resposta imunossupressora. Em função dessa característica, a PGE₂ produzida nas osteoartrite, é decisiva para o efeito terapêutico das CTMs e na imunorregulação, por agir com as demais moléculas imunossupressoras (SHI et al., 2012; SOLEYMANINEJADIAN; PRAMANIK; SAMADIAN, 2012).

Em equinos com osteoartrite foi possível observar que os níveis de PGE₂ diminuíram no líquido sinovial após a aplicação de CTMs derivadas da medula óssea em comparação com os animais não tratados, e esses achados foram atribuídos a diminuição do edema e inflamação, uma semana após a administração das CTMs (FRISBIE et al., 2009c). Em humanos, as CTMs expostas ao líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatoide tiveram aumento na expressão do RNAm de IL6 e IDO e suprimiram a proliferação de linfócitos in vitro (CARRADE; BORJESSON, 2013).

As CTMs de equinos atuam diminuindo a produção de TNF- α e IFN- γ enquanto mostram aumento da produção de PGE₂ e IL-6 (CARRADE et al., 2012). As CTMs com expressão de MHC-II tratadas com TNF- α não apresentaram aumento na expressão de MHC-II. No entanto, eles exibiram expressão aumentada de MHC-I, IL-6 e IL-8. A expressão do MHC-II foi regulada negativamente pela exposição a IL-1 β (HILL et al., 2017). Esses achados confirmam ainda o fato de que as CTMs devem ser expostas a mediadores inflamatórios para exibir suas habilidades imunomoduladoras.

A presença do processo inflamatório e, em especial a presença de citocinas, é essencial para as CTMs, para que elas consigam atuar na imunomodulação e/ou imunogenicidade, e a ausência de fatores como TNF- α , INF- γ , lipopolissacarídeos (LPS), diversos tipos de interleucinas e hipóxia diminuem a ação das CTM, principalmente em relação à liberação de fatores de crescimento (principalmente TGF- β , IGF-1, VEGF, PDGF, HGF e FGF), fatores tróficos, quimiotaxia e capacidade imunorregulatória (SHI et al., 2012; SOLEYMANINEJADIAN; PRAMANIK; SAMADIAN, 2012; LEE et al., 2013).

A exposição a moléculas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-1 e lipopolissacarídeo (LPS) ajuda a direcionar as CTMs para o local da lesão (processo denominado “homing”) e ativar a secreção de seus marcadores bioativos (SHI et al., 2012). O retorno da CTM ao local da lesão é auxiliado pela

VCAM-1 e E selectina ativada pelas células endoteliais lesadas (DA SILVA MEIRELLES et al., 2009). A presença das CTMs aderidas na membrana sinovial inflamada, pode apresentar imunogenicidade ao invés dos efeitos imunomoduladores (LEE et al., 2013).

Apesar dos diversos estudos ainda há divergências a respeito da identificação específica dos mediadores inflamatórios que são produzidos ou inibidos pelas CTM, não havendo consenso sobre o mecanismo exato envolvido nos efeitos imunomoduladores das CTMs *in vivo* (PROCKOP et al., 2010; CARRADE; BORJESSON, 2013). Há ainda uma rede de interações e efeitos biológicos a serem entendidos na interação de CTMs e o local inflamado.

2.6. Reparação tecidual após aplicação de CTMs no tratamento da osteoartrite

As pesquisas com CTMs demonstram a eficiência no tratamento de osteoartrite em função do seu potencial regenerativo e natureza biológica (WIKÉ; NYDAM; NIXON, 2007; BROECKX et al., 2019). Existem relatos que a administração de CTMs intra-articular melhora a reparação da cartilagem (WIKÉ; NYDAM; NIXON, 2007; FRISBIE et al., 2009a; MCILWRAITH et al., 2011), a espessura e integração do tecido de reparação em imagens de ressonância magnética, a qualidade do tecido neoformado, após verificação artroscópica, o acréscimo da deposição de glicosaminoglicanos e colágeno no tecido de reparação, além de levar a diminuição da dor (GIANNINI et al., 2009; GIGANTE et al., 2011; MCILWRAITH et al., 2011; YAMADA et al., 2013).

Além desses achados, as CTMs que foram induzidas a diferenciação condrogênica *in vivo* produziram substâncias específicas da cartilagem, como aggrecan, glicosaminoglicanos e colágeno tipo II, substâncias estas essenciais no reparo da cartilagem (BERG et al., 2009; SPAAS et al., 2013; BROECKX et al., 2014, 2019).

Os mecanismos de ação das CTMs ainda não são bem definidos, mas a possibilidade das CTMs migrarem para o local da lesão, integrando-se ao tecido e causando a diferenciação em células funcionais está sendo reavaliado nos estudos recentes. Nos últimos anos, observa-se que as CTMs regeneram as lesões teciduais através dos sinais parácrinos, eventos de fusão celular e secreção de vesículas extracelulares (DA SILVA MEIRELLES et al., 2009).

Esses mecanismos são responsáveis pelo efeito anti-inflamatório e angiogênico, estimulando a sobrevivência e proliferação celular local (DA SILVA MEIRELLES et al., 2009; SPEES; LEE; GREGORY, 2016). Mesmo assim, na maior parte das pesquisas o resultado é a formação de fibrocartilagem no local das lesões condrais, após o tratamento da osteoartrite (GIANNINI et al., 2009; FILARDO et al., 2013; YAMADA et al., 2013).

A utilização de CTMs autólogas ou alogênicas de equinos demonstram a eficácia dos tratamentos, visto que os cavalos conseguiram voltar ao trabalho ou retomar o desempenho anterior, variando de 76% a 86% dos casos, dependendo da articulação afetada (BROECKX et al., 2014; FERRIS et al., 2014). Em especial as CTMs derivadas do líquido sinovial podem ser uma fonte melhor para regenerar os defeitos de cartilagem, seja condral ou osteocondral, já que precisa percorrer menor caminho para se tornar condrócito (ORTH et al., 2014).

Ao comparar as fontes celulares medula óssea e membrana sinovial encapsuladas em agarose, os autores observaram melhor cicatrização através da expressão de colágeno tipo II, característica da cartilagem hialina nos animais tratados com CTMs da membrana sinovial, viabilizando a utilização em defeitos osteocondrais de equinos (ZAYED et al., 2018).

Em estudo clínico realizado, utilizando células autólogas os autores não observaram os efeitos benéficos a longo prazo pois os animais não retornaram as atividades atléticas (WIKE; NYDAM; NIXON, 2007). Em contrapartida, a aplicação das CTMs livres na articulação demonstrou efeitos benéficos a longo prazo, em lesões condrais de 1 cm até o nível do osso subcondral no fêmur, permanecendo firmes no local da lesão (MCILWRAITH et al., 2010). O mesmo foi descrito após a utilização intra-articular das CTMs em suínos (LEE et al., 2013).

Aspirado de medula óssea ativado com trombina aplicado sob o defeito articular, demonstrou melhora significativa da reparação condral, observada em corte histológico (FORTIER et al., 2010). Em lesões condrais induzidas experimentalmente em equinos, e tratadas com a associação CTM/PRP gel, observou melhor organização tecidual, maior número de condrócitos, maior produção de matriz extracelular e menor produção de fibrose quando comparadas a um grupo controle sem tratamento (YAMADA et al., 2016).

5. REFERÊNCIAS

- AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.126, n.3, p.701-721, 2011.
- ANDERSON, J. A. et al. Stem cell therapies for knee cartilage repair: The current status of preclinical and clinical studies. **American Journal of Sports Medicine**, v.42, n.9, p. 2253–2261, 2014.
- AWAD, H. A. et al. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. **Biomaterials**, v.25, n.16, p.3211–3222, 2004.
- BARBERINI, D. J. et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: Immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem Cell Research and Therapy**, v.5, n.1, p.25, 2014.
- BENYA, P. D.; SHAFFER, J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. **Cell**, v.30, n.1, p. 215–224, 1982.
- BERG, L. C. et al. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v.22, n.5, p.363-70, 2009.
- BROECKX, S. et al. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: A preliminary study. **PLoS ONE**, v.9, n.1, 2014.
- BROECKX, S. Y. et al. Equine Allogeneic Chondrogenic Induced Mesenchymal Stem Cells Are an Effective Treatment for Degenerative Joint Disease in Horses. **Stem Cells and Development**, v.28, n.6, p.410–422, 2019.
- BROSSI, P. M. et al. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: A comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2015.
- CARRADE, D. D. et al. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Cell Medicine**, v.4, n.1, p.1-11, 2012.
- CARRADE, D. D.; BORJESSON, D. L. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. **Comparative Medicine**, v.63, n.3, p.207-17, 2013. .
- CHEN, F. H.; TUAN, R. S. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. **Arthritis Research and Therapy**, v.10, n.5, p.1–12, 2008.
- COLBATH, A. C. et al. Equine Models for the Investigation of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Orthopaedic Disease. **Operative Techniques in Sports Medicine**, v.25, n.1, p.41–49, 2017.
- COLEMAN, C. M. et al. Mesenchymal stem cells and osteoarthritis: Remedy or accomplice. **Human Gene Therapy**, v.21, n.10, p.1239–1250, 2010.
- CONNELLY, J. T.; GARCÍA, A. J.; LEVENSTON, M. E. Inhibition of in vitro chondrogenesis in RGD-modified three-dimensional alginate gels. **Biomaterials**, v.28, n.6, p.1071–1083, 2007.

- 1 CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A
2 primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical**
3 **Microbiology Reviews**, v.10, n.4, p.742-780, 1997.
- 4 DA SILVA MEIRELLES, L. et al. Mechanisms involved in the therapeutic
5 properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine and Growth Factor Reviews**,
6 v.20, n.5-6, p.419-27, 2009. .
- 7 DE CAMARGO BITTENCOURT, R. A. et al. Cultura de condrócitos em
8 arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. **Acta Ortopédica Brasileira**,
9 v.17, n.4, p.242–246, 2009.
- 10 DEMBIC, Z. **The Cytokines of the Immune System**. 1st Editio ed. [s.l.]
11 Academic Press, 2015.
- 12 EKLUND, K. K.; NIEMI, K.; KOVANEN, P. T. Immune functions of serum amyloid
13 A. **Critical Reviews in Immunology**, v.32, n.4, p.335-48, 2012. .
- 14 ESCRIBANO, O. et al. β -cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance:
15 Role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform.
16 **Diabetes**, v.58, n.4, p.820-8, 2009.
- 17 FERRIS, D. J. et al. Clinical outcome after intra-articular administration of bone
18 marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury.
19 **Veterinary Surgery**, v.43, n.3, p.255-65, 2014.
- 20 FILARDO, G. et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions:
21 From preclinical findings to clinical application in orthopaedics. **Knee Surgery,**
22 **Sports Traumatology, Arthroscopy**, v.21, n.8, p.1717–1729, 2013.
- 23 FOCAROLI, S. et al. Calcium/Cobalt Alginate Beads as Functional Scaffolds for
24 Cartilage Tissue Engineering. **Stem Cells International**, v.1, p.20–22, 2016.
- 25 FORTIER, L. A. et al. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness
26 cartilage repair compared with microfracture in the equine model. **Journal of**
27 **Bone and Joint Surgery - Series A**, v.92, n.10, p.1927-37, 2010.
- 28 FRAGONAS, E. et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of
29 allogenic chondrocytes in alginate. **Biomaterials**, v.21, n.8, p.795–801, 2000.
- 30 FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and**
31 **Specialized Applications**: Seventh Edition, Wiley Blackwell, 2016.
- 32 FRISBIE, D. D. et al. Induced Osteoarthritis. **Blood**, v.68, n.3, p. 290–296, 2007.
- 33 FRISBIE, D. D. et al. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium
34 hyaluronan administered with experimentally induced osteoarthritis. **American**
35 **journal of veterinary research**, v.70, n.2, p.203–209, 2009a.
- 36 FRISBIE, D. D. et al. Liposomal Cream for Treatment of Horses With
37 Experimentally Induced Osteoarthritis. **American Journal Of Veterinary**
38 **Research**, v.70, n.2, p.210-5, 2009b.
- 39 FRISBIE, D. D. et al. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or
40 bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis.
41 **Journal of Orthopaedic Research**, v.27, n.12, p.1675-80, 2009c.
- 42 FRISBIE, D. D. 57th Annual Convention of the American Association of Equine
43 Practitioners - AAEP - Stem Cells for Equine Joint Disease. p.5–8, 2012.

- 1 GIANNINI, S. et al. One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar
2 osteochondral lesions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.467,
3 n.12, p.3307-20, 2009.
- 4 GIGANTE, A. et al. Use of collagen scaffold and autologous bone marrow
5 concentrate as a one-step cartilage repair in the knee: histological repair in the
6 knee: histological results of second-look biopsies at 1 year follow-up.
7 **International journal of immunopathology and pharmacology**, v.24, n.1,
8 p.69-72, 2011.
- 9 GUENTHER, H.L., GUENTHER, H.E, FROESCH, E.R. AND FLEISCH, H. Effect
10 of insulin-like growth factor on collagen and glycosaminoglycan synthesis by
11 rabbit articular chondrocytes in culture. **Experientia**, v.38, p.979–981, 1982.
- 12 GUPTA, P. K. et al. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis.
13 **Stem Cell Research and Therapy**, v.3, n.4, p.1–9, 2012.
- 14 HÄUSELMANN, H. J. et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes
15 after long-term culture in alginate beads. **Journal of Cell Science**, v.107, n.1,
16 p.17–27, 1994.
- 17 HILL, J. A. et al. Antigenicity of mesenchymal stem cells in an inflamed joint
18 environment. **American Journal of Veterinary Research**, v.78, n.7, p.867-75,
19 2017.
- 20 HUEY, D. J.; HU, J. C.; ATHANASIOU, K. A. Unlike bone, cartilage regeneration
21 remains elusive. **Science**, v.338, n.6109, p.917–921, 2012.
- 22 HUTCHEON, D. **Diseases of the Horse and their Treatment**. [s.l: s.n.] TOLAR,
23 J. et al. Hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. **Stem Cells**, v.28,
24 n.8, p.1446–1455, 2010.
- 25 KAPOOR, M. et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of
26 osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v.7, n.1, p.33-42, 2011.
- 27 LAVOIE, J. R.; ROSU-MYLES, M. Uncovering the secretes of mesenchymal
28 stem cells. **Biochimie**, v.95, n.12, p.2212-21, 2013. .
- 29 LEE, J. C. et al. Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported
30 by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model.
31 **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v.29, n.6,
32 p.1034–1046, 2013.
- 33 LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell
34 response in surgery. **Surgery**, v.127, n.2, p.117-26, 2000.
- 35 LIU, X. et al. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate
36 immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. **Nature**
37 **Immunology**, v.12, n.5, p.416-24, 2011.
- 38 LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor
39 superfamilies: Integrating mammalian biology. **Cell**, v.104, n.4, p.487-501, 2001.
- 40 MADEIRA, C. et al. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration.
41 **Trends in Biotechnology**, v.33, n.1, p.35–42, 2015.
- 42 MANDL, E. W. et al. Multiplication of Human Chondrocytes with Low Seeding
43 Densities Accelerates Cell Yield without Losing Redifferentiation Capacity.
44 **Tissue Engineering**, v.10, n.1–2, p.109–118, 2004.

- 1 MAZOR, M. et al. Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: An update.
2 **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.18, n.12, p.2340–2350, 2014.
- 3 MCILWRAITH, C. W. et al. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells
4 to augment healing of microfractured chondral defects. **Arthroscopy**, v.27, n.11,
5 p.1552-61, 2011.
- 6 MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E. The horse as a model of
7 naturally occurring osteoarthritis. **Bone & Joint Research**, v.1, n.11, p.297–309,
8 2012.
- 9 MCILWRAITH, W. et al. Bone marrow-derived culture-expanded mesenchymal
10 stem cells to augment healing of chondral lesions treated with microfracture.
11 **Cartilage**, v.1, n.2, p.115S, 2010.
- 12 MONTEIRO, S. O.; BETTENCOURT, E. V.; LEPAGE, O. M. Biologic Strategies
13 for Intra-articular Treatment and Cartilage Repair. **Journal of Equine Veterinary**
14 **Science**, v.35, n.3, p.175–190, 2015.
- 15 NIMURA, A. et al. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem
16 cells with autologous human serum: Comparisons with bone marrow
17 mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. **Arthritis and**
18 **Rheumatism**, v.58, n.2, p.501–510, 2008.
- 19 NÖTH, U.; STEINERT, A. F.; TUAN, R. S. Technology Insight: Adult
20 mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. **Nature Clinical Practice**
21 **Rheumatology**, v.4, n.7, p.371–380, 2008.
- 22 O’CONNOR, T. M. et al. The role of substance P in inflammatory disease.
23 **Journal of Cellular Physiology**, v.201, n.2, p.167-80, 2004.
- 24 OCHI, M. et al. Current concepts in tissue engineering technique for repair of
25 cartilage defect. **Artificial Organs**, v.25, n.3, p.172–179, 2001.
- 26 ORTH, P. et al. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage
27 repair. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v.7, p.1-17,
28 2014.
- 29 PABBRUWE, M. B. et al. Induction of cartilage integration by a
30 chondrocyte/collagen-scaffold implant. **Biomaterials**, v.30, n.26, p.4277–4286,
31 2009.
- 32 PANSERI, S. et al. Osteochondral tissue engineering approaches for articular
33 cartilage and subchondral bone regeneration. **Knee Surgery, Sports**
34 **Traumatology, Arthroscopy**, v.20, n.6, p.1182–1191, 2012.
- 35 PERONI, J. F.; BORJESSON, D. L. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory
36 Activities of Stem Cells. **Veterinary Clinics of North America - Equine**
37 **Practice**, v.27, n.2, p.351-62, 2011.
- 38 PROCKOP, D. J. et al. Evolving paradigms for repair of tissues by adult
39 stem/progenitor cells (MSCs). **Journal of Cellular and Molecular Medicine**,
40 v.14, n.9, p.2190–2199, 2010.
- 41 RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **American Journal of Surgery**,
42 v.183, n.3, p.268-73, 2002.

- 1 REDDI, A. H.; IWASA, K. **Morphogenesis, Bone Morphogenetic Proteins, and**
2 **Regeneration of Bone and Articular Cartilage.** in Principles of Regenerative
3 Medicine, Third Edition, Elsevier Inc., p.405-416, 2019.
- 4 REN, G. et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-
5 mediated immunosuppression. **Stem Cells**, v.27, n.8, p.1954-62, 2009.
- 6 ROTHE, J. et al. Tumor necrosis factor receptors-structure and function.
7 **Immunologic Research**, v.11, n.2, p.81-90, 1992.
- 8 SAKAGUCHI, Y. et al. Comparison of human stem cells derived from various
9 mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. **Arthritis and**
10 **Rheumatism**, v.52, n.8, 2521-9, 2005.
- 11 SANTOS, V. H. Dos et al. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated
12 mesenchymal stem cell migration in horses. **Research in Veterinary Science**,
13 v.124, p.38–45, 2019.
- 14 SANTOS, V. H. et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine
15 synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. **BMC Veterinary**
16 **Research**, v.14, n.1, p.1–10, 2018.
- 17 SATUÉ, M. et al. Intra-articularly injected mesenchymal stem cells promote
18 cartilage regeneration, but do not permanently engraft in distant organs.
19 **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1–10, 2019.
- 20 SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis
21 pathogenesis. **Bone**, v.51, n.2, p.249–257, 2012.
- 22 SCHLUETER, A. E.; ORTH, M. W. Equine osteoarthritis: a brief review of the
23 disease and its causes. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v.1,
24 n.4, p. 221–231, 2004.
- 25 SCHMIDT, M. B.; CHEN, E. H.; LYNCH, S. E. A review of the effects of insulin-
26 like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing
27 and repair. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.14, n.5, p.403–412, 2006.
- 28 SCHNABEL, L. V. et al. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells
29 are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune
30 response in vitro. **Stem Cell Research and Therapy**, v.5, n.1, p.1–13, 2014.
- 31 SCHURMAN, D. J.; KAJIYAMA, G. Antibiotic absorption from infected and
32 normal joints using a rabbit knee joint model. **Journal of Orthopaedic Research**,
33 v.3, n.2, p.185–188, 1985.
- 34 SHI, Y. et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune
35 responses. **Trends in Immunology**, v.33, n.3, p.136–143, 2012.
- 36 SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of
37 Inflammation. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.6,
38 p.457-78, 2011.
- 39 SOLEYMANINEJADIAN, E.; PRAMANIK, K.; SAMADIAN, E. Immunomodulatory
40 properties of mesenchymal stem cells: Cytokines and factors. **American Journal**
41 **of Reproductive Immunology**, v.67, n.1, p.1–8, 2012.
- 42 SONG, C. et al. Serum amyloid A induction of cytokines in
43 monocytes/macrophages and lymphocytes. **Atherosclerosis**, v.207, n.2, p.374–
44 383, 2009.

- 1 SOUZA, M. V. de. Osteoarthritis in horses - Part 1: relationship between clinical
2 and radiographic examination for the diagnosis. **Brazilian Archives of Biology
3 and Technology**, v.59, n.0, p.1–9, 2016.
- 4 SPAAS, J. H. et al. Culture and characterisation of equine peripheral blood
5 mesenchymal stromal cells. **Veterinary Journal**, v.195, n.1, p.107-13, 2013.
- 6 SPEES, J. L.; LEE, R. H.; GREGORY, C. A. Mechanisms of mesenchymal
7 stem/stromal cell function. **Stem Cell Research and Therapy**, v.7, n.1, p.1–13,
8 2016.
- 9 STASHAK, T. S. **Claudicação em equinos**. 5a.ed. ed. [s.l: s.n.]
- 10 SUTTON, S. et al. The contribution of the synovium, synovial derived
11 inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis.
12 **Veterinary Journal**, v.179, n.1, p.10–24, 2009.
- 13 TER HUURNE, M. et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of
14 intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental
15 osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v.64, n.11, p.3604–3613, 2012.
- 16 TEXTOR, J. A. et al. Ultrastructure and growth factor content of equine platelet-
17 rich fibrin gels. **American Journal of Veterinary Research**, v.75, n.4, p.392–
18 401, 2014.
- 19 TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell
20 signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta -
21 Molecular Cell Research**, v.1843, n.11, p.2563-2582, 2014.
- 22 UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and
23 disease. **Nature Reviews Immunology**, v.8, n.9, p.726–736, 2008.
- 24 VAN LENT, P. L. E. M.; VAN DEN BERG, W. B. Mesenchymal stem cell therapy
25 in osteoarthritis: Advanced tissue repair or intervention with smouldering synovial
26 activation? **Arthritis Research and Therapy**, v.15, n.2, p.1–2, 2013.
- 27 VANDENABEELE, P. et al. Two tumour necrosis factor receptors: structure and
28 function. **Trends in Cell Biology**, v.5, n.10, p.392-9, 1995.
- 29 VINATIER, C. et al. Cartilage engineering: a crucial combination of cells,
30 biomaterials and biofactors. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.5, p.307–314,
31 2009.
- 32 WAKITANI, S. et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes
33 embedded in collagen gel. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series B**, v.71,
34 n.1, p.74–80, 1989.
- 35 WANG, M.; YUAN, Q.; XIE, L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation:
36 Properties and clinical application. **Stem Cells International**, v.14, p.12, 2018.
- 37 WANG, S.; ZHAO, R. C. A historical overview and concepts of mesenchymal
38 stem cells. In: **Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical
39 Translation**, 2013.
- 40 WIKE, M. M.; NYDAM, D. V.; NIXON, A. J. Enhanced early chondrogenesis in
41 articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an
42 equine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v.25, n.7, p.913-25, 2007.

- 1 YAMADA, A. L. M. et al. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects
2 healing in horses. **Stem Cell Discovery**, v.03, n.04, p.218–225, 2013.
- 3 YAMADA, A. L. M. et al. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco
4 mesenquimais: Uso em lesões condrais em modelo experimental equino.
5 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.6, p.461–467, 2016.
- 6 YANG, I. H. et al. Comparison of phenotypic characterization between "alginate
7 bead" and "pellet" culture systems as chondrogenic differentiation models for
8 human mesenchymal stem cells. **Yonsei Medical Journal**, v.45, n.5, p.891-900,
9 2004.
- 10 ZAYED, M. et al. Xenogenic implantation of equine synovial fluid-derived
11 mesenchymal stem cells leads to articular cartilage regeneration. **Stem Cells**
12 **International**, v.6, p.9, 2018.
- 13 ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International**
14 **Anesthesiology Clinics**, v.45, n.2, p.27-37, 2007.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40