

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 score 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 (WIKE; NYDAM; NIXON, 2007; BROECKX et al., 2019). Existem relatos que a administração de CTMs intra-articular melhora a reparação da cartilagem (WIKE; 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).

3. JUSTIFICATIVA

Recentemente pesquisas têm alcançado progressos significativos referentes a reparação da cartilagem articular na osteoartrite, através do advento da bioengenharia, com implantes autólogos auxiliados pelo acesso artroscópico. Devido ao limitado mecanismo de reparação do tecido condral, tendo como consequência a manutenção da inflamação e progressão da osteoartrite, os efeitos biológicos dos diferentes tipos celulares em questão continuam concentrando estudos, mas ainda sem o completo restabelecimento morfofuncional da cartilagem articular lesada.

Em estudo realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa (YAMADA et al., 2016), foi verificada a eficácia do tratamento de lesões condrais com CTM e PRP, aplicados de forma isolada ou em conjunto. A aplicação em conjunto dessa terapia apresentou significativo sinergismo e resultados favoráveis na reparação da cartilagem articular, porém ainda com excessiva formação de fibrocartilagem. O emprego da técnica de microfraturas, como uma terapia consagrada que favorece resultados favoráveis, com a aplicação de CTM e PRP, que já é sabidamente vantajosa, deve continuar sendo pesquisada a fim de incrementar o processo de reparação condral.

O entendimento da imunomodulação das CTMs não está completamente compreendido quando administrados por via intra-articular em equinos. Nesse trabalho, as aplicações das CTMs livres e encapsulada em hidrogel de alginato representam uma grande possibilidade de compreender o processo inflamatório e aperfeiçoar a reparação condral, visando a diminuição da inflamação, formação de fibrocartilagem e consequente regeneração condral.

Diante disso, a hipótese de que as CTMs encapsuladas em hidrogel de alginato apresente maior potencial de imunomodulação e reparação condral nas lesões articulares induzidas experimentalmente.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o processo inflamatório e reparação da cartilagem articular de equinos com células tronco mesenquimais alogênicas, obtidas da membrana

sinovial, encapsuladas em hidrogel de alginato e aplicadas em lesões de cartilagem induzidas experimentalmente.

Objetivos específicos

- Caracterizar morfolologicamente e fenotipicamente CTM_{MS} alogênicas cultivadas a partir da membrana sinovial.
- Realizar avaliações clínicas, através de exames de claudicação, antes e após a instituição dos tratamentos, nos grupos experimentais;
- Analisar a inflamação articular, pelo exame do líquido sinovial (IL-1 α , IL-10, IL-6, Substância P, amilóide sérica A, TGF- β , TNF α , INF- γ , IGF e PGE2), citologia, antes e após a instituição dos tratamentos, nos grupos experimentais;
- Avaliar a morfologia e a composição do tecido de reparação da cartilagem articular ao final do experimento, por meio de exames macroscópicos, histopatológicos e imunohistoquímicos.

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

Artigo científico a ser submetido ao periódico: **Stem Cells Research & Therapy**.
Link: <<https://stemcellres.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research>>.

CAPÍTULO 2:

Aplicação intra-articular de célula tronco mesenquimal alogênica da membrana sinovial encapsulada para modular a inflamação articular equina

Intra-articular application of allogeneic mesenchymal stem cell of the synovial membrane encapsulated to modulate equine joint inflammation

Vitor Hugo Santos^{1, 2}, João Pedro Hübbe Pfeifer¹, Fernanda de Castro Stievani¹, Gustavo Santos Rosa¹, Emanuel Vitor Pereira Apolonio¹, Mariana Correa Rossi¹, Leonel Vinicius Constantino², Thadeu Rodrigues de Melo², Ana Liz Garcia Alves¹.

Resumo

A osteoartrite é a principal causa de claudicação em equinos, sendo desafiadora para medicina equina. A utilização de células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial tem apresentado resultados promissores em tratamento de lesões articulares, especialmente por seu potencial imunomodulador que necessita de melhor compreensão. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características da imunomodulação das células tronco alogênicas derivadas da membrana sinovial (CTM_{MS}) encapsuladas em hidrogel de alginato e livres em lesões articulares induzidas em equinos.

Métodos: As lesões condrais foram induzidas na tróclea medial do talus em quinze cavalos. No dia da indução os animais foram divididos em três grupos, CTM_{MS} encapsuladas, CTM_{MS} livres e controle. Foram realizadas avaliações clínicas, análise citológica, química e dosagem de citocinas (IL-1, IL-10, IL-6, INF- γ , TNF α , Substância P, amilóide sérica A, TGF- β , IGF e PGE2) do líquido sinovial, antes da lesão e 24, 48, 96, 168 e 336 horas.

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil.

² Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid PR 445 – KM 380, Londrina, PR, 86057-970, Brasil.

1 **Resultados:** O tratamento com CTM_{MS} seja ela livre ou encapsulada reduziu o
2 processo inflamatório articular. O grupo CTM_{MS} encapsuladas apresentou maior
3 processo inflamatório inicial comparado com os demais grupos, em função do
4 elevado número de neutrófilos, macrófagos, IL-6, IL-10, TNF α e INF- γ .

5 **Conclusões:** A manutenção dos macrófagos e linfócitos observada no controle
6 contribui para a manutenção da osteoartrite. As CTM_{MS} atuaram de forma a
7 diminuir a concentração destas células nos grupos tratados. As CTM_{MS}
8 encapsuladas em hidrogel de alginato causaram mais inflamação inicialmente,
9 mas as CTM_{MS}, foram capaz reduzir o número de neutrófilos, macrófagos e
10 linfócitos e aumentou a IL-10 e IL-6, o que contribuiu de forma mais eficaz para
11 o controle da inflamação quando comparado ao grupo de CTM_{MS} livres,
12 provavelmente devido ao maior tempo de permanência das células
13 encapsuladas dentro da articulação.

14 **Palavras-chave:** alginato, bioengenharia, cavalos, células mesenquimais,
15 imunomodulação.

16

17 **Abstract**

18 **Background:** Osteoarthritis is the main cause of lameness in horses and is
19 challenging for the equine medicine. Although promising results have been
20 demonstrated with the use of mesenchymal stem cells, the immunomodulatory
21 potential is not fully understood. The aim of this study was to evaluate the
22 immunomodulatory effect of allogeneic synovial membrane-derived
23 mesenchymal stem cells (MSC_{SM}), free or encapsulated in sodium alginate, in
24 induced equine articular lesions.

25 **Methods:** Chondral defects were induced in the medial trochlea of the talus in
26 fifteen horses. Animals were divided in three groups, MSC_{SM} encapsulated of
27 alginate hydrogel, free MSC_{SM} and control group. Clinical evaluations, cytological
28 analysis, chemistry, and cytokine dosage (IL-1, IL-10, IL-6, INF- γ , TNF α ,
29 Substance P, serum amyloid A, TGF- β , IGF, and PGE2) of synovial fluid were
30 performed before the defect and 24, 48, 96 hours, 7, and 14 days.

31 **Results:** Treatment with MSC_{SM}, either free or encapsulated, has reduced the
32 joint inflammatory process. MSC_{SM} encapsulated of alginate hydrogel, showed a
33 higher initial inflammatory process compared to other groups, due to the high
34 number of neutrophils, macrophages, IL-6, IL-10, TNF α and INF- γ .

Conclusions: The maintenance of macrophages and lymphocytes observed in control group contributes to the maintenance of osteoarthritis. The MSCs acted in order to decrease the concentration of these cells in the treated groups. The MSCs inserted in alginate microcapsules caused more inflammation, but the MSCs were able to decrease the number of neutrophils, macrophages and lymphocytes and increased IL-10, which contributed more effectively to the control of inflammation when compared to the group of free MSCs, probably due to the longer stay of encapsulated cells within the joint.

Keywords: alginate, bioengineering, horses, immunomodulation, mesenchymal cells.

Introdução

A osteoartrite (OA) é considerada o principal motivo de claudicação em equinos, gerando baixo desempenho e consequentemente perdas econômicas no mercado mundial dos cavalos (1). Apresenta origens multifatoriais, mas as forças mecânicas são consideradas as principais causadoras de lesão na cartilagem saudável. As lesões na matriz estimulam uma alteração no metabolismo dos condrócitos, conduzindo a liberação de enzimas proteolíticas, que causam fibrilação da cartilagem e colapso da rede de proteoglicanos (2,3).

A utilização da terapia celular associada a bioengenharia tecidual, tem contribuído de forma significativa não apenas para a redução da destruição articular e da dor, mas também como alternativa terapêutica de regeneração (4). Ultimamente, tratamentos combinados envolvendo células-tronco, arcabouços biocompatíveis e compostos bioativos estão sendo amplamente utilizados como uma forma de fornecer uma fonte celular, uma estimulação mecânica e molecular, visando a restauração morfofuncional da cartilagem articular danificada (4,5).

Diversas fontes celulares estão sendo utilizadas com resultados positivos. No homem a membrana sinovial, demonstrou superioridade, principalmente no potencial condrogênico e na manutenção da proliferação no cultivo (6), além de serem fontes tecido específicas e poderem ser obtidas por técnicas minimamente invasivas (6–9).

Algumas pesquisas descrevem a grande importância das CTMs no tratamento da OA, em função do notável potencial terapêutico e capacidade de regular a inflamação (5), incluindo o tropismo pelo tecido lesado, redução da ativação de linfócitos, das reações inflamatórias mistas, liberando substâncias anti-inflamatórias (IL 10, IL 1ra, TGF- β e PGE2) (5,10,11), ativação de citocinas e diversos fatores de crescimento (12–17).

Recentemente as pesquisas têm alcançado progressos significativos referentes à terapia com CTMs na osteoartrite, através do advento da bioengenharia, com a utilização de implantes autólogos e alogênicos. Entretanto, a frequente dispersão das CTMs no líquido sinovial (18), quando administradas de forma livre, bem como a diminuição da viabilidade destas, quando em contato com o líquido sinovial, levaram pesquisadores a estudarem o encapsulamento como forma de proteção e prolongamento da viabilidade das CTMs, podendo ainda estimular a diferenciação destas células em condrócitos através a estimulação pelo arcabouço 3D (19).

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de imunomodulação das CTMs derivadas da membrana sinovial (MS) administradas livres ou em cápsulas de hidrogel de alginato em enfermidades articulares induzidas experimentalmente na articulação tíbio-társica de equinos.

Material e métodos

Foram utilizados 15 equinos adultos, mestiços, com três a oito anos de idade, machos castrados, pesando em média 330 kg, clinicamente hígidos e sem histórico de afecções locomotoras.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos e um controle. Quinze animais foram divididos em três grupos CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato, CTM_{MS} livres e controle, cada grupo com cinco animais. Em todos os grupos, as articulações tarsais (“n” = 5, articulações por grupo) foram abordadas por cirurgia artroscópica para a realização da lesão condral e submetidas a tratamento conforme o grupo: lesão condral e tratamento com CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato; lesão condral e tratamento com CTM_{MS} aplicadas livremente na articulação; lesão

condral sem tratamento controle (10 mL PBS). A artroscopia para a indução das lesões condrais e aplicação dos respectivos tratamentos foi definida como tempo zero do experimento (0h). Os parâmetros clínicos e a análises do líquido sinovial foram realizadas em todos os grupos em (0 horas; 24 horas; 48 horas; 96 horas; 168 horas e 336 horas) após a realização do defeito e aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram realizados em 0h, imediatamente após a indução das lesões, para todas as articulações.

Indução da lesão

A lesão cartilaginosa da tróclea medial do talus foi o primeiro procedimento realizado, considerado tempo zero (0h). A técnica artroscópica foi a descrita por McIlwraith (20). Para criar a lesão foi utilizada uma lâmina abrasiva motorizada (shaver) e pinças artroscópicas, com desgaste controlado, suficiente para obter a dimensão da lesão condral desejada, equipamentos e instrumentos artroscópicos foram os mesmos utilizados por Yamada (21). As lesões foram padronizadas em 15 mm de diâmetro e induzidas retirando a cartilagem hialina e toda a cartilagem calcificada, porém, não havendo abrasão, perfuração ou sangramento do osso subcondral (profundidade aproximada de 1,5 a 3,2 mm). O diâmetro da lesão foi mensurado com o auxílio de uma pinça tipo “Ferris-Smith” (Figura 1).

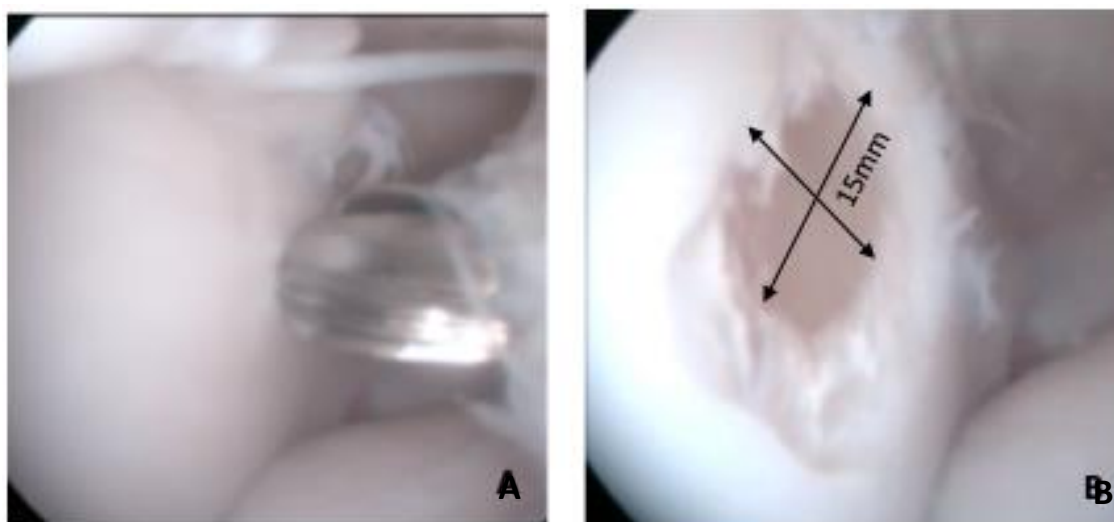


Figura 1. Artroscopia tibiotársica realizada para indução da lesão condral. (A) Indução da lesão condral realizado no T0 com broca circular, removendo apenas

a cartilagem hialina. (B) Defeito criado com 15mm de diâmetro, na tróclea medial do talus.

Células Tronco derivadas da membrana sinovial (CTM_{MS})

As CTM_{MS} de equinos foram provenientes do Biobanco de Células tronco do Laboratório de Terapia Celular, do Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Botucatu – SP. Os criotubos foram selecionados de maneira aleatória e as CTMs foram cultivadas com a técnica descrita (5,22), em garrafas com meio de cultivo (DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos essenciais e não-essenciais, L-glutamina e solução antibacteriana e antimicótica (anfotericina B, penicilina e estreptomicina)) e expandidas até o número necessário (1×10^7), trinta dias antes do momento inicial. Todas as aplicações foram realizadas com CTMs em terceira passagem.

A análise imunofenotípica das CTM_{MS} foi realizada em terceira passagem (P3) com o citômetro de fluxo¹, usando os seguintes anticorpos: rato anti-rato CD90 – FITC (clone OX7)², rato anti-humano CD105 – FITC (clone SN6)³, rato anti-cavalo CD 44 (clone CVS18)⁴ e camundongo anti-cavalo MHC classe II⁵, que foram marcados com anticorpo secundário de cabra anti-IgG-FITC de camundongo⁶. Os protocolos utilizados foram descritos pelos fabricantes.

Durante a P3, as amostras de CTM_{MS} foram colocadas em triplicata em placa de seis poços⁷ para diferenciação osteogênica e adipogênica e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Após atingir confluência, o meio de cultura foi removido e os meios de diferenciação osteogênica⁸ e adipogênica⁹ foram adicionados às culturas. Os meios foram trocados a cada três dias, e a diferenciação osteogênica foi confirmada por coloração positiva da matriz extracelular de cálcio usando 2% de coloração com

¹ BD, San Jose, CA, USA

² Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA

³ AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK

⁴ AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK.

⁵ AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK.

⁶ Molecular Probes, Eugene, OR, USA.

⁷ Sarstedt, EUA.

⁸ StemPro Osteogenesis Differentiation Kit GIBCO – Invitrogen Cell Culture, EUA.

⁹ StemPro adipogenesis Differentiation Kit GIBCO – Invitrogen Cell Culture, EUA.

Alizarin Red S¹. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela deposição de gotículas lipídicas no citoplasma, utilizando 0,5% de Oil Red O². Para a diferenciação condrogênica, um pellet de CTMs foi cultivado em tubo Falcon e incubado a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Após dois dias, o meio de cultura foi removido e o meio de diferenciação³ foi adicionado e trocado a cada três dias. Para confirmação da diferenciação condrogênica, os pellets foram corados com Alcian Blue⁴ e Azul de Toluidina⁵ para identificar os proteoglicanos. Os implantes foram todos alogénicos e a dose utilizada no tratamento foi de 10⁷ células cultivadas para cada articulação.

Encapsulação das CTM_{MS}

As células do grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato foram ressuspensas em solução de alginato de sódio 1,5%, na concentração de 10 milhões cels/mL de 1,5% (w/v), utilizando 10uL de solução com 10 mil células, contadas em Câmara de Neubauer. A suspensão de células em alginato não polimerizado foi colocada em uma seringa de 10mL acoplada em agulha 21G e com o auxílio da bomba de infusão, o conteúdo da seringa foi então gotejado dentro da solução de geleificação de cloreto de cálcio (CaCl₂ - 102 mM), permitindo assim a polimerização do alginato durante 10 minutos, até que as cápsulas fossem formadas. A solução de gelatinização foi desprezada, e as cápsulas foram lavadas três vezes em solução de NaCl a 0,15M.

A recuperação das células do hidrogel para acessar a viabilidade celular foi realizada através da dissolução do hidrogel em citrato de sódio⁶. Posteriormente foi realizada a contagem de células em ambos os grupos e a determinação da viabilidade celular pela técnica de exclusão de células mortas coradas por solução de azul de tripan, utilizando a câmara de Neubauer.

¹ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

² Sigma-Aldrich Corp., EUA.

³ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

⁴ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

⁵ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

⁶ Anticoagulant Acid Citrate Dextrose Solution (ACD-A) - Haemonetics Corporation - Braintree, MA

Instituição dos tratamentos

Os tratamentos foram realizados em T0, imediatamente após a indução das lesões, para todas as articulações. As células do grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato foram implantadas com auxílio de uma sonda levine 20 introduzida pelo canal do artroscópio. As CTM_{MS} livres foram implantadas, acrescidas de 10 mL de PBS. O grupo controle recebeu 10 mL de PBS.

Avaliação clínica e laboratorial

Os parâmetros clínicos, como exame de claudicação foram avaliados por dois avaliadores, e as análises do líquido sinovial foram realizadas em todos os grupos nos diferentes momentos (antes do tratamento – 0 horas; 24 horas; 48 horas; 96 horas; 168 horas e 336 horas) após a realização do defeito e aplicação dos tratamentos. O líquido sinovial foi coletado com uma seringa descartável de 10 mL e agulha hipodérmica 30x8, com prévia tricotomia e antissepsia da região escolhida. O material foi depositado em frascos com EDTA e sem EDTA.

No exame químico, foi realizada a dosagem de fibrinogênio, no exame citológico foi realizada a contagem global e diferencial de células nucleadas, contagem aproximada do número de hemácias, utilizando a Câmara de Neubauer.

Outra parte do líquido sinovial coletado foi congelado em tubos eppendorfs® a -80° C para a quantificação da IL-1, IL-10, IL-6, INF- γ , TNF α ¹, Substância P², amilóide sérica A³, TGF- β ⁴, IGF⁵ e PGE2⁶. As amostras foram submetidas a testes imunoenzimáticos utilizando “kits” ELISA comerciais com reação cruzada para equinos, de acordo com as instruções observadas pelo fabricante. A absorbância foi analisada em comprimentos de 450 nm em leitor de microplaca ELISA. A curva de regressão da análise e a conversão das

¹ Milliplex Map Kit, Equine cytokine (EQCYTMAG-93K) - EMD Millipore Corporation – Germany.

² Horse Substance P (SP) Elisa Kit – MYBIOSOURCE – USA.

³ Horse Serum Amyloid A (SAA) Elisa Kit – MYBIOSOURCE – USA.

⁴ Milliplex Map Kit, TGF beta single plex magnetic bead kit – EMD Millipore Corporation – Germany.

⁵ Horse IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) Elisa Kit- MYBIOSOURCE – USA.

⁶ PGE2 (Prostaglandin E2) Elisa Kit – Elabscience Biotechnology Inc. – USA.

densidades ópticas obtidas na leitura foram realizadas com o auxílio de um software.

Análise estatística e análise dos resultados

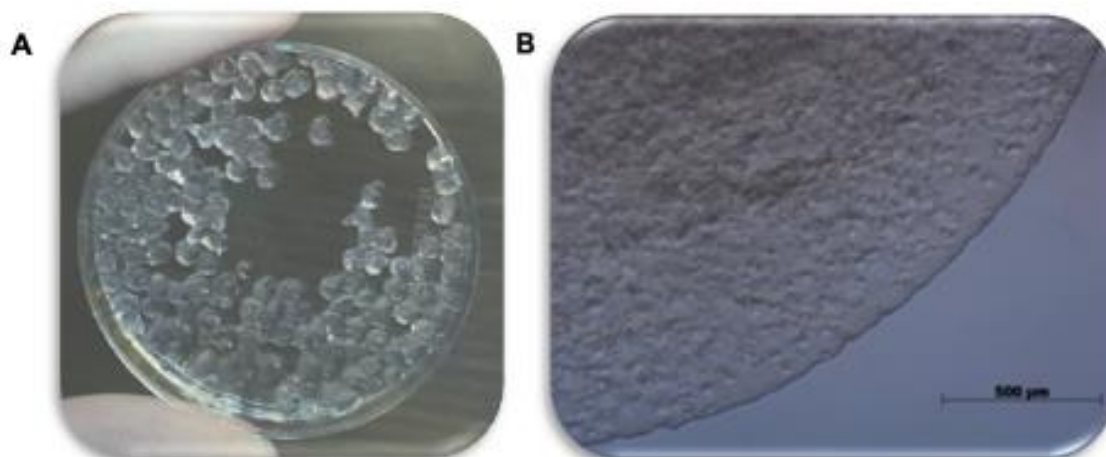
Para as aferições numéricas foi realizado o teste de Kolmogorov – Smirnov ($P < 0,05$) para testar a normalidade e, os parâmetros não apresentaram distribuição normal. Para as aferições numéricas foi realizado os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) para comparação dos grupos (horizontal) em cada momento e Friedman para as Medidas Repetidas no Tempo (vertical) dentro de cada grupo. Quando houve significância foi realizado o Teste de Tukey para comparação das medianas, utilizando o Sigmastat 3.5. A relação entre os tratamentos e as variáveis (citocinas) foram visualizados por meio de heatmap (pheatmap package), por meio dos dados normalizados, além do agrupamento hierárquico utilizando a distância euclidiana e o método de Ward, Para realização do teste de significância do coeficiente de correlação de Pearson ($P < 0,05$), foi utilizado o pacote qgraph e corrplot, empregando o software R.

Resultados

Alta viabilidade das CTMs e facilidade no encapsulamento das células

Foram aplicadas em média $1,5 \times 10^7$ células para cada lesão do grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato e $1,4 \times 10^7$ para CTM_{MS} livres. A média de viabilidade dessas células foi de 97,40% CTM_{MS} encapsuladas e 98,20% CTM_{MS} livres. As caracterizações das células apresentaram média de marcação positiva para o CD44 (55,3%), CD90 (92,49%) e CD105 (90,25%), com média de marcação negativa para o MHC Classe II (1,00%). Todas as células submetidas às diferenciações através dos “kits” comerciais confirmaram a transformação em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso.

1 A confecção das cápsulas com solução de alginato de sódio a 1,5%,
 2 obteve a concentração média de 1×10^5 células por cápsula (Figura 2).



3 **Figura 2.** Células-tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina
 4 encapsuladas em hidrogel de alginato a 1,5% com agulha 21G. (A) Cápsulas de
 5 hidrogel de alginato após solidificação; (B) Microscopia invertida com contraste
 6 de fase da cultura celular em hidrogel de alginato, observa-se inúmeras
 7 estruturas esféricas e arredondadas que representam a alta celularidade,
 8 objetiva de 20x.

10 Ausência de alterações clínicas

12
 13 Na avaliação clínica, os parâmetros físicos se mantiveram dentro do
 14 intervalo fisiológico para espécie em todos os momentos.

15 A análise dos escores de claudicação dos animais foi realizada, antes das
 16 coletas. Nos momentos 24 e 48 horas foi possível observar que todos os animais
 17 apresentavam claudicação grau 2/5, e posteriormente os mesmos foram
 18 apresentando melhora clínica com claudicação grau 1/5 após 168 horas. Esses
 19 achados condizem com a distensão sinovial observado em todos os animais,
 20 apresentando melhora nos momentos posteriores.

22 Aumento da contagem das células nucleadas no líquido sinovial

23
 24 Na análise do líquido sinovial (Figura 3) em relação à contagem total de
 25 células nucleadas foi possível observar diferença estatística significativa
 26 ($P=0,0473$) entre o grupo CTM_{MS} encapsuladas e os demais grupos nos
 27 momentos avaliados. Ao analisar o grupo CTM_{MS} encapsuladas, houve diferença
 28 estatística do momento 24h ($p<0,001$), com valores superiores das células

nucleadas em comparação às avaliações realizadas às 0h e 336 h, as quais não diferiram entre si. No grupo CTM_{MS} livres observou-se as mesmas tendências sendo que os momentos 24 e 48h foram estatisticamente superiores ao momento 0h ($p=0,002$), porém não diferiram dos demais.

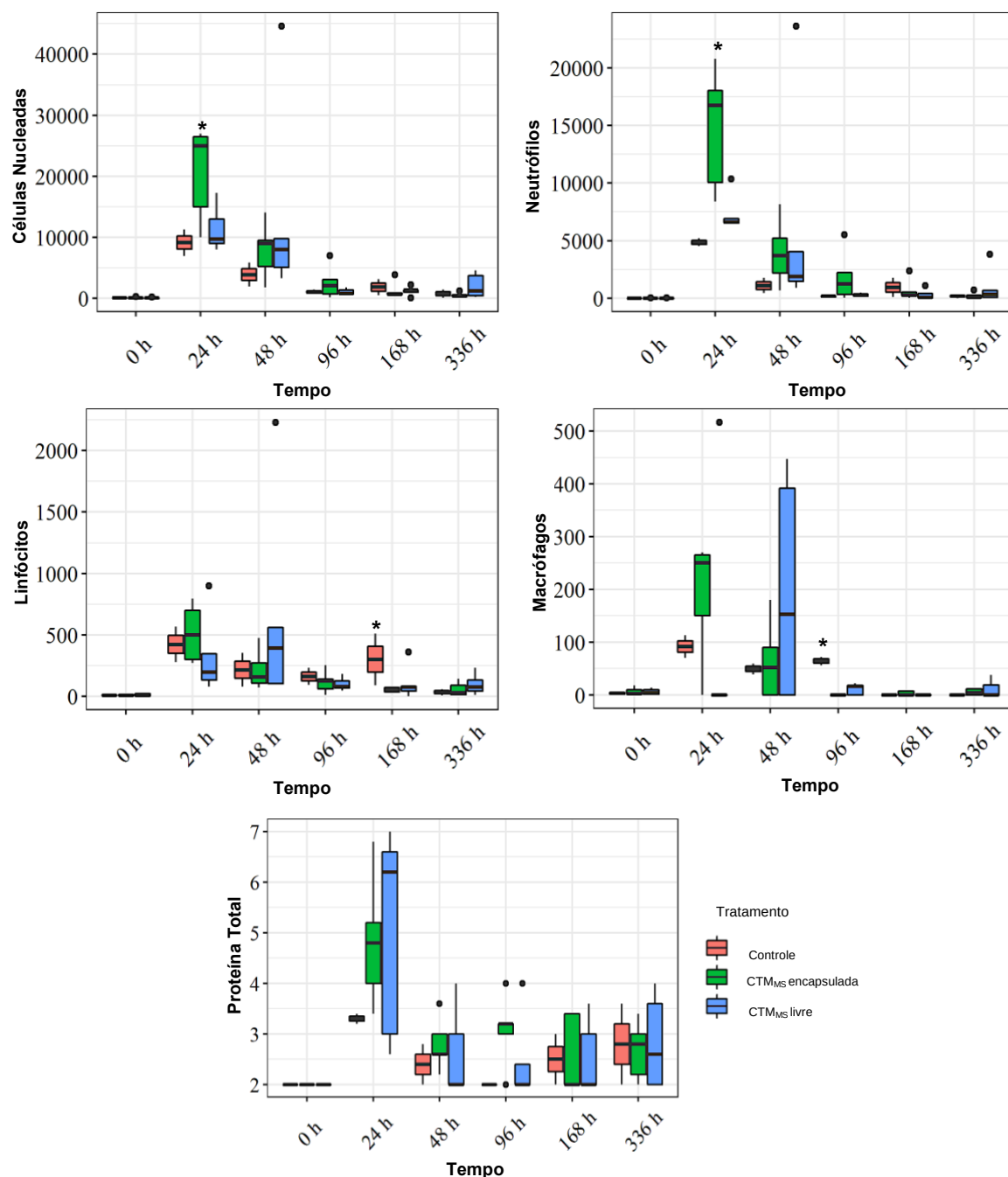
Analisando o número de neutrófilos do líquido sinovial, observamos um aumento no grupo CTM_{MS} encapsuladas, em relação aos demais grupos com diferença estatística em 24 horas ($P=0,006$). No grupo CTM_{MS} encapsulada houve diferença estatística entre os momentos ($P=0,001$) 24 e 48 horas comparados com o 0h, mas os valores elevados foram observados também em 168 e 336h, sem diferença estatística. No grupo CTM_{MS} livres, os momentos 24 e 48h foram estatisticamente superiores em relação às 0h de avaliação ($P<0,001$), não diferindo dos demais.

Os linfócitos apresentaram uma elevação em todos os grupos, mas no grupo controle, esses valores se mantiveram até 168h, com diferença estatística significativa ($P=0,015$). No CTM_{MS} encapsuladas observamos maiores valores em 24 horas, e esses altos valores apresentaram diferença estatística ($P=0,004$). No grupo CTM_{MS} livres os maiores valores foram observados em 24 e 48 horas, valores que diferiram estatisticamente de 0h ($P=0,009$).

Em relação ao número de macrófagos observou-se aumento em todos os grupos nos momentos iniciais, mas os grupos tratados demonstraram uma redução na contagem de maneira mais rápida, possibilitando observar a diferença estatística significativa em 96 h ($P=0,025$) entre os grupos tratados e o controle.

Os valores de proteína total apresentaram diferença estatística no grupo CTM_{MS} encapsuladas e CTM_{MS} livres entre os momentos ($P<0,05$), sendo que em 24h de avaliação as quantidades de PT foram superiores às das 0h, não diferindo das demais avaliações.

Na avaliação citológica e proteína do líquido sinovial, foi possível observar maior diferença entre os momentos 0h e 24h das CTM_{MS} encapsulada se comparado as CTM_{MS} livre.



1 **Figura 3.** Número de células nucleadas, neutrófilos, linfócitos, macrófagos
 2 (células/μL) e proteína total (g/dL) do líquido sinovial dos grupos CTM_{MS}
 3 encapsuladas em hidrogel de alginato, CTM_{MS} livres e controle, nos diferentes
 4 momentos 0, 24, 48, 96, 168 e 336 horas.

5 * Valor de $p > 0,05$ entre os grupos.

6
7
8
9

Elevação nos valores das citocinas e proteínas de fase aguda no líquido sinovial

Na dosagem da interleucina 6 (IL – 6) (Figura 4), não observamos diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre os grupos dentro de cada momento, exceto as 168h de avaliação ($P=0,030$) em que o grupo CTM_{MS} encapsulada apresentou valor de IL – 6 superior ao grupo controle e ambos não diferiram do CTM_{MS} livre. No CTM_{MS} encapsulada houve diferença estatística entre os momentos ($P=0,004$) sendo que o momento 96h de avaliação mostrou valores de IL – 6 superiores às 0h e as 336h, não diferindo dos demais momentos. No CTM_{MS} livre, os momentos 48 e 96h foram estatisticamente superiores em valor de IL – 6 ($P=0,003$) em relação às 0h de avaliação, não diferindo dos demais. Já no controle não houve diferença nos valores de IL – 6 no decorrer das avaliações ($P=0,218$).

Para amilóide A sérica (SAA), substância P, prostaglandina E2 (PGE2), interleucina 1 alfa (IL – 1 α), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), não observamos diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre os grupos dentro de cada momento, bem como entre os momentos dentro de cada grupo.

Nos valores de fator de crescimento da insulina (IGF 1) e fator de transformação de crescimento (TGF β), não foi possível observar diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre os grupos dentro de cada momento, bem como entre os momentos dentro de cada grupo. No entanto, foi possível observar que os valores de TGF β , foram maiores no controle comparado com os demais grupos.

Não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre os grupos dentro de cada momento na dosagem de interleucina 10 (IL – 10). Mas no CTM_{MS} encapsuladas, os momentos 24, 48 e 96h foram estatisticamente superiores em valores de IL 10 ($P=0,012$) em relação às 0h e 336h de avaliação, não diferindo da avaliação de 168h. Já no CTM_{MS} livres e controle não houve diferença nos valores de IL 10 no decorrer das avaliações ($P>0,05$).

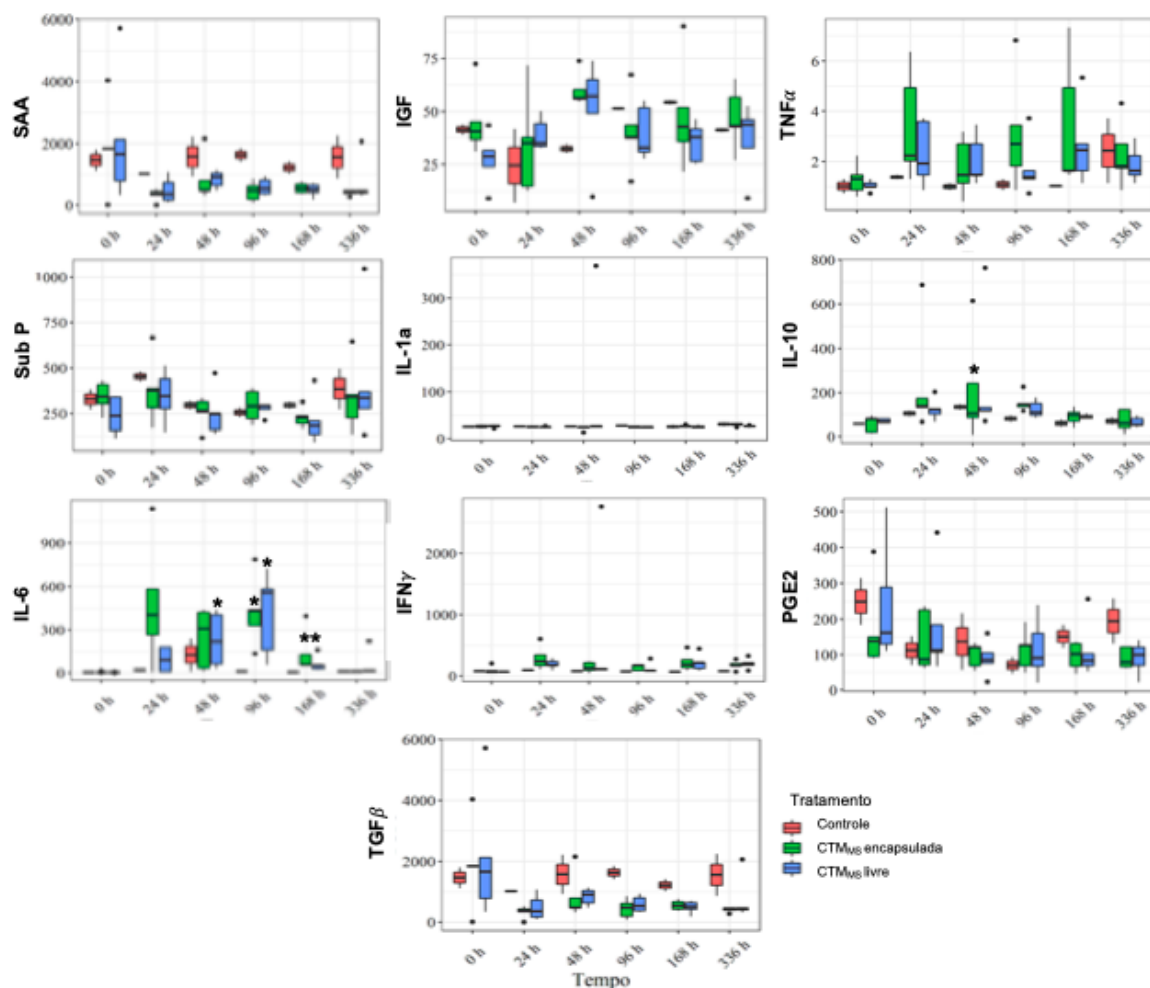


Figura 4. Gráfico da mediana das interleucinas/ μ L amilóide A sérica (SAA), IGF, fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), substância P, IL-1 α , IL-10, IL-6, interferon gama (IFN - γ), prostaglandina E2 (PGE2) e TGF β , no líquido sinovial no grupo CTM_{MS} encapsuladas, CTM_{MS} livres e controle, nos diferentes momentos 0, 24, 48, 96, 168 e 336 horas

* Valor de $p > 0,05$ dentro do grupo; ** $p > 0,05$ entre os grupos.

A partir do agrupamento hierárquico, os tratamentos puderam ser separados em dois grupos: grupo controle e os grupos que receberam CTMs seja ela livre ou encapsulada, enquanto as variáveis em quatro grupos, formados por: SAA com IGF; TNCC, TP, IFN, TGF, TNF, IL-10, NC e IL-6; MC, LC e IL-1; SP e PG2. CTMs encapsuladas estão relacionadas aos maiores níveis de SAA, IGF, contagem total de células nucleadas (TNCC), proteína total (TP), IFN- γ , TGF β , $\text{TNF}\alpha$, IL-10, número de neutrófilos e IL-6. CTMs livres propiciaram os maiores níveis de IL-1, macrófagos e linfócitos. Por outro lado, o controle foi associado às maiores concentrações de SP e PGE2, que contrapõe o que foi observado para CTMs encapsuladas (Figura 4).

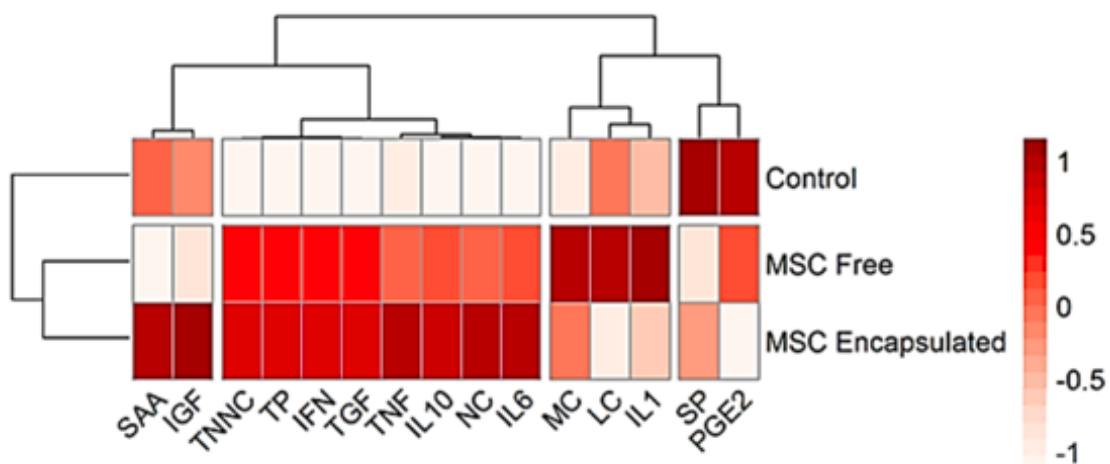


Figura 4. Mapa de calor da relação entre as variáveis SAA, IGF, número total de células nucleadas (TNCC), proteína total (TP), IFN - γ , TNF α , TGF β , IL-10, número de neutrófilos (NC), IL-6, número de macrófagos (MC), número de linfócitos (LC), IL-1 α , SP, PGE2 e os tratamentos, CTMs encapsuladas, CTMs livres e controle, do líquido sinovial.

As variáveis PGE2 com TGF β estão correlacionadas direta e positivamente ($r=0,47$) (Figura 5), bem como, para IL-1 com IL-10 ($r=0,96$), IFN- γ com TNF α ($r=0,87$), IL-10 com IL-6 ($r=0,37$), SP com TNF α ($r=0,49$) e IL-6 com os neutrófilos ($r=0,23$) no grupo tratado com CTM_{MS} livres. Já no tratamento com CTM_{MS} encapsuladas foi possível observar a correlação positiva do número de neutrófilos com IL-10 ($r=0,43$), IL-10 com IL-6 ($r=0,32$), IFN - γ com TNF α ($r=0,75$), IFN com IL-6 ($r=0,23$), TNF α com IL-10 ($r=0,38$) e macrófagos com TNF α ($r=0,19$). No grupo controle foram observadas correlações positivas na IL-6 com IL-10 ($r=0,77$) e no IGF com TP ($r=0,44$).

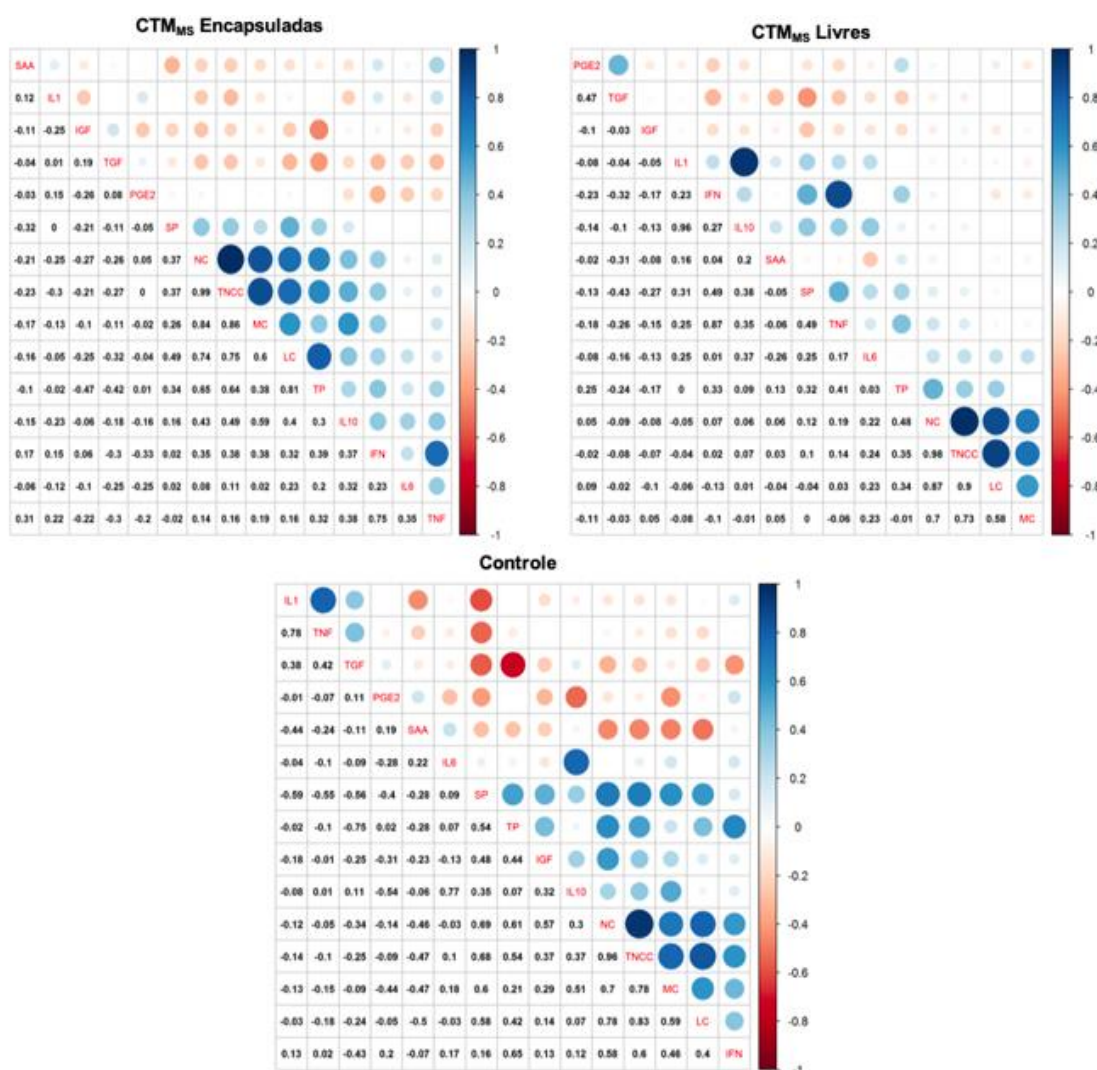


Figura 5. Teste de significância do coeficiente de Correlação de Pearson $p(<0,05)$ entre SAA, IGF, número total de células nucleadas (TNCC), proteína total (TP), IFN - γ , TNF α , TGF β , IL-10, número de neutrófilos (NC), IL-6, número de macrófagos (MC), número de linfócitos (LC), IL-1 α , SP, PGE2 e os tratamentos, CTM_{MS} encapsuladas, CTM_{MS} livres, controle das amostras do líquido sinovial.

Discussão

Torna-se necessário ressaltar que a caracterização celular é uma etapa fundamental para confiabilidade e comparabilidade dos resultados obtidos. Os resultados obtidos nesse trabalho corrobora resultados descritos na literatura, atendendo os requisitos mínimos para a caracterização celular, aderência na placa de cultivo, diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica, positiva para CD 90, CD44 e CD105 (23) e não expressando MHC-II (24,25).

A utilização das CTM_{MS}, ocorreu em função da sua superioridade na diferenciação condrogênica, manutenção da proliferação em cultivo (8,26), fonte

tecidual específica e facilidade de obtenção por técnicas minimamente invasivas (6–9), além da compatibilidade com as cápsulas de alginato, mantendo a sua proliferação e diferenciação (22).

A concentração de CTM_{MS} por cápsula, precisa atender a recomendação que utiliza de 10 a 30 milhões de células para obtenção do efeito terapêutico (27). Dessa forma utilizamos nossa metodologia (22), na qual ajustamos uma concentração ideal por cápsula de 100 mil células, pois a quantidade de cápsulas a ser aplicada na articulação está diretamente relacionada à concentração de células em cada cápsula, em função do volume das articulações-alvo ser limitado. Passa a ser extremamente útil concentrar mais células/cápsula de maneira a tornar a técnica da aplicação de CTM em cápsula viável na rotina clínica.

A administração das CTMs de forma livre na articulação culmina com uma rápida dispersão, desaparecendo da articulação 7 dias (17,28–30).

Almejando diminuir a dispersão, o nosso grupo realizou pesquisas anteriores utilizando o plasma rico em plaquetas (PRP) como arcabouço, obtendo resultados positivos na reparação condral (21). No entanto, a utilização do hidrogel de alginato como arcabouço para CTMs no tratamento de lesões condrais em equinos não foi descrito, tornando o nosso trabalho pioneiro.

Neste contexto, conjecturando aumentar o efeito terapêutico, reduzir a frequência de aplicação e ainda custos do tratamento, a utilização das CTMs inseridas em *scaffolds* no tratamento de defeitos ósseos, aumentou o efeito terapêutico e o potencial de diferenciação das CTMs (31). Em paralelo, a instituição do tratamento de forma menos invasiva do estudo demonstrou ser vantajosa, pois recentemente foi descrito que a microencapsulação de células em alginato, foi capaz de aumentar a viabilidade das células para aplicação conjunta (32). Mediante isso, a utilização de CTMs de forma livre geraria uma ação mais imediata, com dispersão das células para os tecidos periarticulares com o tempo. Em contrapartida, a utilização de CTM_{MS} encapsuladas ocasionaria um efeito mais tardio e prolongado devido à taxa de liberação das mesmas ocorrer de forma mais tardia.

A não alteração nos parâmetros físicos (frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal, coloração de mucosa e tempo de preenchimento

capilar) para espécie, após a implantação dos tratamentos com células tronco é achado frequentemente descrita em estudos similares (33,34).

A elevação no grau de claudicação 2/5 (35), com resolução 48 horas após a instituição dos tratamentos, corrobora resultados obtidos (33), ao descreverem que alguns animais claudicavam de forma leve a moderada, não diferindo entre os tratamentos que consistiam em CTMs alogênicas e xenogênicas, com resolução após 24 a 48 horas. Achados similares foram descritos utilizando as CTMs derivadas do cordão umbilical em modelo de sinovite induzida por lipopolissacarídeo (LPS), através do aumento da claudicação em 24 horas com resolução 48 horas (36). Achados diferentes foram relatados (37) após administração intra-articular de uma dose única de CTMs autólogas derivadas da medula óssea e duas doses separadas de CTMs alogênicas da medula óssea reunidas de vários doadores, observando melhora significativa na claudicação em comparação com o controle. Também é relatado o aumento da viscosidade e diminuição da concentração de glicosaminoglicanos nos grupos tratados (38).

O tratamento com CTMs derivadas da medula óssea livres intra-articular em equinos foi capaz de estimular o aumento no número de células nucleadas com 24 e 48 horas, sejam elas autólogas, alogênicas ou xenogênicas (33,37,39).

Essa diferença estatística observada na resposta das células nucleadas e neutrófilos ($P=0,0473$ e $P=0,006$, respectivamente) e correlação positiva ($r=0,99$) no grupo CTM_{MS} encapsuladas, ocorreu em função da somatória do processo inflamatório induzido pelas CTMs, o arcabouço de alginato de sódio e indução da lesão. Embora o objetivo seja ter uma cápsula, o mais inerte possível, entendemos que a composição da cápsula foi capaz de induzir um processo inflamatório superior aos demais grupos. Parte do processo inflamatório acentuado, é justificado em função do uso do cálcio para encapsulação, sendo capaz de imunoestimular as células do sistema imune (40). Esse achado é confirmado em estudo *in vivo* (41), ao utilizar a administração de cápsulas de alginato na cavidade peritoneal de ratos, visualizando aumento significativo no número total de células inflamatórias as 48, 96 e 168h, após o implante de cápsula do que após a injeção de solução salina.

Acredita-se que inicialmente o processo inflamatório seja maior, em função do retardo do efeito das CTMs por estarem inseridas em um arcabouço, conforme observa-se os valores das contagens de células neutrófilos. Contudo

no decorrer das avaliações ocorreu um declínio de neutrófilos e ao final da pesquisa esse grupo apresentou a menor contagem de células, o que nos leva a inferir que as CTMs encapsuladas modularam o processo inflamatório, não as expondo diretamente às células de defesa.

As CTMs atuam de forma parácrina, capaz de estimular indiretamente a secreção de fatores bioativos, como as citocinas e fatores de crescimento (42–44). Além disso, a estrutura tridimensional do alginato é porosa que permite a difusão de oxigênio, nutrientes e o transporte de metabólitos (45). A ação parácrina das CTMs é responsável pelo efeito anti-inflamatório e angiogênico, estimulando a sobrevivência e proliferação celular local (42,46).

Confirmando essa hipótese, sugere-se que proteger as CTMs da detecção imune e prolongar sua persistência *in vivo* podem melhorar os resultados clínicos e impedir a sensibilização do paciente em relação aos antígenos doadores (47).

A retomada aos valores iniciais dos neutrófilos ocorreu em diferentes momentos, com 7 a 9 dias (34,48), diferindo do observado em nosso trabalho, no qual houve permanência da elevação dos valores mesmo após 14 dias. Em contrapartida relato recente, descreve que a elevação ocorreu com 7 dias, obtendo o pico com 14 dias após administração de CTMs derivadas da medula óssea (49).

O aumento do número de neutrófilos é resultante da resposta inflamatória aguda após a indução da lesão condral como demonstrado em pesquisa anterior, onde os níveis apresentaram-se elevados em 10% nos primeiros dias (21), comprovando que o modelo experimental utilizado apresentou eficácia em indução do processo inflamatório. Algumas pesquisas inferem que esse aumento ocorre em função do fluxo transitório de neutrófilos após o tratamento com CTMs (50), diferindo dos nossos achados, uma vez que o aumento foi visualizado também no grupo controle, demonstrado através da diferença estatística no momento 24 horas entre todos os grupos.

Existe uma correlação positiva entre os valores de proteína e os macrófagos ($r=0,38$) em CTMs encapsuladas, grupo com menor contagem de células e que diferiu estatisticamente dos demais ($P=0,025$) em 96 h, dessa forma podemos prever que as CTMs já estavam modulando o processo inflamatório.

1 A elevação nos valores de proteína foi descrito anteriormente, após a
2 aplicação de CTMs alogênicas e xenogênicas em equinos atingindo 5g/dL (33),
3 semelhante ao observado no GB em 24 horas, diferindo dos demais momentos
4 analisados, não observando diferença estatística entre os grupos.

5 Evidências clínicas descritas recentemente (33,34,37) também
6 observaram essa inflamação temporária, através do aumento da contagem de
7 células nucleadas totais e neutrófilos, após a administração de CTMs alogênicas
8 em articulações híginas. Em contrapartida, pesquisas utilizando modelo de
9 sinovite induzida por LPS demonstraram que as CTMs alogênicas induziram
10 reação inflamatória leve e auto limitante inicial quando administradas em
11 articulações inflamadas, sendo capazes de reduzir a população de células do
12 líquido sinovial (36).

13 Os linfócitos estão presentes no sistema imune adaptativo, e possuem
14 importante papel nos processos inflamatórios, atraídos por uma série de
15 quimiocinas (51). Os resultados apresentados neste estudo demonstraram um
16 aumento no número de células com diferença estatística ($P=0,015$) as 168 horas
17 no grupo controle, e este resultado pode ser explicado, uma vez que as CTMs
18 são capazes de reduzir a ativação dos linfócitos e infiltrado inflamatório, o que
19 explica a menor quantidade de células inflamatórias no líquido sinovial CTM_{MS}
20 encapsuladas ou livres (12,52).

21 Os macrófagos estão presentes no ambiente articular, com diferentes
22 funções dependendo do seu subtipo. Essas células podem se polarizar para os
23 fenótipos pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2), sendo o último associado
24 à liberação de citocinas pró-condrogências como IL-10, IL-1Ra e TGF β (53,54).
25 Apesar de não realizarmos a marcação para identificar os macrófagos M1 e M2,
26 podemos inferir a presença dos dois tipos em função dos valores de IL-10, IL-6
27 e TNF α . O menor número de macrófagos no líquido sinovial no grupo CTM_{MS}
28 encapsuladas após 96 horas ($P=0,025$), demonstra a interação da CTMs e o
29 ambiente inflamatório, estimulando a polarização em M2, que
30 consequentemente foi capaz de modular o processo inflamatório, e também
31 responsável por inibir a proliferação e função de linfócitos, visualizado através
32 da diferença estatística com 168h nos grupos tratados ($P=0,015$) (55–57).

33 No grupo controle as contagens de macrófagos foram mais altas com
34 diferença estatística em 96 horas ($P=0,025$) com os grupos tratados. A

manutenção desses valores é prejudicial pois induz a polarização de M1, que são responsáveis por secretar grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF α , que ativam vias intracelulares pró-inflamatórias, resultando na diapedese de leucócitos e consequente aumento da condição inflamatória local proporcionando a manutenção da OA (58–60).

Comprovando a ação imunomoduladora das CTM_{MS} encapsuladas, os macrófagos apresentaram correlação positiva com o TNF α ($r=0,19$) que é considerado o principal iniciador das CTMs, em contrapartida os macrófagos M2 são responsáveis pela liberação IL-10 ($r=0,59$), que faz a potencialização do TNF α (61). Vale ressaltar também que o aumento dos macrófagos, linfócitos e do TNF α foi relatado (41) após o transplante de cápsulas de alginato na cavidade peritoneal de ratos, deduzindo que esse aumento foi benéfico, visto que as CTMs dependem do processo inflamatório para conseguir expressar seu potencial de imunomodulação.

Outra hipótese do elevado número de macrófagos em momentos iniciais no grupo CTM_{MS} encapsuladas, mesmo que sem diferença estatística pode ser explicado em função do alginato, responsável por causar inflamação inicial ao estimular a ativação de células semelhantes a macrófagos (62). Uma questão importante a ser levantada neste experimento é a ausência de um grupo apenas com cápsulas à fim de se conhecer a resposta inflamatória específica do alginato, o que pode ser inferido pela literatura, além de estar sendo testado por outros pesquisadores da equipe.

A permanência de valores elevados de macrófagos e linfócitos no controle, são responsáveis por manter o processo inflamatório articular, levando a OA, em função da secreção de grandes quantidades de IL-1 e TNF- α (63–65), além de produzir óxido nítrico (54).

O IFN γ responsável por estimular a ativação de macrófagos e aumentar a função dos neutrófilos e monócitos (66), apresentou relação positiva nos tratamentos, com o aumento no grupo CTM_{MS} encapsuladas em 24 horas e no CTM_{MS} livres em 24, 168 e 336 horas, o que pode ter ocorrido em função do processo inflamatório instalado, decorrente da aplicação das CTMs. Além disso o IFN γ e o TNF- α apresentaram correlação positiva em ambos os grupos CTM_{MS} encapsuladas ($r=0,75$) e CTM_{MS} livres ($r=0,87$), eles são considerados responsáveis pela interrupção da homeostase articular (1); em contrapartida,

1 associado com IL-1 ($r=0,15$ e $r=0,23$, respectivamente) (67,68) são consideradas
2 as principais citocinas pró-inflamatórias capazes de induzir a expressão das
3 características imunorreguladoras das CTMs de forma sinérgica (67,69),
4 mantendo a proliferação e diferenciação (38,69,70).

5 Nossos achados mencionados anteriormente, são descritos por outros
6 pesquisadores, que relataram a importância da inflamação, para estimular a
7 função imunorreguladora completa das CTMs, melhorando a eficácia terapêutica
8 (71). A relação positiva observada das CTMs com INF γ , demonstrou melhor
9 resposta à supressão na proliferação das células T (72–74), como observado
10 nos grupos tratados, e oposto do grupo controle em que os valores se
11 mantiveram elevados, em decorrência da ausência da ação das CTMs,
12 mantendo o processo inflamatório articular, possibilitando a manutenção da OA.

13 Estudos com a IL-6 em equinos são escassos, no entanto sabe-se que
14 ela é considerada citocina pró-inflamatória, produzida na resposta inflamatória
15 em artrites induzidas por LPS (75). A observação dos maiores níveis no CTM_{MS}
16 encapsuladas, permite concluir que nesse grupo ocorreu maior processo
17 inflamatório inicial, que foi controlado, através da correlação positiva com INF γ
18 ($r=0,23$) e o TNF α ($r=0,23$). Esta associação pode ainda aumentar o potencial
19 imunomodulador das CTMs (30). Ainda existem relatos que a IL-6 secretada
20 pelas CTMs é responsável por atrasar a apoptose de linfócitos e neutrófilos, além
21 de diminuir a estimulação das células T (76,77).

22 Outra hipótese é que a alta expressão da IL-6 no CTM_{MS} encapsuladas
23 ocorreu em função da cápsula de alginato, pois o alginato é responsável por
24 estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias (62), esse fato também foi
25 observado por outros autores, onde oligômeros de alginato estimularam a
26 secreção de IL-1a, IL-1b, IL-6 e TNF- α (78,79). Em contraste novas pesquisas
27 têm trazido que a IL-6 tem um papel imunorregulador ou um papel dúbio
28 dependendo do ambiente (80), com a observação da relação da IL-6 com o
29 CTM_{MS} encapsuladas e a correlação positiva da IL-6 com IL-10 ($r=0,32$),
30 citocinas que podem ser consideradas anti-inflamatórias, inferimos que no
31 CTM_{MS} encapsuladas a imunorregulação foi mais eficaz, no controle do processo
32 inflamatório.

33 Além disso, esse grupo apresentou melhor resposta ao final da pesquisa,
34 visto que as CTM_{MS}, aumentaram a secreção de IL-6, juntamente com a

1 correlação positiva TNF- α ($r=0,35$) e IFN- γ ($r=0,23$), dessa forma inferimos que
2 as CTMs atuaram inibindo proliferação de linfócitos e macrófagos (M1),
3 justificado com as baixas contagens ao final da avaliação.

4 A não observação da elevação simultânea da concentração de IL-6, IL-1
5 e TNF α , são achados importantes, visto que essas três citocinas são
6 consideradas as responsáveis pela estimulação da degradação da matriz da
7 cartilagem articular (63–65). Baseado nestes resultados, inferimos que a
8 presença das CTMs na cavidade articular foi capaz de bloquear a evolução do
9 processo inflamatório, evitando a progressão da OA.

10 Os níveis de IL-10 apresentaram-se elevados no CTM_{MS} encapsuladas, o
11 que inferimos ser em função da aplicação das CTMs, células essas com
12 capacidade de modular o sistema imune adaptativo, estimulando a expressão e
13 reduzindo o processo inflamatório (30). Esse achado foi relatado em estudos
14 onde as células devidamente estimuladas, foram capazes de expressar
15 moléculas anti-inflamatórias como a IL-10, o antagonista de interleucina 1 (IL-
16 1ra), indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), TGF- β e PGE2 (10,21). Além desse fato
17 a liberação de IL-10 pelas CTMs em maior quantidade no CTM_{MS} encapsuladas
18 foi capaz de reduzir os efeitos pró-inflamatórios da IL-6 ($r=0,32$), TNF α ($r=0,38$)
19 e IFN- γ ($r=0,37$), almejando a melhora do ambiente articular (33,61,72).

20 O fato do alginato, componente das cápsulas poder ter gerado um
21 processo inflamatório mais acentuado, estimulou ainda mais a imunomodulação,
22 fazendo com que este grupo apresentasse maior controle do processo ao final
23 da pesquisa. Inferimos que isso ocorreu pela secreção expressiva de
24 mediadores pelos poros da cápsula como descrito por nosso grupo
25 anteriormente (17), além da proteção das CTMs do líquido sinovial, buscando
26 efeitos imunomoduladores e de regeneração a longo prazo. Em uma pesquisa
27 realizada com neuroinflamação, utilizando CTMs em hidrogel de alginato, foi
28 observada uma imunomodulação semelhante à encontrada em nosso
29 experimento, o que reforça a hipótese de que o alginato pode não apenas
30 fornecer um veículo de entrega, aprimorando o transplante, mas também pode
31 aumentar o benefício terapêutico das CTMs (81). Adicionalmente, as CTMs
32 encapsuladas em alginato, são capazes de preservar sua função anti-
33 inflamatória e fornecer um veículo de entrega controlada, capaz de reduzir a
34 inflamação e, conseqüentemente, promover a reparação tecidual *in vivo* (82–85).

Para compreender de forma totalitária os mecanismos de ação das novas terapias direcionadas às enfermidades articulares, deve-se avaliar os efeitos articulares funcionais e fisiológicos resultantes de sua utilização. Terapias voltadas para o controle do processo inflamatório e de reparação apresentam-se vantajosas no controle dos sintomas e alterações estruturais ocorridos durante a progressão da OA (48,86).

Conclusão

A manutenção dos macrófagos e linfócitos observada no grupo controle pode ser prejudicial pois contribui para a manutenção da osteoartrite. As CTMs atuaram de forma a diminuir a concentração destas células nos grupos tratados. As CTMs inseridas em cápsulas de alginato induziram processo inflamatório inicial mais acentuado, mas a ação das CTMs, foi capaz de imunomodular o processo inflamatório. Essa modulação reduziu o número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos e aumentou a IL-10 e IL-6, o que contribuiu de forma mais eficaz para o controle da inflamação quando comparado ao grupo de CTMs livres, provavelmente devido ao maior tempo de permanência das células encapsuladas dentro da articulação.

A investigação do controle do processo inflamatório e o encapsulamento das CTMs *in vivo* apresentaram resultados promissores e embasamento para pesquisas posteriores, visando explorar o potencial imunomodulador em diferentes condições.

Aprovação ética

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos conforme as diretrizes e aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Campus Botucatu/SP sob o protocolo nº 032/2020 – CEUA.

Referências

1. Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*, 2009;179(1):10–24.

- 1 2. Alcaraz MJ, Megías J, García-Arnandis I, Clérigues V, Guillén MI. New
2 molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical*
3 *Pharmacology*, 2010;80(1):13-21.
- 4 3. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally
5 occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res.* 2012;1(11):297–309.
- 6 4. Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JMS. Advanced cell
7 therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol.*
8 2015;33(1):35–42.
- 9 5. Yamada ALM, Carvalho A de M, Moroz A, Deffune E, Watanabe MJ,
10 Hussni CA, et al. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects
11 healing in horses. *Stem Cell Discov.* 2013;03(04):218–25.
- 12 6. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I.
13 Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow,
14 synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.*
15 2007;327(30):449-62.
- 16 7. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent
17 mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis*
18 *Rheum.* 2001;44(8)1928-42.
- 19 8. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem
20 cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium
21 as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2521-9.
- 22 9. Lee JC, Min HJ, Park HJ, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovial membrane-
23 derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can
24 repair osteochondral defects in a rabbit model. *Arthrosc - J Arthrosc Relat*
25 *Surg.* 2013;29(6):1034–46.
- 26 10. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal
27 stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.*
28 2012;33(3):136–43.
- 29 11. Van Lent PLEM, van den Berg WB. Mesenchymal stem cell therapy in
30 osteoarthritis: Advanced tissue repair or intervention with smouldering
31 synovial activation? *Arthritis Res Ther.* 2013;15(2):1–2.
- 32 12. Nöth U, Steinert AF, Tuan RS. Technology Insight: Adult mesenchymal
33 stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol.*
34 2008;4(7):371–80.
- 35 13. Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch KH. Influence of
36 platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of
37 chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.*
38 2009;189(5):317-26.
- 39 14. Coleman CM, Curtin C, Barry FP, O'Flatharta C, Murphy JM. Mesenchymal
40 stem cells and osteoarthritis: Remedy or accomplice? *Hum Gene Ther.*
41 2010;21(10):1239–50.
- 42 15. Frisbie DD, Smith RKW. Clinical update on the use of mesenchymal stem
43 cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal.* 2010;42(1):86-9.
- 44 16. Frisbie DD, Stewart MC. Cell-based Therapies for Equine Joint Disease.
45 *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice.* 2011;27(2)335-49.
- 46 17. Santos VH Dos, Pfeifer JPH, Souza JB De, Stievani FDC, Hussni CA,
47 Golim MDA, et al. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated
48 mesenchymal stem cell migration in horses. *Res Vet Sci.* 2019;124(May
49 2018):38–45.
- 50 18. Ayral X. Injections in the treatment of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin*

- 1 Rheumatol. 2001;15(4):609-26.
- 2 19. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and
3 Specialized Applications: Sixth Edition. Culture of Animal Cells: A Manual
4 of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. 2011.
- 5 20. McIlwraith CW, Nixon AJ, Wright IM, Boening KJ. Diagnostic and Surgical
6 Arthroscopy in the Horse. Diagnostic and Surgical Arthroscopy in the
7 Horse. 2005.
- 8 21. Yamada ALM, Alvarenga ML, Brandão JS, Watanabe MJ, Rodrigues CA,
9 Hussni CA, et al. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco
10 mesenquimais: Uso em lesões condrais em modelo experimental equino.
11 Pesqui Vet Bras. 2016;36(6):461–7.
- 12 22. Santos VH, Pfeifer JPH, de Souza JB, Milani BHG, de Oliveira RA, Assis
13 MG, et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial
14 membrane in alginate hydrogel microcapsules. BMC Vet Res.
15 2018;14(1):1–10.
- 16 23. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause
17 DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal
18 cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.
19 Cytotherapy. 2006;8(4):315–7.
- 20 24. Carvalho AM, Yamada ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Hussni CA, Alves
21 ALG. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine
22 tendonitis therapy. Equine Vet J. 2014;46(5):635-8.
- 23 25. Spaas JH, Schauwer C De, Cornillie P, Meyer E, Soom A Van, Van de
24 Walle GR. Culture and characterisation of equine peripheral blood
25 mesenchymal stromal cells. Vet J. 2013;195(1):107-13.
- 26 26. To K, Zhang B, Romain K, Mak C, Khan W. Synovium-Derived
27 Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Cartilage Regeneration: A
28 PRISMA Review of in vivo Studies. Frontiers in Bioengineering and
29 Biotechnology. 2019;7:314.
- 30 27. Wike MM, Nydam D V., Nixon AJ. Enhanced early chondrogenesis in
31 articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell
32 implantation in an equine model. J Orthop Res. 2007;25(7):913-925.
- 33 28. Horie M, Choi H, Lee RH, Reger RL, Ylostalo J, Muneta T, et al. Intra-
34 articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat
35 meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that
36 enhances expression of type II collagen. Osteoarthr Cartil.
37 2012;20(10):1197-207.
- 38 29. Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, et al. Not
39 single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain
40 viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats.
41 Osteoarthr Cartil. 2016;24(6):1061-70.
- 42 30. Ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, De Munter W, Grevers
43 LC, et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular
44 injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis.
45 Arthritis Rheum. 2012;64(11):3604–13.
- 46 31. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with
47 MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite
48 scaffolds. PLoS One. 2014;9(8).
- 49 32. Koh E, Jung YC, Woo HM, Kang BJ. Injectable alginate-microencapsulated
50 canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for enhanced

- 1 viable cell retention. *J Vet Med Sci.* 2017;79(3):492-501.
- 2 33. Pigott JH, Ishihara A, Wellman ML, Russell DS, Bertone AL. Inflammatory
3 effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and
4 xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses.
5 *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2013;23(6):453-60.
- 6 34. Boone L. Intra-articular administration of allogeneic equine bone derived
7 mesenchymal stem cells. Athens, Georgia: University of Georgia.; 2013.
- 8 35. Stashak TS. *Claudicação em equinos.* 5a.ed. Roca, editor. São Paulo:
9 Roca; 2006. 1093p.
- 10 36. Williams LB, Koenig JB, Black B, Gibson TWG, Sharif S, Koch TG. Equine
11 allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce
12 synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation
13 when evaluated in an LPS induced synovitis model. *Equine Vet J.*
14 2015;48(50):619-25.
- 15 37. Ardanaz N, Vázquez FJ, Romero A, Remacha AR, Barrachina L, Sanz A,
16 et al. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem
17 cells in an equine experimental model: Effect of autologous, and single and
18 repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Vet Res*
19 [Internet]. 2016;12(1):1–9.
- 20 38. Zayed MN, Schumacher J, Misk N, Dhar MS. Effects of pro-inflammatory
21 cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived
22 from bone marrow or synovial fluid. *Vet J.* 2016;217:26-32.
- 23 39. Colbath AC, Dow SW, Hopkins LS, Phillips JN, McIlwraith CW, Goodrich
24 LR. Single and repeated intra-articular injections in the tarsocrural joint with
25 allogeneic and autologous equine bone marrow-derived mesenchymal
26 stem cells are safe, but did not reduce acute inflammation in an
27 experimental interleukin-1 β model of synovitis. *Equine Vet J.*
28 2019;52(4):601-612.
- 29 40. Chan G, Mooney DJ. Ca²⁺ released from calcium alginate gels can
30 promote inflammatory responses in vitro and in vivo. *Acta Biomater.*
31 2013;9(12):9181-91.
- 32 41. Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Desbiens K, Labrecque N, Hallé JP.
33 Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate-poly-L-lysine
34 microcapsules. *Biomaterials.* 2005;26(19):4119-27.
- 35 42. da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms
36 involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine*
37 and Growth Factor Reviews. 2009;20(5-6):419-27.
- 38 43. Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F, et al.
39 Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates
40 osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res*
41 *Ther.* 2013;15(1):22.
- 42 44. Kim YS, Choi YJ, Koh YG. Mesenchymal Stem Cell Implantation in Knee
43 Osteoarthritis: An Assessment of the Factors Influencing Clinical
44 Outcomes. *Am J Sports Med.* 2015;43(9):2293-301.
- 45 45. Sun J, Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine
46 applications. *Materials (Basel).* 2013;6(4):1285–309.
- 47 46. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal
48 stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):1–13.
- 49 47. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: Immune evasive,
50 not immune privileged. *Nature Biotechnology.* 2014;32:252-260.

- 1 48. Joswig AJ, Mitchell A, Cummings KJ, Levine GJ, Gregory CA, Smith R, et
2 al. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells
3 causes an adverse response compared to autologous cells in the equine
4 model. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):42.
- 5 49. Bertoni L, Branly T, Jacquet S, Desancé M, Desquilbet L, Rivory P, et al.
6 Intra-articular injection of 2 different dosages of autologous and allogeneic
7 bone marrow- And umbilical cord-derived mesenchymal stem cells triggers
8 a variable inflammatory response of the fetlock joint on 12 sound
9 experimental horses. *Stem Cells Int.* 2019;2019.
- 10 50. Carrade DD, Borjesson DL. Immunomodulation by mesenchymal stem
11 cells in veterinary species. *Comparative Medicine.* 2013;63(3):207-17.
- 12 51. Cruvinel W de M, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza
13 AWS de, Silva NP da, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da
14 imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da
15 resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol.* 2010;50(4):434-61.
- 16 52. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. Cartilage
17 engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors.
18 *Trends Biotechnol.* 2009;27(5):307–14.
- 19 53. Fernandes TL, Gomoll AH, Lattermann C, Hernandez AJ, Bueno DF,
20 Amano MT. Macrophage: A Potential Target on Cartilage Regeneration.
21 *Front Immunol.* 2020;11(February):1–9.
- 22 54. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, et al.
23 Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine
24 microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio.*
25 2013;4(3):1–10.
- 26 55. Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells:
27 Novel concept for future therapies. *Expert Opinion on Biological Therapy.*
28 2008;8(5):1-10.
- 29 56. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human
30 Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is
31 Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to
32 Induce CD4 + CD25 high FOXP3 + Regulatory T Cells . *Stem Cells.* 2008;
33 26(1):212-22.
- 34 57. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit
35 monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering
36 with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived
37 prostaglandin E2. *Blood.* 2009;113(26):6576-83.
- 38 58. Van den Bossche J, Baardman J, de Winther MPJ. Metabolic
39 characterization of polarized M1 and M2 bone marrow-derived
40 macrophages using real-time extracellular flux analysis. *J Vis Exp.*
41 2015;28(105):53424.
- 42 59. Boutens L, Hooiveld GJ, Dhingra S, Cramer RA, Netea MG, Stienstra R.
43 Unique metabolic activation of adipose tissue macrophages in obesity
44 promotes inflammatory responses. *Diabetologia.* 2018;61(4):942-953.
- 45 60. Vinay Kumar, Abul K. Abbas JCA. Robbins and Cotran's Pathological Basis
46 of Disease. Elsevier Health Sciences. 2015.
- 47 61. Saldaña L, Bensiamar F, Vallés G, Mancebo FJ, García-Rey E, Vilaboa N.
48 Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation
49 by macrophage-derived soluble factors. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10:58.
- 50 62. Yang D, Jones KS. Effect of alginate on innate immune activation of

- 1 macrophages. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009;90(2):411-8.
- 2 63. Venn G, Nietfeld JJ, Duits AJ, Brennan FM, Arner E, Covington M, et al.
- 3 Elevated synovial fluid levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor
- 4 associated with early experimental canine osteoarthritis. *Arthritis Rheum*.
- 5 1993;36(6):819-26.
- 6 64. Wittenberg RH, Willburger RE, Kleemeyer KS, Peskar BA. In vitro release
- 7 of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone
- 8 in degenerative joint diseases. *Arthritis Rheum*. 1993;36(10):1444-50.
- 9 65. Alwan WH, Carter SD, Dixon JB, Bennett D, May SA, Edwards GB.
- 10 Interleukin-1-like activity in synovial fluids and sera of horses with arthritis.
- 11 *Res Vet Sci*. 1991;5(2):79-82.
- 12 66. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al.
- 13 Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles
- 14 in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-721.
- 15 67. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal
- 16 Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of
- 17 Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
- 18 68. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role
- 19 for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow
- 20 Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):386-98.
- 21 69. Barrachina L, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Albareda J, Prades
- 22 M, et al. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow
- 23 derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory
- 24 properties. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016;171:57–65.
- 25 70. Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA. Proinflammatory
- 26 cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for
- 27 bone repair during inflammation. *Osteoarthr Cartil*. 2009;17(6):735-42.
- 28 71. Cuerquis J, Romieu-Mourez R, François M, Routy JP, Young YK, Zhao J,
- 29 et al. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine
- 30 production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation:
- 31 Effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α stimulation. *Cytotherapy*.
- 32 2014;16(2):191-202.
- 33 72. Cassano JM, Schnabel L V., Goodale MB, Fortier LA. Inflammatory
- 34 licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced
- 35 immunomodulation in an inflammatory environment. *Stem Cell Res Ther*.
- 36 2018;9:82.
- 37 73. Polchert D, Sobinsky J, Douglas GW, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al.
- 38 IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention
- 39 of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1745-55.
- 40 74. Szabó E, Fajka-Boja R, Kriston-Pál É, Hornung Á, Makra I, Kudlik G, et al.
- 41 Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of
- 42 Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem*
- 43 *Cells Dev*. 2015;24(18):2171-80.
- 44 75. Hawkins DL, MacKay RJ, Gum GG, Colahan PT, Meyer JC. Effects of intra-
- 45 articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial
- 46 fluid tumor necrosis factor, interleukin 6, and prostaglandin E2 values in
- 47 horses. *Am J Vet Res*. 1993;54(3):379-86.
- 48 76. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F,
- 49 et al. Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A
- 50 Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *Stem Cells*.

- 1 2008;26(1):151-62.
- 2 77. Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren G, Shi Y. The role of IL-6 in inhibition of
3 lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res*
4 *Commun.* 2007;361(3):745-750.
- 5 78. Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, Kim D, Yamaguchi K, Oda T, et al.
6 Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction
7 of cytokine production from RAW264.7 cells. *FEBS Lett.*
8 2005;579(20):4423-9.
- 9 79. Otterlei M, Østgaard K, Skjåk-Bræk G, Smidsrød O, Soon-Shiong P,
10 Espevik T. Induction of Cytokine Production from Human Monocytes
11 Stimulated with Alginate. *J Immunother.* 1991; 10(4):286-91.
- 12 80. Smith JK. IL-6 and the dysregulation of immune, bone, muscle, and
13 metabolic homeostasis during spaceflight. *npj Microgravity.* 2018;4(1):1–8.
- 14 81. Stucky EC, Schloss RS, Yarmush ML, Shreiber DI. Alginate micro-
15 encapsulation of mesenchymal stromal cells enhances modulation of the
16 neuro-inflammatory response. *Cytotherapy.* 2015;17(10):1353-64.
- 17 82. Barminko J, Kim JH, Otsuka S, Gray A, Schloss R, Grumet M, et al.
18 Encapsulated mesenchymal stromal cells for in vivo transplantation.
19 *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(11):2747-2758.
- 20 83. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells
21 and clinical experience. *Journal of Internal Medicine.* 2007;262(5):509-25.
- 22 84. Goren A, Dahan N, Goren E, Baruch L, Machluf M. Encapsulated human
23 mesenchymal stem cells: a unique hypoimmunogenic platform for long-
24 term cellular therapy. *FASEB J.* 2010;24(1):22-31.
- 25 85. Garate A, Murua A, Orive G, Hernández RM, Pedraz JL. Stem cells in
26 alginate bioscaffolds. *Therapeutic Delivery.* 2012;3(6):761-74.
- 27 86. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology.*
28 2007;213(3):626-34.
- 29
- 30

Artigo científico a ser submetido ao periódico: **Stem Cells Research & Therapy**.
 Link: <<https://stemcellres.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research>>.

CAPÍTULO 3:

AVALIAÇÃO À LONGO PRAZO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEMBRANA SINOVIAL ALOGÊNICAS ENCAPSULADAS COM HIDROGEL DE ALGINATO PARA O TRATAMENTO DE LESÃO CONDRAL EM EQUINOS

LONG -TERM EVALUATION OF ENCAPSULATED SINOVIAL MEMBRANE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ALLOGENIC FOR THE TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS IN HORSES

Vitor Hugo Santos¹, João Pedro Hübbe Pfeifer¹, Fernanda de Castro Stievani¹,
 Gustavo Santos Rosa¹, Emanuel Vitor Pereira Apolonio¹, Mariana Correa
 Rossi¹, Carlos Eduardo Fonseca Alves¹, Ana Liz Garcia Alves¹.

Resumo

A alta incidência e dificuldade no tratamento da osteoartrite (OA) em equinos, tem incentivado a comunidade científica na busca do tratamento mais efetivo. Sendo assim, foi avaliado os efeitos da aplicação intra-articular de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial (CTM_{MS}) encapsuladas em alginato para o tratamento de osteoartrite em equinos.

Métodos: Defeitos condrais foram induzidos na tróclea medial do talus em quinze cavalos. No dia da indução os animais foram divididos em três grupos: CTM_{MS} encapsuladas, CTM_{MS} livres e controle. Após 150 dias da instituição dos tratamentos, realizamos a avaliação *in situ* através da cirurgia artroscópica (o escore da International Society Cartilage Repair) e coletamos material para análise histológica (escore de O'Driscoll) e imunohistoquímica para colágeno tipo II.

Resultados: Na avaliação *in situ* da reparação da cartilagem foi observado diferença estatística na avaliação global de reparo no grupo CTM_{MS} encapsuladas. Na análise microscópica coradas com H.E e azul de toluidina, o

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil.

CTM_{MS} encapsuladas e CTM_{MS} livres, demonstraram diferentes graus da formação de fibrocartilagem, no entanto as características morfológicas foram semelhantes a cartilagem nativa.

Conclusões: As CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato demonstram ter maior potencial de reparação em lesões condrais induzidas, formando tecido de reparação semelhante a cartilagem nativa.

Palavras-chave: bioengenharia, cartilagem hialina, reparação, terapia celular.

Abstract

The high incidence and difficulty in the treatment of osteoarthritis (OA) in horses has encouraged the scientific community to seek the most effective treatment. Therefore, the effects of intra-articular application of mesenchymal stem cells derived from synovial membrane (MSC_{SM}) allogenic encapsulated in alginate for the treatment of osteoarthritis in horses have been evaluated.

Methods: Chondral defects were induced in the medial trochlea of the talus in fifteen horses. On the day of induction, the animals were divided into three groups: MSC_{SM} encapsulated, MSC_{SM} free and control. After 150 days of treatment, we performed in situ evaluation through arthroscopic surgery (the score of the International Society for Cartilage Repair) and collected material for histological analysis (O'Driscoll score) and immunohistochemistry for collagen type II.

Results: In the evaluation in situ of cartilage repair, a statistical difference was observed in the global evaluation of MSC_{SM} encapsulated repair. In the microscopic analysis stained with H.E and toluidine blue, MSC_{SM} encapsulated and MSC_{SM} free, showed different degrees of fibrocartilage formation, however the morphological characteristics were similar to native cartilage.

Conclusions: MSC_{SM} encapsulated in alginate hydrogel showed a higher potential for repair in induced chondral lesions, forming repair tissue similar to native cartilage.

Keywords: bioengineering, hyaline cartilage, repair, cell therapy.

1

2 **Introdução**

3

4 A osteoartrite é responsável por 35% das claudicações em equinos, sendo
5 altamente incapacitante e com tratamento complexo (1–3). Esta enfermidade
6 gera impacto no mercado do cavalo atleta, em decorrência das características
7 degenerativas de evolução da lesão articular, reduzindo o desempenho e dessa
8 forma afeta o valor dos animais (2,4,5).

9 Esse fato se deve a reparação da cartilagem articular que depende de
10 processos intrínsecos, que são limitados em função do baixo potencial mitótico
11 dos condrócitos, além dos processos extrínsecos, restritos a migração das
12 células progenitoras do osso subcondral (6), a associação desses processos
13 culminam com abundância de tecido fibrocartilaginoso, sendo este composto por
14 metade dos glicosaminoglicanos da cartilagem nativa, reduzindo as
15 características morfofuncionais (7–9).

16 A terapia celular vem para superar estes desafios, demonstrando a
17 reparação da cartilagem a mais próxima da nativa (1,10). A utilização da fonte
18 precursora tecido específica, auxiliou a regeneração da cartilagem *in vitro* e *in*
19 *vivo* (11), ainda apresentou melhor potencial condrogênico (12) comparada com
20 as demais fontes.

21 As CTMs quando administradas livremente na articulação migraram para
22 o local da lesão mas também apresentaram dispersão, visto que a articulação
23 não é uma estrutura isolada do restante do corpo (13,14). Diante disso, a
24 engenharia tecidual tem ajudado no desenvolvimento das técnicas para proteção
25 das CTMs, visando melhor desempenho quando aplicadas intra-articular. Uma
26 das opções é a utilização do arcabouço de hidrogel de alginato, que é capaz de
27 manter boa produção de matriz extracelular, além da manutenção das
28 características das CTMs por longos períodos (15).

29 A utilização dos implantes encapsulados possibilita maior permanência
30 das células na articulação, diminui a migração para circulação corpórea
31 (10,13,16). Pesquisas demonstram que as CTMs ficam aderidas a membrana
32 sinovial (10,13). Outro estudo, descreve o tropismo das CTMs para o local da
33 lesão (16), confirmando a permanência das CTMs dentro do espaço articular.

Portanto, devido as inúmeras qualidades das CTMs e os resultados já descritos, o objetivo desse estudo foi avaliar as CTMs derivadas de membrana sinovial, encapsuladas em hidrogel de alginato em defeitos induzidos experimentalmente na cartilagem articular, observando a viabilidade da aplicação e o aspecto da lesão após 150 dias da instituição dos tratamentos.

Material e métodos

Foram utilizados 15 equinos adultos, mestiços, com três a oito anos de idade, machos castrados, pesando em média 330 kg, clinicamente hígidos e sem histórico de afecções do sistema locomotor.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos e um controle. Quinze animais foram divididos em três grupos CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato, CTM_{MS} livres e controle, cada grupo com cinco animais. Em todos os grupos, as articulações társicas (“n” = 5, articulações por grupo) foram abordadas por cirurgia artroscópica para a realização da lesão condral e submetidas a tratamento conforme o grupo: lesão condral e tratamento com CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato; lesão condral e tratamento com CTM_{MS} aplicadas livremente na articulação; lesão condral sem tratamento controle (10 mL PBS). A artroscopia para a indução das lesões condrais e aplicação dos respectivos tratamentos foi definida como tempo zero do experimento (0h).

Indução da lesão

A lesão cartilaginosa da tróclea medial do talus foi o primeiro procedimento realizado, considerado tempo zero (T0). A técnica artroscópica foi a descrita por McIlwraith (17). Para criar a lesão foi utilizada uma lâmina abrasiva motorizada (shaver) e pinças artroscópicas, com desgaste controlado, suficiente para obter a dimensão da lesão condral desejada, equipamentos e instrumentos artroscópicos foram os mesmos utilizados por Yamada (9). As lesões foram padronizadas em 15 mm de diâmetro e induzidas retirando a cartilagem hialina e toda a cartilagem calcificada, porém, não havendo abrasão, perfuração ou sangramento do osso subcondral (profundidade aproximada de 1,5 a 3,2 mm).

- 1 O diâmetro da lesão foi mensurado com o auxílio de uma pinça tipo “Ferris-
2 Smith” (Figura 1).



3
4 **Figura 1.** Imagem artroscópica da lesão condral criada na tróclea na tróclea
5 medial do talus, criada com auxílio da lâmina abrasiva motorizada.

6 7 8 **Células Tronco Mesenquimais derivada da membrana sinovial (CTM_{MS})**

9 As CTM_{MS} de equinos foram provenientes do Biobanco de Células tronco
10 do Laboratório de Terapia Celular, da Universidade Estadual Paulista Júlio de
11 Mesquita Filho – Campus Botucatu – SP. Os criotubos foram selecionados de
12 maneira aleatória e as CTMs foram cultivadas com a técnica descrita (3,18), até
13 atingirem a concentração para o tratamento (1×10^7), trinta dias antes do
14 momento inicial

15

16 **Caracterização celular**

17 A análise imunofenotípica das CTM_{MS} foi realizada em terceira passagem
18 (P3) com o citômetro de fluxo¹, usando os seguintes anticorpos: rato anti-rato
19 CD90 – FITC (clone OX7)², rato anti-humano CD105 – FITC (clone SN6)³, rato

1 BD, San Jose, CA, USA

2 Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA

3 AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK

anti-cavalo CD 44 (clone CVS18)¹ e camundongo anti-cavalo MHC classe II², que foram marcados com anticorpo secundário de cabra anti-IgG-FITC de camundongo³. Os protocolos utilizados foram descritos pelos fabricantes.

Durante a P3, as amostras de CTM_{MS} foram colocadas em triplicata em placa de seis poços⁴ para diferenciação osteogênica e adipogênica e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Após atingir confluência, o meio de cultura foi removido e os meios de diferenciação osteogênica⁵ e adipogênica⁶ foram adicionados às culturas. Os meios foram trocados a cada três dias, e a diferenciação osteogênica foi confirmada por coloração positiva da matriz extracelular de cálcio usando 2% de coloração com Alizarin Red S⁷. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela deposição de gotículas lipídicas no citoplasma, utilizando 0,5% de Oil Red O⁸. Para a diferenciação condrogênica, um pellet de CTMs foi cultivado em tubo Falcon e incubado a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Após dois dias, o meio de cultura foi removido e o meio de diferenciação⁹ foi adicionado e trocado a cada três dias. Para confirmação da diferenciação condrogênica, os pellets foram corados com Alcian Blue¹⁰ e Azul de Toluidina¹¹ para identificar os proteoglicanos. Os implantes foram todos alogênicos e a dose utilizada no tratamento foi de 10⁷ células cultivadas para cada articulação.

Encapsulamento das CTM_{MS} em hidrogel de alginato

As células do GA foram ressuspensas em solução de alginato de sódio 1,5%, na concentração de 10 milhões células/mL de 1,5% (w/v), utilizando-se 10uL de solução com 100 mil células, contadas em Câmara de Neubauer. A suspensão de células em alginato não polimerizado foi colocada em uma seringa de 10mL acoplada em agulha 21G e com o auxílio da bomba de infusão, o

¹ AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK.

² AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK.

³ Molecular Probes, Eugene, OR, USA.

⁴ Sarstedt, EUA.

⁵ StemPro Osteogenesis Differentiation Kit GIBCO – Invitrogen Cell Culture, EUA.

⁶ StemPro adipogenesis Differentiation Kit GIBCO – Invitrogen Cell Culture, EUA.

⁷ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

⁸ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

⁹ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

¹⁰ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

¹¹ Sigma-Aldrich Corp., EUA.

conteúdo da seringa foi então gotejado dentro da solução de geleificação de cloreto de cálcio (CaCl_2 - 102 mM), permitindo assim a polimerização do alginato durante 10 minutos, até que as cápsulas fossem formadas. A solução de gelatinização foi desprezada, e as cápsulas foram lavadas três vezes em solução de NaCl a 0,15M.

Biópsia e avaliação macroscópica

Após cinco meses (T150) da indução da lesão condral e realização dos tratamentos, os animais foram submetidos a um segundo procedimento artroscópico, para avaliação *in situ* da lesão e observação do aspecto da reparação.

Escores estabelecidos pela Sociedade Internacional de Reparação da Cartilagem (ICRS) foram utilizados para avaliação macroscópica da reparação da cartilagem, que classifica o grau de reparação da cartilagem, integração com a borda da lesão, aparência macroscópica e avaliação global do reparo. Essa pontuação foi realizada por seis avaliadores que desconheciam os grupos, através das imagens gravadas provenientes do procedimento artroscópico realizado para cada lesão, de cada grupo em T150.

Análise histopatológica

Em T150, as amostras para as análises histopatológicas foram coletadas na região central do defeito condral de cada lesão sendo imediatamente congeladas em Tissue-Tek® O.C.TTM¹. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos dos blocos congelados e distendidos em lâminas histológicas. Esses cortes foram corados habitualmente pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (H&E) e azul de toluidina. A análise das lâminas foi realizada por microscopia óptica, sem o prévio conhecimento do observador dos grupos a que pertenciam cada lâmina, sendo classificadas em escores tabulados e padronizados pela ICRS, utilizando o escore histológico de O' DRISCOLL.

Avaliação imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada com técnica descrita na literatura (19). As amostras para análise imunohistoquímica foram coletadas na região

¹ Sakura Finetek Europe B.V. Alemanha.

1 central da lesão e armazenadas em formol para parafinização. As lâminas foram
2 desparafinadas em xilol e reidratadas em etanol graduado, para a realização da
3 coloração imunohistoquímica para o anticorpo anti-colágeno tipo II usando o
4 método de peroxidase e tetracloreto de 3,3 'diaminobenzidina (DAB). Para a
5 recuperação do antígeno, as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH
6 6,0) em uma panela de pressão¹. Depois que as lâminas foram colocadas na
7 plataforma de *autostainer Dako Cytomation*². O anticorpo anti-colágeno tipo II foi
8 detectado com um anticorpo monoclonal secundário de camundongo³ com
9 diluição de 1/200. A marcação imunológica foi realizada pelo método Histofine⁴.
10 As seções foram então contrastadas com hematoxilina. O controle positivo
11 consistiu em um tecido pulmonar. Um controle negativo foi realizado por omissão
12 do anticorpo primário e substituição por solução salina tamponada com TRIS.

13

14 **Análise imunohistoquímica**

15 As amostras foram avaliadas por microscopia óptica usando um escore
16 semiquantitativo, sem o prévio conhecimento do observador dos grupos a que
17 pertenciam cada lâmina. As amostras sem expressão foram denominadas
18 pontuação 0, pontuação 1 foi de 1% a 25% das células positivas (ausência da
19 marcação), pontuação 2 foi de 26% até 50% de células positivas (fraca),
20 pontuação foi de 3 51% a 75% de células positivas (moderada) e pontuação 4 a
21 75% das células positivas (forte).

22

23 **Análise estatística**

24 Para análise estatística as variáveis respostas foram analisadas por
25 ANOVA empregando o modelo linear generalizado (GLM), considerando o
26 avaliador e o grupo como fatores fixos do modelo. Na presença de um efeito
27 significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para análise
28 descritiva, os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($M \pm SE$) ou
29 proporção. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico Minitab®

¹ Pascal®; Dako, Carpinteria, CA, EUA.

² Dako, Carpinteria, CA, EUA.

³ Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA.

⁴ 414154F, Nichirei Biosciences, Tóquio, JP.

1 18.1.1. Para significância estatística foi adotado $p \leq 0,05$ e tendência estatística
2 quando $p < 0,10$.

3 **Resultados**

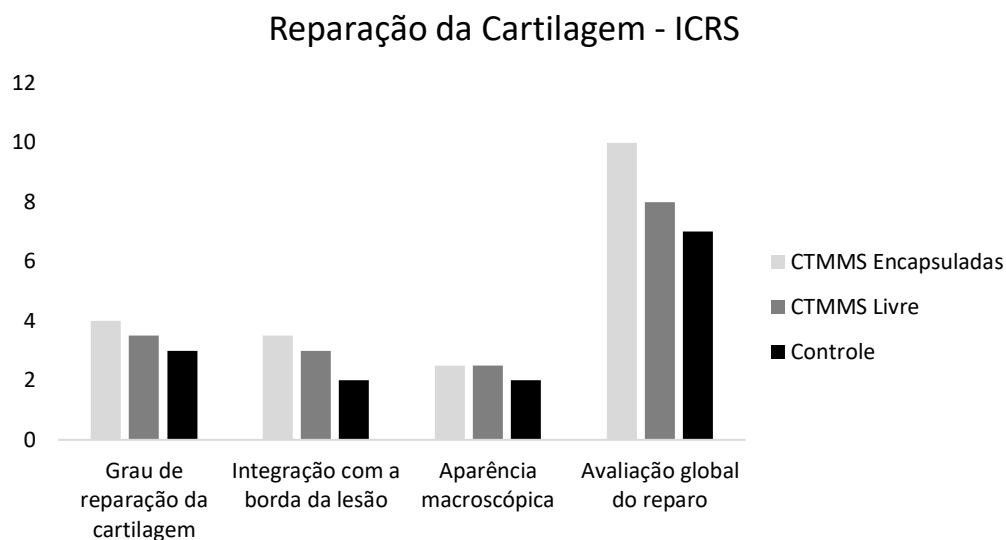
4 As CTM_{MS} foram administradas atendendo as características
5 imunofenotípicas, de diferenciação recomendada pela Sociedade Internacional
6 de Terapia Celular.

7 As cápsulas demonstraram facilidade de aplicação, através da utilização
8 da sonda Levine no portal de trabalho (Figura 2), imediatamente após a indução
9 da lesão condral, realizando a drenagem da articulação e posterior aplicação,
10 para que as cápsulas permaneçam dentro da articulação, sem a distensão
11 articular. A suspensão de 10 mL de PBS juntamente com as células tronco foram
12 administradas no grupo B, com auxílio de uma seringa e agulha 21G, após a
13 sutura da cápsula articular. Não houve intercorrências em relação a aplicação
14 das cápsulas, no entanto a experiência do cirurgião e da equipe foram essenciais
15 para o sucesso da instituição dos implantes.



16 **Figura 2.** Deposição das CTM derivadas da membrana sinovial equina inseridas
17 em cápsulas de hidrogel de alginato, administradas após a indução da lesão
18 condral no grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato, com auxílio da
19 sonda Levine (seta).
20
21

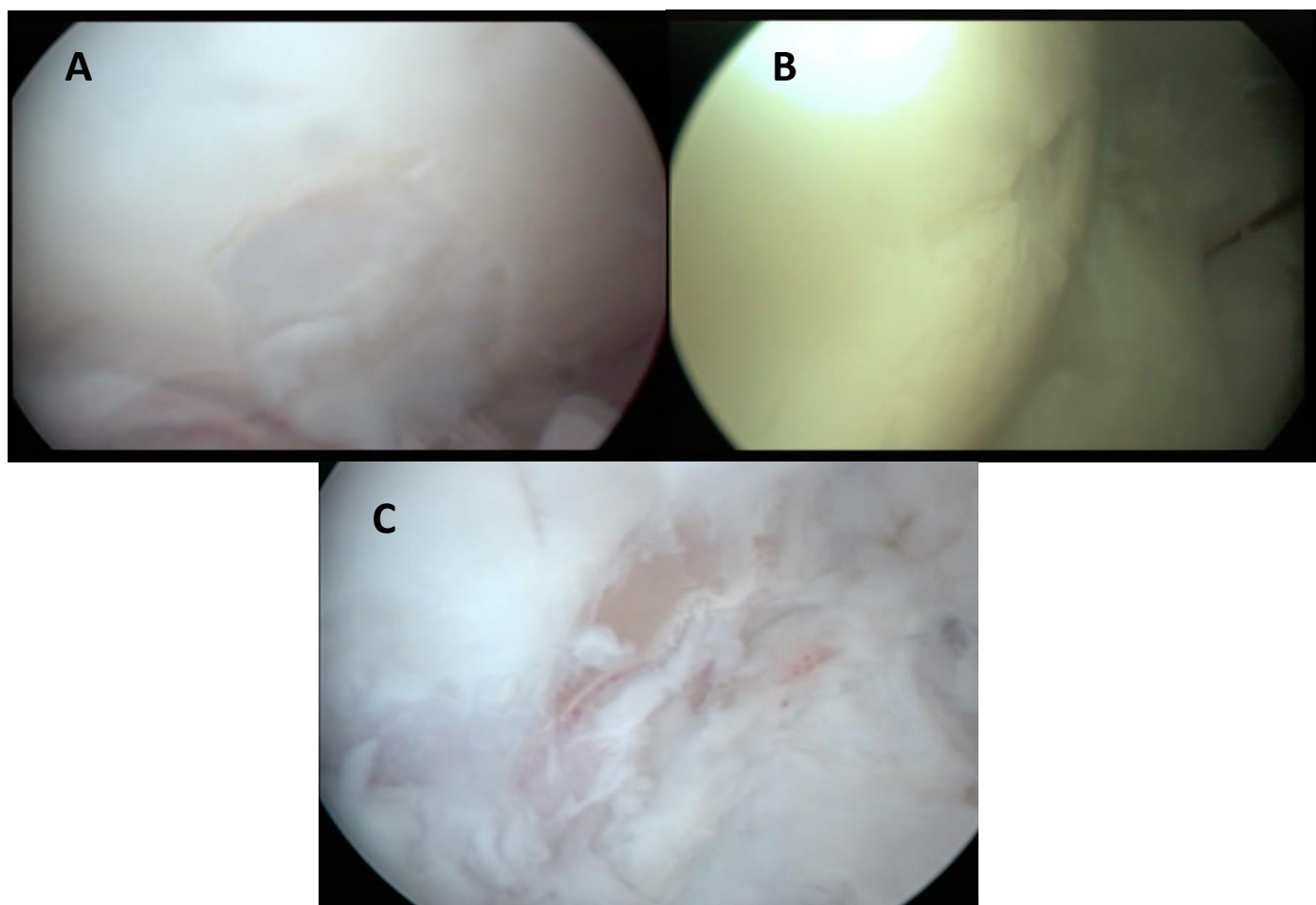
1 A pontuação referente à avaliação macroscópica da reparação da
 2 cartilagem realizada conforme escores estabelecidos pela Sociedade
 3 Internacional de Reparação da Cartilagem (ICRS) (Figura 3).



4 **Figura 3.** Gráfico de média da avaliação macroscópica utilizando os escores
 5 estabelecidos pela Sociedade Internacional de Reparação da Cartilagem
 6 (ICRS), realizada por 6 avaliadores, através da visualização de vídeos gravados
 7 no momento da cirurgia artroscópica com 150 dias após a instituição dos
 8 tratamentos CTM_{MS} encapsulada, CTM_{MS} livre e controle.
 9

10 O grupo CTM_{MS} encapsuladas apresentou tecido de reparação com melhor
 11 aspecto macroscópico, ou seja, o tecido estava no mesmo nível da cartilagem
 12 normal adjacente, possuía integração com a borda da lesão e superfície lisa com
 13 algumas fibrilas, além do tecido com resistência à palpação com a probe,
 14 semelhante a cartilagem. Em contraste, no CTM_{MS} livre foram observadas falhas
 15 de adesão do tecido na borda da lesão e pequenas lacunas de preenchimento.

1 Visivelmente, o CTM_{MS} encapsulada foi melhor na análise macroscópica do
2 que o CTM_{MS} livre. Não foram observados sinais de sinovite, fibrilações ou
3 erosões adjacentes nos grupos CTM_{MS} encapsulada ou livre (Figura 4). O grupo
4 controle apresentou tecido cicatricial escasso com falhas graves de
5 preenchimento, tecido friável e pouco aderido, além da sinovite, fibrilações e
6 erosões condrais adjacentes na maior parte das articulações.



7 **Figura 4.** Exames macroscópicos da área da lesão e tecido neoformado após
8 150 dias em todos os grupos. Tecido neoformado abundante recobrindo a área
9 total da lesão no grupo CTM_{MS} encapsulada (A). Tecido neoformado recobrindo
10 a área da lesão com irregularidades na borda e lacunas de preenchimento no
11 grupo CTM_{MS} livre (B). Lesão com tecido cicatricial escasso, friável e pouco
12 aderido no grupo controle (C).

13

14 Na avaliação macroscópica da reparação da cartilagem realizada conforme
15 escores estabelecidos pela Sociedade Internacional de Reparação da
16 Cartilagem (ICRS), foi observado diferença para variável “Avaliação Global do
17 Reparo (AGR)”, onde o CTM_{MS} encapsulado foi estatisticamente diferente do
18 grupo controle $p=0,007$. Vale ressaltar que o CTM_{MS} encapsulado apresentou

1 maior média de AGR ($10,0 \pm 1,58$), seguido dos grupos CTM_{MS} livre ($8,60 \pm 0,89$)
 2 e controle ($6,60 \pm 0,54$) (Tabela 1).

3

4 **Tabela 1.** Avaliação macroscópica da reparação da cartilagem de utilizando os
 5 escores estabelecidos pela Sociedade Internacional de Reparação da
 6 Cartilagem (ICRS) da variável Avaliação Global do Reparo (AGR).

	Grupo	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Mediana	P
Avaliação Global do Reparo “AGR”	CTM _{MS} encapsulada	10.000	0.707	1.581	10.000	
	CTM _{MS} Livre	8.600	0.400	0.894	8.000	0.007
	Controle	6.600	0.245	0.548	7.00	

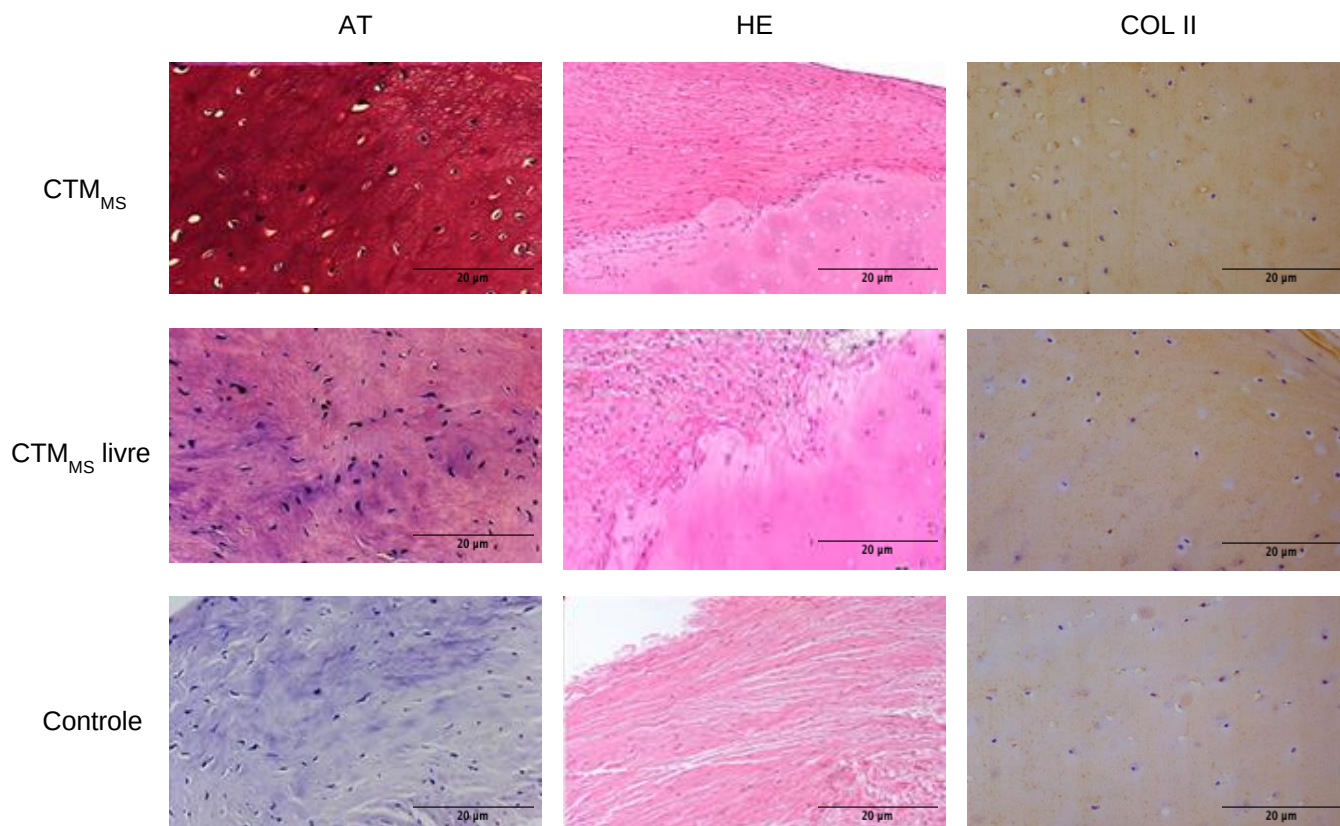
7

8 A análise microscópica das amostras obtidas coradas em H.E e Azul de
 9 toluidina (Figura 5). Os grupos demonstraram diferentes graus, na formação de
 10 fibrocartilagem, no entanto no CTM_{MS} encapsulada e CTM_{MS} livre, o tecido de
 11 reparação continha maior número de condrócitos e melhor organização celular,
 12 características morfológicas semelhantes a cartilagem nativa. Ainda, nesses
 13 grupos foi possível observar menor formação de fibrocartilagem, maior produção
 14 de matriz extracelular condral, visto através da metacromasia na coloração de
 15 azul de toluidina.

16 O CTM_{MS} encapsulada teve uma melhor avaliação em função da maior
 17 quantidade de glicosaminoglicanos presentes, observados pelo intenso efeito
 18 metacromático. No grupo controle observou apenas formação de fibrocartilagem
 19 e fibrose, sem condrócitos, ausência da organização tecidual e metacromasia.

20 Na marcação imunoistoquímica do colágeno tipo II, não houve diferença
 21 estatística entre os grupos. No CTM_{MS} encapsulada e livre ocorreu marcação
 22 forte escore 4 (75% células positivas) e moderada escore 3 (51 a 75% células

- 1 positivas), respectivamente. Já o controle apresentou marcação fraca ou
 2 ausência de marcação escore 2 (1 a 25% células positivas) (Figura 5).

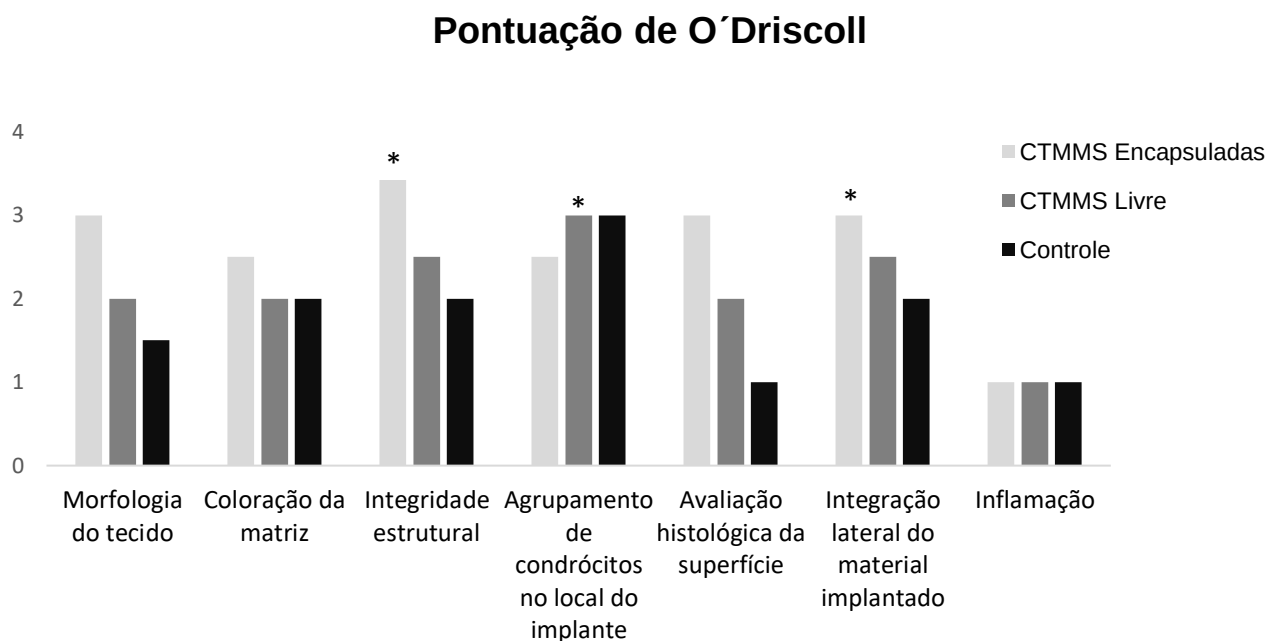


3 **Figura 5.** Fotomicroscopia das lâminas do tecido coletado após 150 dias do
 4 tratamento dos grupos experimentais. Lâminas coradas com hematoxilina
 5 eosina (H.E), Azul de Toluidina (AT) e colágeno tipo II (COL II). Melhor
 6 organização estrutural e maior presença de condrócitos nos grupos CTM_{MS}
 7 encapsulada e CTM_{MS} livre. Maior metacromasia na coloração AT para os
 8 grupos CTM_{MS} encapsulada e CTM_{MS} livre. Superioridade na marcação de
 9 colágeno tipo II no CTM_{MS} encapsulada e menos evidente no grupo controle.

10

11 A pontuação dos escores foi tabulada e padronizada pela ICRS, usando
 12 a pontuação histológica de O' DRISCOLL. Foi possível observar entre os grupos
 13 os valores de integridade estrutural ($p=0,028$), agrupamento de condrócitos no
 14 local do implante ($p=0,013$) e integração lateral do material implantado
 15 ($p=0,031$). Ainda foi possível observar tendência estatística entre os grupos na
 16 morfologia do tecido ($p=0,07$) entre o CTM_{MS} encapsulada e o controle.
 17 Observou-se ainda que o CTM_{MS} encapsulada apresentou a maior mediana
 18 dentre os três grupos (3,5). Em relação ao agrupamento de condrócitos no local

- 1 do implante, o CTM_{MS} livre se destacou dos demais, mais dessa vez coma
 2 mediana mais baixa dentre os três grupos (2,5) (Figura 6).



- 3
 4 **Figura 6.** Valores das medianas resultantes dos escores histológicos de
 5 O'Driscoll e Teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos CTM_{MS}
 6 encapsuladas, CTM_{MS} livres e controle em T150 (* diferença estatística entre os
 7 grupos).
 8

9 **Discussão**

10
 11 Inúmeras estratégias estão sendo desenvolvidas para prevenir a
 12 degradação da cartilagem articular e a osteoartrite no homem e nos equinos. As
 13 CTMs foram descritas como alternativa no tratamento, pois demonstra eficácia
 14 não imunogênica e imunossupressora, possibilitando a utilização sem
 15 necessidade de medicação imunossupressora (20,21).

16 Ao utilizar as CTM_{MS} preconizamos a viabilidade e o número de células,
 17 visto que a concentração de células foi superior a 10^7 . A utilização de maiores
 18 quantidades de células no local da lesão demonstram melhores pontuações nos
 19 cortes histológicos no tecido de reparação (22,23), no entanto, essa elevada
 20 concentração celular costuma predispor elevada proliferação sinovial, em função
 21 da adesão das CTMs na membrana sinovial, levando a quadro de sinovites
 22 severas (10).

1 Além da viabilidade celular, a caracterização das mesmas torna-se
2 importante, possibilitando a melhor comparação nos dados, com isso as CTM_{MS}
3 utilizadas apresentaram todos os requisitos estabelecidos pela Sociedade
4 Internacional de Terapia Celular, para serem consideradas CTMs.
5 Características essas, aderência ao plástico quando em cultivo, expressão
6 positiva dos marcadores CD90, CD44 (24) e CD105, e negativa para MHC classe
7 II, ainda devem ser capazes de diferenciação condrogênica, osteogênica e
8 adipogênica (25,26).

9 Recentemente foi descrito que as células tronco quando administradas de
10 forma livre migram da articulação após 7 dias da injeção articular (13,16,27,28).
11 Vislumbrando aumentar o efeito terapêutico, reduzir a frequência de aplicação e
12 ainda custos do tratamento, a utilização das CTMs inseridas em *scaffolds* no
13 tratamento de defeitos ósseos, aumentou o efeito terapêutico e o potencial de
14 diferenciação das CTMs (29). Em paralelo, a instituição do tratamento do estudo
15 demonstrou ser vantajosa, pois recentemente foi descrito que a
16 microencapsulação de células em alginato, foi capaz de aumentar a viabilidade
17 das células para aplicação conjunta (30).

18 Visando aumentar a viabilidade do tratamento, foi essencial proteger as
19 células da resposta imune do hospedeiro. O encapsulamento foi o método de
20 proteção escolhido, almejando um sistema semipermeável (31), com a utilização
21 do alginato, pois, é um biopolímero natural extraído de algas marrons, é
22 conhecido por ser biocompatível, relativamente não tóxico e baixo custo (32–35).

23 A utilização do microencapsulamento das CTMs de tecido adiposo foi
24 descrito por (36), esses autores observaram menor degradação na cartilagem
25 articular e menor expressão de MMP-13, demonstrando os seus efeitos
26 condroprotetores decorrentes da associação do alginato com as CTMs,
27 diminuindo a progressão e extensão da OA.

28 O uso do hidrogel de alginato como arcabouço para as CTM_{MS}, demonstrou
29 ser bastante efetivo, capaz de auxiliar as CTM_{MS}, possibilitando a expressão de
30 todo o seu potencial. O hidrogel de alginato demonstrou que as cápsulas são de
31 fácil confecção, simples aplicação e custo de produção (18,37), além da
32 capacidade de produzir um ambiente tridimensional semelhante a cartilagem
33 articular (37).

Podemos inferir que as CTMs dentro do arcabouço utilizado no grupo encapsuladas estão protegidas da dispersão no líquido sinovial, dessa forma as CTMs exercem ação parácrina, que estimula indiretamente a secreção de fatores bioativos, como as citocinas e fatores de crescimento (38–40). Além disso, a estrutura tridimensional do alginato é porosa que permite a difusão de oxigênio, nutrientes e o transporte de metabólitos (35). Essas características são responsáveis pelo efeito anti-inflamatório e angiogênico, estimulando a sobrevivência e proliferação celular local (38,41), justificando a melhor qualidade no tecido de reparação, porém, na maior parte das pesquisas o resultado é a formação de fibrocartilagem no local das lesões condrais, após o tratamento da osteoartrite (3,42,43).

As cápsulas de hidrogel de alginato são capazes de prolongar a sobrevivência das CTM_{MS}, manter o crescimento celular por alguns meses, estimular a condrogênese e produção de matriz extracelular, além de prolongar a atividade parácrina (34,36,44,45), fato observado no CTM_{MS} encapsulada através do melhor escore macroscópico e microscópico, segundo a pontuação O' DRISCOLL e da maior quantidade de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, observado pelo intenso efeito metacromático observado na coloração de azul de toluidina. No entanto, a manutenção da coloração azul no CTM_{MS} livres e controle, quando comparado ao CTM_{MS} encapsulada, enfatiza a prevalência do tecido fibroso destes grupos. Resultados semelhantes também foram observados na literatura consultada com formação de cartilagem hialina e produção de matriz extracelular, após a administração de CTM_{MS} em coelhos (46).

O agrupamento de condrócitos no local do implante, também foi descrito após utilização de CTM_{MS} em suínos após três meses do tratamento, em contraste o grupo controle apresentou maior defeito na cartilagem comparados com a lesão inicial (47).

Outros autores descrevem que as CTM_{MS} foram capaz de reparar os defeitos de cartilagem na articulação do joelho em coelhos (48). Achados semelhantes aos nossos foram descritos com a utilização de CTMs derivadas do líquido sinovial em coelho, o grupo tratado possuía um tecido de reparação que preencheu completamente o defeito e tinha coloração histológica

1 semelhante a da cartilagem hialina nativa, visualizado pela coloração de azul de
2 toluidina e colágeno II (49).

3 Utilizando outro modelo experimental, *minipigs* (50) os autores
4 observaram que as CTM_{MS} foram capaz de regenerar a cartilagem articular do
5 côndilo femoral medial. Ao mesmo tempo, esses pesquisadores descobriram
6 que o tecido de reparação parecia menos maduro, semelhante ao estudo atual.
7 Mantendo o mesmo modelo experimental uma equipe japonesa demonstrou que
8 o tecido cartilaginoso gerado pelo transplante apresentava características
9 semelhantes ao tecido cartilaginoso normal (51–54). Dessa forma, podemos
10 inferir que estes experimentos demonstraram que as CTM_{MS} podem reparar com
11 sucesso a cartilagem danificada.

12 Além desses achados, a presença marcante de glicosaminoglicano no
13 grupo CTM_{MS} encapsuladas associada a imunoistoquímica de colágeno II,
14 justifica que as CTMs quando diferenciadas em condrócitos são capazes de
15 produzir substâncias específicas da cartilagem, como aggrecan,
16 glicosaminoglicanos e colágeno tipo II, substâncias estas essenciais no reparo
17 da cartilagem (55–58).

18 A imunomarcação positiva com anticorpo anticolágeno II no grupo CTM_{MS}
19 encapsuladas indicou que as células estão secretando quantidade maior de
20 colágeno tipo II na matriz extracelular. Contudo, essa produção, cerca de 75%,
21 não diferenciou totalmente o tecido neoformado em cartilagem hialina. Em cães
22 foi observado que a combinação das CTMs com ácido hialurônico regenerou a
23 cartilagem articular, através da observação da imunohistoquímica para colágeno
24 tipo II (59), o mesmo foi descrito em ratos (60). Em contraste e em conjunto com
25 CTM_{MS} livres e controle, os demais grupos sem tratamento exibiram baixa ou
26 ausência da expressão de colágeno tipo II (60).

27 As CTMs da membrana sinovial de equinos, foram administradas em ratos,
28 e a avaliação macroscópica e histológica demonstraram resultados semelhantes
29 (61) aos do trabalho atual, apesar de não ter diferença estatística entre os
30 grupos, 75% do tecido neoformado expressou de colágeno II, sugerindo a
31 presença de cartilagem hialina no defeito cicatrizado.

32 A presença de um tecido branco, liso, aparentemente fibroso e bem aderido
33 encontrando no grupo CTM_{MS} encapsuladas, já foi relatado em pesquisas que
34 utilizaram o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) em lesões condrais induzidas ou

1 de ocorrência natural em equinos (62–64). Esses mesmos autores relatam que
2 as lesões condrais que não receberam tratamento, demonstram falha de
3 preenchimento e evolução da degradação da cartilagem articular, como
4 observado no grupo controle.

5 Os efeitos benéficos da reparação da cartilagem articular descritos
6 corroboram com os obtidos no nosso estudo, observando a melhora na
7 qualidade do tecido neoformado, com 75% de colágeno tipo II no tecido de
8 reparação (3,43,65,66). Com o uso de PRP com CTMs (10), descreveram a
9 superioridade na marcação de colágeno tipo II, além da melhora microscópica e
10 histológica. Essa diferença não foi notada em nosso estudo, mas o grupo CTM_{MS}
11 encapsuladas se destacou por apresentar melhores escores macroscópicos e
12 histopatológicos, além da melhor aparência do tecido de reparação (67), com a
13 melhor fixação, organização tecidual parcial e metacromasia, demonstrando a
14 produção de proteoglicanos.

15 Compreendemos que o melhor aspecto morfológico do tecido de reparação
16 no grupo CTM_{MS} encapsuladas está relacionado com a alta densidade celular
17 (68). Ainda os melhores escores estão correlacionados a ações autócrina,
18 parácrina e quimiotática das CTMs (69), que são capazes de modular o
19 processo de reparação, pois pesquisas no âmbito das CTMs afirmam que essas
20 são capazes de modular a função do sistema imune adaptativo, como os
21 linfócitos T e B, além de estimular a expressão de IL-10, TGF- β e IL-1 α , reduzindo
22 a inflamação.

23 De acordo com esses achados, também encontramos evidências no estudo
24 atual que sustentam que as CTMs encapsuladas auxiliam na regeneração da
25 cartilagem, mas os mecanismos ainda precisam ser elucidados. Acreditamos
26 que as CTMs podem estimular a regeneração da cartilagem ao interagir com
27 macrófagos sinoviais, levando a uma redução subsequente de citocinas pró-
28 inflamatórias, como IL-1 β (60). E a permanência dessas na articulação por mais
29 tempo, possibilita maior contato com os macrófagos sinoviais, que possui a
30 capacidade de se polarizar em M1 pró inflamatório e M2 anti-inflamatório, sendo
31 que os M2 estão envolvidos na reparação dos tecidos (39,70–73).

32 Dessa forma, podemos confirmar que a microencapsulação permitiu uma
33 maior permanência das CTMs dentro da articulação, iniciando a proliferação e

diferenciação, juntamente com a produção de matriz extracelular e liberação de fatores quimiotáticos (18).

Embora os melhores resultados foram observados no grupo CTM_{MS} encapsuladas, principalmente nos escores histológicos, inferimos que esse estudo ainda apresenta algumas limitações e pontos a serem explorados. Bem como, a comparação das CTMs derivadas da membrana sinovial com as demais fontes celulares. Por fim, um maior tempo de acompanhamento dos animais, para analisar se haveriam diferenças na expressão de colágeno II e escores morfológicos e histopatológicos do tecido de reparação.

Conclusão

Concluimos que a microencapsulação das CTM_{MS} foi vantajosa no tratamento das lesões condrais, por demonstrar melhores resultados na reparação condral, resultando em um tecido de reparação macroscopicamente semelhante a cartilagem nativa com melhores escores histológicos, com destaque a maior quantidade de glicosaminoglicanos na matriz extracelular, preenchimento total da lesão e aderência do tecido neoformado.

Aprovação ética

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos conforme as diretrizes e aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Campus Botucatu/SP sob o protocolo nº 032/2020 – CEUA.

1
2
3
4
5
6
7
8
9

10 Referências

- 11 1. Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JMS. Advanced cell
12 therapies for articular cartilage regeneration. Trends Biotechnol.
13 2015;33(1):35–42.
- 14 2. Monteiro SO, Bettencourt E V., Lepage OM. Biologic Strategies for Intra-
15 articular Treatment and Cartilage Repair. J Equine Vet Sci.
16 2015;35(3):175–90.
- 17 3. Yamada ALM, Carvalho A de M, Moroz A, Deffune E, Watanabe MJ,
18 Hussni CA, et al. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects
19 healing in horses. Stem Cell Discov. 2013;03(04):218–25.
- 20 4. Schlueter AE, Orth MW. Equine osteoarthritis: a brief review of the disease
21 and its causes. Equine Comp Exerc Physiol. 2004;1(4):221–31.
- 22 5. Stashak TS. Claudicação em equinos. 5a.ed. Roca, editor. São Paulo:
23 Roca; 2006. 1093p.
- 24 6. Colbath AC, Dow SW, Phillips JN, McIlwraith CW, Goodrich LR.
25 Autologous and Allogeneic Equine Mesenchymal Stem Cells Exhibit
26 Equivalent Immunomodulatory Properties In Vitro. Stem Cells Dev.
27 2017;26(7):503-511.
- 28 7. Coleman CM, Curtin C, Barry FP, O'Flatharta C, Murphy JM. Mesenchymal
29 stem cells and osteoarthritis: Remedy or accomplice? Hum Gene Ther.
30 2010;21(10):1239–50.
- 31 8. Mazor M, Lespessailles E, Coursier R, Daniellou R, Best TM, Toumi H.
32 Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: An update. J Cell Mol
33 Med. 2014;18(12):2340–50.
- 34 9. Yamada ALM, Alvarenga ML, Brandão JS, Watanabe MJ, Rodrigues CA,
35 Hussni CA, et al. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco
36 mesenquimais: Uso em lesões condrais em modelo experimental equino.
37 Pesqui Vet Bras. 2016;36(6):461–7.
- 38 10. Lee JC, Min HJ, Park HJ, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovial membrane-
39 derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can
40 repair osteochondral defects in a rabbit model. Arthrosc - J Arthrosc Relat
41 Surg. 2013;29(6):1034–46.
- 42 11. Kanamoto T, Nakamura N, Nakata K YH. Articular cartilage regeneration
43 using stem cells. Clin Calcium. 2013;23:1741–9.
- 44 12. Harvanová D, Tóthová T, Šarišský M, Amrichová J, Rosocha J. Isolation
45 and characterization of synovial mesenchymal stem cells. Folia Biol (Czech
46 Republic). 2011;57(3):119–24.
- 47 13. Santos VH Dos, Pfeifer JPH, Souza JB De, Stievani FDC, Hussni CA,
48 Golim MDA, et al. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated
49 mesenchymal stem cell migration in horses. Res Vet Sci. 2019;124(May

- 1 2018):38–45.
- 2 14. Schurman DJ, Kajiya G. Antibiotic absorption from infected and normal
- 3 joints using a rabbit knee joint model. *J Orthop Res.* 1985;3(2):185–8.
- 4 15. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte
- 5 MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-
- 6 term culture in alginate beads. *J Cell Sci.* 1994;107(1):17–27.
- 7 16. Ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, De Munter W, Grevers
- 8 LC, et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular
- 9 injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis.
- 10 *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3604–13.
- 11 17. McIlwraith CW, Nixon AJ, Wright IM, Boening KJ. Diagnostic and Surgical
- 12 Arthroscopy in the Horse. *Diagnostic and Surgical Arthroscopy in the*
- 13 *Horse.* 2005.
- 14 18. Santos VH, Pfeifer JPH, de Souza JB, Milani BHG, de Oliveira RA, Assis
- 15 MG, et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial
- 16 membrane in alginate hydrogel microcapsules. *BMC Vet Res.*
- 17 2018;14(1):1–10.
- 18 19. dos Anjos DS, Vital AF, Lainetti P de F, Leis-Filho AF, Dalmolin F, Elias F,
- 19 et al. Dereglulation of VEGFR-2 and PDGFR expression and microvascular
- 20 density in a triple-negative model of canine malignant mammary tumors
- 21 with lymph node or lung metastasis. *Vet Sci.* 2019;6(1):3.
- 22 20. Tsai S-Y. Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem
- 23 cells for the treatment of canine osteoarthritis: A pilot study. *World J*
- 24 *Transplant.* 2014;4(9):196-205.
- 25 21. Gutierrez-Fernandez M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Otero-
- 26 Ortega L, Fuentes B, Vallejo-Cremades TT, et al. Comparison between
- 27 xenogeneic and allogeneic adipose mesenchymal stem cells in the
- 28 treatment of acute cerebral infarct: Proof of concept in rats. *J Transl Med.*
- 29 2015;13:46.
- 30 22. Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H, et al.
- 31 Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with
- 32 autologous human serum: Comparisons with bone marrow mesenchymal
- 33 stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum.* 2008;58(2):501–
- 34 10.
- 35 23. Li YY, Cheng HW, Cheung KMC, Chan D, Chan BP. Mesenchymal stem
- 36 cell-collagen microspheres for articular cartilage repair: Cell density and
- 37 differentiation status. *Acta Biomater.* 2014;10(5):1919–29.
- 38 24. Carvalho AM, Yamada ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Hussni CA, Alves
- 39 ALG. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine
- 40 tendonitis therapy. *Equine Vet J.* 2014;46(5):635-8.
- 41 25. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause
- 42 DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal
- 43 cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.
- 44 *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
- 45 26. Yang Z, Schmitt JF, Lee EH. Immunohistochemical analysis of human
- 46 mesenchymal stem cells differentiating into chondrogenic, osteogenic, and
- 47 adipogenic lineages. *Methods Mol Biol.* 2011;698:353-66.
- 48 27. Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, et al. Not
- 49 single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain
- 50 viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats.

- 1 Osteoarthr Cartil. 2016;24(6):1061-70.
- 2 28. Horie M, Choi H, Lee RH, Reger RL, Ylostalo J, Muneta T, et al. Intra-
3 articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat
4 meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that
5 enhances expression of type II collagen. Osteoarthr Cartil.
6 2012;20(10):1197-207.
- 7 29. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with
8 MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite
9 scaffolds. PLoS One. 2014;9(8).
- 10 30. Koh E, Jung YC, Woo HM, Kang BJ. Injectable alginate-microencapsulated
11 canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for enhanced
12 viable cell retention. J Vet Med Sci. 2017;79(3):492-501.
- 13 31. Luca G, Calvitti M, Nastruzzi C, Bilancetti L, Becchetti E, Angeletti G, et al.
14 Encapsulation, in vitro characterization, and in vivo biocompatibility of
15 sertoli cells in alginate-based microcapsules. Tissue Eng. 2007;13(3):641-
16 8.
- 17 32. Bhat A, Hoch AJ, Decaris ML, Leach JK. Alginate hydrogels containing cell-
18 interactive beads for bone formation. FASEB J. 2013;27(12):4844-52.
- 19 33. Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the
20 microencapsulation of cells. Journal of the Royal Society Interface.
21 2014;11.
- 22 34. Yang IH, Kim SH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ, Lee JW. Comparison of
23 phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture
24 systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal
25 stem cells. Yonsei Med J. 2004;45(5):891-900.
- 26 35. Sun J, Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine
27 applications. Materials (Basel). 2013;6(4):1285–309.
- 28 36. Choi S, Kim JH, Ha J, Jeong BI, Jung YC, Lee GS, et al. Intra-articular
29 injection of alginate-microencapsulated adipose tissue-derived
30 mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis in rabbits. Stem
31 Cells Int. 2018;2791632.
- 32 37. Focaroli S, Teti G, Salvatore V, Orienti I, Falconi M. Calcium/Cobalt
33 Alginate Beads as Functional Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering.
34 Stem Cells Int. 2016;2016:20–2.
- 35 38. da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AL. Mechanisms
36 involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine
37 and Growth Factor Reviews. 2009;20(5-6):419-27.
- 38 39. Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F, et al.
39 Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates
40 osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. Arthritis Res
41 Ther. 2013;15(1):22.
- 42 40. Kim YS, Choi YJ, Koh YG. Mesenchymal Stem Cell Implantation in Knee
43 Osteoarthritis: An Assessment of the Factors Influencing Clinical
44 Outcomes. Am J Sports Med. 2015; 43(9):2293-301.
- 45 41. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal
46 stem/stromal cell function. Stem Cell Res Ther. 2016;7(1):1–13.
- 47 42. Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiari M, Kon E, et al.
48 Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: From
49 preclinical findings to clinical application in orthopaedics. J Cell Sci.
50 2013;107(8):17–27.

- 1 43. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B. One-step bone
2 marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin*
3 *Orthop Relat Res*. 2009;467(12):3307-20.
- 4 44. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis*
5 *Res Ther*. 2008;10(5):1–12.
- 6 45. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F,
7 et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic
8 chondrocytes in alginate. *Biomaterials*. 2000;21(8):795–801.
- 9 46. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju YJ, Mochizuki T, et al.
10 Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo
11 chondrogenesis: Suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in
12 rabbit. *Cell Tissue Res*. 2008;333(2):207-15.
- 13 47. Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, et al.
14 Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a
15 minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial
16 mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs. *Cytherapy*.
17 2012;14(3):327-38.
- 18 48. Nagase T, Muneta T, Ju YJ, Hara K, Morito T, Koga H, et al. Analysis of
19 the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to
20 harvest site and culture parameters in knees with medial compartment
21 osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(5):1389-98.
- 22 49. Jia Z, Liu Q, Liang Y, Li X, Xu X, Ouyang K, et al. Repair of articular
23 cartilage defects with intra-articular injection of autologous rabbit synovial
24 fluid-derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2018;16(1):123.
- 25 50. Kondo S, Nakagawa Y, Mizuno M, Katagiri K, Tsuji K, Kiuchi S, et al.
26 Transplantation of Aggregates of Autologous Synovial Mesenchymal Stem
27 Cells for Treatment of Cartilage Defects in the Femoral Condyle and the
28 Femoral Groove in Microminipigs. *Am J Sports Med*. 2019;47(10):2338-47.
- 29 51. Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, et al.
30 Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered
31 construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells.
32 *Biomaterials*. 2007;28(36):5462-70.
- 33 52. Ando W, Fujie H, Moriguchi Y, Nansai R, Shimomura K, Hart DA, et al.
34 Detection of abnormalities in the superficial zone of cartilage repaired using
35 a tissue engineered construct derived from synovial stem cells. *Eur Cells*
36 *Mater*. 2012;24:292-307.
- 37 53. Shimomura K, Ando W, Moriguchi Y, Sugita N, Yasui Y, Koizumi K, et al.
38 Next Generation Mesenchymal Stem Cell (MSC)–Based Cartilage Repair
39 Using Scaffold-Free Tissue Engineered Constructs Generated with
40 Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cartilage*. 2015;6(2):13-29.
- 41 54. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, Nansai R, Fujie H, Hart DA, et al. The
42 influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-
43 based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials*.
44 2010;31(31):8004-11.
- 45 55. Broeckx S, Zimmerman M, Crocetti S, Suls M, Mariën T, Ferguson SJ, et
46 al. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: A
47 preliminary study. *PLoS One*. 2014;9(1).
- 48 56. Spaas JH, Schauwer C De, Cornillie P, Meyer E, Soom A Van, Van de
49 Walle GR. Culture and characterisation of equine peripheral blood
50 mesenchymal stromal cells. *Vet J*. 2013;195(1):107-13.

- 1 57. Broeckx SY, Seys B, Suls M, Vandenberghe A, Mariën T, Adriaensen E, et
2 al. Equine Allogeneic Chondrogenic Induced Mesenchymal Stem Cells Are
3 an Effective Treatment for Degenerative Joint Disease in Horses. *Stem*
4 *Cells Dev.* 2019;28(6):410–22.
- 5 58. Berg LC, Koch TG, Heerkens T, Besonov K, Thomsen PD, Betts DH.
6 Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine
7 bone marrow and umbilical cord blood. *Vet Comp Orthop Traumatol.*
8 2009;22(5):363-70.
- 9 59. Li L, Duan X, Fan Z, Chen L, Xing F, Xu Z, et al. Mesenchymal Stem Cells
10 in Combination with Hyaluronic Acid for Articular Cartilage Defects. *Sci*
11 *Rep.* 2018;8:9900.
- 12 60. Satué M, Schüler C, Ginner N, Erben RG. Intra-articularly injected
13 mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration, but do not
14 permanently engraft in distant organs. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–10.
- 15 61. Zayed M, Newby S, Misk N, Donnell R, Dhar M. Xenogenic implantation of
16 equine synovial fluid-derived mesenchymal stem cells leads to articular
17 cartilage regeneration. *Stem Cells Int.* 2018;6:1073705.
- 18 62. Yamada ALM, Carvalho AM, Oliveira PGG, Felisbino SL, Queiroz DL,
19 Watanabe MJ, et al. Plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões
20 condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos: Avaliação
21 clínica, macroscópica, histológica e histoquímica. *Arq Bras Med Vet e*
22 *Zootec.* 2012;64(2):323-332.
- 23 63. W. M, D.D. F, W.G. R, J.R. S, J. K, C. K. Bone marrow-derived culture-
24 expanded mesenchymal stem cells to augment healing of chondral lesions
25 treated with microfracture. *Cartilage.* 2010;
- 26 64. Raheja LF, Galuppo LD, Bowers-Lepore J, Dowd JP, Tablin F, Yellowley
27 CE. Treatment of Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage
28 Fissures in a Horse Using Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal
29 Stromal Cells. *J Equine Vet Sci.* 2011;31(3):147-154.
- 30 65. Gigante A, Calcagno S, Cecconi S, Ramazzotti D, Manzotti S, Enea D.
31 sults of second-look biopsies at 1 year follow-up. Use of collagen scaffold
32 and autologous bone marrow concentrate as a one-step cartilage repair in
33 the knee: histological re. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(1-2):69-
34 72.
- 35 66. McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak
36 CE, et al. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment
37 healing of microfractured chondral defects. *Arthrosc - J Arthrosc Relat*
38 *Surg.* 2011;27(11):1552-61.
- 39 67. McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak
40 CE, et al. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment
41 healing of microfractured chondral defects. *Arthrosc - J Arthrosc Relat*
42 *Surg.* 2011;27(11):1552-61.
- 43 68. Li YY, Cheng HW, Cheung KMC, Chan D, Chan BP. Mesenchymal stem
44 cell-collagen microspheres for articular cartilage repair: Cell density and
45 differentiation status. *Acta Biomater.* 2014;10(5):1919-29.
- 46 69. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of
47 Inflammation. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6:457-78.
- 48 70. Ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, De Munter W, Grevers
49 LC, et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular
50 injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis.

- 1 Arthritis Rheum. 2012;64(11):3604-13.
- 2 71. Zhang QZ, Su WR, Shi SH, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, et al.
- 3 Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of M2
- 4 macrophages and enhance cutaneous wound healing. Stem Cells.
- 5 2010;28(10):1856-68.
- 6 72. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel
- 7 type of alternatively activated macrophages. Exp Hematol.
- 8 2009;37(12):1445-1453.
- 9 73. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I,
- 10 et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn
- 11 activated macrophages into a regulatory-like profile. PLoS One. 2010;5(2).
- 12
- 13
- 14
- 15

ANEXOS

Tabela 1. Mediana do número de células nucleadas (células/ μ L) do líquido sinovial do grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato, CTM_{MS} livres e controle, nos diferentes momentos 0, 24, 48, 96, 168 e 336 horas.

Tempo	CTM encapsuladas	CTM Livres	Controle	P
0h	87,0 [52,5 – 397,5] c	77,0 [52,8 – 115,2] b	96,0 [70,0 – 122,0]	0,877
24h	25000,0 [13750,0 – 26625,0] abA	9750,0 [8743,8 – 13062,5] aB	9135,0 [6960,0 – 11310,0] B	0,0473
48h	9000,0 [4368,8 – 10650,0] aB	8000,0 [4650,0 – 18506,2] a	3907,5 [1940,0 – 5875,0]	0,593
96h	2100,0 [562,5 – 4068,8] abc	787,0 [737,5 – 1500,0] ab	1068,5 [700,0 – 1437,0]	0,775
168h	687,0 [674,2 – 1622,8] abc	1350,0 [805,0 – 1593,8] ab	1843,5 [500,0 – 3187,0]	0,928
336h	350,0 [247,5 – 750,0] bc	1200,0 [406,2 – 3943,8] ab	758,5 [100,0 – 1417,0]	0,252
P	<0,001	0,002	0,103	

*Medianas seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

Tabela 2. Mediana do número de neutrófilos (células/ μ L) do líquido sinovial do grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato, CTM_{MS} livres e controle, nos diferentes momentos 0, 24, 48, 96, 168 e 336 horas.

Tempo	CTM encapsuladas	CTM Livres	Controle	P
0h	1,0 [0,0 – 184,0] c	0,0 [0,0 – 5,8] b	0,0 [0,0 – 0,0]	0,552
24h	16750,0 [9637,5 – 18712,5] aA	6619,0 [6524,8 – 7785,0] aB	4863,5 [4524,0 – 5203,0] C	0,006
48h	3690,0 [1817,2 – 5963,2] ab	1887,0 [1309,0 – 8926,2] a	1095,0 [427,0 – 1763,0]	0,345
96h	1239,0 [246,0 – 3028,2] abc	285,0 [162,2 – 387,2] ab	161,0 [49,0 – 273,0]	0,300
168h	233,0 [160,0 – 970,5] bc	74,0 [16,2 – 566,2] ab	921,5 [90,0 – 1753,0]	0,674
336h	67,0 [9,0 – 357,8] bc	335,0 [61,2 – 1448,0] ab	158,5 [5,0 – 312,0]	0,552
P	0,001	<0,001	0,093	

*Medianas seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

Tabela 3. Mediana do número de linfócitos (células/ μ L) do líquido sinovial do grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato, CTM_{MS} livres e controle nos diferentes momentos 0, 24, 48, 96, 168 e 336 horas.

Tempo	CTM encapsuladas	CTM Livres	Controle	P
0h	7,0 [1,8 – 64,0] b	6,0 [3,2 – 21,5] b	8,5 [6,0 – 11,0]	0,988
24h	500,0 [292,5 – 723,8] a	195,0 [117,5 – 483,8] a	422,0 [278,0 – 566,0]	0,506
48h	157,0 [98,5 – 321,2] ab	392,0 [101,2 – 977,8] a	215,5 [78,0 – 353,0]	0,593
96h	126,0 [48,8 – 168,0] ab	77,0 [62,0 – 140,0] ab	160,5 [91,0 – 230,0]	0,674
168h	55,0 [34,8 – 72,0] abA	73,0 [31,0 – 150,8] abA	300,0 [90,0 – 510,0] B	0,015
336h	29,0 [12,8 – 103,5] ab	74,0 [35,2 – 156,5] ab	32,0 [7,0 – 57,0]	0,496
P	0,004	0,009	0,156	

*Medianas seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

Tabela 4. Mediana do número de macrófagos (células/ μ L) do líquido sinovial do grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato, CTM_{MS} livres e controle nos diferentes momentos 0, 24, 48, 96, 168 e 336 horas.

Tempo	CTM encapsuladas	CTM Livres	Controle	P
0h	2,0 [1,0 – 17,0]	4,0 [0,8 – 11,0]	3,0 [0,0 -6,0]	0,759
24h	250,0 [112,5 – 266,2]	100 [0,0 – 129,2]	91,5 [70,0 – 113,0]	0,379
48h	52,0 [0,0 – 112,5]	153,0 [0,0 – 405,8]	49,0 [39,0 – 59,0]	0,807
96h	0,0 [0,0 -0,0] A	16,0 [0,0 – 19,0] B	64,0 [56,0 – 72,0]C	0,025
168h	0,0 [0,0 – 7,5]	0,0 [0,0 – 0,0]	0,0 [0,0 – 0,0]	0,558
336h	4,0 [0,0 – 11,2]	0,0 [0,0 – 23,8]	0,0 [0,0 – 0,0]	0,611
P	0,054	0,280	0,115	

*Medianas seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 5. Mediana dos valores de proteína total (g/dL) do líquido sinovial do grupo CTM_{MS} encapsuladas em hidrogel de alginato, CTM_{MS} livres e controle, nos diferentes momentos 0, 24, 48, 96, 168 e 336 horas.

Tempo	CTM encapsuladas	CTM Livres	Controle	P
0h	2,0 [2,0 – 2,0] b	2,0 [2,0 – 2,0] b	2,6 [2,0 – 3,2]	0,611
24h	4,8 [3,8 – 5,6] a	6,2 [2,9 – 6,7] a	2,7 [2,0 – 3,4]	0,292
48h	2,6 [2,5 – 3,2] ab	2,0 [2,0 – 3,2] ab	2,4 [2,0 – 2,8]	0,638
96h	3,2 [2,8 – 3,4] ab	2,0 [2,0 – 2,8] ab	2,0 [2,0 – 2,0]	0,270
168h	2,0 [2,0 – 3,4] ab	2,0 [2,0 – 3,2] ab	2,5 [2,0 – 3,0]	0,988
336h	2,8 [2,2 – 3,1] ab	2,6 [2,0 – 3,7] ab	2,8 [2,0 – 3,6]	0,988
P	0,005	0,011	0,769	

*Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 6. Avaliação macroscópica da reparação da cartilagem segundo a Sociedade Internacional de Reparação da Cartilagem (ICRS) realizada por seis avaliadores, através da gravação obtida no momento da artroscopia após 150 dias da instituição dos tratamentos.

Avaliador/ Grupo	Grau de reparação da cartilagem	Integração com a borda da lesão	Aparência macroscópica	Avaliação global do reparo
1	4	4	4	12
2	4	3	4	11
3	3	3	2	8
4	3	3	3	9
5	4	4	2	10
6	4	4	2	10
1	3	3	2	8
2	2	3	3	8
3	2	4	2	8
4	3	2	2	7

<i>Avaliador/ Grupo</i>	<i>Grau de reparação da cartilagem</i>	<i>Integração com a borda da lesão</i>	<i>Aparência macroscópica</i>	<i>Avaliação global do reparo</i>
5	3	2	3	8
6	3	3	3	9
1	2	2	2	6
2	2	3	2	7
3	3	3	2	8
4	2	2	3	7
5	2	2	3	7
6	3	2	2	7

1

2

3 **Tabela 7.** Avaliação histológica do reparo da cartilagem, utilizando a pontuação
4 O' DRISCOLL, realizada por seis avaliadores, através da gravação obtida no
5 momento da artroscopia após 150 dias da instituição dos tratamentos.

<i>Avaliador / Grupo</i>	<i>Morfologia do tecido</i>	<i>Coloração da matriz</i>	<i>Integridade estrutural</i>	<i>Agrupamento de condrócitos no local do implante</i>	<i>Avaliação histológica da superfície</i>	<i>Integração lateral do material implantado</i>	<i>Inflamação</i>
1	3	2	4	3	3	3	1
2	2	3	3	3	3	3	1
3	3	3	4	3	3	3	2
4	3	3	3	2	3	2	2
5	3	2	4	3	3	3	1
6	3	2	2	2	2	2	1
1	2	2	2	3	3	3	1
2	2	2	2	3	3	3	1
3	3	3	2	3	2	2	2
4	2	2	3	3	2	2	1
5	3	3	3	3	3	3	1
6	1	2	2	3	1	2	1
1	1	2	2	3	2	3	1
2	2	2	2	3	2	2	1
3	2	2	2	3	2	2	1
4	1	2	2	3	1	1	1
5	1	2	2	3	2	1	1
6	3	3	3	3	3	2	1

6

7