

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

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO SINOVIAL EM
EQUINOS COM SINOVITE INDUZIDA TRATADOS COM CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS**

VITTORIA GUERRA ALTHEMAN

Botucatu, São Paulo

Abril de 2022.

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

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES NO LÍQUIDO SINOVIAL EM
EQUINOS COM SINOVITE INDUZIDA TRATADOS COM CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS**

VITTORIA GUERRA ALTHEMAN

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

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, São Paulo

Abril de 2022

Autor: Vittoria Guerra Altheman

Data: 28 de Abril de 2022.

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

Altheman, Vittoria Guerra.

Avaliação de biomarcadores no líquido sinovial em equinos com sinovite induzida tratados com células-tronco mesenquimais / Vittoria Guerra Altheman. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Ana Liz Garcia
Alves Capes: 50501003

1. Cavalos. 2. Cartilagem articular. 3. Líquido sinovial. 4. Sinovite. 6. Colágeno. Inflamações.

Palavras-chave: Cartilagem articular; Cavalos; Colágeno; Degradação articular.

Comissão Examinadora

Profª Dra. Ana Liz Garcia Alves

Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP, Botucatu

Profª Dra. Fernanda de Castro Stievani

Membro

Departamento de Ciências Agrárias. Universidade de Taubaté

Medicina Veterinária, UNITAU, Taubaté

Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP, Botucatu

Agradecimentos

Agradeço à Prof^a Dra. Ana Liz Garcia Alves por me orientar desde o início e por compartilhar seus conhecimentos, sabedoria e conselhos.

A todos que me acompanharam em cada processo da minha formação como pessoa, desde a infância até agora: minha família de sangue, minha família de Botucatu, meus amigos e colegas.

À CAPES, à CNPq e à FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo Programa de Demanda Social.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismos da progressão da osteoartrite. 6
- Figura 2. Análise da concentração do marcador CPII do líquido sinovial no momento inicial, 8, 24, 72 horas, 7 e 14 dias após a indução da sinovite. Os tratamentos foram realizados após a coleta do momento 8h 28
- Figura 3. Análise da concentração sinovial do marcador C2C no momento inicial, 8, 24, 72 horas, 7 e 14 dias após a indução da sinovite 29
- Figura 4. Análise da concentração sinovial do marcador CS846 no momento inicial, 8, 24, 72 horas, 7 e 14 dias após a indução da sinovite 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 . Quantificação da concentração sinovial de CPII. As letras minúsculas indicam comparação do mesmo grupo nos diferentes momentos e as maiúsculas comparam os diferentes grupos no mesmo momento 29

Tabela 2. Quantificação da concentração sinovial de C2C. As letras minúsculas indicam comparação do mesmo grupo nos diferentes momentos e as maiúsculas comparam os diferentes grupos no mesmo momento 30

Tabela 3. Quantificação da concentração sinovial de CS846. As letras minúsculas indicam comparação do mesmo grupo nos diferentes momentos e as maiúsculas comparam os diferentes grupos no mesmo momento 31

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
Capítulo 1	1
1. Introdução e Justificativa	1
2. Revisão bibliográfica	3
3. Referências	11
Capítulo 2	19
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Delineamento experimental	22
2.2. Obtenção e Cultivo das CTMs	25
2.3. Indução experimental da sinovite e tratamento	26
2.4. Quantificação de C2C, CPII e CS846 por ELISA	26
2.5. Análise estatística	27
3. RESULTADOS	28
3.1. Concentração sinovial de CPII	28
3.2. Concentração sinovial de C2C	29
3.3. Concentração sinovial de CS846	30
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS	39

ALTHEMAN, V. G. Avaliação de biomarcadores no líquido sinovial em equinos com sinovite induzida tratados com células-tronco mesenquimais. Botucatu, 2022. Dissertação de Mestrado. 42 páginas. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, câmpus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Os constantes impactos no sistema locomotor de equinos atletas gerados pelo intenso exercício físico levam ao surgimento de lesões articulares, como a inflamação da membrana sinovial que, se não tratada, pode evoluir para um quadro de osteoartrite (OA) e posterior afastamento do esporte. A utilização de células tronco mesenquimais (CTMs) vem ganhando destaque nestes casos como uma possibilidade de tratamento que busca modificar a progressão desta enfermidade. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito das CTMs alogênicas derivadas da membrana sinovial (CTMms) sobre a síntese e degradação da cartilagem articular em casos de sinovite aguda em equinos. A sinovite foi induzida utilizando 0,5ng de LPS via intra-articular (IA) e os animais foram tratados 8 horas após a indução. O grupo controle recebeu como tratamento 2 mL de PBS IA, enquanto o grupo tratado recebeu 10^7 CTMms IA. Foi realizada a determinação da concentração sinovial dos biomarcadores de síntese e degradação de colágeno, CPII e C2C respectivamente, e de síntese de agregam, CS846, através de teste imunoenzimático (ELISA). A análise revelou aumento significativo nos níveis de CPII ($P=0,019$) e de CS846 ($P=0,032$) no grupo controle no momento 14 dias e também aumento nos níveis de C2C ($P=0,015$) no momento 24h, quando comparados com o grupo tratado. Os dados avaliados sugerem que as CTMs interagiram na manutenção da homeostase da cartilagem articular, exercendo uma atividade no ambiente que resultou em menor dano nas primeiras 24 horas e, conseqüentemente, menor necessidade de reparo posterior.

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

ALTHEMAN, V. G. Evaluation of biomarkers in synovial fluid in horses with induced synovitis treated with mesenchymal stem cells. Botucatu, 2022. Master 's Thesis. 42 pages. School of Veterinary Medicine and Animal Science, campus Botucatu , São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The constant impacts on the locomotor system of equine athletes generated by intense physical exercise lead to the emergence of joint injuries, such as inflammation of the synovial membrane that, if left untreated, can progress to osteoarthritis (OA) and subsequent withdrawal from sport. The use of mesenchymal stem cells (MSCs) has been gaining prominence in these cases as a possible treatment that seeks to modify the progression of this disease. The aim of the present work was to investigate the effect of allogeneic MSCs derived from the synovial membrane (mMSCs) on the synthesis and degradation of articular cartilage in cases of acute synovitis in horses. Synovitis was induced using 0.5ng of LPS via intra-articular (IA) and the animals were treated 8 hours after induction. The control group received 2 mL of PBS IA as treatment, while the treated group received 107 mMSCs IA. The synovial concentration of collagen synthesis and degradation biomarkers, CPII and C2C, respectively, and aggrecan synthesis biomarkers, CS846, were determined by enzyme immunoassay (ELISA). The analysis revealed a significant increase in the levels of CPII ($P=0.019$) and CS846 ($P=0.032$) in the control group at 14 days and also an increase in C2C levels ($P=0.015$) at 24h, when compared with the group treated. The evaluated data suggest that MSCs interacted in the maintenance of articular cartilage homeostasis, exerting an activity in the environment that resulted in less damage in the first 24 hours and, consequently, less need for later repair.

Keywords: regenerative therapy; synovial membrane; synovial inflammation.

CAPÍTULO 1

1. Introdução e Justificativa

O sistema articular pode sofrer lesões em todas as suas estruturas. Em equinos atletas, por exemplo, repetidos traumas à membrana sinovial e à cápsula articular levam ao surgimento de sinovite e capsulite, respectivamente (McIlwraith, 2020).

A inflamação da membrana sinovial, com consequente liberação de mediadores inflamatórios, causa danos bioquímicos à articulação, tornando-se um fator importante na patogênese e apresentação clínica da osteoartrite (OA) (De Grauw *et al.*, 2009; McIlwraith, 2020). OA é uma enfermidade resultante da interação de diversos processos mecânicos e biológicos que culminam em uma desordem de toda articulação e é a principal causa de queda de desempenho em humanos e equinos (De Grauw *et al.*, 2014).

Além da sinovite, na OA ocorre destruição da cartilagem hialina, remodelamento do osso subcondral, formação de proliferações ósseas e hipertrofia da cápsula articular (Robinson *et al.*, 2016).

A presença de infiltrado de células mononucleares, de sinovite e de mediadores inflamatórios na articulação podem indicar estágios iniciais da doença. São interessantes as estratégias terapêuticas que visam o controle da inflamação

e que, conseqüentemente, modificam a progressão da osteoartrite (Benito *et al.*, 2005; Sokolove *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2016).

Tratamentos atuais devem focar na redução da inflamação, da dor e da degradação articular. As terapias medicamentosas variam, sendo que anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e corticoides são as classes mais comumente empregadas, mas também pode-se fazer uso de ácido hialurônico, glicosaminoglicanos ou ainda N-acetilglicosamina (Frisbie *et al.*, 2009; Neuenschwander *et al.*, 2019).

Uma outra abordagem emergente que tem se mostrado promissora é a terapia com células tronco mesenquimais (CTM). Estas ganham destaque devido às suas propriedades imunomoduladoras, parácrinas e de diferenciação. Entretanto, ambientes variados podem resultar em diferentes estímulos para as células, o que influencia diretamente na ação das mesmas. Dessa maneira, são necessárias pesquisas com o foco no melhor entendimento da interação célula-ambiente, como um ambiente inflamatório de sinovite (Rosa *et al.*, 2020).

Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o líquido sinovial em casos de sinovite equina induzida, buscando investigar o efeito das células tronco mesenquimais sobre a degradação e síntese da cartilagem articular.

Objetivos específicos

Investigar a síntese de colágeno e agregam, pelos marcadores CPII e CS846 respectivamente, e a degradação de colágeno, através do marcador C2C,

em casos de sinovite equina tratados com células tronco mesenquimais.

2. Revisão bibliográfica

As articulações são responsáveis por unir extremidades ósseas e são divididas em: articulações cartilaginosas, fibrosas ou sinoviais, sendo que a união é realizada por cartilagem, tecido conjuntivo denso ou uma cápsula preenchida por líquido sinovial, respectivamente (Dyce *et al.*, 2010).

No caso das articulações sinoviais, que deslizam uma sobre a outra permitindo movimento, as superfícies articulares são recobertas por cartilagem do tipo hialina, composta por condrócitos e matriz extracelular rica em colágeno tipo II e proteoglicanos, principalmente o agrecan, e são contidas em uma cápsula articular preenchida com fluido sinovial. A cartilagem hialina possui características como ser flexível, elástica e não apresentar vasos sanguíneos, linfáticos nem terminações nervosas (Dyce *et al.*, 2010; König & Liebich, 2016; McIlwraith *et al.*, 2016).

A cápsula articular apresenta uma camada externa fibrosa, formada por tecido conjuntivo denso e fibras nervosas sensoriais, e uma interna, a membrana sinovial (König & Liebich, 2016; Junqueira & Carneiro, 2017).

A membrana sinovial por sua vez é dividida em duas lâminas: a mais interna chamada de íntima, composta por macrófagos e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos; e a mais externa, subíntima, a qual apresenta em sua composição vasos sanguíneos e sinoviócitos dispostos em tecido conjuntivo frouxo rico em fibroblastos (De Sousa *et al.*, 2014). Além de células unipotentes e especializadas, a membrana também apresenta uma população de células tronco mesenquimais (CTMs) (De Bari *et al.*, 2001).

Os sinoviócitos são responsáveis por produzir o líquido sinovial, o qual preenche a cavidade da cápsula. Este fluido é constituído por um dialisado do plasma sanguíneo com alto teor de ácido hialurônico e glicoproteínas, que tem a função de lubrificar e nutrir a cartilagem, além de participar na atividade dos condrócitos (De Sousa *et al.*, 2014; Junqueira & Carneiro, 2017; König e Liebich, 2016).

É possível isolar células tronco mesenquimais da membrana sinovial (Santos *et al.*, 2018). Estas apresentam alta taxa de proliferação, baixa imunogenicidade e ótimo potencial de diferenciação condrogênica, além da capacidade de se diferenciarem em múltiplas linhagens, o que as tornam interessantes do ponto de vista terapêutico (De Bari *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2020).

Equinos são considerados bons modelos para estudos musculoesqueléticos já que além de apresentarem semelhanças anatômicas, também sofrem lesões parecidas com a de humanos, o que os tornam relevantes também para ensaios terapêuticos (Chu *et al.*, 2010; Colbath *et al.*, 2017).

Os constantes impactos gerados nos esportes, tanto para equinos quanto para humanos, faz com que ambos estejam sempre sujeitos a sofrerem pequenas lesões ortopédicas que culminam em doenças articulares, como a osteoartrite (OA), uma das principais causas de afastamento precoce em atletas das duas espécies (McWraith *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2016).

A osteoartrite é considerada uma doença crônica, multifatorial, inflamatória de baixo grau, com alta incidência e que afeta toda a articulação, causando

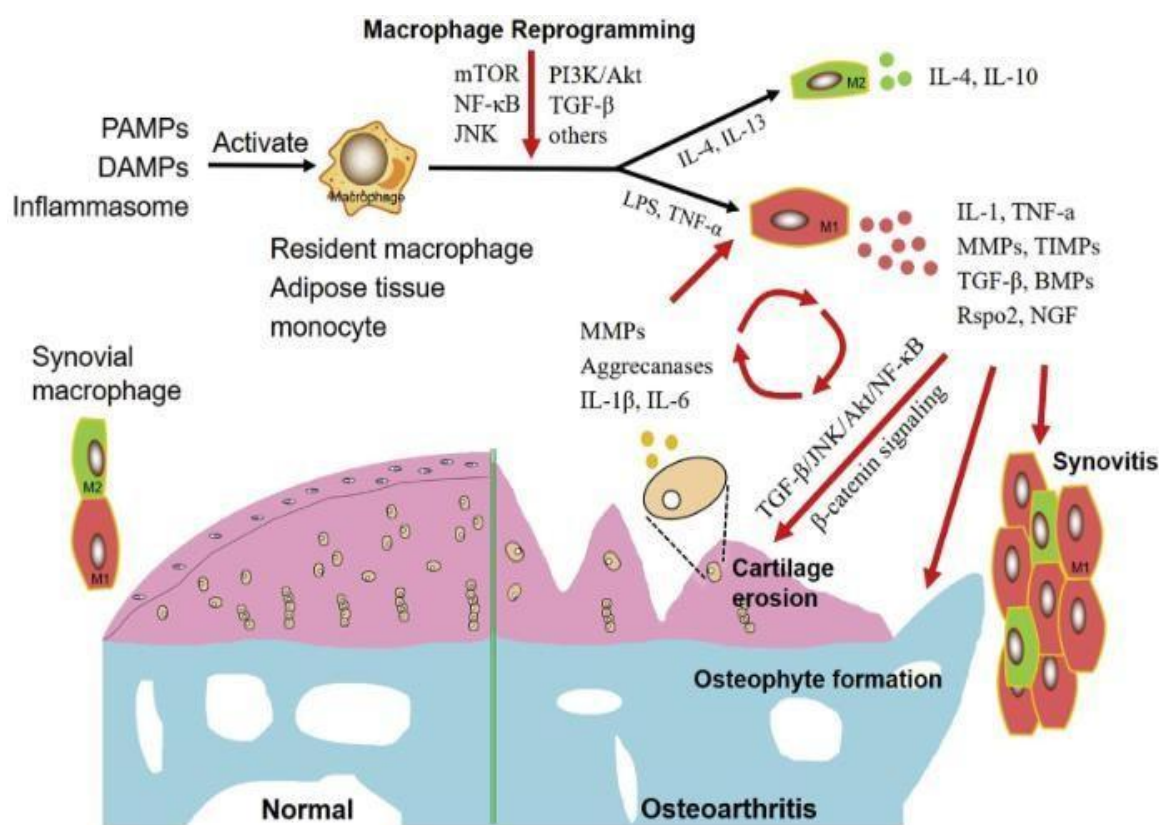
destruição progressiva da cartilagem hialina, sinovite, remodelamento do osso subcondral, formação de osteófitos, hipertrofia da cápsula articular e, consequente quadro de dor e perda de função (Robinson *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2020).

A inflamação da membrana sinovial é um dos primeiros sinais da OA e está associada com aumento de destruição da cartilagem e com a redução de mobilidade. Com a sinovite, há um aumento de mediadores inflamatórios no ambiente articular, os quais podem alterar o metabolismo dos condrócitos e ativar enzimas que degradam a cartilagem, como as metaloproteinases de matriz (MMP) e as agrecanases; tais eventos magnificam a inflamação da membrana, tornando o processo cíclico (Robinson *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2020).

A patogênese da OA ainda não é totalmente esclarecida, mas sabe-se que a sinovite tem um papel importante em sua progressão e severidade e que trata-se de uma doença inflamatória mediada principalmente pelo sistema imune inato com foco para os macrófagos (Mahon *et al.*, 2020; Lv *et al.*, 2021).

Quando moléculas conhecidas como DAMPs (Padrões moleculares associados a danos ou *Danger pattern-associated molecular patterns*), liberadas quando há dano celular, e PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos ou *Pathogen-associated molecular patterns*), advindas de micro-organismos, estão presentes na articulação estimulam a polarização de monócitos em macrófagos Tipo 1 (M1) e a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β) (Figura 1). Esses

mediadores recrutam mais células do sistema imune, como linfócitos, e também aumentam a produção de citocinas inflamatórias e metaloproteinases (MMPs) por condrócitos e macrófagos; e assim o ciclo continua, com o agravamento da sinovite, eventual degradação da cartilagem e comprometimento osteocondral, levando à evolução da OA (Martinon et. al, 2009; Zhang *et al.*, 2020; Lv *et al.*,



2021).

Figura 1: Mecanismos da progressão da osteoartrite. Adaptado de Zhang *et al.*, 2020.

DAMPs são moléculas endógenas, produzidas quando há dano tecidual (Robinson *et al.*, 2016). Já as PAMPs são moléculas microbianas exógenas que alertam o organismo sobre a presença de patógenos invasores, sendo o

lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular de bactérias gram-negativas, um exemplo de PAMP muito bem caracterizado (Jiang *et al.*, 2020). Ambas moléculas se ligam a receptores do tipo Toll-like (TLR) presentes nas células do sistema imune inato, ativando-as através da sinalização da via intracelular NF κ B (Bianchi, 2007; Robinson *et al.*, 2016).

Uma característica marcante dos macrófagos é a sua plasticidade, sendo capazes de alterar o fenótipo de acordo com o ambiente, podendo ser classificados como M1, com um fenótipo pró-inflamatório, ou M2, com propriedades anti-inflamatórias (Fahy *et al.*, 2014). Menarim *et al.* (2020) relataram, em equinos, um aumento dos marcadores de M1 e M2 proporcional ao nível do dano causado por inflamação sinovial, sendo que em casos de OA os marcadores de M1 foram altamente expressos e relacionados com hiperplasia da membrana sinovial, o que sugeriu um maior recrutamento de macrófagos.

A IL-1 β e o TNF- α são citocinas de destaque na patogenia da OA, produzidas por sinoviócitos, células mononucleares e condrócitos. Essas duas citocinas agem de forma sinérgica nos condrócitos, tanto para estimular a ativação de enzimas proteolíticas, como as MMPs, quanto para suprir a síntese de componentes da MEC e de inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs) (Mueller; Tuan, 2011; Sokolove; Lepus, 2013).

As MMPs são um grupo de enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular. Em casos de OA, há o aumento nos níveis de IL-1 β e de TNF- α , sendo que essas moléculas levam a ativação da via intracelular NF κ B nos

sinoviócitos, nos macrófagos e nos condrócitos, resultando em um aumento na expressão de MMPs, principalmente da MMP-13, enzima com alta ação de clivagem do colágeno tipo II (Mueller; Tuan, 2011).

Por outro lado, existem proteínas liberadas durante a OA, como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), que estimulam a síntese dos componentes da MEC (Van Der Kraan *et al.*, 2010; Finnson *et al.*, 2012). O TGF- β é produzido por macrófagos e linfócitos e inibe a ação da IL-1 β e do TNF- α , enquanto as BMPs são ativadas por essas duas citocinas (Mueller; Tuan, 2011). A membrana sinovial e a cartilagem articular produzem de maneira espontânea citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e a IL-10, que diminuem a produção de IL-1 β e do TNF- α . (Sutton *et al.*, 2009)

Para o monitoramento da progressão da doença e a avaliação da atividade inflamatória, pode-se realizar exames de imagem, como radiografia, ultrassom ou ressonância magnética, ou ainda análise de biomarcadores presentes na urina, sangue ou líquido sinovial (Lotz *et. al*, 2014; Ishibachi *et al.*, 2020).

Esses marcadores podem ser classificados como diretos, no caso de moléculas efetoras que causam o dano articular, ou indiretos, que são o produto de tal dano ou que irão ativar os marcadores diretos, ou até mesmo os dois (Lotz *et al.*, 2014). Por exemplo, o marcador CII (carboxypropeptide of type II collagen) indica a síntese de colágeno tipo II, enquanto o C2C (collagenase-cleavage neoepitope) indica degradação do mesmo e são considerados marcadores indiretos (De Grauw *et al.*, 2009). Wang *et al.* (2015) demonstrou o aumento nos

níveis C2C do líquido sinovial de equinos 24 horas após a indução de sinovite com LPS, que perdurou por 168 horas.

O colágeno tipo II é formado a partir da clivagem de procolágeno, que libera os amino-propeptídeo e carboxi-propeptídeo (CPII), sendo que este último pode ser detectado em tecidos e fluidos corporais por imunoensaios. Existem também marcadores indiretos de agregam, um dos principais proteoglicanos da MEC, como o GAG e CS846, que indicam degradação e síntese, respectivamente (Laverty *et al.*, 2000).

A maioria das lesões e doenças do sistema musculoesquelético, com exceção das fraturas, não estimulam a regeneração com tecido idêntico ao original, mas sim a reparação com tecido fibroso. No caso de cartilagem lesionada, sua regeneração é dificultada pela capacidade mitótica reduzida dos condrócitos, pelo fato de ser um tecido avascular e pelo aumento insuficiente na produção de colágeno e proteoglicanos (McIlwraith, 2020).

Assim, estratégias terapêuticas que focam na regeneração de cartilagem são de grande interesse tanto na medicina humana quanto na veterinária, e devem ser mais exploradas (Zayed, 2018). Nesse contexto, a terapia celular com células tronco mesenquimais vem emergindo como uma possibilidade promissora de tratamento (Lee, 2017).

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes, derivadas do tecido mesodermal, com o potencial de diferenciarem em diversas linhagens celulares, como por exemplo adipócitos e condrócitos, o que as tornam

atraentes para medicina regenerativa, além de possuírem atividade imunomodulatória e parácrina anti-inflamatória, antiapoptótica, angiogênica e antifibrótica (Colbath *et al.*, 2017; Cassano *et al.*, 2018; Cifù *et al.*, 2020).

As CTMs podem ser isoladas de diversos tecidos como tecido adiposo, medula óssea, cordão umbilical, polpa dentária, periósteo e músculo esquelético (Li, 2020). De Bari (2001) isolou pela primeira vez CTMs da membrana sinovial (CTMms) de humanos e desde então essa fonte tem se demonstrado interessante devido à sua elevada capacidade condrogênica (To *et al.*, 2019)

Koizumi *et al.* (2016) demonstrou que lesões osteocondrais de humanos tratadas com CTMms apresentaram melhores resultados histológicos quando comparadas a lesões não tratadas. Zayed *et al.* (2018) também constatou, através da técnica de imunofluorescência, significativo aumento na produção de cartilagem hialina em ratos com lesões osteocondrais tratadas com CTMms xenogênicas.

Porém os mecanismos pelos quais as CTMms promovem alta condrogenicidade e reparação articular ainda não foram totalmente elucidados, sendo assim necessária a realização de mais pesquisas na área (To *et al.*, 2019)

3. Referências

- BENITO, M. J., VEALE, D. J., FITZGERALD, O., VAN DEN BERG, W. B.;
BRESNIHAN, B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 64(9), p. 1263–1267. 2005. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.025270>
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 81, n.1, p. 1–5. 2007. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
- CHU, C. R., SZCZODRY, M.; BRUNO, S. Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. *Tissue Engineering: Part B*, v. 1(1), p. 105-115. 2010. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0452>
- CIFÙ, A.; DOMENIS, R.; POZZI-MUCELLI, M.; DI BENEDETTO, P.; CAUSERO, A., MORETTI, M.; STEVANATO, M.; PISTIS, C.; PARODI, P. C.; FABRIS, M.; CURCIO, F. . The Exposure to Osteoarthritic Synovial Fluid Enhances the Immunomodulatory Profile of Adipose Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells International*, v. 2020, p. 1-13. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4058760>
- COLBATH, A. C., FRISBIE, D. D., DOW, S. W., KISIDAY, J. D., MCILWRAITH, C. W.; GOODRICH, L. R. Equine Models for the Investigation of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Orthopaedic Disease. *Operative Techniques in Sports Medicine*, v. 25(1), p. 41–49. 2017. <https://doi.org/10.1053/j.otsm.2016.12.007>
- DE BARI, C., DELL'ACCIO, F., TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P. . Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, v. 44 (8), p. 1928–1942, 2001. <https://doi.org/10.1002/1529-0131>

DE GRAUW, J. C., VAN DE LEST, C. H. A., BRAMA, P. A. J., RAMBAGS, B. P. B.; VAN WEEREN, P. R. In vivo effects of meloxicam on inflammatory mediators, MMP activity and cartilage biomarkers in equine joints with acute synovitis. *Equine Veterinary Journal*, v. 41(7), p. 693–699. 2009. <https://doi.org/10.2746/042516409X436286>

DE GRAUW, J. C.; VAN LOON, J. P. A. M.; VAN DE LEST, C. H. A.; BRUNOTT, A.; VAN WEEREN, P. R. In vivo effects of phenylbutazone on inflammation and cartilage-derived biomarkers in equine joints with acute synovitis. *Veterinary Journal*, v. 201(1), p. 51–56. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.030>

DE SOUSA, E. B.; LADEIRA CASADO, P.; NETO, V. M.; DUARTE, M. E. L.; AGUIAR, D. P. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 5(5). 2014. <https://doi.org/10.1186/scrt501>

DYCE, K. M.; SACK, W. G.; WENSING, C. J. G. Tratado de Anatomia Veterinária. Rio de Janeiro: 4 ed. Elsevier Editora Ltda, 2010. 1714p.

FAHY, N., DE VRIES-VAN MELLE, M. L., LEHMANN, J., WEI, W., GROTENHUIS, N., FARRELL, E., VAN DER KRAAN, P. M., MURPHY, J. M., BASTIAANSEN-JENNISKENS, Y. M.; VAN OSCH, G. J. V. M. Human osteoarthritic synovium impacts chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via macrophage polarisation state. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 22(8), p. 1167–1175. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.05.021>

FINNISON, K.W.; CHI Y, BOU-GHARIOS G, LEASK A, PHILIP A. TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front Biosci (Schol Ed)*. v.4, p.251-68, 2012

FRISBIE, D.D. et al. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. *American Journal of Veterinary Research*. v.70, p. 203-209, 2009. <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.2.203>

HAN, D., FANG, Y., TAN, X., JIANG, H., GONG, X., WANG, X., HONG, W., TU, J.; WEI, W. The emerging role of fibroblast-like synoviocytes-mediated synovitis in osteoarthritis: An update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 24(17), p. 9518–9532. 2020. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15669>

ISHIBASHI, K.; SASAKI, E.; OTA, S.; CHIBA, D.; YAMAMOTO, Y.; TSUDA, E.; YOSHIKUNI, S.; IHARA, K.; ISHIBASHI, Y. Detection of synovitis in early knee osteoarthritis by MRI and serum biomarkers in Japanese general population. *Scientific Reports*, v. 10(1). 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69328-w>

JIANG, K., NIE, H., LI, D.; YAN, X. New insights into the Manila clam and PAMPs interaction based on RNA-seq analysis of clam through in vitro challenges with LPS, PGN, and poly(I:C). *BMC Genomics*, v. 21, n. 1. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06914-2>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. Cap 7. Tecido Cartilaginoso. In: *Histologia básica: texto e atlas*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KOIZUMI, K., EBINA, K., HART, D. A., HIRAO, M., NOGUCHI, T., SUGITA, N., YASUI, Y., CHIJIMATSU, R., YOSHIKAWA, H., & NAKAMURA, N. . Synovial mesenchymal stem cells from osteo- or rheumatoid arthritis joints exhibit good potential for cartilage repair using a scaffold-free tissue engineering approach. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 24(8), p. 1413–1422. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.03.006>

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. Anatomia dos animais domésticos - texto e atlas colorido. 6 ed. Artmed Editora Ltda. 2016. 824p.

LAVERTY, S.; IONESCU, M.; MARCOUX, M.; BOURE, L.; DOIZE, B.; POOLE, A.R. Alterations in cartilage type-II procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis. *J. orthop. Res.*, v. 18, p. 399-405. 2000.

LI, N., GAO, J., MI, L., ZHANG, G., ZHANG, L., ZHANG, N., HUO, R., HU, J.; XU, K. Synovial membrane mesenchymal stem cells: Past life, current situation, and application in bone and joint diseases. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 11(1). 2020. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01885-3>

LOTZ, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; CHRISTIANSEN, C.; BRANDI, M. L.; BRUYÈRE, O., CHAPURLAT, R.; COLLETTE, J.; COOPER, C.; GIACOVELLI, G.; KANIS, J. A.; KARSDAL, M. A., KRAUS, V.; LEMS, W. F.; MEULENBELT, I.; PELLETIER, J. P.; RAYNAULD, J. P., REITER-NIESERT, S., RIZZOLI, R.; SANDELL, L. J.; REGINSTER, J. Y. Value of biomarkers in osteoarthritis: Current status and perspectives. *Postgraduate Medical Journal*, v. 90(1061), p. 171–178. 2014. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2013-203726rep>

LV, Z.; XU, X.; SUN, Z.; YANG, Y. X.; GUO, H.; LI, J.; SUN, K.; WU, R.; XU, J.; JIANG, Q.; IKEGAWA, S.; SHI, D. TRPV1 alleviates osteoarthritis by inhibiting M1 macrophage polarization via Ca²⁺/CaMKII/Nrf2 signaling pathway. *Cell Death and Disease*, v. 12(6). 2021 <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03792-8>

MAHON, O. R.; KELLY, D. J.; MCCARTHY, G. M.; DUNNE, A. Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals alter immune cell metabolism and promote M1 macrophage polarization. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 28(5), p. 603– 612. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.10.010>

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 229–265. 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.13271>

MCILWRAITH, C. W. Joint injuries and disease and osteoarthritis. In: BAXTER, G. M. *Adams and Stashak's lameness in horses*. 7 ed. John Wiley & Sons. 2020. Cap. 7, p. 801-819.

MCILWRAITH, C. W., FRISBIE, D. D., KAWCAK, C. E.; WEEREN, R. V. Joint disease in the horse. 2 ed. Elsevier Inc. 2016. 407 p.

MCILWRAITH, C. W., FRISBIE, D. D., KAWCAK, C. E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone and Joint Research*, v. 1(11), p. 297-309. 2012. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.111>

MENARIM, B. C.; GILLIS, K. H.; OLIVER, A.; NGO, Y.; WERRE, S. R.; BARRETT, S. H., RODGERSON, D. H.; DAHLGREN, L. A. Macrophage Activation in the Synovium of Healthy and Osteoarthritic Equine Joints. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7. 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.568756>

NEUENSCHWANDER, H. M., MOREIRA, J. J., VENDRUSCOLO, C. P., FÜLBER, J., SEIDEL, S. R. T., MICHELACCI, Y. M.; BACCARIN, R. Y. A. Hyaluronic acid has chondroprotective and joint-preserving effects on LPS-induced synovitis in horses. *Journal of Veterinary Science*, v. 20(6). 2019.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2019.20.e67>

ROBINSON, W. H., LEPUS, C. M., WANG, Q., RAGHU, H., MAO, R., LINDSTROM, T. M.; SOKOLOVE, J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 12 (10), p. 580–592. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.136>

ROSA, G., KRIECK, A. M. T., PADULA, E., PFEIFER, J. P. H., DE SOUZA, J. B., ROSSI, M., STIEVANI, F., DEFFUNE, E., TAKAHIRA, R.; ALVES, A. L. G. Allogeneic synovial membrane-derived mesenchymal stem cells do not significantly affect initial inflammatory parameters in a LPS-induced acute synovitis model. *Research in Veterinary Science*, v. 132, p. 485–491. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.001>

SANTOS, V. H.; PFEIFER, J. P. H.; DE SOUZA, J. B.; MILANI, B. H. G.; DE OLIVEIRA, R. A.; ASSIS, M. G.; DEFFUNE, E.; MOROZ, A.; ALVES, A. L. G. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. *BMC Veterinary Research*, v. 14(1). 2018.
<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1425-0>

SOKOLOVE, J.; LEPUS, C. M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: Latest findings and interpretations. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, v. 5 (2), p. 77–94. 2013.

<https://doi.org/10.1177/1759720X12467868>

SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P.; GENT, T.; FREEMAN, S.; FOSTER, N.; BARRET-JOLLEY, R.; MOBASHERI, A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, v. 179, n.1, p. 10-24, 2009.

TO, K.; ZHANG, B.; ROMAIN, K.; MAK, C.; KHAN, W. Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Cartilage Regeneration: A PRISMA Review of in vivo Studies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7. 2019. *Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00314>

VAN DER KRAAN, P. M.; BLANEY DAVIDSON, E. N.; VAN DEN BER, W. B. Bone morphogenic proteins and articular cartilage: to serve and protect or a wolf in sheep clothing's? *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 15, n. 3, p. 237-244. 2007.

WANG, G., Li, X., JIANG, R., Li, Y., FAN, X., ZHENG, Y.; GAO, L. Changes in synovial fluid inflammatory mediators and cartilage biomarkers after experimental acute equine synovitis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v. 59(1), p. 129– 134. 2015 <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0019>

WILLIAMS, L. B., KOENIG, J. B., BLACK, B., GIBSON, T. W. G., SHARIF, S.; KOCH, T. G. Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an lipopolysaccharide induced synovitis model. *Equine Veterinary Journal*, v. 48(5), p. 619–625. 2016. <https://doi.org/10.1111/evj.12477>

ZAYED, M.; NEWBY, S.; MISK, N.; DONNELL, R.; DHAR, M. (2018). Xenogenic implantation of equine synovial fluid-derived mesenchymal stem cells leads to articular cartilage regeneration. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1073705>

ZHANG, H., CAI, D.; BAI, X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 28(5), p.555–561. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.01.007>

CAPÍTULO 2

Artigo científico a ser submetido para a revista “Research in Veterinary Science”.

(sob as normas vigentes – disponíveis em

<https://www.journals.elsevier.com/research-in-veterinary-science>)

Título: “CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MINIMIZAM DEGRADAÇÃO ARTICULAR NO PICO INFLAMATÓRIO DE SINOVITES INDUZIDAS EM EQUINOS”

Highlights:

- Células-tronco mesenquimais auxiliam na redução da degradação articular em casos de sinovite induzida em equinos
- Marcadores biológicos presentes no líquido sinovial podem ser detectados já nos estágios iniciais da sinovite, sendo considerados bons métodos de diagnóstico e de detecção precoce de lesão.
- A minimização da degradação articular proveniente da interação das CTMs com o ambiente inflamatório resultou em menor necessidade de reparo do tecido.

RESUMO

Os constantes impactos no sistema locomotor de equinos atletas gerados pelo intenso exercício físico levam ao surgimento de lesões articulares, como a inflamação da membrana sinovial que, se não tratada, pode evoluir para um quadro de osteoartrite (OA) e posterior afastamento do esporte. A utilização de células tronco mesenquimais (CTMs) vem ganhando destaque nestes casos como uma possibilidade de tratamento que busca modificar a progressão desta enfermidade. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito das CTMs alogênicas derivadas da membrana sinovial (CTMms) sobre a síntese e degradação da cartilagem articular em casos de sinovite aguda em equinos. A sinovite foi induzida utilizando 0,5ng de LPS via intra-articular (IA) e os animais foram tratados 8 horas após a indução. O grupo controle recebeu como tratamento 2 mL de PBS IA, enquanto o grupo tratado recebeu 10^7 CTMms IA. Foi realizada a determinação da concentração sinovial dos biomarcadores de síntese e degradação de colágeno, CPII e C2C respectivamente, e de síntese de agregam, CS846, através de teste imunoenzimático (ELISA). A análise revelou aumento significativo nos níveis de CPII ($P=0,019$) e de CS846 ($P=0,032$) no grupo controle no momento 14 dias e também aumento nos níveis de C2C ($P=0,015$) no momento 24h, quando comparados com o grupo tratado. Os dados avaliados sugerem que as CTMs interagiram na manutenção da homeostase da cartilagem articular, exercendo uma atividade no ambiente que resultou em menor dano nas primeiras 24 horas e, conseqüentemente, menor necessidade de reparo posterior.

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

1. INTRODUÇÃO

Equinos atletas estão cada vez mais sujeitos a sofrerem lesões ortopédicas devido a intensas demandas atléticas impostas sobre eles para atingirem os altos níveis de performance exigidos nas competições (Van Weeren, 2001). Doenças que afetam as articulações estão entre as principais causas de perda de qualidade de vida e afastamento das atividades físicas em cavalos e humanos (De Grauw, 2011).

A osteoartrite (OA) é a doença articular mais comum e uma das principais causas de incapacidade e dor em humanos, equinos e pequenos animais (Cokelaere *et al.*, 2018; Hunter; Bierma-zeinstra, 2019). Atualmente a OA é considerada uma enfermidade multifatorial resultante de processos complexos e interativos de todas as estruturas articulares, com a inflamação, principalmente da membrana sinovial, tomando um papel importante em seu processo patológico (Atukorala *et al.*, 2016).

A sinovite está presente em todos os estágios da OA e tem um papel importante na progressão da enfermidade, já que a liberação de diversos mediadores inflamatórios por ela agrava o progressivo quadro de degradação da cartilagem (Han *et al.*, 2020).

O monitoramento da progressão da doença pode ser feito através de exames de imagem ou de análises de biomarcadores presentes na urina, sangue ou líquido sinovial, como os marcadores CPII e C2C que indicam a síntese e degradação de colágeno tipo II, respectivamente, ou o marcador CS846 que indica síntese de agregam (De Grauw *et al.*, 2009; Lotz *et al.*, 2014; Ishibachi *et al.*,

2020).

A cartilagem hialina é um tecido avascular e não innervado, além de suas células, os condrócitos apresentarem taxa metabólica baixa, o que faz com que danos a tal estrutura tornem-se de grande importância, uma vez que a capacidade de reparação é reduzida e lenta (Berenbaum, 2013). Assim, abordagens regenerativas, como a terapia com célula-tronco mesenquimal (CTM), vêm ganhando destaque como opção terapêutica para alcançar reparo de cartilagem de melhor qualidade.

As CTMs possuem atividade imunomodulatória e parácrina, podendo estimular angiogênese e proliferação de condrócitos, além de se diferenciarem em diversas linhagens de células, como linhagens condrogênicas, adipogênicas e osteogênicas, o que as torna interessante para auxiliar no processo de reparo da cartilagem (Arshi *et al.*, 2020).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o líquido sinovial de equinos com sinovite induzida, buscando investigar o efeito das células tronco mesenquimais sobre a degradação e síntese da cartilagem articular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental

Este experimento foi conduzido conforme as diretrizes do Comitê de Ética e Utilização Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob o protocolo nº 034/2022.

O presente estudo utilizou amostras de líquido sinovial obtidas de um experimento previamente realizado (Rosa *et al.*, 2020) conduzido pela equipe de pesquisa do Laboratório de Terapia Regenerativa do setor de Cirurgia de Grandes Animais, no Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da FMVZ UNESP, Botucatu. Brevemente, o experimento consistiu em induzir a sinovite aguda com LPS nas articulações tibiotársicas de 12 equinos hípidos sem raça definida, com idade variando entre 4 e 6 anos e peso entre 370 e 415 kg, e tratá-los com células- tronco mesenquimais alogênicas derivadas da membrana sinovial, utilizando a aplicação de PBS como controle. Como critério de inclusão dos animais, foram realizados: exame físico, avaliação de claudicação, ultrassom da articulação e contagem de células nucleadas do líquido sinovial, sendo que animais com alterações nos padrões fisiológicos e mais de 500 células nucleadas/ μ L não foram incluídos.

As amostras utilizadas foram o líquido sinovial proveniente de articulações tibiotársicas (n=12), divididas em dois grupos, totalizando cinco articulações no grupo controle e sete articulações no grupo tratado com células tronco livres. A sinovite foi induzida imediatamente após a coleta inicial de líquido sinovial (M0), para todas as articulações. Todos os tratamentos foram realizados oito horas (M8) após M0.

As coletas se deram em 6 momentos no total: antes da indução (M0), 8 (M8), 24 (M24) e 72 horas (M72), 7 (M7) e 14 dias (M14) após.

Os líquidos foram coletados em tubos sem coagulante, centrifugados a 800x g por 10 minutos e posteriormente congelados em freezer -80 °C. Para realização das análises, o descongelamento foi feito em temperatura ambiente.

O detalhamento de cada grupo segue abaixo:

- Grupo controle (GC): administração intra-articular de 2 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS¹);
- Grupo tratado (GT): implante intra-articular de 1×10^7 CTMms suspensas em 2 mL de PBS;

¹Phosphate-Buffered Saline, pH 7.4 - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

2.2. Obtenção e Cultivo das CTMs

As CTMs alogênicas derivadas de membrana sinovial equina foram obtidas de acordo com Rosa et al (2020), selecionadas aleatoriamente e estavam armazenadas em Freezer -80 °C no biobanco de células-tronco do Laboratório de Terapia Regenerativa do setor de Cirurgia de Grandes Animais, no Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da FMVZ UNESP, Botucatu.

As CTMs foram cultivadas segundo Carvalho (2013), em garrafas com meio de cultivo (DMEM² suplementado com soro fetal bovino (SFB)³, aminoácidos essenciais⁴ e não-essenciais⁵, L-glutamina⁶ e solução antibacteriana e antimicótica⁷ (anfotericina B, penicilina e estreptomicina) e expandidas até o número necessário (1×10^7), quinze dias antes do momento inicial. Todas as aplicações foram realizadas com CTMs em terceira passagem.

Para a caracterização da CTM equina foram realizadas as diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica, além da imunofenotipagem celular, a qual avaliou os marcadores positivos CD90 e CD73 e os negativos CD34, CD11b, CD45 e MHC classe II por citometria de fluxo, seguindo metodologia descrita por Carvalho et al. (2013).

²DMEM KnockOut - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

³Fetal Bovine Serum - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

⁴MEM Amino Acids - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

⁵NEAA Non-Essential Amino Acids - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

⁶L-Glutamine - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

⁷Anti-Anti antibiotic - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, Estados Unidos da América.

2.3. Indução experimental da sinovite e tratamento

A indução da sinovite foi realizada com o animal em posição quadrupedal, em tronco de contenção, através de artrocentese tibiotársica. O tarso aleatoriamente escolhido foi previamente submetido à antissepsia cirúrgica.

A articulação tibiotársica de cada animal foi infiltrada sob condições assépticas com solução estéril de PBS contendo 0,5 ng de LPS proveniente de *Escherichia coli*⁸, segundo Williams et al. (2016).

A administração do LPS foi considerada como momento zero do experimento (M0), sendo precedida apenas pela coleta de líquido sinovial, considerada como “basal”. Os tratamentos foram realizados 8h (M8) após M0.

2.4. Quantificação de C2C, CPII e CS846 por ELISA

Após a indução e tratamento, ambos os grupos foram avaliados quanto aos biomarcadores C2C, CPII e CS846 no líquido sinovial, realizados imediatamente antes da indução, 8, 24 e 72 horas, 7 e 14 dias após a mesma. A determinação da concentração sinovial desses marcadores foi realizada por teste imunoenzimático utilizando kits multiespécies ELISA comerciais^{9, 10, 11}, previamente utilizados por De Grauw et al. (2009). A curva de regressão da análise e a conversão das densidades ópticas obtidas na leitura foram realizadas pelo leitor de microplacas com o auxílio de um software¹². A leitura da placa foi realizada com a absorbância a 450nm.

⁸ Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* serotype 055:B5 – Sigma-Aldrich®. Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América.

⁹ C2C ELISA Kit. IBEX Pharmaceuticals, Inc. Québec, CA. Distribuído por LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil.

¹⁰ CPII ELISA Kit. IBEX Pharmaceuticals, Inc. Québec, CA. Distribuído por LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil.

¹¹ CS846 ELISA Kit. IBEX Pharmaceuticals, Inc. Québec, CA. Distribuído por LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil.

2.5. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Foi realizada a Análise de Medidas Repetidas no Tempo (One Way Repeated Measures) para comparação dos tempos de avaliação dentro de cada grupo, sendo que resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Quando houve significância estatística foi realizado o Teste de Tukey para múltiplas comparações de médias nos diferentes momentos ($P < 0,05$). Para comparação dos grupos dentro de cada tempo foi realizado o Teste t (Student). O software utilizado foi GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Concentração sinovial de CPII

Na comparação entre os grupos, notou-se que o GC demonstrou maior concentração sinovial de CPII em relação ao GT no M14 dias ($P= 0,019$). Não houve diferença entre os grupos nos demais momentos avaliados (Figura 1).

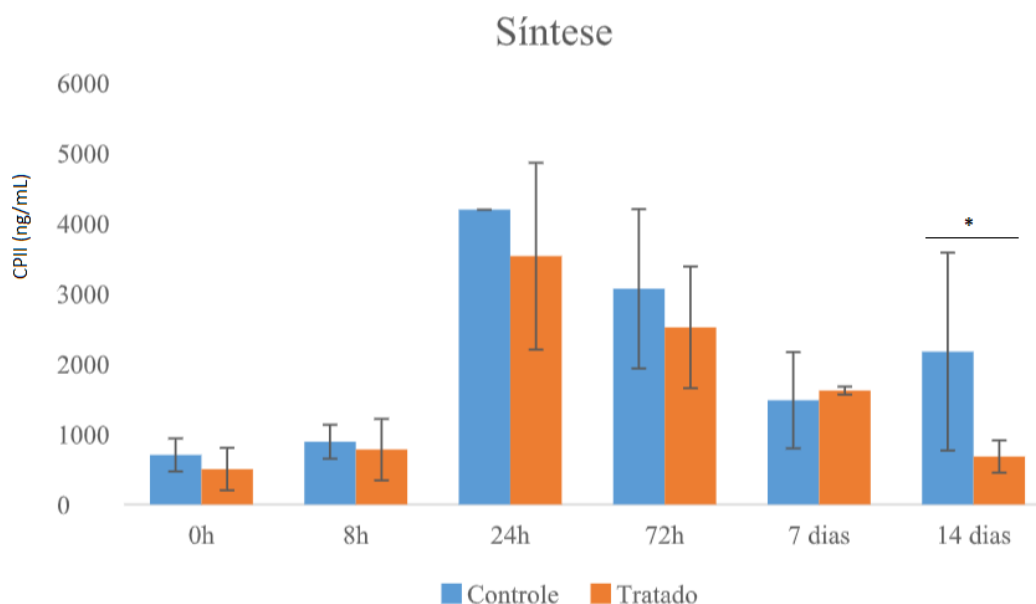


Figura 2: Análise da concentração do marcador CPII do líquido sinovial no momento inicial, 8, 24, 72 horas, 7 e 14 dias após a indução da sinovite. Os tratamentos foram realizados após a coleta M8. * indica diferença estatística ($P=0,019$).

Em relação à comparação dos tempos de avaliação dentro de cada grupo, os dois grupos avaliados se comportaram igualmente (Tabela 1). Notou-se um aumento significativo na concentração de CPII no líquido sinovial 24 e 72 horas após a indução de sinovite ($P<0,001$). Entretanto, após 7 dias não houve diferença significativa com o momento inicial em ambos os grupos.

Tabela 1: Quantificação da concentração sinovial de CPII. As letras minúsculas indicam comparação do mesmo grupo nos diferentes momentos e as maiúsculas comparam os diferentes grupos no mesmo momento.

Síntese			
Tempo	Grupo		P
	Controle	Tratado	
0h	704,3 ± 234,2 cA	502,0 ± 302,8 cA	0,241
8h	892,8 ± 241,9 cA	781,8 ± 438,0 cA	0,627
24h	4195,0 ± 0,0 aA	3534,4 ± 1328,4 aA	0,299
72h	3070,0 ± 1134,8 abA	2519,1 ± 864,7 abA	0,360
7 dias	1482,8 ± 685,4 bcA	1621,0 ± 58,4 bcA	0,715
14 dias	2174,1 ± 1409,4 bcA	681,9 ± 229,4 cB	0,019
P	<0,001		<0,001

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

3.2. Concentração sinovial de C2C

Na comparação entre os grupos, notou-se que o GC demonstrou maior concentração sinovial de C2C em relação ao GT no M24 horas (P= 0,015). Não houve diferença entre os grupos nos demais momentos avaliados (Figura 3).

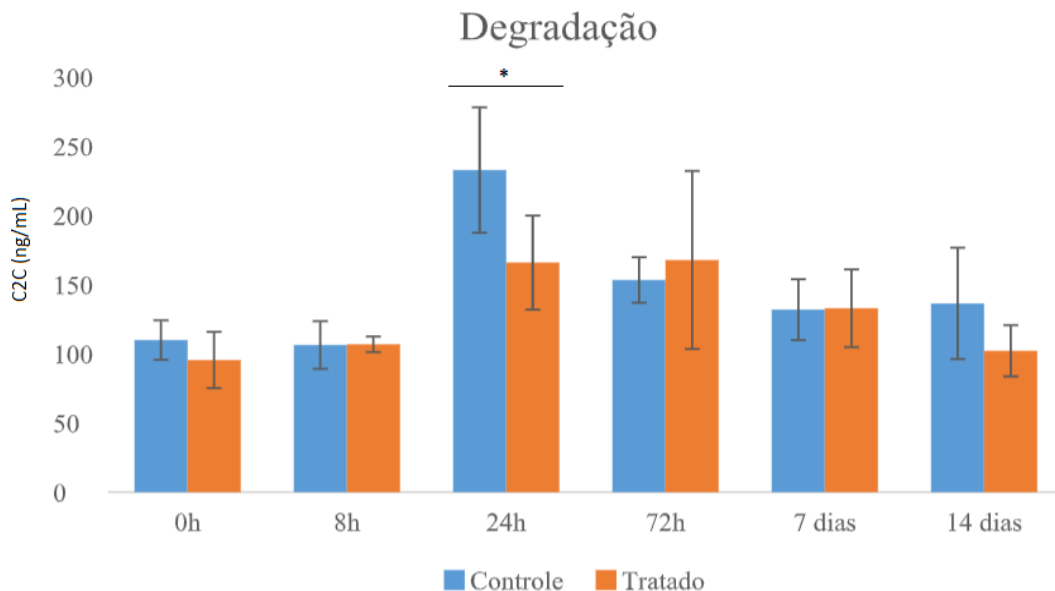


Figura 3: Análise da concentração sinovial do marcador C2C no momento inicial, 8, 24, 72 horas, 7 e 14 dias após a indução da sinovite. * indica diferença estatística (P=0,015).

Em relação à comparação dos tempos de avaliação dentro de cada grupo,

no GC houve aumento significativo apenas no momento 24 horas ($P < 0,001$), mas

após 72 horas e nos demais momentos seguintes não houve diferença significativa com o momento inicial. Já no GT houve aumento significativo nos momentos 24, 72 horas e 7 dias em relação ao momento inicial (Tabela).

Tabela 2: Quantificação da concentração sinovial de C2C. As letras minúsculas indicam comparação do mesmo grupo nos diferentes momentos e as maiúsculas comparam os diferentes grupos no mesmo momento.

Degradação			
Tempo	Grupo		P
	Controle	Tratado	
0h	110,0 ± 14,2 bA	95,5 ± 20,3 bA	0,203
8h	106,4 ± 17,2 bA	106,9 ± 5,7 bA	0,953
24h	232,9 ± 45,4 aA	166,0 ± 34,0 aB	0,015
72h	153,4 ± 16,5 bA	167,8 ± 64,4 aA	0,639
7 dias	132,0 ± 22,0 bA	133,0 ± 28,1 abA	0,949
14 dias	136,4 ± 40,2 bA	102,2 ± 18,5 bA	0,073
P	<0,001	<0,001	

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

3.3. Concentração sinovial de CS846

Comparando os dois grupos, o GC demonstrou maior concentração sinovial de CS846 em relação ao GT no M14 dias (P= 0,032). Não houve diferença entre os grupos nos demais momentos avaliados (Figura 4).

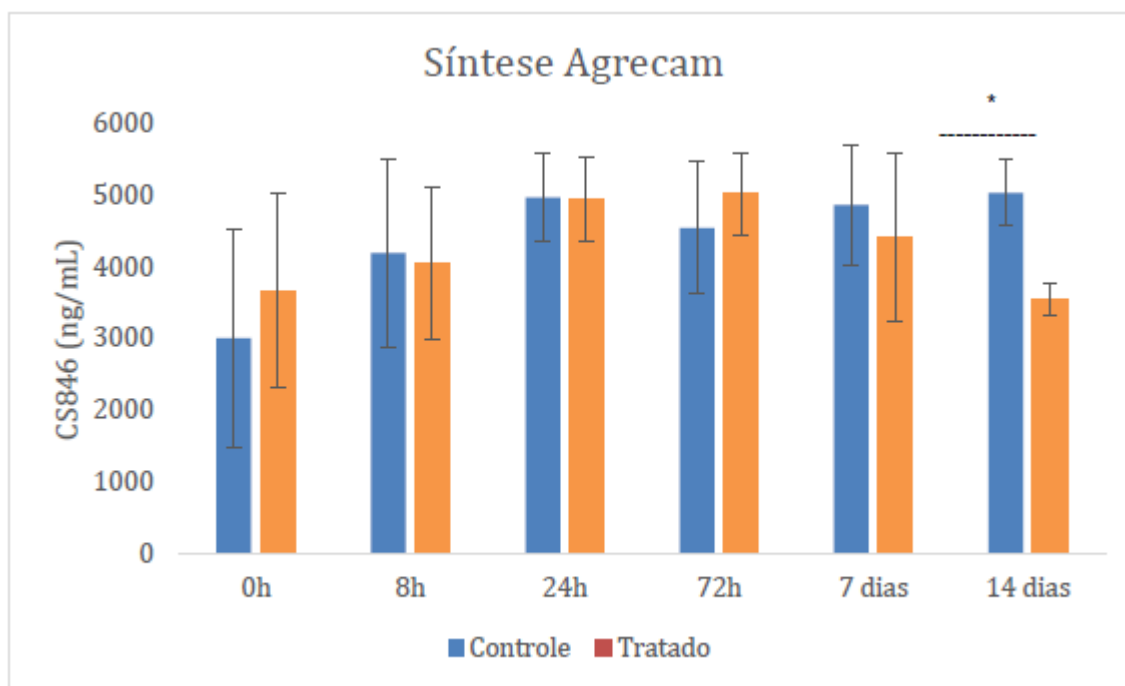


Figura 4: Análise da concentração sinovial do marcador CS846 no momento inicial, 8, 24, 72 horas, 7 e 14 dias após a indução da sinovite. * indica diferença estatística (P=0,032).

Em relação à comparação dos tempos de avaliação dentro de cada grupo, no GC houve aumento significativo apenas nos momentos 24 horas e 14 dias (P<0,001). Já no GT não houve diferença estatística entre os momentos.

Tabela 3: Quantificação da concentração sinovial de CS846. As letras minúsculas indicam comparação do mesmo grupo nos diferentes momentos e as maiúsculas comparam os diferentes grupos no mesmo momento.

Tempo	Controle	Tratado	P
0 h	3009,6 ± 1528,4 bA	3666,7 ± 1352,6 aA	0,477
8 h	4191,8 ± 1319,6 abA	4052,9 ± 1073,7 aA	0,851
24 h	4974,5 ± 604,7bA	4937,1 ± 589,3 aA	0,917
72 h	4535,7 ± 925 abA	5029,2 ± 570,9 aA	0,285
7 dias	4868,4 ± 842,1 abA	4414,8 ± 1173 aA	0,479
14 dias	5037,1 ± 464,8 aA	3548 ± 1259 aB	0,032
P	0,033	0,061	

4. DISCUSSÃO

Nesse experimento foi induzida sinovite aguda com LPS nas articulações tibiotársicas de 12 equinos hígidos e como tratamento os animais foram divididos em dois grupos: o grupo controle que recebeu apenas aplicação de PBS, e o grupo tratado no qual foi realizada aplicação de CTMs, com o objetivo de investigar o efeito das células tronco mesenquimais sobre a degradação e síntese da cartilagem articular através da análise dos principais biomarcadores, o CPII e o CS846, que indicam síntese de colágeno e agregam respectivamente, e o C2C, que indica degradação de colágeno. Concluiu-se que as CTMs têm um efeito positivo ao minimizar o dano da inflamação na cartilagem e, consequentemente, reduzir a necessidade de reparo.

A sinovite pode representar um dos primeiros eventos no estabelecimento da osteoartrite. A OA já foi considerada uma afecção degenerativa primária da cartilagem articular, progressiva e tipicamente não inflamatória, porém estudos recentes demonstram tratar-se de uma enfermidade multifatorial, de natureza complexa com envolvimento de todos tecidos articulares e seus mediadores inflamatórios (Berenbaum, 2013; Robinson *et al.*, 2016).

A dose de 0,5ng de LPS utilizada é um modelo amplamente estabelecido e

aceito para induzir sinovite aguda transitória em equinos sem causar efeitos adversos sistêmicos (Palmer *et al.*, 1994; de Grauw *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). Embora a finalidade de sua utilização seja ocasionar a inflamação transitória e autolimitante da membrana sinovial, os resultados apresentados neste estudo demonstraram um aumento significativo nos níveis de C2C, CPII e CS846 24 horas após a indução de sinovite, indicando que no estágio inicial da inflamação da membrana sinovial já há dano na cartilagem hialina, assim como também uma resposta reparadora. Tais resultados corroboram o reportado por Grauw *et al.* (2009), que relataram um pico na concentração dos mesmos três marcadores 24 horas após a aplicação de LPS na articulação de equinos.

De maneira similar, Coppelman *et al.* (2020) notaram concentrações elevadas consideráveis nos níveis de C2C e CPII no líquido sinovial de equinos com osteoartrite de ocorrência natural quando comparados com equinos com articulações hípidas. Frisbie *et al.* (2008) também relataram níveis significativamente aumentados de CS846 em equinos com OA quando comparados com os animais controles saudáveis.

Assim, é esperado um aumento em tais biomarcadores no caso de inflamação articular aguda, conforme ocorreu no presente estudo, indicando a importância dos mesmos como método de diagnóstico e de progressão da condição. Tal informação é corroborada por Mao *et al.* (2018), que demonstraram

a importância desses marcadores como indicadores precoce da OA.

De Grauw et al. (2009) conduziram um estudo no qual a administração do anti-inflamatório meloxicam 2 horas após a indução de sinovite com LPS resultou em diminuição significativa, no momento 24 horas, da atividade de MMPs (MMP-1, -8 e -13) e no nível de C2C quando comparado ao grupo no qual foi administrado apenas PBS. Em outro estudo também conduzido por De Grauw et al. (2014), com o mesmo delineamento experimental, porém utilizando fenilbutazona, não houve diferença estatística na atividade de MMPs e no nível de C2C entre o grupo tratado e o grupo controle, resultado que os pesquisadores justificaram pelo fato da fenilbutazona não ser capaz de inibir a ação das MMPs.

Os níveis mais baixos de CPII no GT do presente estudo podem refletir o fato de que houve dano menos intenso do colágeno ao longo do tempo nestas articulações e, portanto, a resposta reparadora também foi menor. Em contrapartida, no grupo controle houve maior produção de CPII em resposta ao maior catabolismo no momento 24 horas ocorrido na MEC destes animais. O aumento significativo na síntese de colágeno e de agregam no GC no momento 14 dias sugere que a homeostase da cartilagem começou a se restabelecer após um processo intenso de catabolismo, permitindo assim que a atividade anabólica realizasse o reparo. Este achado corrobora os resultados de Lucia et al. (2013), que encontraram maiores concentrações de CPII em articulações de equinos nas

quais a sinovite foi induzida com 0,5ng de LPS quando comparadas com as articulações que receberam 0,25ng de LPS e as que foram aplicadas apenas solução de Ringer Lactato estéril, indicando que a mudança metabólica para síntese de colágeno acompanha em proporção o dano infligido ao mesmo. Ma et al. (2018) também relataram aumento significativo nos níveis de CS846 após duas semanas de indução de OA em ratos, quando comparados aos níveis do grupo com articulação hígida.

Células-tronco mesenquimais vêm ganhando destaque na terapia regenerativa devido à sua atividade parácrina anti-inflamatória e imunomodulatória, sendo capazes de inibir a ação de linfócitos T e B, monócitos e macrófagos (Barry; Murphy, 2013; Khatab *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2019). Chen et al. (2019) relataram níveis mais altos de TIMP em articulações de ratos com OA induzida e tratadas com CTMs derivadas de medula óssea quando comparadas às articulações tratadas com PBS.

Adicionalmente, Rosa et al. (2020) demonstraram menor número de macrófagos no líquido sinovial de equinos com sinovite induzida tratados com CTMms 24 horas após a administração de LPS, quando comparados ao grupo controle, que recebeu PBS. No mesmo momento, no presente estudo, foi notada menor concentração de C2C no GT, o que pode indicar o efeito biológico das CTMs no ambiente inflamatório, o que gerou menor ativação de macrófagos

pró-inflamatórios e, conseqüentemente, de metaloproteinases. Esse fato pode ter ocorrido devido à capacidade das CTMs de inibir a diferenciação de monócitos e de induzir a diferenciação de macrófagos no fenótipo M2 (Melief et al., 2013; Jiang; Xu, 2019).

Os condrócitos são responsáveis por manter o equilíbrio entre os processos catabólicos e anabólicos da MEC (Finnson et al., 2012). Em quadros inflamatórios, as atividades catabólica e anabólica aumentam, porém muitas vezes os condrócitos não conseguem compensar a intensa depleção da MEC e a resposta de reparação do tecido é insuficiente (Mueller; Tuan, 2011).

Os dados deste trabalho sugerem que as CTMs, ao interagirem com o ambiente inflamatório, diminuem a degradação da MEC, indicando uma ação protetora sobre a cartilagem articular. Porém estudos que incluam a avaliação histológica deste tecido tratado com CTMs durante eventos inflamatórios e avaliações a longo prazo auxiliariam na interpretação dessa interação.

5. CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos demonstrou uma interação entre as CTMs e o ciclo do colágeno tipo II em um ambiente inflamatório, causando uma diminuição na degradação deste último nas primeiras 24 horas após o insulto inflamatório. Os resultados ainda indicam que essa redução nos danos à cartilagem leva a uma menor necessidade de reparo, demonstrada pelos menores níveis de síntese de colágeno e de agregam 14 dias depois do pico da inflamação. Por fim, as análises demonstraram que os biomarcadores avaliados no presente estudo são relevantes para entender melhor a dinâmica catabolismo-anabolismo da cartilagem articular, sendo uma área com alto potencial para estudos subsequentes.

Agradecimentos

À CAPES, à CNPq e à FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo Programa de Demanda Social.

6. REFERÊNCIAS

ARSHI, A.; PETRIGLIANO, F. A.; WILLIAMS, R. J.; JONES, K. J. Stem Cell Treatment for Knee Articular Cartilage Defects and Osteoarthritis. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v. 13, n. 1, p. 20–27, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12178-020-09598-z>

ATUKORALA, I., KWOH, C. K., GUERMAZI, A., ROEMER, F. W., BOUDREAU, R. M., HANNON, M. J., & HUNTER, D. J. Synovitis in knee osteoarthritis: A precursor of disease? **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75(2), p. 390–395. 2016. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205894>

BARRY, F.; MURPHY, M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 10, p. 584–594. 2013. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.109>

BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis), **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 1, p. 16-21, 2013.

CARVALHO, A. M. et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 65, n. 4, p. 939- 945, 2013

CARVALHO, A. É. S., SOUSA, M. R. R., ALENCAR-SILVA, T., CARVALHO, J. L.;
SALDANHA-ARAUJO, F. Mesenchymal stem cells immunomodulation: The road to
IFN- γ licensing and the path ahead. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 47,
p. 32–42, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.05.006>

CHEN, W., SUN, Y., GU, X., HAO, Y., LIU, X., LIN, J., CHEN, J., & CHEN, S.
Conditioned medium of mesenchymal stem cells delays osteoarthritis progression
in a rat model by protecting subchondral bone, maintaining matrix homeostasis,
and enhancing autophagy. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative
Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1618–1628, 2019. <https://doi.org/10.1002/term.2916>

COKELAERE, S. M.; PLOMP, S. G. M.; DE BOEF, E.; DE LEEUW, M.; BOOL, S.;
VAN DE LEST, C. H. A.; VAN WEEREN, P. R.; KORTHAGEN, N. M. Sustained
intra-articular release of celecoxib in an equine repeated LPS synovitis model.
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 128, p.
327–336, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.00>

COPPELMAN, E. B., DAVID, F. H., TÓTH, F., ERNST, N. S., & TRUMBLE, T. N.
The association between collagen and bone biomarkers and radiographic
osteoarthritis in the distal tarsal joints of horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 52,
n. 3, p. 391–398. 2020. <https://doi.org/10.1111/evj.13187>

DE GRAUW, J. C., VAN DE LEST, C. H. A., BRAMA, P. A. J., RAMBAGS, B. P. B.; VAN WEEREN, P. R. In vivo effects of meloxicam on inflammatory mediators, MMP activity and cartilage biomarkers in equine joints with acute synovitis. **Equine Veterinary Journal**, v. 41(7), p. 693–699. 2009.
<https://doi.org/10.2746/042516409X436286>

DE GRAUW, J. C. Molecular monitoring of equine joint homeostasis. **Veterinary Quarterly**, v. 31, Issue 2, p. 77–86, 2011.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2011.565546>

DE GRAUW, J. C.; VAN LOON, J. P. A. M.; VAN DE LEST, C. H. A.; BRUNOTT, A.; VAN WEEREN, P. R. In vivo effects of phenylbutazone on inflammation and cartilage-derived biomarkers in equine joints with acute synovitis. **Veterinary Journal**, v. 201(1), p. 51–56. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.03.030>

FINNISON, K.W.; FINNISON, K.W.; CHI Y, BOU-GHARIOS G, LEASK A, PHILIP A. . TGF-
 b signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. **Front Biosci (Schol Ed)**. v.4, p.251-68, 2012.

FRISBIE, D. D., AL-SOBAYIL, F., BILLINGHURST, R. C., KAWCAK, C. E., & MCILWRAITH, C. W. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 10, p. 1196–1204. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.03.008>

HAN, D., FANG, Y., TAN, X., JIANG, H., GONG, X., WANG, X., HONG, W., TU, J.; WEI, W. The emerging role of fibroblast-like synoviocytes-mediated synovitis in

osteoarthritis: An update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24(17), p. 9518–9532. 2020. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15669>

HUNTER, D. J.; BIERMA-ZEINSTRA, S. . Osteoarthritis. **The Lancet**, v. 393, n. 10182, p. 1745–1759. 2019. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)

ISHIBASHI, K.; SASAKI, E.; OTA, S.; CHIBA, D.; YAMAMOTO, Y.; TSUDA, E.; YOSHIKUNI, S.; IHARA, K.; ISHIBASHI, Y. Detection of synovitis in early knee osteoarthritis by MRI and serum biomarkers in Japanese general population. **Scientific Reports**, v. 10(1). 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69328-w>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. Cap 7. Tecido Cartilaginoso. In: **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KHATAB, S., VAN OSCH, G. J. V. M., KOPS, N., BASTIAANSEN-JENNISKENS, Y. M., BOS, P. K., VERHAAR, J. A. N., BERNSEN, M. R.; BUUL, G. M. Mesenchymal stem cell secretome reduces pain and prevents cartilage damage in a murine osteoarthritis model. **European Cells and Materials**, v. 36, p. 218–230. <https://doi.org/10.22203/eCM.v036a16>

LOTZ, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; CHRISTIANSEN, C.; BRANDI, M. L.; BRUYÈRE, O., CHAPURLAT, R.; COLLETTE, J.; COOPER, C.; GIACOVELLI, G.; KANIS, J. A.; KARSDAL, M. A., KRAUS, V.; LEMS, W. F.; MEULENBELT, I.. PELLETIER, J. P.; RAYNAULD, J. P., REITER-NIESERT, S., RIZZOLI, R.; SANDELL, L. J.; REGINSTER, J. Y. Value of biomarkers in osteoarthritis: Current status and perspectives. **Postgraduate Medical Journal**, v. 90(1061), p. 171–178. 2014. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2013-203726rep>

LUCIA, J. L.; COVERDALE, J. A.; ARNOLD, C. E.; WINSO, K. N. Influence of an intra-articular lipopolysaccharide challenge on markers of inflammation and cartilage metabolism in young horses 1. **J. Anim. Sci.**, v. 91, p. 2693–2699, 2013. <https://doi.org/10.2527/jas2012-5981>

MA, T., ZHANG, Z., SONG, X., BAI, H., LI, Y., LI, X., ZHAO, J., MA, Y.; GAO, L. Combined detection of COMP and CS846 biomarkers in experimental rat osteoarthritis: A potential approach for assessment and diagnosis of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Res.*, v. 13, n. 1. 2018 <https://doi.org/10.1186/s13018-018-0938-3>

MENARIM, B. C.; GILLIS, K. H.; OLIVER, A.; NGO, Y.; WERRE, S. R.; BARRETT, S. H., RODGERSON, D. H.; DAHLGREN, L. A. Macrophage Activation in the Synovium of Healthy and Osteoarthritic Equine Joints. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7. 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.568756>

MUELLER, M. B., & TUAN, R. S. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. **PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation**, v. 3, n. 6, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2011.05.009>

ROBINSON, W. H., LEPUS, C. M., WANG, Q., RAGHU, H., MAO, R., LINDSTROM, T. M.; SOKOLOVE, J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12 (10), p. 580– 592. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.136>

ROSA, G., KRIECK, A. M. T., PADULA, E., PFEIFER, J. P. H., DE SOUZA, J. B., ROSSI, M., STIEVANI, F., DEFFUNE, E., TAKAHIRA, R.; ALVES, A. L. G.

Allogeneic synovial membrane-derived mesenchymal stem cells do not significantly affect initial inflammatory parameters in a LPS-induced acute synovitis model. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 485–491. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.001>

SOKOLOVE, J.; LEPUS, C. M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: Latest findings and interpretations. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 5 (2), p. 77–94. 2013. <https://doi.org/10.1177/1759720X12467868>

VAN WEEREN, P.R. Cap. 1. History of locomotor research. In: BACK, W.; CLAYTON, H. **Equine locomotion**. 1. ed. Saudenders, 2001.

WANG, G., Li, X., JIANG, R., Li, Y., FAN, X., ZHENG, Y.; GAO, L. Changes in synovial fluid inflammatory mediators and cartilage biomarkers after experimental acute equine synovitis. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 59(1), p. 129–134. 2015 <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0019>

WILLIAMS, L.B.; KOENIG, J. B., BLACK, B., GIBSON, T. W., SHARIF, S., & KOCH, T. G. Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an lipopolysaccharide induced synovitis model. **EVJ**, v. 48, p. 619–25, 2016. ISSN 0425-1644. DOI: 10.1111/evj.12477

ZHANG, H., CAI, D.; BAI, X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 28(5), p. 555–561. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.01.007>