

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
MEMBRANA SINOVIAL EQUINA INSERIDAS EM MICROCÁPSULAS DE  
HIDROGEL DE ALGINATO**

VITOR HUGO DOS SANTOS

BOTUCATU – SP  
ABRIL/2017

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
MEMBRANA SINOVIAL EQUINA INSERIDAS EM MICROCÁPSULAS DE  
HIDROGEL DE ALGINATO**

**VITOR HUGO DOS SANTOS**

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

**Orientadora:** Profa. Adj. Ana Liz Garcia Alves

BOTUCATU – SP  
ABRIL/2017

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.

Avaliação das células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina inseridas em microcápsulas de Hidrogel de alginato / Vitor Hugo dos Santos. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501070

1. Equino - Doenças. 2. Osteoartrite. 3. Cartilagem articular - Ferimentos e lesões. 4. Membranas sinoviais. 5. Terapia celular. 6. Células-tronco. 7. Patrimônio genético.

Palavras-chave: Arcabouço; Equinos; Osteoartrite; Terapia celular.

**Vitor Hugo dos Santos**

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
MEMBRANA SINOVIAL EQUINA INSERIDAS EM MICROCÁPSULAS DE  
HIDROGEL DE ALGINATO

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Adj. Ana Liz Garcia Alves**

*Presidente e Orientadora*

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

---

**Dr<sup>a</sup> Bruna De Vita**

*Membro*

*Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/UNESP - Botucatu-SP*

---

**Dr. Leandro Maia**

*Membro*

*Secretaria de Saúde - Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de  
Botucatu/SP*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, acima de tudo.

A minha família querida, que é meu porto seguro. Aos meus pais Edson e Rose, que estiveram ao meu lado em todas as adversidades, me ensinando, me motivando e me amparando sempre. Se não fosse por vocês eu certamente não chegaria até aqui hoje. O meu irmão Bruno que muito me motivou com sua amizade, atenção e carinho. Amo vocês.

A minha orientadora, Professora. Dra. Ana Liz Garcia Alves, não somente pelos diversos ensinamentos e confiança depositados em mim e em meu trabalho.

A minha namorada e amiga Gabriela, agradeço pelo apoio em todos os momentos nesses últimos três anos. Seu companheirismo diário me confortou e me deu coragem e ânimo para obter sucesso nessa jornada. Te amo.

Aos todos amigos pela enorme ajuda.

A toda a minha equipe de pesquisa, João Pedro, Jaqueline, Betsabeia, André, Caio, Luiz Henrique, Gustavo e Mariana, orientados pela Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves, pelo coleguismo e auxílio.

A Professora Marjorie e Elenice Deffune pelo auxílio com os cultivos, processamento e análise das amostras.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial a técnica Shelly pelo auxílio com o processamento e leitura dos cortes histológicos.

A todos os colegas da pós-graduação, pelo companheirismo e horas de descontração.

Ao Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu, que me receberam de portas abertas e me proporcionaram a oportunidade de grandes aprendizados e experiências.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, que me permitiu a dedicação exclusiva a Pós graduação e a realização deste trabalho.

E a todos que, contribuíram direta e indiretamente, fizeram parte desta história.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                         | PAGINAS |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <i>CAPÍTULO 1</i> .....                                                                                                                 | 01      |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                              | 01      |
| <b>1.2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                                                                                  | 04      |
| 1.2.1. A OA nos equinos.....                                                                                                            | 04      |
| 1.2.2. Terapia Celular na osteoartrite equina.....                                                                                      | 06      |
| 1.2.3. Cultivo CTM MS em tres dimensões (3D).....                                                                                       | 08      |
| 1.2.4. Identificação celular nos tecidos.....                                                                                           | 11      |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                                                                | 13      |
| <i>CAPÍTULO 2</i> .....                                                                                                                 | 21      |
| <b>2. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>                                                                                                           | 21      |
| <b>2.1. Cultivo de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina em microcápsulas de hidrogel de alginato</b> ..... | 21      |
| <b>2.2. Avaliação da migração das células tronco mesenquimais inseridas em microcápsulas de hidrogel de alginato em equinos</b> .....   | 48      |

SANTOS, V. H. **Avaliação das células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina inseridas em microcápsulas de hidrogel de alginato**. Botucatu, 2017, 74p. Dissertação - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, FMVZ - Campus de Botucatu.

## RESUMO

Animais com lesão na cartilagem articular, decorrente da osteoartrite, apresentam-se como um desafio para a Medicina Veterinária, pois o reparo cartilagíneo nunca é completo quando técnicas convencionais de tratamento são utilizadas. Os avanços médicos e pesquisas relacionadas têm mostrado crescente interesse na utilização da terapia celular com células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial (CTM<sub>MS</sub>) no tratamento destas lesões, buscando proporcionar total reparo da cartilagem lesada e promover a imunomodulação necessária para o controle do processo inflamatório. Além disso, existem dúvidas quanto à persistência, comportamento das células e a migração a outros locais inflamados. Desta forma este estudo teve como objetivo cultivar e avaliar a viabilidade de CTM<sub>MS</sub> encapsuladas em um arcabouço tridimensional composto de hidrogel de alginato (HA). Adicionalmente avaliar a migração celular utilizando o nanocristal Qtracker 655. Para isso, fragmentos de membrana sinovial foram coletados da articulação metatarsofalangeana de equinos por cirurgia astros cópica, submetidos à digestão enzimática e cultivados em monocamadas. As células foram encapsuladas em várias concentrações: 10<sup>4</sup>; 20<sup>4</sup>; 50<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup>; 20<sup>5</sup> células em solução de alginato de sódio a 1,5% (w/v). Em seguida, fez-se o processo de gelatinização em CaCl<sub>2</sub> (102 mM), permitindo a formação do HA, com posterior cultivo em meio DMEM Knockout durante quatro semanas. A viabilidade, proliferação e diferenciação das células foram realizadas através da dissolução das microcápsulas em citrato de sódio e contagem com azul de tripan, e a diferenciação através dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) e azul de toluidina (AT). Para avaliar a migração celular *in vivo* utilizou-se a citometria de fluxo até os 21 dias e cortes histológicos em microscopia de fluorescência aos sete dias. Houve um aumento no número e na viabilidade das CTMs durante as quatro semanas de cultura nas microcápsulas com 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 20<sup>5</sup> células. Através das análises histológicas dos HAs corados com azul de toluidina e HE foi possível observar a distribuição

definida dos condrócitos no hidrogel, assemelhando-se a grupos isógenos e formação de matriz territorial. As células migraram expressivamente para membrana sinovial, sendo encontradas também em estruturas adjacentes, comprovando a quimiotaxia pela inflamação. Este estudo demonstrou a eficiência do HA como arcabouço para ser utilizado na cultura de CTM<sub>MS</sub> mantendo a viabilidade e estimulando a diferenciação condrogênica e o nanocristal mostrou ser eficiente na marcação das CTM<sub>MS</sub>, não alterando a sua viabilidade, permitindo avaliação da migração celular *in vivo* na articulação dos equinos.

**Palavras-chave:** equinos; osteoartrite; terapia celular; arcabouço.

SANTOS, V. H. **Evaluation of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules.** Botucatu, 2017, 74p. Dissertation (Masters) – University of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, State University of São Paulo.

### **ABSTRACT**

Animals with joint cartilage damage resulting from osteoarthritis present a challenge for Veterinary Medicine, since cartilage repair is never complete when conventional treatment techniques are used. Medical advances and related research have shown increasing interest in the use of cell therapy with mesenchymal stem cells derived from the synovial membrane (MSC<sub>SM</sub>) in the treatment of these lesions, seeking to provide total repair of injured cartilage and to promote the immunomodulation necessary to control the inflammatory process. In addition, there are doubts about the persistence, behavior of cells and migration to other inflamed sites. In this way, this study aimed to cultivate and evaluate a viability of MSC<sub>SM</sub> encapsulated in a three-dimensional scaffold composed of alginate hydrogel (HA) 655. For this, fragments of synovial membrane were collected from the metatarsophalangeal joint of horses by arthroscopic surgery, submitted to enzymatic digestion and cultured in monolayers. The cells were resuspended in various concentrations: 10<sup>4</sup>; 20<sup>4</sup>; 50<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup>; 20<sup>5</sup> cells in 1.5% (w/v) sodium alginate solution. The gelatinization process was then carried out in CaCl<sub>2</sub> (102 mM), allowing the formation of HA, with subsequent culturing in DMEM Knockout medium for four weeks. Cell viability, proliferation and differentiation were performed by dissolving microcapsules in sodium citrate and counting with trypan blue, and differentiation through histological sections stained with hematoxylin and eosin (HE) and toluidine blue (AT). To evaluate cell migration in vivo, flow cytometry was used up to 21 days and histological sections under fluorescence microscopy at 7 days. There was an increase in the number and viability of MSCs during the four weeks of culture in the microcapsules with 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> and 20<sup>5</sup> cells. Through the histological analysis of HAs stained with toluidine blue and HE it was possible to observe the defined distribution of chondrocytes in the hydrogel, resembling isogenic groups and formation of a territorial matrix. The cells migrated expressively to synovial membrane, being also found in adjacent structures, proving chemotaxis by inflammation. This study

demonstrated the efficiency of the HA as a scaffold to be used in the culture of MSC<sub>MS</sub> maintaining viability and stimulating the chondrogenic and nanocrystal differentiation was shown to be efficient in the labeling of the MSC<sub>MS</sub>, not altering its viability, allowing evaluation of cellular migration in vivo the equine joint.

**Keywords:** equines; Osteoarthritis; Cell therapy; Scaffold.

# *CAPÍTULO 1*

## **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o terceiro mundial. Somados aos muares e asininos, são oito milhões de cabeças que movimentam um mercado de sete bilhões de reais por ano. O rebanho engloba mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final, e compõe a base do chamado “Complexo do Agronegócio Cavalo”, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2016). O esporte equestre está amplamente difundido no Brasil. Estima-se que cerca de 50 mil cavalos atletas pratiquem esportes hípicas nas diversas modalidades: salto, vaquejada, corrida, adestramento, entre outras (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2004). Apesar da maior parte dos cavalos do país ser voltada ao trabalho no campo, são os cerca de 20% dedicados ao esporte e ao lazer que impulsiona o mercado equestre no Brasil (LIMA, 2006). Assim, é notória a importância atual do equino atleta em nosso país.

Considerando este fato, tornam-se extremamente relevantes as enfermidades que possam diminuir o desempenho atlético desses animais. A osteoartrite (OA) é uma das principais causas de claudicação em equinos, e está associada com baixo rendimento do equino atleta, incapacitação física e retirada precoce do animal das atividades esportivas (FRISBIE et al., 2007). Esta enfermidade afeta principalmente a cartilagem articular, porém acomete

todo o conjunto da articulação (osso, cápsula, membrana sinovial, ligamentos, tecidos periarticulares (MCILWRAITH et al., 2012). Além disso, a OA implica em grandes prejuízos econômicos para a indústria do cavalo atleta (FRISBIE et al., 2007; SUTTON et al., 2009), sendo uma doença altamente incapacitante e de tratamento complexo (MONTEIRO et al., 2015). As lesões condrais articulares extensas são frequentes nesses equinos, independente da idade ou tipo de exercício realizado (MONTEIRO et al., 2015). Essas lesões apresentam grande dificuldade na reparação e consequências deletérias a longo prazo (NIXON et al., 2015).

Vários estudos foram realizados avaliando a eficácia do tratamento da OA por completo (FRISBIE et al., 2009; GOBBI, 2011; MILANO et al., 2010, YAMADA et al., 2013), mas a reparação condral ainda é dependente de processos intrínsecos e extrínsecos, correlacionados principalmente com a matriz extracelular, e constantemente o tecido de reparação se torna fibrocartilagem, com perda de função (YAMADA et al., 2013; MAZOR et al., 2014).

Frente a esta situação, inúmeros pesquisadores buscam superar os desafios do processo de reparação da cartilagem. A bioengenharia tecidual está sendo utilizada como um adjuvante em tratamentos convencionais, contribuindo de forma significativa não apenas para a redução da destruição articular e da dor, mas também como uma alternativa terapêutica de regeneração (KOCH et al., 2009; VINATIER et al., 2009; GOBBI, 2011; YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015).

Implantes de células tronco mesenquimais (CTM) em lesões condrais demonstram ser promissores, representando uma alternativa terapêutica (VINATIER et al., 2009), contornando a limitada reparação cartilaginosa, reduzindo a formação de fibrocartilagem e bloqueando o ciclo inflamatório articular expressando moléculas anti-inflamatórias como a IL-10, o antagonista de interleucina 1 (IL-1ra), indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (SHI et al., 2012; LENT & BERG, 2013; YAMADA et al., 2013), o que resultaria em baixa morbidade e no tratamento completo da osteoartrite, quando comparado com as terapias e técnicas cirúrgicas habituais e atualmente

disponíveis (YAMADA et al., 2013; MCILWRAITH et al., 2011; CARRADE et al., 2011; RAHEJA et al., 2011; ANDERSON et al., 2014; TSUZUKI et al., 2014).

Uma condição fundamental para a utilização das CTM na reparação de defeitos condrais é o método de aplicação e a manutenção dessas células no sítio de ação. Inúmeros métodos têm sido estudados no intuito de garantir o melhor desempenho das CTM no local da lesão (NÖTH et al., 2008). No caso dos condrócitos, o hidrogel de alginato (HA) têm sido o método mais indicado (FRESHNEY, 2000) por proporcionar o arcabouço tridimensional requerido por esse tipo celular para evitar sua desdiferenciação e também por favorecer a permanência das CTM no local da lesão, evitando que as células migrem no organismo do animal. Häuselmann et al. (1994) e Bittencourt et al. (2009) utilizaram alginato de sódio e obtiveram bons resultados de proliferação celular, viabilidade e produção de moléculas específicas de cartilagem, utilizando bovinos e ratos, respectivamente como modelo experimental.

A avaliação da manutenção das células e sua diferenciação no tecido ao qual as células são implantadas necessitam ser detectadas (KAUR & SINGHAL, 2011). Diversas marcações celulares têm sido estudadas, dentre estas estão disponíveis os pontos quânticos (WU & BRUCHEZ, 2004). Dificuldades são encontradas em se marcar as células a serem transplantadas, assim como avaliar o seu destino *in vivo*, obtendo resultados controversos e de limitações técnicas (OLIVEIRA et al., 2009).

Os pontos quânticos (QDs) são formados por nanocristais semicondutores, excitáveis e fotoestáveis, podendo ser estimulados por um único comprimento de onda (AZZAZY et al., 2006). Os QDs são atóxicos às células e sua fluorescência continua ativa por um tempo 100 vezes maior se comparado a corantes orgânicos (MARSH et al., 2007). Os nanocristais provêm luminosidade e fluorescência que podem ser observados por horas em tecidos marcados, ainda podem ser arquivados permanentemente e são capazes de marcar quase todos os tipos de material de interesse biológico (PARAK et al., 2005). A fluorescência do nanocristal pode ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, sendo que algumas células podem permanecer marcadas por até duas semanas (DONALDSON et al., 2004).

As CTM derivadas de membrana e líquido sinoviais são fontes tecido específicas, com elevado potencial condrogênico e de expansão. Além disso, tais células podem ser obtidas por técnicas minimamente invasivas (DE BARI et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2005; YOSHIMURA et al., 2007; LEE et al., 2012).

Apesar de todo este potencial, até o nosso conhecimento ainda não existem estudos sobre a aplicação da técnica de microencapsulamento das CTM em HA para o reparo de lesões articulares, em equinos. Desta forma o este estudo teve como objetivo cultivar e avaliar a viabilidade de CTM<sub>MS</sub> encapsuladas em um arcabouço tridimensional composto de hidrogel de alginato (HA). Adicionalmente avaliar a migração celular in vivo utilizando o nanocristal Qtracker 655.

## **1.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.2.1. A OA nos equinos**

As claudicações são a maior causa de afastamento das atividades esportivas, implicando em grande prejuízo econômico para a indústria do cavalo atleta. A osteoartrite (OA) representa até 35% das causas de claudicação em equinos, sendo uma doença altamente incapacitante e de tratamento complexo, principalmente por apresentar gatilhos multifatoriais (MONTEIRO et al., 2015). Trata-se de enfermidade muito preocupante devido à solidez de instalação e a característica degenerativa da doença, concebendo um fator determinante no desempenho e no valor dos animais atletas (STASHAK, 2006; SCHLUETER & ORTH, 2004; BROMMER, 2005).

Os animais com lesão na cartilagem articular demonstram um desafio para a Medicina Veterinária tanto clínica quanto cirúrgica, em decorrência do potencial limitado de reparação desse tecido. Apesar dos avanços dos processos realizados na cirurgia artroscópica e da terapia farmacológica utilizada para o tratamento da OA, a reparação condral ainda é dependente de processos intrínsecos e extrínsecos, correlacionados principalmente com a

matriz extracelular, e constantemente o tecido de reparação se torna fibrótico (YAMADA et al., 2013; MAZOR et al., 2014).

Passado alguns anos destas afirmações, muitos avanços foram realizados. Diversos fármacos, procedimentos invasivos e não invasivos foram descobertos, otimizando a qualidade de vida do paciente, melhorando o prognóstico e recuperando o desempenho esportivo do animal com osteoartrite. Porém, o restabelecimento satisfatório de uma cartilagem hialina competente ainda não foi alcançado. Os resultados obtidos no tratamento de lesões da cartilagem articular ainda são controversos e, mesmo com o preenchimento cicatricial de defeitos condrais, na maioria dos casos o dano se estende para o osso subcondral, o processo inflamatório se mantém e o animal continua a desenvolver a doença (LEE et al., 2013). Como consequência, há o desencadeamento de inflamação cíclica, sinovite, capsulite, esclerose do osso subcondral, degradação enzimática da cartilagem articular, apoptose celular, perda de glicosaminoglicanos, destruição da matriz extracelular e da rede de colágeno. Essa série de fatores tem como resultado final a quebra estrutural e funcional da cartilagem articular, e corrobora com a característica degenerativa e progressiva da osteoartrite (MCILWRAITH, 2005; NESIC et al., 2006).

No equino adulto, a cartilagem articular é desprovida de inervação, organização linfática e vasos, o que implica no reduzido influxo de células progenitoras sanguíneas e um limitado mecanismo regenerativo (KURODA et al., 2007; HALEEM et al., 2010). A reparação depende de processos intrínsecos e extrínsecos, intimamente relacionados com a matriz extracelular. Os processos intrínsecos são limitados devido ao baixo potencial mitótico dos poucos condrócitos. Os processos extrínsecos são limitados a escassa migração de elementos mesenquimais e células progenitoras do osso subcondral (MCILWRAITH, 2005).

Na reparação de lesões cartilaginosas existe uma abundante formação de tecido fibroso e fibrocartilaginoso, contendo cerca da metade de colágeno tipo II e glicosaminoglicanos presentes em uma cartilagem normal. A formação desse tecido é extremamente limitada em zonas superficiais da cartilagem articular (FRISBIE et al., 2002; MCILWRAITH, 2005; FORTIER et al., 2010), e não confere o retorno morfofuncional desse tecido (MCILWRAITH, 2005).

Com o intuito de superar os desafios do processo de reparação da cartilagem, a comunidade científica continua pesquisando diferentes terapias e novas abordagens na tentativa de restaurar as funções e componentes estruturais de uma cartilagem articular saudável.

### **1.2.2. Terapia celular na osteoartrite equina**

A bioengenharia, empregada como adjuvante em tratamentos convencionais, tem contribuído de forma significativa não apenas para a redução da destruição articular e da dor, mas também como uma alternativa terapêutica de regeneração (KOCH et al., 2009; VINATIER et al., 2009; GOBBI, 2011; YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015). Atualmente, os tratamentos combinados envolvendo células tronco, arcabouços biocompatíveis e compostos bioativos estão sendo amplamente utilizados como uma forma de fornecer fonte celular e estimulação mecânica e molecular, visando a restauração morfofuncional da cartilagem articular danificada (YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015).

Depois de tantos progressos, o emprego da terapia celular possibilitou que os pesquisadores aproximassem-se de uma reparação de cartilagem muito próxima ao ideal. Agora, novos estudos se voltam para os detalhes nesse campo de investigação, apresentando resultados positivos desde sua primeira utilização com implante autólogo de condrócitos (BRITTBERG et al., 1994; LEE et al., 2013; MADEIRA et al., 2015). As interações moleculares, a presença de inflamação, as expressões genéticas e as respostas celulares, a morfologia do tecido de reparação e as aplicações associadas são os alvos das atenções, já que o controle biológico desses indicadores poderá contribuir, de forma imperativa, para o sucesso do tratamento, tornando a cura da osteoartrite possível, mesmo com a doença já instalada (FILARDO et al., 2013; LEE et al., 2013).

Várias pesquisas foram realizadas envolvendo terapia celular no tratamento da OA, como o uso de CTM de diferentes fontes. Yamada et al. (2016) utilizaram CTM derivadas de tecido adiposo em gel de plasma rico em plaquetas na lesão condral equina e observaram que o arcabouço

tridimensional produzido a partir da polimerização da fibrina presente no PRP foi biocompatível e capaz de fixar as CTMs no local da lesão, proporcionando um microambiente protetor e rico em fatores de crescimento. Dentro do arcabouço de PRP, as CTMs migraram e se desenvolveram, indicando dessa maneira seu efeito biológico, auxiliando de forma inegável no processo de reparação condral (YAMADA et al., 2013). Esses mesmos autores relataram ainda que a associação utilizada melhorou a qualidade do tecido de reparação, devido a ação conjunta das vantagens apresentadas pela utilização das CTMs (YAMADA et al., 2016), como quimiotaxia, imunomodulação, proliferação e migração, somadas ao suporte e à alta concentração de fatores de crescimento presentes no PRP, que estimulam a produção de matriz extracelular e a diferenciação condrogênica (TEXTOR et al., 2014; XIE et al., 2014; LEE et al., 2013; YAMADA et al., 2013). Lee et al. (2013) relataram a necessidade de esclarecer o efeito do PRP sobre as CTMs, pois altas doses induzem proliferação e produção de matriz extracelular descontrolada, culminando com o efeito negativo, como a fibrose, diferentemente do que ocorre com no cultivo com alginato de sódio, que apresenta uma produção de matriz extracelular e mantém as características fenotípicas dos condrócito por longos períodos (HÄUSELMANN et al., 1994).

Outra alternativa que vem apresentando resultados promissores são as CTM derivadas de membrana sinovial (CTM<sub>MS</sub>). As CTM obtidas da membrana sinovial tem potencial de auxiliar na reparação da cartilagem *in vitro* e *in vivo* (KANAMOTO et al., 2008), fato esse confirmado por McGonagle et al. (2008), que relataram que existem indícios convincentes de que estas células podem ser utilizadas de forma eficaz para promover a reparação em lesões ligamentares.

Comparada a outras fontes de CTMs, a membrana sinovial é o tecido mais próximo da cartilagem articular, tem maior capacidade condrogênica e pode ser colhida facilmente por exame artroscópico sem danificar tecidos normais (SAKAGUCHI et al., 2005, MOCHIZUKI et al., 2006). A capacidade de regeneração espontânea da cartilagem articular é bastante baixa. Por esta razão, a pesquisa de cicatrização de defeitos superficiais articulares centra-se na possibilidade de melhor reparo da cartilagem lesada através da

transplantação de células (condrócitos, células-tronco mesenquimais) e engenharia de tecidos (NECAS et al., 2010).

Domini et al. (2006) e Pei et al. (2008) relatam que as CTM<sub>MS</sub> são negativas para o marcador hematopoiético CD45 e positivas para CD44, CD90, CD105. Harvanová et al. (2011) determinaram que as células aderentes derivadas de MS e fluido sinovial (FS) tinham marcadores de superfície celular semelhantes e mantiveram propriedades proliferativas após oito passagens. Estes achados indicam que as células aderentes derivadas da membrana sinovial e do líquido sinovial apresentam características típicas de CTMs. Existem estudos que revelam que as CTMs humanas derivadas MS retêm a sua capacidade proliferativa mesmo após a passagem 10 (DE BARI et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2001).

### **1.2.3. Cultivo CTM MS em três dimensões (3D)**

Com o avanço da engenharia de tecidos, novas oportunidades para restauração funcional e estrutural do tecido lesado estão sendo propostas. O crescimento e a diferenciação das células na engenharia de tecidos são hipoteticamente influenciados por interações com biomateriais (AWAD et al., 2004). Awad et al. (2004) estudaram as CTMs derivadas de tecido adiposo humano (CTMs TA) no que se refere ao potencial de diferenciação condrogênica. Neste estudo, as CTMs foram semeadas em diferentes hidrogéis, tais como alginato, agarose e suportes porosos de gelatina (Surgifoam®). Os autores concluíram que os vários biomateriais apoiam a diferenciação de células condrogênica derivadas de CTMs TA, e que a manipulação da composição dessas construções da engenharia de tecidos pode ter efeitos positivos sobre as suas propriedades mecânicas. Focaroli et al. (2016) utilizaram CTMs TA humano encapsuladas em alginato, relataram que as cápsulas produziram ambiente semelhante ao tecido cartilágneo e eram promissoras para uso em engenharia de tecidos. Ainda destacaram que a técnica de encapsulamento é simples e reprodutível, não interferindo na viabilidade celular.

Yang et al. (2004) relataram a necessidade que os condrócitos tem que crescer em cultivo em três dimensões (3D) para manterem sua morfologia e produção de componentes da matriz. O mesmo não ocorre quando cultivados em monocamadas: as células tendem a aderir no fundo do recipiente de cultura e passam pelo processo de desdiferenciação, no qual adquirem características morfológicas atípicas e passam a produzir componentes de matriz fibroblásticas como colágeno tipo I (BENYA & SHAFFER, 1982; MANDL, et al., 2004). Assim, para conseguir a produção de um tecido cartilaginoso funcional, é crucial evitar a desdiferenciação dos condrócitos durante o processo de engenharia de cartilagem (ZHANG et al, 2004).

O cultivo com arcabouço tridimensional se baseia em manter as células em uma matriz artificial, biodegradável, que possa suportar o crescimento da cartilagem enquanto os condrócitos e a matriz se estabelecem. O cultivo consiste em produzir células através da matriz para implantá-las num defeito articular. A matriz artificial degrada-se gradualmente em 8 a 10 semanas após o implante de cartilagem (BENTLEY & MINAS, 2001; YANG, et al., 2004).

Várias matrizes são investigadas na expansão de condrócitos *in vitro* para o reparo da cartilagem lesada. Essas matrizes incluem: arcabouços à base de colágeno (gel de colágeno tipo I e II, esponjas de colágeno tipo II), ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídeos e alginato (FRAGONAS et al., 2000; KISIDAY et al., 2002).

O isolamento dos condrócitos em hidrogel de alginato têm sido o método mais indicado (FRESHNEY, 2000). 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; MULDER, 2002). 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). Uma das vantagens deste polissacarídeo polimerizado é a sua constituição atóxica, biocompatível e injetável em modelos animais.

Alguns autores realizaram o encapsulamento das CTMs TA em HA, no intuito de avaliar o potencial de diferenciação condrogênica, para utilização

destas células na reparação da cartilagem e observaram resultados satisfatórios pela semelhança da cápsula com a cartilagem (AWAD et al., 2004; FOCAROLI et al., 2016).

Independentemente do modo de aplicação, as CTMs, além de atuarem no local da lesão, possuem ação significativa na modulação inflamatória da membrana sinovial. Aryal (2001) relatou que a grande falha causada pela administração intra-articular ocorre devido ao rápido efluxo pela cavidade articular após a instilação. Esta limitação aparece pelo fato da cavidade articular não ser uma cavidade isolada do corpo. O aspecto macroscópico da cavidade articular como um compartimento anatômico pode levar a suposição de que o material administrado fica confinado, mas deve-se considerar que há um equilíbrio direto com a circulação (SCHURMAN & KAJIYAMA, 1985). Assim, a utilização de implantes encapsulados articulares podem ter ação local maior pelo fato de não migrarem para a circulação corpórea.

Lee et al. (2013) observaram que CTMs marcadas foram encontradas aderidas à membrana sinovial, junto à macrófagos, um dia após a aplicação intra-articular, corroborando com dados anteriormente descritos por Huurne et al. (2012), o que evidencia a capacidade de tropismo das CTMs para os locais de lesão e também demonstra que CTMs protegidas por cápsulas permanecem na articulação e não alcançam a circulação sanguínea. No estudo de Huurne et al. (2012) foi relatado ainda melhora significativa na inflamação e espessamento sinovial, e redução da formação de osteófitos e entesófitos após o tratamento intra-articular com CTMs em osteoartrites induzidas.

Bittencourt et al. (2009) estudaram condrócitos de coelho cultivados em hidrogel de alginato a 1,5% e observaram proliferação celular com aumento na viabilidade por até 4 semanas. Notaram ainda, em cortes histológicos corados com azul de toluidina e hematoxilina eosina (HE), distribuição definida dos condrócitos no hidrogel, assemelhando-se a grupos isógenos, e formação de matriz territorial. Os mesmos autores concluíram que o HA foi eficiente como arcabouço para ser usado na cultura de condrócitos, constituindo, assim, uma alternativa no reparo de lesões na cartilagem articular.

### **1.2.4 Identificação celular nos tecidos**

O entendimento do comportamento e do potencial regenerativo das CTMs será totalmente efetivo no momento em que houver um aporte definitivo das células no local desejado (FOX et al., 2007). Neste contexto, as formas de identificação são cruciais para responder a diversas questões importantes (KOCH et al., 2008). Muitos pesquisadores utilizam técnicas de imunofluorescência ou imunohistoquímica para identificar os nichos das CTM (JONES & McGONAGLE, 2007).

Nos últimos anos houve um aumento crescente na busca por métodos fluorescentes capazes de realizar a detecção das células (GWINN & VALLYATHAN, 2006). Esta busca cresceu com o advento da nanotecnologia, que faz uso de nanopartículas aplicadas a novas terapias e marcação molecular, além de utilizar métodos de detecção óptica (BORM, 2006).

Os nanocristais são materiais que podem ser observados utilizando qualquer microscopia fluorescente (epifluorescência, confocal e multifocal), brilhando como sinais de néon, durante até 48 horas (BORM, 2006). Por definição, o nanocristal pode ser detectado por pelo menos quatro gerações celulares (DONALDSON et al., 2007), não são tóxicos e sua fluorescência é ativa por tempo 100 vezes maior quando comparado aos corantes orgânicos (MARSH et al., 2007). O controle da cor emitida pelos QDs pode ser alterada de acordo com o seu tamanho: os pontos pequenos emitem luz azul, verde ou amarela e pontos maiores brilham nas cores laranja, vermelha ou cinza (SIMBERG et al., 2007). A marcação ocorre sem causar efeitos deletérios à célula, através do envolvimento e interação do marcador com a membrana celular, ocorrendo endocitose e quimiotaxia (AZZAZY et al., 2006).

Resultados com CTM marcadas com nanocristais fluorescentes Q-tracker foram úteis na identificação de células implantadas em defeitos ósseos em cães sete dias após o tratamento (OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, estudos mostraram que a marcação não interfere na viabilidade, capacidade proliferativa e diferenciação celular (COSTA, 2009). O tratamento de infarto de miocárdio com CTM realizado por Rosen et al. (2007) sugeriu que as células transplantadas possuem capacidade de migração em direção ao tecido lesado,

e são capazes de se incorporar neste tecido, podendo ser visualizadas após um período de 8 semanas. Não foram encontrados em literatura trabalhos que avaliassem por marcação com nanocristal o comportamento das CTM nas articulações dos equinos.

Carvalho et al. (2014) utilizando o Qtracker para avaliação da migração das CTMs em tendinites induzidas em equinos, concluíram que os nanocristais apresentaram ser um valioso marcador *in vivo* de CTMs para serem utilizados no tratamento da tendinite. Embora a migração de CTMs para a corrente sanguínea tenha sido observada, não foi possível identificar as células marcadas nos tendões não tratados.

Oliveira et al. (2014) avaliaram a marcação das CTMs com nanocristal antes e após o implante em lesões tendíneas experimentais do tendão flexor digital superficial (TFDS) de equinos. Observando que as CTMs marcadas e injetadas no tecido tendíneo mantiveram sua fluorescência sete dias após seu implante, não ocorrendo migração para o membro contralateral. O uso do nanocristal para a marcação das CTMs derivadas da medula óssea equina mostrou-se efetivo pelo fato de essa nanopartícula não ter alterado a viabilidade celular e por ela ter permanecido ativa durante o período implantado.

## REFERÊNCIAS

Anderson JA, Little D, Toth AP, Moorman CT, Tucker BS, Ciccotti MG, Guilak F. Stem cell therapies for knee cartilage repair: the current status of preclinical and clinical studies. *Am J Sports Med* 2014; 42(9):2253-61.

Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimple JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adiposederived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004;25(16):3211–3222.

Azzazy HM, Mansour MM, Kazmierczak SC. Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine. *Clin Chem* 2006; 52(7):1238-46.

Bentley G, Minas T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. *Br. Med. J.*, London 2001; 10.

Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982;30(1):215-24.

Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Ferreira RR, Guilherme GRB, Moroz A, Deffune E. Cultura de Condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. *Acta Ortop Bras* 2009; 17(4):242-246.

Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part *Fibre Toxicol* 2006; 14(3):11.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889-95.

Brommer H, Brama PA, Laasanen MS, Helminen HJ, van Weeren PR, Jurvelin JS. Functional adaptation of articular cartilage from birth to maturity under the influence of loading: a biomechanical analysis. *Equine Vet J* 2005;37(2):148-54.

Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 2011; 13(4):419-30.

Carvalho AM, Yamada AL, Golim MA, Álvarez LE, Hussni CA, Alves AL. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J* 2014;46(5):635-8.

Costa LT. Avaliação da migração e integração de células-tronco mesenquimais ao tecido retiniano lesado. Estudo experimental em ratos wistar. Tese

(Doutorado), 111p. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; 2009.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1928–1942

Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 2004;61:727-728.

Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiari M, Kon E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013;21(8):1717-29.

Focaroli S, Teti G, Salvatore V, Orienti I, Falconi M. Calcium/Cobalt Alginate Beads as Functional Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Stem Cells International* 2016 (12).

Fortier LA, Potter HG, Rickey EJ, Schnabel LV, Foo LF, Chong LR, Stokol T, Cheetham J, Nixon AJ. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92(10):1927-37.

Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007;137(6):491-502.

Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, Vittur F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*. 2000;21(8):795-801.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3rd. ed. New York: Wiley Liss; 2001.

Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* 2002;9(1):12-20.

Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2007; 68(3):290-296.

Frisbie DD, Kisiday JD, Kawcak CE, Werpy NM, McIlwraith CW. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J Orthop Res* 2009; 27(12):1675-80.

Gobbi A, Karnatzikos G, Scotti C, Mahajan V, Mazzucco L, Grigolo B. One-step cartilage repair with bone marrow aspirate concentrated cells and collagen matrix in full-thickness knee cartilage lesions: results at 2 year follow up. *Cartilage* 2011;2(3):286-299.

Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect* 2006;114(12):1818-25.

Haleem AM, Singergy AA, Sabry D, Atta HM, Rashed LA, Chu CR, El Shewy MT, Azzam A, Abdel Aziz MT. The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage* 2010;1(4):253-261.

Harvanová D, Tóthová T, Sarišský M, Amrichová J, Rosocha J. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha)* 2011;57(3):119-24.

Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 1):17-27.

Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noël D, Casteilla L, Jorgensen C, van den Berg W, Van Lent PL. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64(11):3604-13.

Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(2):126-31.

Kanamoto T, Nakamura N, Nakata K, Yoshikawa H. Articular cartilage regeneration using stem cells. *Clin Calcium* 2008;18(12):1744-9.

Kaur S, Singhal B. When nano meets stem: the impact of nanotechnology in stem cell biology. *J Biosci Bioeng* 2012;113(1):1-4.

Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9996-10001.

Koch TG, Berg LC, Betts DH. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J* 2008;49(10):1009-17.

Koch TG, Berg LC, Betts DH. Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J* 2009; 50(2):155-165.

Kurth T, Hedbom E, Shintani N, Sugimoto M, Chen FH, Haspl M, Martinovic S, Hunziker EB. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(10):1178-89.

Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(2):226-31.

Lee JC, Lee SY, Min HJ, Han SA, Jang J, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovium-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a novel injectable gel can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Tissue Eng Part A* 2012;18(19-20):2173-86.

Lee JC, Min HJ, Park HJ, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Arthroscopy* 2013;29(6):1034-46.

Lent PLV, Berg WBVD. Mesenchymal stem cell therapy in osteoarthritis: advanced tissue repair or intervention with smouldering synovial activation? *Arthritis Research & Therapy* 2013; 15:112

Lima RAS, Shiota R, Barros GSC. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006: 250.

Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JM. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol* 2015; 33(1):35-42.

Mandl EW, Van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng* 2004;10(1-2):109-18.

Marsh JN, Partlow KC, Abendschein DR, Scott MJ, Lanza GM, Wickline SA. Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: quantification of the concentration dependence of contrast enhancement for binding to sparse cellular epitopes. *Ultrasound Med Biol* 2007;33(6):950-8.

Mazor M, Lespessailles E, Coursier R, Daniellou R, Best TM, Toumi H. Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. *J Cell Mol Med* 2014; 18(12):2340-50.

McGonagle D, Jones E. A potential role for synovial fluid mesenchymal stem cells in ligament regeneration. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(8):1114-1116.

McIlwraith CW. From arthroscopy to gene therapy – 30 years of looking in joints. In: *Proceedings of the Annual Convention - American Association of Equine Practitioners* 2005; 51:65-113.

McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 2011; 27(11):1552-61.

McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res* 2012; 1(11):297–309.

Ministério da Agricultura e Pecuária. Criação de Equinos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>, acesso: 28 setembro 2016.

Milano G, Sanna Passino E, Deriu L, Careddu G, Manunta L, Manunta A, Saccomanno MF, Fabbriani C. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(7):971-80.

Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium and adipose synovium derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum* 2006; 3: 843-853.

Monteiro SO, Bettencourt EV, Lepage OM. Biologic Strategies for Intra-Articular Treatment and Cartilage Repair. *J Equine Vet Sci* 2015; 35(3):175-190.

Mulder L. Cell adhesion on alginate scaffolds for tissue engineering of aortic valve – a review. *Faculty Biomedical Engineering - Eindhoven University Technology* 2002:22-34.

Nečas A, Plánka L, Srnec R, Crha M, Hlučilová J, Klíma J, Starý D, Křen L, Amler E, Vojtová L, Jančář J, Gál P. Quality of newly formed cartilaginous tissue in defects of articular surface after transplantation of mesenchymal stem cells in a composite scaffold based on collagen I with chitosan micro- and nanofibres. *Physiol. Res* 2010; 59: 605-614.

Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(2):300-22.

Nixon AJ, Rickey E, Butler TJ, Scimeca MS, Moran N, Matthews GL. A chondrocyte infiltrated collagen type I/III membrane (MACI® implant) improves cartilage healing in the equine patellofemoral joint model. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23(4):648-660.

Nöth U, Steinert AF, Tuan RS. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(7):371-80.

Oliveira PGG, Carvalho AM, Yamada ALM, Maia L, Freitas NPP, Watanabe MJ, Landim-Alvarenga FC, Alves ALG. Avaliação da migração das células

progenitoras após terapia da tendinite equina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2014; 66(4):1033-1038.

Oliveira DM, Almeida BO, Marti LC, Sibov TT, Pavon LF, Malheiros DMAC, Campos AH. Labeling of human mesenchymal stem cells with *quantum dots* allows tracking of transplanted cells engrafted in infarcted pig hearts. Einstein 2009; 7(3):284-289.

Oliveira GK, Raiser AG, Olsson D, Salbego FZ, Martins DB, Dezengrine R, Santos Júnior EB, Rappeti J, Trindade LB, Tognoli GK, Pippi NL, Sausen L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteínas óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2010; 62(1):72-79.

Parak WJ, Pellegrino T, Plank C. Labelling of cells with quantum dots. Nanotechnology 2005;16(2):R9-R25.

Pei M, He F, Vunjak-Novakovic G. Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. Differentiation 2008; 76: 1044-1056.

Raheja LF, Galuppo LD, Bowers-Iepore J, Dowd JP, Tablin F, Yellowley CE. Treatment of Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage Fissures in a Horse Using Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. J Equine Vet Sci 2011;31(3):147-154.

Rosen AB, Kelly DJ, Schuldt AJ, Lu J, Potapova IA, Doronin SV, Robichaud KJ, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR, Gaudette GR, Cohen IS. Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis. Stem Cells 2007;25(8):2128-38.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum 2005;52(8):2521-9.

Schlueter AE, Orth MW. Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. Equine and Comparative Exercise Physiology 2004; 1(4):221–231.

Schurman DJ, Kajiyama G. Antibiotic absorption from infected and normal joints using a rabbit knee joint model. Journal of Orthopaedic Research 1985;3(2):185-8.

Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. Trends Immunol 2012; 33(3):136-43.

Simberg D, Duza T, Park JH, Essler M, Pilch J, Zhang L, Derfus AM, Yang M, Hoffman RM, Bhatia S, Sailor MJ, Ruoslahti E. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(3):932-6.

Stashak TD. Claudicação em equinos. 5a.ed. São Paulo: Roca, 2006. 1093p.

Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, Barrett-Jolley R, Mobasher A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*. 2009; 179:10-24.

Textor JA, Murphy KC, Leach JK, Tablin F. Ultrastructure and growth factor content of equine platelet-rich fibrin gels. *Am J Vet Res* 2014;75(4):392-401.

Tsuzuki N, Oshita N, Seo JP, Yamada K, Haneda S, Furuoka H, Tabata Y, Sasaki N. Effect of platelet-rich plasma-incorporated gelatin hydrogel microspheres and subchondral drilling on equine cartilage defects. *J Equine Vet Sci* 2014;34(6):820-824.

Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 2009;27(5):307-14.

Wu X, Bruchez MP. Labeling cellular targets with semiconductor quantum dot conjugates. *Methods Cell Biol* 2004;75:171-83.

Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy* 2014;16(204):1-15.

Yamada ALM, Carvalho AM, Moroz A, Deffune E, Watanabe MJ, Hussni CA, Rodrigues CA, Alves ALG. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects healing in horses. *Stem Cell Discovery* 2013; 3(4)218-225.

Yamada ALM, Alvarenga ML, Brandão JS, Watanabe MJ, Rodrigues CA, Hussni CA, Alves ALG. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino. *Pesq. Vet. Bras* 2016;36(6):461-467.

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

Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007;327(3):449-62.

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

Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo- Kinne E, Emmrich F, Kinne RW. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture – primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res.*2001; 3: 72-76.

## *CAPÍTULO 2*

### **2. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

**Artigo científico a ser submetido ao periódico Cell Biology International**

**2.1. Cultivo de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina em microcápsulas de hidrogel de alginato**

**Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules**

(sob as normas vigentes - disponível

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

Vitor Hugo Santos<sup>1</sup>, João Pedro Hubbe Pfeifer<sup>1</sup>, Jaqueline Brandão Souza<sup>1</sup>, Betsabéia Heloisa Gentilha Milani<sup>1</sup>, Rogério Antonio de Oliveira<sup>2</sup>, Marjorie Assis Golim<sup>3</sup>, Elenice Deffune<sup>3</sup>, Andrei Moroz<sup>4</sup>, Ana Liz Garcia Alves<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, UNESP - Distrito de Rubião Junior, n/n, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

\*Corresponding author.

<sup>2</sup> Departamento de Estatística, Instituto de Biociências, UNESP - Distrito de Rubião Junior, n/n, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento do Hemocentro, UNESP - Distrito de Rubião Junior, n/n, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, FCFAR - UNESP, Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 - s/n, Bairro: Campos Ville, CEP: 14800-903, São Paulo, Brasil.

\*Corresponding author:

Anaalves@fmvz.unesp.br

Address: Rubião Jr, s/n. Botucatu, SP/Brasil Telephone number: 55(14) 3880-2025.

**Key words:** viability, proliferation, differentiation, horses.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells derived from synovial membrane (MSC<sub>SM</sub>) have a greater capacity for chondrogenic differentiation because they are a source close to the chondrocytes. This study aimed to cultivate and evaluate viability and differentiation of MSC<sub>SM</sub> encapsulated in a three-dimensional alginate hydrogel (HA) framework. Samples of the synovial membrane of the metatarsophalangeal joint of 4 horses were collected by arthroscopic surgery. These were subjected to enzymatic digestion, isolated mesenchymal cells, cultured in monolayers and encapsulated at various concentrations, 10<sup>4</sup>; 20<sup>4</sup>; 50<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup>; 20<sup>5</sup> cells in 1.5% sodium alginate solution. The gelatinization process was carried out and cultured for 4 weeks. Viability and cell proliferation were performed by dissolving the microcapsules and counting with trypan blue. The ratio of live cells and total live cells at moments 0, 7, 14, 21 and 28 days was analyzed. For the evaluation of differentiation, histological sections stained with hematoxylin and eosin and toluidine blue were performed. There was no statistical difference in the proportion of live cells between groups over the 28 days. The group of 10<sup>5</sup> cells obtained a higher total number of living cells at the end of the experiment. Through the histological analyzes it was possible to observe at 7 days a low amount of spherical cells with chondrocyte characteristics. On day 21, chondrogenic differentiation became evident, with

pericellular and territorial matrix production. This study demonstrated the efficiency of HA as a framework for MSC<sub>SM</sub> and the chondrogenic differentiation power of the studied technique, promising for use in the treatment of joint injuries in horses.

## RESUMO

Células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial (CTM<sub>MS</sub>) apresentam maior capacidade de diferenciação condrogênica por serem fonte próxima dos condrócitos. Este estudo teve como objetivo cultivar e avaliar viabilidade e diferenciação de CTM<sub>MS</sub> encapsuladas em arcabouço tridimensional de hidrogel de alginato (HA). Foram coletadas amostras de membrana sinovial da articulação metatarsofalangeana de 4 equinos por cirurgia astros cópica. Estas foram submetidas à digestão enzimática, as células mesenquimais isoladas, cultivadas em monocamadas e encapsuladas em várias concentrações, 10<sup>4</sup>; 20<sup>4</sup>; 50<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup>; 20<sup>5</sup> células, em solução de alginato de sódio a 1,5%. Realizou-se o processo de gelatinização e posterior cultivo durante 4 semanas. A viabilidade e a proliferação celular foram realizadas através da dissolução das microcápsulas e contagem com azul de tripan. Analisou-se a proporção de células vivas e o total de células vivas nos momentos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Para a avaliação da diferenciação, foram realizados cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina e azul de toluidina. Não houve diferença estatística na proporção de células vivas entre os grupos no decorrer dos 28 dias. O grupo de 10<sup>5</sup> células obteve maior número total de células vivas ao final do experimento. Através das análises histológicas foi possível observar aos 7 dias baixa quantidade de células de formato esférico com características dos condrócitos. No dia 21, a diferenciação condrogênica ficou evidente, com produção de matriz pericelular e territorial. Este estudo demonstrou a eficiência do HA como arcabouço para as CTM<sub>MS</sub> e o poder de diferenciação condrogênica da técnica estudada, promissora para o uso no tratamento de lesões articulares em equinos.

**Palavras chave:** viabilidade, proliferação, diferenciação, cavalos.

## 1. Introdução

A osteoartrite (OA) é umas das principais causas de claudicação em equinos e está associada com baixo rendimento do equino atleta, incapacitação física e retirada precoce do animal das atividades esportivas (FRISBIE et al., 2007). A cartilagem articular é o principal alvo das alterações degenerativas da OA (MCILWRAITH, 2005). Inúmeras estratégias de tratamento estão sendo desenvolvidas para melhorar a reparação da cartilagem articular. No entanto, as propriedades biológicas e mecânicas do tecido de reparo formado são inferiores às da cartilagem articular nativa. A dificuldade ocorre porque a cartilagem articular tem capacidade limitada de auto-regeneração (HUNZIKER, 2002; REDMAN et al. 2005). Pelo fato de ser desprovida de inervação, organização linfática e vasos, implicando no reduzido influxo de células progenitoras sanguíneas, limitando o mecanismo regenerativo (KURODA et al., 2007; HALEEM et al., 2010).

Atualmente, as terapias estão utilizando tratamentos combinados envolvendo células tronco mesenquimais (CTM), arcabouços biocompatíveis e compostos bioativos, como forma de fornecer fonte celular e estimulação mecânica e molecular, visando a restauração morfofuncional da cartilagem articular danificada (YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015). Estes fatores promovem estímulos para melhorar a diferenciação condrogênica (LEMARE et al., 1998; JOHNSTONE et al., 1998; WAKITANI et al., 1994). Häuselmann et al. (1994) realizaram cultivos de condrócitos em esferas de alginato durante 2 semanas, que deram origem a matriz semelhante à da cartilagem articular nativa, mantendo o fenótipo durante 8 meses, o que exemplifica a ação benéfica de arcabouços biocompatíveis sobre a diferenciação condrogênica.

O hidrogel de alginato é um polissacarídeo linear (n-ácido gulurônico-ácido manurônico), aniônico, capaz de gelatinizar de maneira reversível na presença de cálcio ou outros cátions divalentes (HÄUSELMANN et al., 1994; MAZZITELLI et al., 2010; MORCH et al., 2012; MAZZITELLI et al., 2011; LEE & MONEY, 2012; HUANG et al., 2012). É amplamente utilizado na engenharia tecidual, proporcionando ambiente ideal para as CTMs, facilitando sua distribuição espacial, o que resulta em microambiente que se assemelha a

cartilagem nativa *in vivo* (FRAGONAS et al., 2000; KURTH et al., 2007; LEE & MONEY, 2012; NAKASHIMA et al., 2012; Stölzel et al., 2015). Além disso, possui ações condroindutoras para promover a síntese de componentes da matriz específica da cartilagem (CHANG et al., 2001; CHANG et al., 2003; PLEUMEEKERS et al., 2014), o que favorece a regeneração da cartilagem lesada.

Até o momento, a maior parte dos estudos publicados referentes à diferenciação condrogênica têm focado nas CTMs isoladas a partir da medula óssea (MAJUMDAR et al. 2001; MA et al., 2003; YANG et al. 2004). Mas as CTM de membrana sinovial (MS) vem atraindo atenção considerável, uma vez que possuem maior potencial condrogênico por ser fonte celular mais específica e próxima dos condrócitos (O'CONNELL, 2000; SAKAGUCHI et al. 2005; SHIRASAWA et al. 2006). Em modelos animais, as células MS podem migrar para os defeitos da cartilagem articular, onde se proliferam e se transformam em condrócitos, produzindo tecido de reparo semelhante a cartilagem (HUNZIKER e ROSENBERG, 1996; HUNZIKER, 2001). No entanto, as condições de estimulação precisam ser melhor entendidas para otimizar a formação de uma cartilagem articular totalmente funcional e hialina.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi cultivar CTM<sub>MS</sub> encapsuladas em hidrogel de alginato em diferentes concentrações, comparando a viabilidade, proliferação e diferenciação condrogênica, para posterior utilização em implantes visando a regeneração da cartilagem articular de equinos. Assim, a hipótese deste estudo foi encapsular maior número de células por microcápsulas viabilizando o tratamento intra articular em equinos.

## **2. Material e métodos**

O experimento foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu (Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária), no Laboratório de Terapia Celular, FMVZ, Unesp Campus de Botucatu), no período de outubro a novembro de 2016. Foi aprovado pela Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, sob protocolo número 052/2016.

### **2.1 Coleta da membrana sinovial**

As membranas sinoviais foram coletadas a partir de artroscopias realizadas em equinos atendidos pelo serviço de Cirurgia de Grandes Animais da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho (UNESP), campus Botucatu/SP, no período de abril a setembro de 2016. Como doadores de membrana sinovial, foram utilizados 4 equinos da raça Quarto de Milha, sendo dois machos e duas fêmeas com idade média de  $4 \pm 0,40$  anos, e pesando em média  $400 \pm 5,77$  kg. Destes animais foram obtidos fragmentos de membrana sinovial (MS) das articulações metatarsofalangeana direita e esquerda, com auxílio da pinça Rongeur Ferris Smith. É importante salientar que esses animais foram apenas doadores da membrana sinovial, já que o experimento utilizou células alogênicas.

### **2.3 Cultura CTM<sub>MS</sub>**

Após a coleta a amostra foi submetida a sucessivas lavagens com Knockout™ DMEM e sofreu separação mecânica com auxílio da lâmina de bisturi e ação digestiva de solução 2mg/mL de colagenase tipo I diluída em meio Knockout™ DMEM. A solução foi homogeneizada e levada à estufa em 37° C e 5,0% de CO<sub>2</sub>, overnight e após este período foi adicionado o mesmo volume de meio Knockout™ DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). Este material foi centrifugado a 628G durante 10 minutos. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e foi adicionado o meio de cultivo para posterior centrifugação. Novamente foi removido o sobrenadante e adicionado o meio de cultivo. As CTM<sub>MS</sub> foram cultivadas em frascos de cultura de 75cm<sup>2</sup> a uma concentração de  $10 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> utilizando o meio de cultura Knockout™ DMEM 10% de SFB. Os frascos foram mantidos em estufa em 37°C e 5,0% de CO<sub>2</sub>.

## **2.4 Microcápsulas de alginato**

As células ao termino do cultivo em monocamada foram encapsuladas em várias concentrações:  $10^4$ ;  $20^4$ ;  $50^4$ ;  $10^5$ ;  $20^5$  células por microcápsulas em uma solução de alginato de sódio a 1,5% com o pH 7,4. A suspensão de células em alginato foi colocada em uma seringa de 10 mL com uma agulha de 21 G, e posteriormente foi dispensada da seringa por gotejamento dentro da solução de gelatinização ( $\text{CaCl}_2$  - 102 mM), permitindo assim a polimerização do alginato durante 10 minutos até formar os “hidrogéis”. A solução de gelatinização foi desprezada, e as microcápsulas foram lavadas 3 vezes em 5 vol. de NaCl a 0,15 M. As microcápsulas foram cultivados em meio Knockout™ DMEM. A cultura foi mantida em estufa de 37° C em atmosfera úmida a 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar durante quatro semanas. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias.

## **2.5 Viabilidade celular**

A recuperação das células do hidrogel para acessar a viabilidade celular foi realizada através da dissolução do hidrogel em citrato de sódio, por 20 minutos em estufa de 37°C. Posteriormente realizada a centrifugação da amostra e diluição na solução de azul de tripan. A contagem de células e determinação da viabilidade celular foi realizada utilizando a câmara de Neubauer em 5 momentos, descritos a seguir: momento 0 (pós encapsulamento), momento 1 (7 dias), momento 2 (14 dias), momento 3 (21 dias) e momento 4 (28 dias). O número de células vivas foi determinado pela técnica de exclusão de células mortas coradas por solução de azul de tripan.

## **2.6 Morfologia celular e caracterização da matrix extracelular**

Para avaliar a produção dos componentes da matriz extracelular as amostras foram avaliadas em dois momentos: 7 dias e 21 dias após encapsulamento. As amostras foram fixadas em formaldeído a 10%, passadas por soluções crescentes de álcool (70%, 95% e 100%), incluídas em parafina e posteriormente seccionadas no micrótomo. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina (AT) a 0,3%, pH 3.65 e Hematoxilina e Eosina (HE).

## 2.7 Caracterização imunofenotípica - citometria de fluxo

As células progenitoras foram diferenciadas nas linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênica demonstrando sua multipotencialidade. Todas as diferenciações foram realizadas em triplicata para cada animal, sendo que uma amostra adicional por animal foi mantida em meio de cultura basal durante 14 dias (como controle da diferenciação adipogênica e osteogênica) e por 21 dias (como controle da diferenciação condrogênica).

Para a diferenciação adipogênica, as células provenientes da terceira passagem foram incubadas a uma densidade de 20.000 cells/cm<sup>2</sup> em uma placa de cultura de 24 poços e cultivadas em meio de cultura adipogênico durante 14 dias. O meio de cultura (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, USA) foi trocado a cada três dias. Posteriormente as células foram fixadas com solução de formoldeído a 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com PBS sendo coradas com *Oil Red O* (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Para realizar a caracterização osteogênica das CTM<sub>MS</sub>, as células progenitoras da terceira passagem foram incubadas a uma densidade de 20,000 cells/cm<sup>2</sup> em placa de cultura de 24 poços e mantidas em condições osteogênicas durante 14 dias, o meio (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, USA) foi trocado a cada três dias. As células foram fixadas em solução de formoldeído 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com água estéril sendo corada com *Alizarin Red* (Gibco, Grand Island, NY, USA).

A condrogênese foi induzida em um pellet de micromassa preparado com  $1 \times 10^6$  células alocadas em um tubo cônico de 15 mL de polipropileno. O pellet foi cultivado a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em 2 mL de meio de cultivo condrogênico (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, USA), o meio foi trocado a cada três dias. Após o período de três semanas de incubação, o pellet foi fixado em solução de formaldeído 10% durante 24 horas a temperatura ambiente, este foi parafinizado e posteriormente cortado em seções de 5 µm, sendo corado com hematoxilina para a histologia geral e com *Alcian blue* para detectar os proteoglicanos sulfatados.

A seleção dos anticorpos foi parcialmente baseado em estudo prévio sobre o conhecimento das pesquisas em CTMs de equinos (Carvalho et al., 2013). As células progenitoras devem expressar os marcadores CD29,

CD44, e CD90 e não expressar os marcadores CD14, CD79, e MHC-II (De Schauwer *et al.*, 2011). A citometria de fluxo foi realizada no aparelho FACSCalibur (BD, San Jose, CA, USA), da primeira e terceira passagem, utilizando o anticorpo monoclonal *mouse anti-rat* CD90-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) e *mouse anti-human* CD105-FITC mAb (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) para avaliar a expressão interespecies. O anticorpo monoclonal específico *mouse anti-horse* CD44 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) e *mouse anti-horse* MHC Class II (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), foram marcados com o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgG-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

### 2.8 Análise estatística

Os dados coletados sobre a quantidade de células vivas e mortas observadas em diferentes concentrações ( $10^4$ ;  $20^4$ ;  $50^4$ ;  $10^5$ ;  $20^5$  células) e em diferentes dias (0, 7, 14, 21 e 28) foram analisados utilizando um modelo linear generalizado para distribuição binomial com função de ligação logística. Para analisar a contagem de células totais em diferentes concentrações ( $10^4$ ;  $20^4$ ;  $50^4$ ;  $10^5$ ;  $20^5$  células) e em diferentes dias (0, 7, 14, 21 e 28), utilizou-se um modelo linear generalizado para a distribuição Binomial Negativa porque os dados apresentaram alta variabilidade. As diferenças estatísticas observadas para as concentrações e os dias foram testadas, sendo consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor p do teste era inferior a 5% ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS versão 9.3 (2011).

### 3. Resultados e discussão

O isolamento das CTM<sub>MS</sub> dos equinos foi realizado utilizando a metodologia semelhante a descrita por De Bari *et al.* (2001), que coletou MS de pacientes humanos com doença articular degenerativa e realizou digestão enzimática com a enzima collagenase para extrair as células do tecido e obter menor tempo de cultivo.

As colônias de células do presente estudo apresentaram aderência ao plástico nas primeiras 36 horas de cultivo (Figura 1A). Aos 15

dias as colônias das células apresentavam-se semelhantes a fibroblastos em todos os cultivos (Figura 1B), resultados semelhantes foram observados por Prado et al. (2015), mantendo a característica fenotípica até a passagem 11 (P11). O cultivo celular foi mantido até a terceira passagem utilizando amostras de quatro animais. A capacidade das CTM<sub>MS</sub> de diferenciação em trilhaagem foi confirmada utilizando os meios de diferenciação comercial para o homem (Gibco, Grand Island, NY, USA).

A coloração com *Oil red* marcou as gotículas de lipídeos dentro das células sobre o meio de indução adipogênico. A diferenciação osteogênica foi confirmada com a coloração em *Van Kossa* das células diferenciadas, evidenciando o depósito de cálcio formado durante a diferenciação osteogênica. As culturas controles não exibiram diferenciação. O potencial condrogênico foi avaliado utilizando o sistema de cultura em forma de pellet. As células submetidas à diferenciação condrogênica mostraram-se coradas com *Safranin O* evidenciando a matriz extracelular condral durante a diferenciação em cartilagem.

A análise pela citometria de fluxo revelou a expressão pelo CD90 e CD105 em todas as passagens testadas (1<sup>a</sup> a 3<sup>a</sup> passagens), determinando a reação cruzada inter espécie entre o camundongo e o equino, e entre homem e equino, respectivamente. O CD44 também reagiu com as CTM<sub>MS</sub> em todas as passagens. Como esperado, não houve reação do marcador MHC Classe II nas CTM<sub>MS</sub> (Tabela. 1).

O crescimento das células até atingirem a confluência de 80% para realização da primeira passagem (P1) ocorreu em média com 15 dias, e o tempo de cultivo entre a P1 e P3 ocorreu em média de 30 dias. De Bari et al. (2001), cultivando CTM<sub>MS</sub> humanas, observaram tempo de cultura primária (P1) que variou de 20 a 25 dias. Utilizando CTM<sub>MS</sub> de equinos hípidos com idade de 2 a 10 anos, pelo método de inserto, Fulber et al. (2016) observaram tempo médio de cultivo até P3 de 68 dias. Em estudos utilizando a collagenase para o isolamento das células, à semelhança do que foi realizado neste trabalho, a expansão e a confluência celular foram observadas na segunda semana de cultivo (KOGA et al., 2007; KURTH et al., 2007; DE BARI et al., 2001).

Fafián-Labora et al. (2015) relacionaram a idade dos doadores como fator relevante no tempo de cultivo. Ao realizarem o estudo com ratos

observaram que as células apresentam declínio no potencial regenerativo com o aumento da idade do doador. No presente trabalho, os animais utilizados tinham idade média de 4 anos, podendo ser considerados animais jovens, o que favoreceu a proliferação celular. Nos estudos comentados anteriormente, animais com médias de idade mais altas foram utilizados, o que pode ter gerado o menor tempo de crescimento celular com necessidade de tempo de cultivo mais prolongado.

O encapsulamento das CTMs tem sido realizado de diferentes formas, variando desde a concentração da solução de alginato até o calibre da agulha. Häuselmann et al. (1994) utilizaram solução de alginato 1,2% (w/v) ao encapsular condrócitos bovinos com agulha 22G, Bittencourt et al. (2009), 1,5% de alginato e 21G, Ma et al. (2003), 1,2% e 16G, Kurth et al. (2007), 2% de alginato e molde de 22 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Já no presente estudo, as microcápsulas foram confeccionadas com solução de alginato a 1,5%, agulha 21G e apresentavam diâmetro médio 1000µm (Figura 3).

Estas variações (concentração do alginato, tamanho da cápsula, calibre da agulha utilizada) podem interferir na viabilidade das células. Domm et al. (2004) utilizaram seis tipos de alginato comercial em seu experimento, demonstrando que o tipo de alginato pode influenciar na cultura de condrócitos, ao encontrar variação no seu pH, viscosidade ou relação n-ácido gulturônico-ácido manurônico. Bittencourt et al. (2009) confirmaram que as variações na concentração do alginato influenciam o metabolismo da célula e a difusão dos componentes necessários provenientes do meio de cultura, recomendando utilizar 1,5% (w/v). O diâmetro da agulha interferindo na viabilidade celular foi avaliado por Garvican et al., (2016), que concluíram que agulhas de maior calibre (19G) para a implantação celular reduzem a perda de viabilidade induzida pelo estresse em comparação com calibres menores de agulha (21G e 23G). Com isso, pode-se notar que a utilização de agulha 21G no presente estudo, levou em consideração os fatores citados acima, buscando minimizar a interferência na viabilidade e proliferação celular, mantendo a viabilidade das células em 80% e a proliferação celular por quatro semanas, tornando os resultados os mais eficientes possíveis.

Além das variações anteriormente citadas, existem variações na concentração de células por microcápsulas, descritas em literatura, variando de

10 mil células (BITTENCOURT et al., 2009) até 60 mil células por microcápsula (MA et al., 2003). No tratamento de lesões articulares em equinos recomenda-se utilizar de 10 a 30 milhões de células para a obtenção de efeito clínico eficiente (WILKE et al., 2007). Assim, a quantidade de microcápsulas a ser aplicada na articulação está diretamente relacionada à concentração de células em cada microcápsula. Como normalmente o volume das articulações-alvo é limitado, passa a ser extremamente útil concentrar mais células/microcápsulas de maneira a tornar a técnica da aplicação de CTM<sub>MS</sub> em microcápsulas viável na rotina clínica. Desta forma, neste trabalho, foram avaliadas microcápsulas com maior (200 mil) e menor (10 mil) número de células, mantendo volume constante de 10µL. Assim, foram delineados grupos experimentais contendo microcápsulas de 10<sup>4</sup>; 20<sup>4</sup>; 50<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup>; 20<sup>5</sup> células, que foram avaliados em 0, 7, 14, 21 e 28 dias.

Ao analisar o número de células vivas, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos até os 28 dias (Figura 4), ou seja, todos os grupos estudados tiveram o mesmo comportamento e curva de crescimento semelhante, com células vivas e mortas em proporção estatisticamente iguais no decorrer do tempo de avaliação. No dia 7 podemos observar declínio do número de células vivas em todos os grupos (com aumento na proporção de células mortas), possivelmente devido ao aumento da atividade metabólica que ocorre no interior das microcápsulas logo após sua confecção, relatada por Farrell et al. (2012). Estes mesmos autores relataram que em estruturas tridimensionais ocorre morte celular no centro e na parte inferior dos arcabouços, justificando o declínio da viabilidade nas primeiras semanas após o implante. Heywood et al. (2006) observaram declínio na viabilidade das células, 2 dias após cultivo em alginato de 4 mm de espessura. Assim, o declínio inicial na viabilidade é esperado, e no presente estudo ocorreu no 7º dia de avaliação.

Conforme citado anteriormente, nos momentos seguintes de avaliação, as células dos diferentes grupos mantiveram curva de crescimento semelhante, apresentando expansão. A avaliação estatística demonstra que não ocorreu menor crescimento nos grupos com maiores concentração de células, o que poderia acontecer por competição por espaço ou nutrientes dentro da microcápsula. Com isso, podemos inferir que é possível utilizar

diferentes concentrações por microcápsulas mantendo sua viabilidade até os 28 dias.

Analisando os resultados do número total de células vivas nos diferentes dias e diferentes concentrações (Tabela. 2), podemos observar que houve diferença estatística entre quase todos os grupos quando analisa-se momento a momento. Essa diferença pode ser explicada pela disparidade entre as concentrações iniciais de cada grupo. Como citado anteriormente, a curva de crescimento (porcentagem de células vivas no decorrer do período analisado) de cada um dos grupos é semelhante. Assim, é de se esperar que as diferenças, no que se refere a contagem total de células vivas, sejam mantidas. A exceção ocorreu no dia 14, onde os grupos de  $20^4$  e  $50^4$  células não obtiveram diferença estatística entre si, assim como entre os grupos de  $100^5$  e  $200^5$  células no mesmo momento de avaliação. Este fato provavelmente ocorreu devido a proximidade na concentração inicial de células destes grupos.

Já ao observarmos o número células vivas totais no decorrer dos momentos dentro de cada grupo, várias diferenças foram encontradas indicando principalmente o aumento no número total de células vivas com o passar do tempo. A maior exceção ocorreu com o grupo de  $20^4$  células, que praticamente não apresentou crescimento no período experimental, mostrando-se o pior grupo de avaliação.

Analisando a curva de crescimento do número total de células no gráfico ao longo de 28 dias (Figura 5), foi possível observar que os grupos de  $10^4$ ,  $100^5$  e  $200^5$  células apresentaram maior número de células totais ao final do experimento. Porém, apenas os grupos de  $10^4$  e  $10^5$  células demonstraram proliferação celular, com número total de células vivas maior ao final do período de experimento. Bittencourt et al. (2009) utilizaram metodologia semelhante do presente estudo, encapsulando  $10^4$  células por microcápsulas, e observando a manutenção e proliferação celular por até 4 semanas. Já Ma et al. (2003) realizaram o encapsulamento de CTMs da medula óssea humana, na concentração de 60 mil células por microcápsula de alginato, relataram que a viabilidade manteve-se elevada (> 90%) ao longo de 4 semanas e a duração da cultura in vitro não teve efeito sobre a viabilidade das células.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o grupo de  $10^4$  pode ser utilizado para aplicação intra articular em equinos,

porém seriam necessárias várias microcápsulas para atingir o número total de CTM necessárias para o efeito desejado, e o volume articular é limitante. Já o grupo de  $10^5$  células manteve a curva de crescimento semelhante, obtendo maior proliferação celular aos 28 dias. A utilização de maior número de células por microcápsulas viabiliza a aplicação clínica em equinos, concentrando o número de células em menor volume, e possibilitando a aplicação do número de células necessárias para efeito terapêutico utilizando aproximadamente 100 microcápsulas. Aumentando a densidade por cápsula, o número de microcápsulas a ser transplantadas será menor, reduzindo o dano tecidual produzido pelo transplante (ROSS & CHANG, 2002; NOGUÉS et al., 2013). Porém é importante salientar que concentrações maiores por microcápsulas devem ser avaliadas com cuidado, para que não haja prejuízos na viabilidade celular a longo prazo após o encapsulamento. No presente trabalho, por exemplo, a concentração de  $200^5$  células teve pior desempenho que a de  $100^5$  células, quando observamos o número total de células ao final do experimento (28 dias), já que, comparando esses dois grupos com maior concentração de células, apenas o de  $100^5$  terminou o período de análise com mais células do que iniciou. Estas observações indicam provável limite de concentração de células por cápsula.

Algumas características foram responsáveis pela escolha do hidrogel de alginato no presente estudo, como a capacidade de gelatinizar de maneira reversível na presença do cálcio (HÄUSELMANN et al., 1994; MULDER, 2002), biocompatibilidade, injetável em modelos animais, possui propriedades condroindutoras por produzir ambiente semelhante ao tecido cartilágneo e não interferem na viabilidade celular (AWAD et al., 2004; FOCAROLI et al., 2016), degradando-se gradualmente em 8 a 10 semanas após o implante de cartilagem (BENTLEY; MINAS, 2001; YANG, et al., 2004).

Várias pesquisas relataram o potencial de estímulo do alginato na diferenciação condrogênica, estimulando tanto células da membrana sinovial (KURTH et al. 2007), como tecido adiposo (FOCAROLI et al., 2016), medula óssea de humanos (MA et al., 2003), e condrócitos bovinos (HAUSELMANN et al., 1994), porém nenhuma pesquisa avaliou o potencial das células de equinos, o que torna o presente trabalho inédito.

A observação das células em hidrogel de alginato, aos 7 dias de cultivo, pela coloração de azul de toluidina demonstrou baixa quantidade de células de formato esférico com características dos condrócitos (Figura 6A). Em maior aumento (Figura 6B) evidenciou-se formação da matriz pericelular com lacunas ao redor dos condrócitos e retenção da morfologia esférica semelhante ao do tecido cartilaginoso nativo. Aos 7 dias de cultivo, Ma et al. (2003), descreveram o mesmo achado morfológico ao trabalhar com CTMs de medula óssea humana. A baixa quantidade de células com características de condrócitos encontradas neste momento pode ser explicada pela hipótese de que as demais células permaneceram indiferenciadas, com a possibilidade de apresentarem ações parácrinas, com efeitos imunomodulatórios e antiinflamatórios (HUURNE et al. 2012).

No decorrer de 21 dias de cultura, a diferenciação foi mais evidente (Figura 6 C e D), com alta celularidade comparada com o cultivo aos 7 dias, indicando a diferenciação e multiplicação destas células no hidrogel, com produção de matriz pericelular e territorial. A coloração com azul de toluidina revelou a produção de proteoglicanas, componente principal desta região. Focaroli et al. (2016) obtiveram a mesma diferenciação das CTMs de tecido adiposo humano em esferas de alginato, na avaliação histológica aos 21 dias.

A presença das lacunas coradas com azul de toluidina foram descritas por Nakashima et al. (2012) ao utilizarem a cultura tridimensional com as esferas de alginato, causadas pela rigidez da matriz. Esses mesmos autores consideraram esta coloração um método vantajoso para o estudo *in vitro* de condrócitos.

Kurth et al. (2007) trabalharam com encapsulamento das CTMMS em alginato e observaram que após duas semanas houve aumento significativo dos níveis de aggrecan e colágeno tipo II, confirmando a diferenciação das células em condrócitos (GOESSLER et al., 2004). Estes achados, somados aos resultados do presente trabalho, permitem predizer que o alginato favorece a diferenciação condrogênica.

Além de favorecer a diferenciação condrogênica o alginato atua na manutenção das células, atendendo os princípios do arcabouço tridimensional, em manter as células em uma matriz artificial, biodegradável, que possa suportar o crescimento da cartilagem durante alguns meses,

enquanto os condrócitos e a matriz se estabelecem (BENTLEY; MINAS, 2001; YANG, et al., 2004).

#### **4. Conclusão**

A técnica de encapsulamento utilizada foi de fácil execução. As CTM<sub>MS</sub> obtiveram boa adaptação ao arcabouço de alginato de sódio. Todos os grupos obtiveram a mesma proporção de células vivas no decorrer do período de estudo, mas diferiram na contagem total de células vivas presentes. A concentração de 100<sup>5</sup> mostrou-se mais eficiente para utilização da aplicação intra articular em equinos, por concentrar maior número de células visto que o volume articular é reduzido. O hidrogel atendeu as características do arcabouço, mantendo as células e estimulando a diferenciação das CTMs em condrócitos. Estudos *in vivo* são necessários para validar o potencial terapêutico da aplicação intra-articular das CTMMS encapsuladas, porém os resultados obtidos até o presente momento mostram-se promissores.

#### **Agradecimentos**

A Dra. Marjorie e Dra Elenice (Hemocentro, FMB - UNESP/ Botucatu - SP, ao suporte a caracterização e citometria. Ao Dr Andrei Moroz (FCFAR - UNESP/ Araraquara - SP) ao suporte no desenvolvimento dos arcabouços.

#### **Financiamento**

Fundação Capes para bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimple JM, Guilak F. 2004. Chondrogenic differentiation of adiposederived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*. 25(16):3211–3222.

Bentley G, Minas T. 2001. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. *Br. Med. J.*, London. 10.

Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Ferreira RR, Guilherme GRB, Moroz A, Deffune E. 2009. Cultura de Condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. *Acta Ortop Bras*. 17:242-246.

Chang SCN, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, Vacanti CA, Bonassar LJ. 2001. Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J Biomed Mater Res A*. 55(4):503–511.

Chang SC, Tobias G, Roy AK, Vacanti CA, Bonassar LJ. 2003. Tissue engineering of autologous cartilage for craniofacial reconstruction by injection molding. *Plast Reconstr Surg*. 112(3):793–799.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 44:1928–1942.

Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8:315-317.

Domm C, Schunke M, Steinhagen J, Freitas S, Kurz B. 2004. Influence of various alginate brands on the dedifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate bead culture under high and low oxygen tension. *Tissue Eng*. 10:1796-1805.

Fafián-Labora J, Fernández-Pernas P, Fuentes I, De Toro J, Oreiro N, Sangiao-Alvarellos S, Mateos J, Arufe MC. 2015. Influence of age on rat bone-marrow mesenchymal stem cells potential. *Sci Rep.* 5:16765.

Farrell MJ, Farrell KM, Riggin CN, Mauck RL. 2012. Mesenchymal stem cell death in three-dimensional agarose culture for cartilage tissue engineering applications: progression, factors, and prevention. 38th Annual Northeast Bioengineering Conference (NEBEC), Temple University , Philadelphia, PA:117-118.

Focaroli S, Teti G, Salvatore V, Orienti I, Falconi M. 2016. Calcium/Cobalt Alginate Beads as Functional Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Stem Cells International* (12).

Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, Vittur F. 2000. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials.* 21(8):795-801.

Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. 2007. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 68(3):290-296.

Fulber J, Maria DA, Silva LCLC, Massoco CO, Agreste F, Baccarin RYA. 2016. Comparative study of equine mesenchymal stem cells from healthy and injured synovial tissues: an in vitro assessment. *Stem Cell Res Ther.* 7:35.

Garvican ER, Cree S, Bull L, Smith RK, Dudhia J. 2014. Viability of equine mesenchymal stem cells during transport and implantation. *Stem Cell Res Ther.* 5:94.

Goessler UR, Hörmann K, Riedel F. 2004. Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (Review). *Int J Mol Med*. 13(4):505-13.

Hallem AM, El Singergy AA, Sabry D, Atta HM, Rashed LA, Chu CR, El Shewy MT, Azzam A, Aziz MTA. 2010. The clinical use of human culture–expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on platelet-rich fibrin glue in the treatment of articular cartilage defects: a pilot study and preliminary results. *Cartilage*. 1(4):253–261.

Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. 1994. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci*. 107 (Pt 1):17-27.

Heywood HK, Bader DL, Lee DA. 2006. Glucose Concentration and Medium Volume Influence Cell Viability and Glycosaminoglycan Synthesis in Chondrocyte-Seeded Alginate Constructs. *Tissue Engineering*. 12(12):348796.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 7(5):393-5.

Huang X, Zhang X, Wang X, Wang C, Tang B. 2012. Microenvironment of alginate-based microcapsules for cell culture and tissue engineering. *J Biosci Bioeng*. 114(1):1–8.

Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noël D, Casteilla L, Jorgensen C, van den Berg W, Van Lent PL. 2012. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 64(11):3604-13.

Hunziker EB. 2001. Growth-factor-induced healing of partial- thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 9:22-32.

Hunziker EB, Rosenberg LC. 1996. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*. 78:721-733.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. 1998. In Vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research*. 238:265-272.

Koga H, Muneta T, Ju YJ, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, Ichinose S, von der Mark K, Sekiya I. 2007. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells*. 25(3):689-96.

Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M. 2007. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *OsteoArthritis and Cartilage* 15:226-231.

Kurth T, Hedbom E, Shintani N, Sugimoto M, Chen FH, Haspl M, Martinovic S, Hunziker EB. 2007. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis Cartilage*. 15(10):1178-89.

Lee KY, Mooney DJ. 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 37(1):106 – 126.

Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M. 1998. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1 $\alpha$ . *Journal of cellular physiology*.176:303-313.

Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL, Lo WH. 2003. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A*. 64(2):273-81.

Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JM. 2015. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol*. 33(1):35-42.

Majumdar MK, Wang E, Morris EA. 2001. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol*. 189(3):275-84.

Mazzitelli S, Capretto L, Zhang XL, Penolazzi L, Lambertini E, Piva R, Nastruzzi C. Process optimization for the production of alginate microparticles containing WJMSCs by a design of experiments (doe) approach. *Journal of Controlled Release* 2010;148(1):76 - 77.

McIlwraith CW. 2005. From arthroscopy to gene therapy – 30 years of looking in joints. In: *Proceedings of the Annual Convention - American Association of Equine Practitioners*. 51:65-113.

Morch YA, Qi M, Gundersen PO, Formo K, Lacik I, Skjåk-Braek G, Oberholzer J, Strand BL. 2012. Binding and leakage of barium in alginate microbeads. *J. Biom. Mat Res*. 100(11):2939–2947.

Mulder L. 2002. Cell adhesion on alginate scaffolds for tissue engineering of aortic valve – a review. *Faculty Biomedical Engineering - Eindhoven University Technology*. 22-34.

Nakashima K, Nakatsuka K, Yamashita K, Kurita K, Hayakawa T. 2012. An In Vitro Model of Cartilage Degradation by Chondrocytes in a three-Dimensional Culture System. *Int J Biomed Sci*. 8(4):249-257.

Nogués CS, Thomas D, Pandit A, O'Brien T. 2013. Stem Cell Microencapsulation for Therapeutic Angiogenesis. In: *Bartolo L, Bader A*.

Biomaterials for Stem Cell Therapy State of Art and Vision for the Future. London: CRC Press. 386–424.

O'Connell JX. 2000. Pathology of the synovium. *Am J Clin Pathol.* 114(5):773-84.

Pleumeekers MM, Nimeskern L, Koevoet WL, Kops N, Poublon RM, Stok KS, van Osch GJ. 2014. The in vitro and in vivo capacity of culture-expanded human cells from several sources encapsulated in alginate to form cartilage. *Eur Cell Mater.* 27:264-80.

Prado AAF, Favaroni PO, Silva LCLC, Baccarin RYA, Miglino MA, Maria DA. 2015. Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. *BMC Vet Res.* 11:281, 2015.

Redman SN. Oldfield SF, Archer CW. 2005. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater.* 9:23-32.

Ross CJD, Chang PL. 2002. Development of small alginate microcapsules for recombinant gene product delivery to the rodent brain. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 13(8):953–962.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. 2005. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 52(8):2521-9.

Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. 2006. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem.* 97(1):84-97.

Stölzel K, Schulze-Tanzil G, Olze H, Schwarz S, Feldmann EM, Rotter N. 2015. Immortalised human mesenchymal stem cells undergo chondrogenic

differentiation in alginate and PGA/PLLA scaffolds. *Cell Tissue Bank*. 16(1):159–170.

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. 1994. Mesenchymal cell based repair of large, full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 76(4):579-92.

Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ. 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res*. 25(7):913-25.

Yamada ALM, Carvalho AM, Moroz A, Deffune E, Watanabe MJ, Hussni CA, Rodrigues CA, Alves ALG. 2013. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects healing in horses. *Stem Cell Discovery*. 3(4):218-225.

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

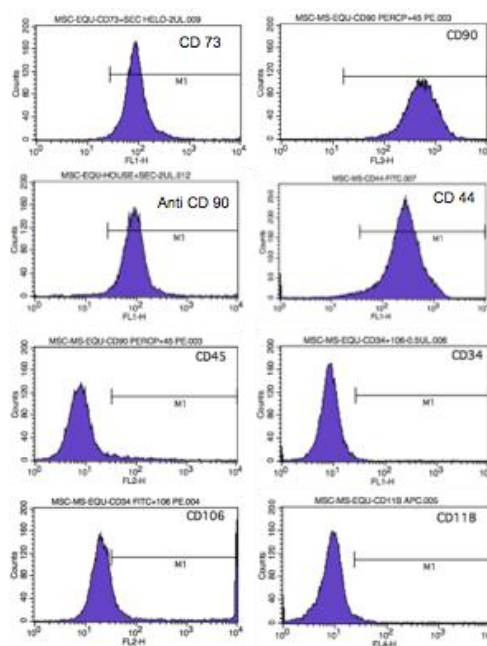


Figura 1. Caracterização imunofenotípica por ensaios de citometria de fluxo das células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina em 3ª passagem (P3) com os marcadores CD 73, Anti CD 90, CD 90, CD 44, CD 45, CD 34, CD 106, CD 11b.

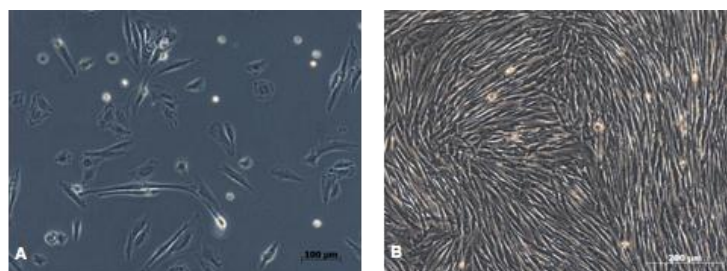


Figura 2. Microscopia invertida em contraste de fase da cultura de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina, em monocamadas. (A) Cultura celular após 36 horas de cultivo, observa-se as células aderidas com morfologia fibroblastóide, objetiva 10X; (B) Cultura celular em monocamada, confluenta após 2 semanas em cultura, objetiva de 20X.

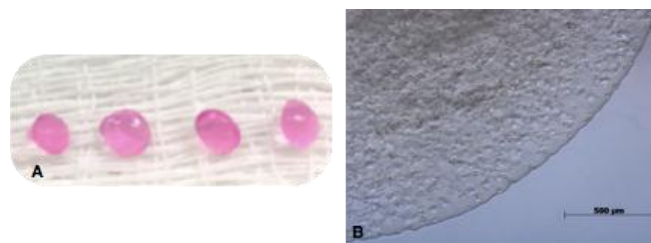


Figura 3. Células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina inseridas em microcápsulas de alginato 1,5% (g/v) confeccionadas com agulha 21G. (A) Microcápsulas de alginato após gelatinização com 1000µm de diâmetro; (B) Microscopia invertida em contraste de fase da cultura celular em hidrogel de alginato, observa-se inúmeras estruturas esféricas e arredondadas que representam a alta celularidade, objetiva de 20x.

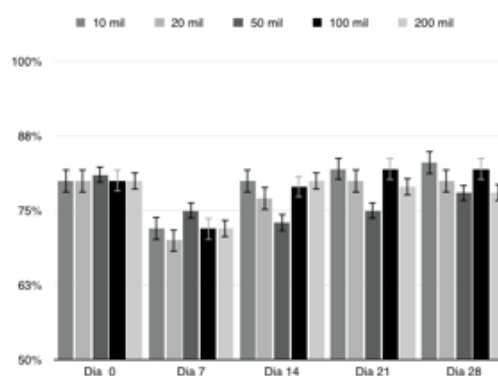


Figura 4. Proporção de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina vivas até os 28 dias, após a dissolução das microcápsulas em todos os grupos ( $10^4$ ;  $20^4$ ;  $50^4$ ;  $100^5$  e  $200^5$  células).

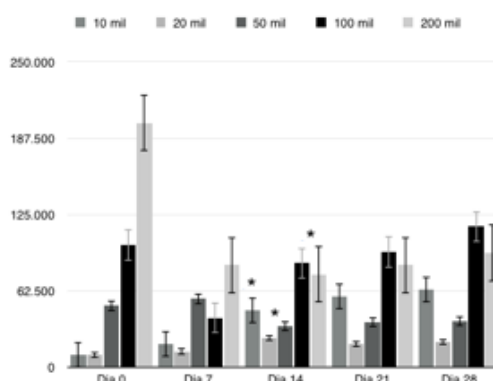


Figura 5. Número de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial totais até os 28 dias, em todos os grupos ( $10^4$ ;  $20^4$ ;  $50^4$ ;  $100^5$  e  $200^5$  células). Diferença estatística considerada quando o valor de  $p < 0,05$ .

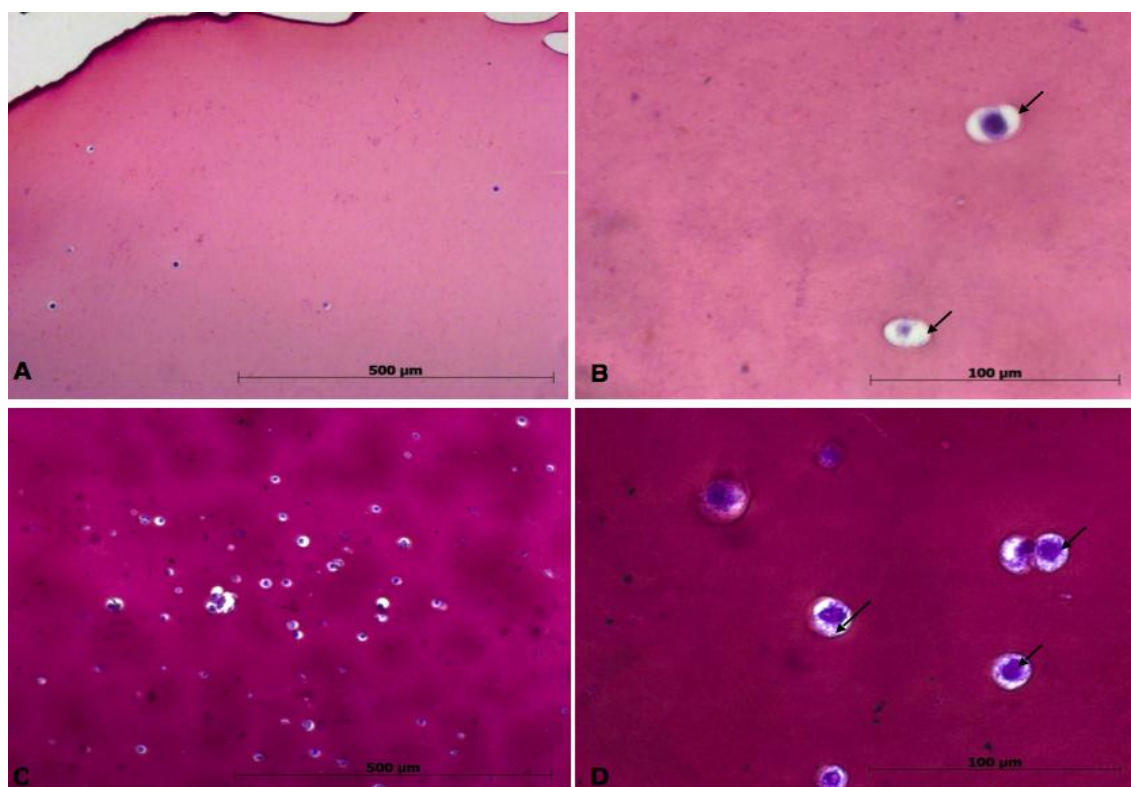


Figura 6. Microscopia óptica das microcápsulas de alginato com células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina (CTM<sub>MS</sub>) aos 7 e 21 dias coradas com azul de toluidina, objetiva de 10 e 40x. (A) 7 dias, observa-se formato arredondado das células, as setas indicam a presença das lacunas; (B) 21 dias, observa-se maior número de células, as setas evidenciam a deposição da matriz de proteoglicanos.

Tabela 1. Valor médio da expressão dos marcadores CD44, CD 90, CD105 e MHC II utilizados na análise da superfície das células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina utilizando a citometria de fluxo na 1<sup>a</sup> passagem (P1) e 3<sup>a</sup> passagem (P3)

|               | P1            | P3             |
|---------------|---------------|----------------|
| CD44          | 55.3% ± 12.31 | 38.43% ± 6.12  |
| CD90          | 92.49% ± 9.81 | 95.29% ± 5.19  |
| CD105         | 90.25% ± 8.00 | 87.50% ± 11.01 |
| MHC Classe II | 1.00% ± 5.23  | 2.50% ± 1.50   |

Tabela 2. Número de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial vivas totais até os 28 dias, em todos os grupos (10<sup>4</sup>; 20<sup>4</sup>; 50<sup>4</sup>; 100<sup>5</sup> e 200<sup>5</sup> células). As letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre momentos no mesmo grupo e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre grupos no mesmo momento, diferença estatística considerada quando o valor de p < 0,05.

| Momentos Grupos | Dia 0              | Dia 7             | Dia 14            | Dia 21            | Dia 28             |
|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 10 mil          | 10.000 ± 1,00 a A  | 19.000 ± 2,86 b A | 46.665 ± 10,4 c A | 57.500 ± 5,00 d A | 63.333 ± 3,88 d A  |
| 20 mil          | 20.000 ± 1,00 a B  | 12.666 ± 1,44 b B | 23.333 ± 13,2 a A | 18.889 ± 1,44 a B | 20.555 ± 1,44 a B  |
| 50 mil          | 50.000 ± 1,00 a C  | 55.833 ± 3,81 b C | 33.333 ± 8,03 c A | 36.666 ± 1,44 d C | 37.500 ± 2,50 d C  |
| 100 mil         | 100.000 ± 1,00 a D | 40.000 ± 9,01 b D | 85.000 ± 2,50 c B | 94.166 ± 3,82 a D | 115.000 ± 5,00 d D |
| 200 mil         | 200.000 ± 1,00 a E | 83.333 ± 6,30 b E | 75.833 ± 29,8 c B | 83.333 ± 27,5 b D | 93.333 ± 27,5 b E  |

**Artigo científico a ser submetido ao periódico Stem Cell Research and Therapy**

**2.2. Avaliação da migração das células tronco mesenquimais inseridas em microcápsulas de hidrogel de alginato em equinos**

**Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses**

(sob as normas vigentes disponível

<http://stemcellres.biomedcentral.com/submission.guidelines/preparing-your-manuscript/research>)

VITOR HUGO DOS SANTOS<sup>1</sup>; JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER<sup>1</sup>; JAQUELINE BRANDÃO DE SOUZA<sup>1</sup>; BETSABÉIA HELOISA GENTILHA MILANI<sup>1</sup>; CAIO NUNES DE BARROS<sup>1</sup>; MARJORIE GOLIM ASSIS<sup>2</sup>, ELENICE DEFFUNE<sup>3</sup>, ANA LIZ GARCIA ALVES<sup>4\*</sup>.

<sup>1</sup>Alunos de pós-graduação, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Botucatu, SP- Brasil (a: vitor.hugo@fmvz.unesp.br, b: joao\_pfeifer@hotmail.com, c: jaquelinebrandao.s@hotmail.com, d: betinhamilani@gmail.com; caionbarros@gmail.com). Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica (Mestrado Profissional) do Hemocentro da UNESP - Botucatu, SP - Brasil (marjoriegolim@gmail.com). Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Divisão Hemocentro, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP - Botucatu, SP - Brasil (ed12@fmb.unesp.br). Distrito de Rubião Junior s/nº - Divisão Hemocentro - Laboratório de Engenharia Celular, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Botucatu, SP- Brasil (anaalves@fmvz.unesp.br). Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

\*autor para correspondência: anaalves@fmvz.unesp.br

## RESUMO

**Introdução:** A osteoartrite é caracterizada clinicamente pela dor e diminuição progressiva da mobilidade articular. O implante de células tronco mesenquimais (CTMs) tem mostrado resultados promissores para seu tratamento. O desafio da técnica é manter as células no sítio de ação para aumentar seu potencial terapêutico. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da marcação do nanocristal Qtracker® 655 em CTMs de membrana sinovial (MS) alogênicas, encapsuladas em hidrogel de alginato, avaliando a migração dessas células na articulação sinovial.

**Métodos:** Cinco equinos foram submetidos a cirurgia artroscópica (D0), onde foi induzida lesão condral de 15mm de diâmetro no osso carpo radial de ambos os membros torácicos. As 10 articulações radio cárpicas foram divididas em dois grupos (GA, GB). O defeito condral foi submetido ao tratamento conforme o grupo: GA recebeu CTM<sub>MS</sub> livres marcadas e GB recebeu microcápsulas com CTM<sub>MS</sub> marcadas. A marcação ocorreu uma hora antes da indução da lesão. As células previamente cultivadas foram incubadas com nanocristais Qtracker 655 por 60 minutos. Foram realizados testes prévios de viabilidade celular pela técnica do Azul de Trypan. Sete dias após a indução da lesão e implante de células marcadas, foram realizadas biópsias do local da lesão em dois animais, sendo retirados fragmentos de membrana sinovial e cápsula articular, que foram congelados e posteriormente processados em cortes histológicos para visualização em microscópio de fluorescência. O líquido sinovial dos outros três animais foi analisado por citometria de fluxo em três momentos, 3, 7 e 21 dias após a aplicação.

**Resultados:** A marcação celular com os nanocristais possibilitou a visibilização das células em cartilagem, membrana sinovial, líquido sinovial e cápsula articular. Observou-se presença evidente de células marcadas na membrana sinovial, possivelmente pela quimiotaxia a inflamação, sendo escassa a observação destas células no local da lesão.

**Conclusão:** O Qtracker® 655 se mostrou seguro na marcação das CTM<sub>MS</sub>, não causando queda na viabilidade após um período de 24 horas in vitro. As células migraram expressivamente para membrana sinovial em ambos os tratamentos, sendo a migração mais acentuada no grupo das células livres.

**Palavras-chave:** cavalo; cartilagem; pontos quânticos.

## ABSTRACT

**Background:** Osteoarthritis is characterized clinically by pain and progressive decrease in joint mobility. The implantation of mesenchymal stem cells (MSCs) has shown promising results for its treatment. The challenge of the technique is to keep the cells at the site of action to increase their therapeutic potential. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the Qtracker® 655 nanocrystal marking on allogeneic synovial membrane (SM) MSC, encapsulated in alginate hydrogel, evaluating the migration of these cells in the synovial joint.

**Methods:** Five horses were submitted to arthroscopic surgery (D0), where a 15-mm diameter chondral lesion was induced in the radial carpal bone of both thoracic limbs. The 10 radiopharmaceutical joints were divided into two groups (GA, GB). The chondral defect was treated according to the group: GA received free labeled MSC<sub>SM</sub> and GB received labeled MSC<sub>SM</sub> microcapsules. The marking occurred one hour before the induction of the lesion. The cells previously cultured were incubated with Qtracker 655 nanocrystals for 60 minutes. Previous tests of cellular viability were performed using the Trypan Blue technique. Seven days after lesion induction and implantation of labeled cells, biopsies of the lesion site were performed in two animals, and fragments of synovial membrane and joint capsule were collected, which were frozen and later processed in histological sections for fluorescence microscopy visualization. The synovial fluid of the other three animals was analyzed by flow cytometry at three times, 3, 7 and 21 days after application.

**Results:** The cellular marking with the nanocrystals allowed the visualization of the cells in cartilage, synovial membrane, synovial fluid and articular capsule. There was an evident presence of marked cells in the synovial membrane, possibly by chemotaxis and inflammation, and the observation of these cells at the lesion site was scarce.

**Conclusion:** Qtracker® 655 was shown to be safe in MSC<sub>SM</sub> labeling, not causing a fall in viability after a 24-hour period in vitro. The cells migrated expressively to synovial membrane in both treatments, being the migration more accentuated in the group of free cells.

**Keywords:** horse; cartilage; quantum dots; scaffold.

## Introdução

A osteoartrite (OA) é uma doença articular degenerativa, comum em equinos atletas. Ocasionalmente por traumas excessivos e recorrentes durante as atividades esportivas, acomete principalmente a cartilagem articular e posteriormente toda articulação, incluindo o osso, cápsula, membrana sinovial, ligamentos e tecidos periarticulares [1]. A OA apresenta-se como uma das maiores causas de claudicação em equinos, sendo uma enfermidade incapacitante e de tratamento complexo, principalmente por apresentar gatilhos multifatoriais [1, 2]. A comunidade científica continuamente pesquisa diferentes terapias e novas abordagens de tratamento para a OA, na tentativa de restaurar as funções e componentes estruturais da cartilagem articular. Recentemente, resultados positivos foram obtidos em estudos *in vivo*, produzindo tecido semelhante à cartilagem hialina e diminuindo a formação da fibrocartilagem [3, 4].

As Células Tronco Mesenquimais (CTM) representam uma importante opção no tratamento da OA por apresentarem notável potencial terapêutico e grande capacidade de regular a inflamação inicial [3, 5]. Para que haja bons resultados na reparação e regeneração é necessária uma fonte celular adequada e facilmente acessível, com grande capacidade de expansão e com potencial de diferenciação, principalmente condrogênica [6].

A literatura afirma que as CTMs tem capacidade de modular a função do sistema imune adaptativo, como os linfócitos T e B, estimular a expressão de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-1ra, reduzindo a inflamação [7]. Acredita-se que algumas citocinas próinflamatórias, como o INF- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$  e IL-6 são capazes de aumentar o potencial imunomodulador das CTMs [8]. O potencial regenerativo das CTMs foi avaliado infiltrando CTMs intra-articular em cavalos com osteoartrite induzida e pré-tratadas com microfraturas. Embora não tenham observados melhora clínica, relataram um tecido de reparação de melhor qualidade, apresentando-se mais denso e firme, com maior quantidade de agregan quando comparado ao grupo controle, sem aplicação de CTMs [9].

Um desafio que necessita ser superado é o método de aplicação das CTMs, além da manutenção destas células no sítio de ação, de maneira a aumentar seu potencial terapêutico. Inúmeras pesquisas têm sido realizadas no

intuito de garantir o melhor desempenho das CTM no local da lesão [10, 11, 12, 13]. A utilização do arcabouço tridimensional como o hidrogel de alginato (HA) é um método indicado para os condrócitos, pois proporciona características ideais evitando a desdiferenciação e também favorece a permanência das CTM no local da lesão, evitando que as células migrem no organismo do animal [11]. A utilização de alginato de sódio como arcabouço para as CTMs, possibilitou a proliferação celular, manutenção da viabilidade e produção de moléculas específicas da cartilagem [10, 13].

Estudos avaliando a migração das CTMs na articulação acometida por OA são escassos. Sabe-se que a habilidade de atração destas células ao foco de lesão se deve aos mecanismos inflamatórios envolvendo a produção de moléculas, incluindo proteínas com ação de adesão entre as células, atuando no tropismo das CTMs ao local inflamado [14].

A marcação celular com pontos quânticos (“Quantum Dots” ou QDs) é uma opção metodológica de avaliação das CTMs após o implante [15]. Estes pontos são nanocristais semicondutores caracterizados por alta fotoestabilidade e excitação de um único comprimento de onda [16]. A interiorização da fluorescência é realizada de forma passiva, mediada por endocitose no citoplasma das células [17], e é descrito que a fluorescência pode permanecer ativa por pelo menos quatro gerações celulares, sendo que algumas células se mantêm marcadas por até oito semanas [18]. Em 2014, foi utilizado os nanocristais fluorescentes Q-Tracker para a identificação das CTMs derivadas do tecido adiposo implantadas em lesões tendíneas de equinos, observando a presença das mesmas no local do implante sete dias após o tratamento e no sangue periférico após 72 horas de aplicação [22].

As vantagens da utilização dos pontos quânticos são: sua citocompatibilidade, sua resistência às degradações químicas e metabólicas, sua elevada fotoestabilidade e efeitos citotóxicos mínimos. Além disso, os pontos quânticos apresentam tais efeitos citotóxicos dose-dependentes, o que permite que a viabilidade celular possa ser otimizada. Portanto, a marcação das CTMs é limitada por baixas concentrações de QDs [20].

Estudos realizando a marcação das CTM in vitro com os QDs, não observaram alterações da viabilidade celular e concluíram que esse tipo de marcação não possui efeitos deletérios importantes para a célula em estudo

[18, 21]. CTMs derivadas do tecido adiposo marcadas com QDs foram encontradas na corrente sanguínea após uma semana do tratamento de tendinite experimental em equinos, demonstrando que as células migram do tecido tendíneo para a circulação sanguínea, mesmo quando injetadas no local da lesão [21].

Este trabalho parte da hipótese de que as CTM<sub>MS</sub> migrem para o local da lesão na cartilagem articular. Assim, avaliamos a eficácia da marcação e a migração das CTM<sub>MS</sub> alogênicas encapsuladas e não encapsuladas em hidrogel de alginato, utilizando o nanocrystal (Qtracker® 655 Cell Labeling Kit, Invitrogen, USA).

## **Material e métodos**

O experimento foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu (Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária), no Laboratório de Terapia Celular, FMVZ, Unesp Campus de Botucatu), em 2016. Foi aprovado pela Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, sob protocolo número 052/2016.

### **Coleta da membrana sinovial (MS) e cultivo**

As membranas sinoviais foram coletadas a partir de artroscopias<sup>a</sup> realizadas em equinos atendidos pelo serviço de Cirurgia de Grandes Animais da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho (UNESP), campus Botucatu/SP, no período de abril a setembro de 2016. Como doadores de membrana sinovial, foram utilizados 4 equinos da raça Quarto de Milha, sendo dois machos e duas fêmeas com idade média de  $4 \pm 0,40$  anos, e pesando em média  $400 \pm 5,77$  kg, apresentando enfermidades articulares (osteoartrite). Destes animais foram obtidos fragmentos de membrana sinovial (MS) das articulações metatarsofalangeana direita e esquerda, com auxílio da pinça Rongeur Ferris Smith. É importante salientar que esses animais foram apenas

doadores da membrana sinovial, já que o experimento utilizou células alogênicas.

A amostra obtida de cada coleta foi submetida a sucessivas lavagens com DMEM Knockout®<sup>b</sup>, seguida de separação mecânica por meio de lâmina de bisturi e ação digestiva com solução de colagenase tipo I<sup>c</sup> (2mg/mL) diluída em meio DMEM Knockout®. A solução foi homogeneizada e levada à estufa a 37° C e 5,0% de CO<sub>2</sub>, “overnight”, e após este período foi adicionado o mesmo volume de meio DMEM Knockout com 10% de soro fetal bovino (SFB)<sup>d</sup> aquecido. Este material foi centrifugado<sup>e</sup> a 628G durante 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o meio de cultivo foi adicionado para posterior centrifugação. Novamente removeu-se o sobrenadante e adicionou-se meio de cultivo. As CTM MS foram cultivadas em frascos de cultura de 75cm<sup>2</sup> a uma concentração de  $10 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> utilizando o meio de cultura DMEM Knockout® 10% de SFB. Os frascos foram mantidos em estufa com ambiente controlado a 37°C e 5,0% de CO<sub>2</sub>.

### **Caracterização imunofenotípica – citometria de fluxo**

As células progenitoras foram diferenciadas nas linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênica demonstrando sua multipotencialidade. Todas as diferenciações foram realizadas em triplicata para cada animal, sendo que uma amostra adicional por animal foi mantida em meio de cultura basal durante 14 dias (como controle da diferenciação adipogênica e osteogênica) e por 21 dias (como controle da diferenciação condrogênica).

Para a diferenciação adipogênica, as células provenientes da terceira passagem foram incubadas a uma densidade de 20.000 cells/cm<sup>2</sup> em uma placa de cultura de 24 poços e cultivadas em meio de cultura adipogênico durante 14 dias. O meio de cultura (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, USA) foi trocado a cada três dias. Posteriormente as células foram fixadas com solução de formoldeído a 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com PBS sendo coradas com *Oil Red O* (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Para realizar a caracterização osteogênica das CTM<sub>MS</sub>, as células progenitoras da terceira passagem foram incubadas a uma densidade de 20,000 cells/cm<sup>2</sup> em placa de cultura de 24 poços e mantidas em condições

osteogênicas durante 14 dias, o meio (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, USA) foi trocado a cada três dias. As células foram fixadas em solução de formoldeído 10% durante 10 minutos, seguido de lavagens com água estéril sendo corada com *Alizarin Red* (Gibco, Grand Island, NY, USA).

A condrogênese foi induzida em um pellet de micromassa preparado com  $1 \times 10^6$  células alocadas em um tubo cônico de 15 mL de polipropileno. O pellet foi cultivado a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em 2 mL de meio de cultivo condrogênico (STEMPRO®, Gibco, Grand Island, NY, USA), o meio foi trocado a cada três dias. Após o período de três semanas de incubação, o *pellet* foi fixado em solução de formaldeído 10% durante 24 horas a temperatura ambiente, este foi parafinizado e posteriormente cortado em seções de 5 µm, sendo corado com hematoxilina para a histologia geral e com *Alcian blue* para detectar os proteoglicanos sulfatados.

A seleção dos anticorpos foi parcialmente baseado em estudo prévio sobre o conhecimento das pesquisas em CTMs de equinos (Carvalho et al., 2013). As células progenitoras deveriam expressar os marcadores CD29, CD44, e CD90 e não expressar os marcadores CD14, CD79, e MHC-II (De Schauwer *et al.*, 2011). A citometria de fluxo foi realizada no aparelho FACSCalibur (BD, San Jose, CA, USA), da primeira e terceira passagem, utilizando o anticorpo monoclonal *mouse anti-rat* CD90-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) e *mouse anti-human* CD105-FITC mAb (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) para avaliar a expressão interespecies. O anticorpo monoclonal específico *mouse anti-horse* CD44 (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) e *mouse anti-horse* MHC Class II (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK), foram marcados com o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgG-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

### **Indução da lesão**

Para indução da lesão, foram utilizados cinco equinos com média de idade  $4,5 \pm 0,4$  anos de idade, sendo três machos e duas fêmeas, mestiços, clinicamente hígidos, sem alterações no sistema locomotor. A confirmação do estado de hígidez inicial, para a inclusão no grupo experimental, foi realizada

por meio de exame físico (mensuração de parâmetros vitais e exame do sistema locomotor).

A indução da lesão experimental foi estabelecida como tempo zero do experimento (D0), nos dois grupos, A e B, sendo o Grupo A o que recebeu as CTM<sub>MS</sub> e o grupo B o que recebeu microcápsulas com CTM<sub>MS</sub>. O mesmo animal recebeu os dois tratamentos, sendo cada articulação um tratamento, totalizando cinco articulações por tratamento. Para criar a lesão os animais foram submetidas a cirurgia artroscópica da articulação radio cárpica e foram utilizadas lâminas abrasivas motorizadas (broca circular Razeq 2,9/5,5) e pinças artroscópicas, com desgaste controlado, suficiente para obter a dimensão da lesão condral desejada. As lesões circulares foram padronizadas em aproximadamente 10 mm de diâmetro no osso carpo radial, mensuradas com o auxílio do instrumental artroscópico e induzidas retirando a cartilagem hialina e toda a cartilagem calcificada, porém, não havendo abrasão, perfuração ou sangramento do osso subcondral [23, 24]. (Fig 1).

### **Marcação celular com nanocristais**

A marcação das células ocorreu uma hora antes da indução da lesão. As células previamente cultivadas foram incubadas com nanomarcadores cristais Qtracker<sup>®f</sup>. Para isto seguiu-se o protocolo preconizado pelo fabricante. Desta forma, para que fosse obtida dosagem de 10 nM de Qdots, acrescentou-se 1 µL da solução A a 1 µL da solução B para cada um milhão de células a serem marcadas. À solução resultante, após 5 minutos a temperatura ambiente (25°C), foi acrescida de 200 µL de meio DMEM e então a solução resultante colocada 30 segundos no vórtex, para agitação e homogeneização dos componentes. Esta solução foi depositada sobre o pellet celular previamente obtido após o cultivo celular e levado para a estufa a 37°C por um período de 45 a 60 minutos, sempre protegido da luminosidade, com o tubo revestido e luz apagada.

As células foram lavadas duas vezes em meio DMEM, e parte delas foi depositada em câmara de Neubauer, sendo levadas ao microscópio de fluorescência, confirmando a sua adequada marcação (Fig 2).

### **Viabilidade das CTMs marcadas**

Para avaliação da viabilidade celular foi realizada a técnica de exclusão do Azul de Trypan. Para isso foi adicionado 20 µL de solução de Azul de Trypan<sup>9</sup> à 20 µL da amostra a ser avaliada. O número de células coradas (mortas) e não coradas (vivas) pela metodologia foi contado e realizado o percentual de células viáveis. Essa viabilidade foi realizada nos momentos pré-implante e 24 horas após a marcação.

### **Implante das CTMs**

O implante das células marcadas de ambos os grupos A e B, foi realizado no D0, durante o ato cirúrgico da indução da lesão. As células marcadas do grupo A foram implantadas em um dos membros de cada animal, acrescidas de 5 mL de PBS. As células do grupo B foram implantadas no membro contralateral do mesmo animal com auxílio de uma sonda levine 20 introduzida pelo canal do artroscópio. Os membros que foram definidos como grupo livre (GA) e grupo microcápsulas (GB) foram escolhidos aleatoriamente no momento do tratamento.

### **Biópsia**

Transcorridos sete dias após a indução da lesão e implante de células marcadas (D7), foram realizadas as biópsias das articulações de ambos os grupos (GA e GB). Para isso dois animais foram sacrificados. Foram realizadas incisões de 6 cm no eixo longitudinal da região dorsal do carpo para a artrotomia. Amostras de aproximadamente 1cm foram retiradas exatamente no local onde foram padronizadas as lesões. Foram coletadas outras amostras da membrana sinovial e da cápsula articular. Estas amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior processamento.

## **Histopatológico e microscopia de fluorescência**

Os fragmentos obtidos nas biópsias em D7 foram congelados em nitrogênio líquido, onde permaneceram por um período de 2 horas. Para a realização das análises histopatológicas, cortes de 7µm de espessura foram obtidos em criostato<sup>h</sup> a partir das amostras congeladas e distendidos em lâminas histológicas, perfazendo um total de 5 cortes por lâmina, sendo 3 lâminas de cada membro. Esses cortes foram analisados, sem nenhum tipo de coloração, em microscópio de fluorescência, nos filtros vermelho e azul. As lâminas, após o corte, foram mantidas em temperatura de -20°C e reavaliadas após 7 dias.

## **Citometria de fluxo**

O líquido sinovial dos animais foi coletado da articulação radio-cárpica com auxílio de uma agulha 21G e seringa de 10mL, em três momentos, sendo eles: 3, 7 e 21 dias após a aplicação. As amostras foram submetidas a lise<sup>i</sup> de hemácias na proporção de 1:10 de amostra, incubadas por 15 minutos protegidas da luz e centrifugadas a 251G por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e foram adicionados 500uL de isoton para o transporte até o laboratório onde foi realizado a citometria de fluxo utilizando o citometro<sup>j</sup> e software Cell Quest Pro. Todas as análises foram realizadas utilizando controle negativo e positivo, adquirindo 10.000 eventos e avaliada a fluorescência do Qtracker 655 em canal FL4.

## **Resultados**

As colônias de células do presente estudo apresentaram aderência ao plástico nas primeiras 36 horas de cultivo (Figura 1A). Aos 15 dias, as colônias das células apresentavam-se semelhantes a fibroblastos em todos os cultivos (Figura 1B). O cultivo celular foi mantido até a terceira passagem utilizando amostras de quatro animais. A capacidade das CTM<sub>MS</sub> de diferenciação em trilhaagem foi confirmada utilizando os meios de diferenciação comercial para humanos (Gibco, Grand Island, NY, USA).

A coloração com *Oil red* marcou as gotículas de lipídeos dentro das células sobre o meio de indução adipogênico. A diferenciação osteogênica foi confirmada com a coloração em *Van Kossa* das células diferenciadas, evidenciando o depósito de cálcio formado durante a diferenciação osteogênica. As culturas controles não exibiram diferenciação. O potencial condrogênico foi avaliado utilizando o sistema de cultura em forma de pellet. As células submetidas à diferenciação condrogênica mostraram-se coradas com *Safranin O* evidenciando a matriz extracelular condral durante a diferenciação em cartilagem.

A análise pela citometria de fluxo revelou a expressão pelo CD90 e CD105 em todas as passagens testadas (1<sup>a</sup> a 3<sup>a</sup> passagens), determinando a reação cruzada inter espécie entre o rato e o equino, e entre humano e equino, respectivamente. O CD44 também reagiu com as CTM<sub>MS</sub> em todas as passagens. Como esperado, não houve reação do marcador MHC Classe II nas CTM<sub>MS</sub> (Tab. 1).

No presente estudo a marcação com o nanocrystal possibilitou a identificação das células nas estruturas que compõem a articulação dos equinos, como cartilagem, membrana sinovial, líquido sinovial e cápsula articular.

As CTM<sub>MS</sub> tiveram predileção pela membrana sinovial, porém foram encontradas CTMs no líquido sinovial, na cartilagem e na cápsula articular por um período de sete dias, comprovado através da detecção da fluorescência emitida pelos QDs (Fig 3). Em ambos os grupos não foi possível a visibilização das CTM<sub>MS</sub> marcadas próximas ao local da lesão.

A citometria de fluxo do líquido sinovial também foi utilizada para avaliar a migração das CTM<sub>MS</sub> (Fig 4.), onde observamos que as células sobreviveram e permaneceram marcadas por até 21 dias.

As células livres marcadas com o QDs estavam discretamente presentes até 21 dias no líquido sinovial. Na primeira avaliação com 3 dias foi possível observar percentual de 0,32%, ao passar dos dias ocorreu um declínio, apresentando 0,07% aos 7 dias e 0,04% aos 21 dias. Este declínio provavelmente ocorreu pela migração das células para a membrana sinovial, cartilagem e circulação sanguínea.

As CTM<sub>MS</sub> marcadas inseridas em microcápsulas estavam escassas no líquido sinovial, podendo estar relacionada com a saída de pequena quantidade de CTMs pelos poros das microcápsulas, pois as CTMs de equinos apresentam diâmetro médio de 19,8 e 20,4  $\mu\text{m}$ , derivadas de medula óssea e cordão umbilical, respectivamente [44].

Dessa maneira, a utilização de implantes de microcápsulas de CTMs aplicados via intra-articular podem ter tido maior ação local e terem migrado em pequena quantidade para a circulação corpórea, justificando o baixo número de células marcadas no líquido sinovial no grupo das microcápsulas nos três momentos, 3 dias 0,01%, 7 dias 0,02% e 21 dias as células se mantiveram com 0,01%.

Com este resultado, podemos inferir que as células que não migraram das microcápsulas, foram liberadas juntamente com a degradação da matriz de hidrogel que ocorre por volta de 8 a 10 semanas após o implante, confirmando a pequena quantidade de células encontradas no líquido sinovial até 21 dias, tempo que a matriz encontra-se intacta.

Ao analisar a viabilidade das células, estas não apresentaram alterações antes e após a realização do implante tecidual com o nanocristal. A viabilidade obtida previamente à marcação celular foi de  $90 \pm 2 \%$  e após a sua incubação (24 horas) com o nanocristal Qtracker 655 continuou com  $90 \pm 2,5\%$ .

## **Discussão**

As CTMs vem sendo utilizadas no tratamento de osteoartrite com resultados interessantes, uma vez que estas possuem características imunomodulatórias e regenerativas que as fazem um tratamento biológico efetivo. Embora o exato mecanismo da migração das CTMs não esteja bem delineado, está claro que estas células secretam um amplo espectro de moléculas bioativas com atividades imunoregulatórias e regenerativas [6, 7, 8, 26, 27, 28].

Alguns autores estudaram o comportamento das células diante das diferentes metodologias de aplicação, visando esclarecer a permanência destas no local da lesão, bem como sua diferenciação e viabilidade frente a

estes métodos. A aplicação intralesional garante a fixação direta das CTMs no local da lesão condral, e apesar de ser um tratamento invasivo, possui a certeza de ação e localização que a aplicação intra-articular não apresenta [28, 29].

Frente a essas indagações optou-se por utilizar os nanocristais, considerando que esses marcadores são adequados para a visualização das células tronco em razão da sua fotoestabilidade, longevidade e fácil visualização em microscopia de fluorescência em virtude de seu comprimento de onda ser maior (655 nanômetros) [30], razão pela qual se optou por utilizar o nanocristal Qtracker 655 no presente estudo. Até o nosso conhecimento não foram relatados o uso deste tipo de nanocristal para marcação de CTM inserida em articulação equina, o que torna inédito o resultado obtido neste trabalho.

A intensa marcação do grupo das células livres na membrana sinovial, provavelmente ocorreu em função da quimiotaxia à inflamação [6, 9]. A aderência pode causar efeitos adversos, como a proliferação sinovial [6], corroborando com os dados anteriormente descritos [8], o que evidencia a capacidade de tropismo das CTM para os locais de lesão na cartilagem. À semelhança de nosso estudo, outros autores, observaram uma expressiva quantidade de CTMs na membrana sinovial e levantaram uma interessante questão sobre a concentração de células aplicadas, bem como a possibilidade destas células ficarem aderidas à membrana sinovial, podendo estimular uma proliferação sinovial exacerbada [35]. Resultados semelhantes foram relatados encontrando grande quantidade de CTM aderidas a membrana sinovial quando aplicadas em lesões induzidas em ratos [36, 37, 38]. Este autores utilizaram uma marcação com óxido de ferro para avaliação com ressonância magnética nuclear, encontrando as células marcadas no líquido sinovial e osso subcondral, mas não na lesão [32].

Diferentemente do observado em nosso estudo, alguns autores relatam a visualização das CTMs no tecido de reparação, com grande concentração no centro do defeito e na margem subcondral [6]. Em outro estudo, a utilização de células GFP (Green Fluorescent Protein) positivas, possibilitou a detecção das células no local da lesão por 2 semanas, após aplicação intra articular em articulações lesadas [33]. Autores obtiveram sucesso na identificação de um número expressivo de células na lesão, em estudo com OA induzida em

caprinos, utilizando células positivas para Green Protein Fluorescent (GFP) [25].

A não detecção de CTMs no local da lesão, quando implantadas na cartilagem e tendão lesados, provavelmente ocorre porque as células migram para circulação sanguínea [39]. Realizando uma analogia com os fármacos, eles residem curto tempo na articulação devido à rápida absorção pela circulação, sendo eliminados pela drenagem linfática [42]. Este fato ocorre porque a articulação está em equilíbrio direto com a circulação corpórea, possibilitando a migração dessas células para o restante do corpo do animal [43]. A migração para a circulação foi comprovada em outro estudo do grupo, ao encontrar células marcadas no sangue periférico 7 dias após aplicação no tendão flexor digital de equinos [22].

Alguns autores observaram resultados semelhantes na sobrevivência das células. Quando utilizaram CTMs no tratamento de tendinites em equinos, estas sobreviveram por mais de 4 semanas em tendões [40, 41]. Outros estudos observaram que as CTMs humanas marcadas com "*DiD fluorescent dye*" aplicadas intra-articular em ratos, permanecem por até 10 semanas na articulação [31]. Utilizando coelhos como modelo experimental, as CTMs marcadas com óxido de ferro aplicadas intra articular, foram observadas por 12 semanas e as células estavam presentes no líquido sinovial na bolsa suprapatelar e no osso subcondral do fêmur [32].

A tecnologia utilizada no presente estudo é atraente devido a simplicidade da marcação e indiscutível detecção do sinal fluorescente emitido, que não se confunde com a autofluorescência do tecido. CTMs humanas foram transplantadas por via intracoronária em infarto agudo do miocárdio em suínos, estas foram encontradas no tecido cardíaco ao redor das áreas de infarto, mostrando a eficácia do marcador para rastreamento de células mesenquimais in vivo [34].

Quando comparamos as CTMs de equinos com humanos e ratos, podemos observar diferença entre o tamanho que varia de 12-15µm [45]. O diâmetro das células juntamente com a porosidade das microcápsulas de ±20 µm de diâmetro por poro, confirmado pela microscopia eletrônica de varredura (Fig 5), possibilitou a migração destas células para o exterior das

microcápsulas, sendo encontradas em pequena quantidade na membrana sinovial.

Até o nosso conhecimento não foi possível encontrar nenhum trabalho que avaliou a migração das CTMs em microcápsulas de alginato, desta maneira podemos inferir o ineditismo do presente estudo. Ao utilizar ácido poliglicólico e polilático como scaffold, autores encontraram porosidade de 100 a 200 µm, possibilitando a migração das células para o exterior do scaffold. Utilizando a mesma metodologia as células estavam presentes dentro das microcápsulas 5 semanas após o tratamento e estas pareciam estar maduras e prolongadas através de poros na matriz polimérica [46, 47]. Esta porosidade é bem superior encontrada na presente pesquisa, possibilitando a passagem das células em grande quantidade [46].

Resultados semelhantes foram observados na viabilidade celular, em estudos *in vitro* durante 12 dias, as CTM não apresentavam diferença no comportamento, obtendo viabilidade mais alta com 98,1% células não marcadas e 97,9% nas marcadas [34]. A não identificação das alterações na viabilidade celular, permitiram constatar que é viável o uso de marcadores fluorescentes QDs a fim de rastrear o destino das células implantadas em tecidos com diversos graus de vascularização, sem comprometer a viabilidade celular e o potencial de diferenciação [19, 49, 50].

Autores relatam a inexistência de correlação entre a viabilidade celular e a dose de nanocristais QDs utilizada para a marcação [51]. Entretanto, os efeitos tóxicos dos QDs, foram observados quando utilizado o dobro da dose recomendada pelo fabricante, ocorrendo elevação da apoptose celular, sugerindo que as células após a marcação deverão ser utilizadas em até 24 horas [20].

## **Conclusão**

As CTM<sub>MS</sub> marcadas com o nanocristal Qtracker 655® não apresentaram queda em sua viabilidade nas análises *in vitro*, sugerindo que o nanocristal é seguro e não possui efeito tóxico às células. As CTM<sub>MS</sub> marcadas

migraram expressivamente para membrana sinovial em ambos os tratamentos, sendo esta migração mais acentuada no grupo das células livres.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer a CAPES por disponibilizar bolsa de estudos aos autores e todos que participaram para o desenvolvimento deste trabalho.

### **Disponibilidade de dados de suporte**

Não se aplica

### **Informações dos autores**

Não se aplica

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não tem conflito de interesses

### **Consentimento para publicação**

Não se aplica

### **Aprovação ética e consentimento para participação**

Os protocolos experimentais foram aprovados pela comissão de ética (Comissão de ética no uso de Animais) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP - FMVZ) com o número de protocolo 052/2016.

---

<sup>a</sup> Artroscope Karl Storz, videocâmera Endocan, NTSC, marca Karl Storz; <sup>b</sup> GIBCO – Invitrogen Cell Culture – EUA; <sup>c</sup> Collagenase, Type I, powder - Life Technologies – CANADA; <sup>d</sup> GIBCO – Invitrogen Cell Culture – EUA; <sup>e</sup> Centrifuge 5804r Eppendorf - Hamburg · Germany; <sup>f</sup> Cell Labeling Kit - Invitrogen – USA; <sup>g</sup> Trypan blue solution 0,4%- SIGMA ALDRICH - St. Louis; <sup>h</sup> MC 5000 Microtome cryostat – Italy; <sup>i</sup> MC 5000 Microtome cryostat – Italy; <sup>j</sup> FACS Lysing Solution - BD - San Jose, USA; <sup>k</sup> FACS Calibur BD - San Jose, USA.

## Referências

- [1] McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res* 2012;1(11):297–309.
- [2] Monteiro SO, Bettencourt EV, Lepage OM. Biologic Strategies for Intra-Articular Treatment and Cartilage Repair. *J Equine Vet Sci* 2015; 35(3):175-190.
- [3] Yamada ALM, Alvarenga ML, Brandão JS, Watanabe MJ, Rodrigues CA, Hussni CA, Alves ALG. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino. *Pesq. Vet. Bras* 2016;36(6):461-467.
- [4] Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JM. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol* 2015; 33(1):35-42.
- [5] Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 2009;27(5):307-14.
- [6] Lee JC, Min HJ, Park HJ, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Arthroscopy* 2013;29(6):1034-46.
- [7] Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012; 33(3):136-43.
- [8] Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noël D, Casteilla L, Jorgensen C, van den Berg W, Van Lent PL. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64(11):3604-13.
- [9] McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 2011; 27(11):1552-61.

- [10] Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 1):17-27.
- [11] Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3rd. ed. New York: Wiley Liss; 2001.
- [12] Nöth U, Steinert AF, Tuan RS. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(7):371-80.
- [13] Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Ferreira RR, Guilherme GRB, Moroz A, Deffune E. Cultura de Condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. *Acta Ortop Bras* 2009; 17(4):242-246.
- [14] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29(18):1971-9.
- [15] Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol 2006; 14(3):11.
- [16] Simberg D, Duza T, Park JH, Essler M, Pilch J, Zhang L, Derfus AM, Yang M, Hoffman RM, Bhatia S, Sailor MJ, Ruoslahti E. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(3):932-6.
- [17] Azzazy HM, Mansour MM, Kazmierczak SC. Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine. *Clin Chem* 2006; 52(7):1238-46.
- [18] Rosen AB, Kelly DJ, Schuldt AJ, Lu J, Potapova IA, Doronin SV, Robichaud KJ, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR, Gaudette GR, Cohen IS. Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis. *Stem Cells* 2007;25(8):2128-38.
- [19] Oliveira GK, Raiser AG, Olsson D, Salbego FZ, Martins DB, Dezengrine R, Santos Júnior EB, Rappeti J, Trindade LB, Tognoli GK, Pippi NL, Sausen L.

Células-tronco mononucleares autólogas e proteínas óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 2010; 62(1):72-79.

[20] Muller-Borer BJ, Collins MC, Gunst PR, Cascio WE, Kypson AP. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *J Nanobiotechnology* 2007; 5:1-9.

[21] Collins MC, Gunst PR, Cascio WE, Kypson AP, Muller-Borer BJ. Labeling and Imaging Mesenchymal Stem Cells with Quantum Dots. *Methods Mol Biol* 2012;906:199-210.

[22] Carvalho AM, Yamada AL, Golim MA, Álvarez LE, Hussni CA, Alves AL. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J* 2014;46(5):635-8.

[23] McIlwraith CW. From arthroscopy to gene therapy – 30 years of looking in joints. In: *Proceedings of the Annual Convention - American Association of Equine Practitioners* 2005; 51:65-113.

[24] McIlwraith CW, Fessler JF. Arthroscopy in the diagnosis of equine joint disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978;172:263-268.

[25] Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(12):3464-74.

[26] Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. *Am J Reprod Immunol* 2012;67(1):1-8.

[27] Lent PLV, Berg WBVD. Mesenchymal stem cell therapy in osteoarthritis: advanced tissue repair or intervention with smouldering synovial activation? *Arthritis Research & Therapy* 2013; 15:112.

[28] Yamada ALM, Carvalho AM, Moroz A, Deffune E, Watanabe MJ, Hussni CA, Rodrigues CA, Alves ALG. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects healing in horses. *Stem Cell Discovery* 2013; 3(4):218-225.

[29] Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiari M, Kon E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013;21(8):1717-29.

- [30] Kaur S, Singhal B. When nano meets stem: the impact of nanotechnology in stem cell biology. *J Biosci Bioeng* 2012;113(1):1-4.
- [31] Li M, Luo X, Xiaoteng LV, Liu V, Zhao G, Zhang G, Cao W, Wang R, Wang W. In vivo human adipose-derived mesenchymal stem cell tracking after intra-articular delivery in a rat osteoarthritis model. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 160.
- [32] Jing XH, Yang L, Duan XJ, et al. In vivo MR imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection. *Joint Bone Spine* 2008;75(4):432–438.
- [33] Mak J, Jablonski CL, Leonard CA, Dunn JF, Raharjo E, Matyas JR, Biernaskie J, Krawetz RJ. Intra-articular injection of synovial mesenchymal stem cells improves cartilage repair in a mouse injury model. *Scientific Reports* 2016; 6: 23076.
- [34] Oliveira DM, Almeida BO, Marti LC, Sibov TT, Pavon LF, Malheiros DMAC, Campos, AH. Labeling of human mesenchymal stem cells with quantum dots allows tracking of transplanted cells engrafted in infarcted pig hearts. *Einstein* 2009;7:284-289.
- [35] Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, Suzuki S, Ju YJ, Mochizuki T, Sekiya I. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* 2008;10(4):R84.
- [36] Mizuno K, Muneta T, Morito T, Ichinose S, Koga H, Nimura A, Mochizuki T, Sekiya I. Exogenous synovial stem cells adhere to defect of meniscus and differentiate into cartilage cells. *J Med Dent Sci* 2008;55(1):101-11.
- [37] Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 2009;27(4):878-87.
- [38] Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F, Fini M, Giardino R, Facchini A, Grigolo B. Intra-articular delivery of adipose derived

stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(1):22.

[39] Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal stem cells: Characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet. Clin. Equine* 2011;27:243-262.

[40] Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: Preliminary study. *Equine Vet J* 2008;40(2):178-81.

[41] Alves AG, Stewart AA, Dudhia J, Kasashima Y, Goodship AE, Smith RK. Cell-based therapies for tendon and ligament injuries. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011;27(2):315-33.

[42] Gerwin N, Hops C, Lucke A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58:226–242.

[43] Aryal X. Injections in the treatment of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15(4):609-26.

[44] Williams LB, Russell KA, Koenig JB, Koch TG. Aspiration, but not injection, decreases cultured equine mesenchymal stromal cell viability. *BMC Vet Res* 2016;12:45.

[45] Walker PA, Jimenez F, Gerber MH, et al. Effect of needle diameter and flow rate on rat and human mesenchymal stromal cell characterization and viability. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:989–97.

[46] Lavik EB, Klassen H, Warfvinge K, Langer R, Young MJ. Fabrication of degradable polymer scaffolds to direct the integration and differentiation of retinal progenitors. *Biomaterials* 2005;26(16):3187–3196.

[47] Warfvinge K, Kiilgaard JF, Lavik EB, Scherfig E, Langer R, Klassen HJ, Young MJ. Retinal progenitor cell xenografts to the pig retina: morphological integration and cytochemical differentiation. *Arch Ophthalmol* 2005;123(10):1385-93.

[48] Bentley G, Minas T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. *Br. Med. J., London* 2001; 10.

- [49] Ranjbarvaziri S, Kiani S, Akhlaghi A, Vosough A, Baharvand H, Aghdami N. Quantum dot labeling using positive charged peptides in human hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2011;32(22):5195-205.
- [50] Xiao Y, Forry SP, Gao X, Holbrook RD, Telford WG, Tona A. Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *J Nanobiotechnology* 2010; 8 (13):1-9.
- [51] Chang NK1, Jeong YY, Park JS, Jeong HS, Jang S, Jang MJ, Lee JH, Shin SS, Yoon W, Chung TW, Kang HK. Tracking of neural stem cells in rats with intracerebral hemorrhage by the use of 3T MRI. *Korean J Radiol* 2008;9(3):196-204.

**FIGURAS**

Fig 1 - Lesão com 15 mm de diâmetro realizada no osso carpo radial dos equinos por cirurgia artroscópica, com auxílio de lâminas abrasivas motorizadas (broca circular Razek 2,9/5,5) e pinças artroscópicas, com desgaste controlado, no momento pré-tratamento, de acordo com metodologia descrita por MCILWRAITH, 2005b; MCILWRAITH e FESSLER, 1978).

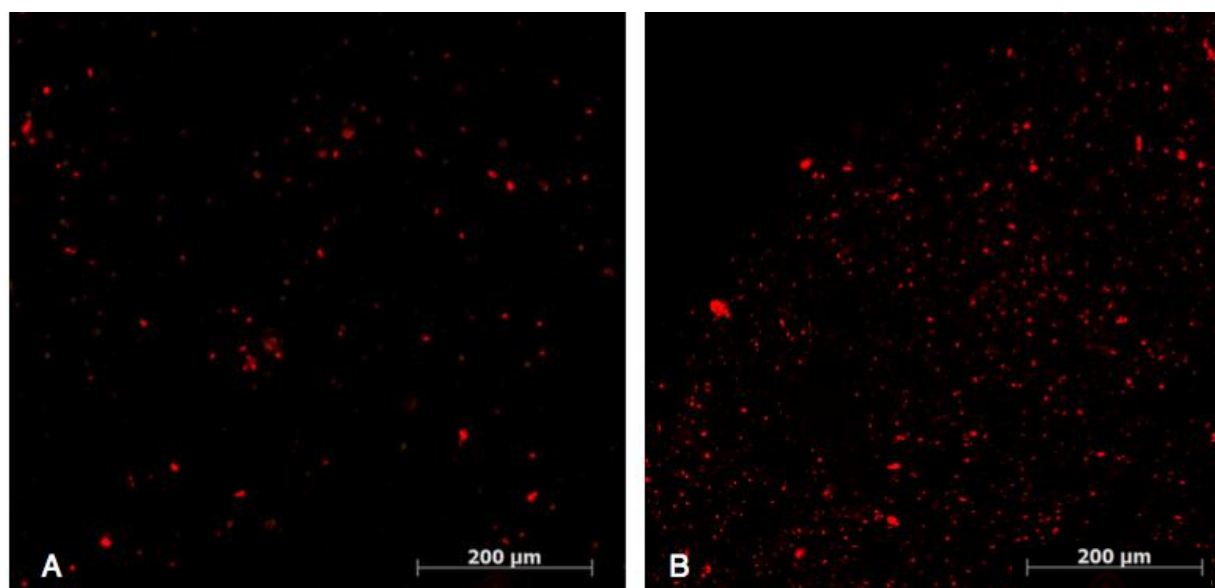


Fig 2 - Células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina (CTM<sub>MS</sub>) observadas em microscopia de fluorescência no filtro vermelho após a marcação com o Qtracker 655. A) CTM<sub>MS</sub> livres marcadas com Qtracker 655, objetiva de 10X; B) CTM<sub>MS</sub> encapsuladas em hidrogel de alginato, objetiva de 10X.

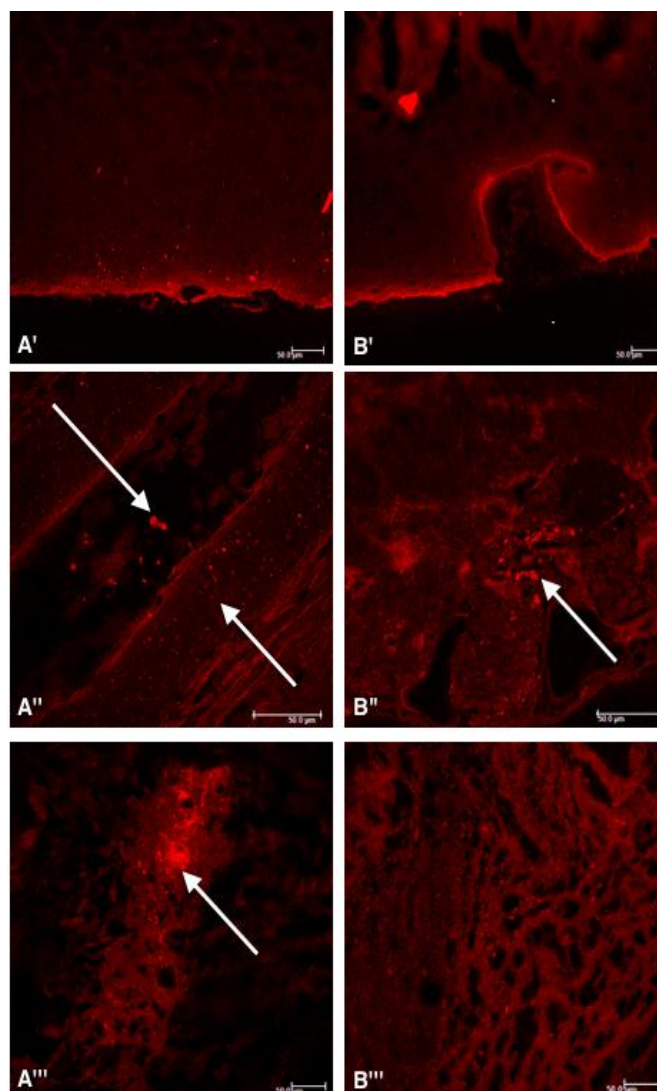


Fig 3 - Cartilagem articular, membrana sinovial e cápsula articular, após 7 dias da aplicação de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina (CTM<sub>MS</sub>) marcadas com Qtracker 655 livres (A) e em microcápsulas (B), observadas em microscopia de fluorescência no filtro vermelho. A') Cartilagem articular do grupo das CTMs livres, observa-se escassas células marcadas próxima a lesão, objetiva de 20X; A'') Membrana sinovial, as setas indicam a presença de células marcadas ao redor do vilo sinovial, adjacente e no local da lesão, objetiva de 20X. A''') Cápsula articular, as setas indicam a presença de células agrupadas, objetiva de 20x; B') Cartilagem articular do grupo das CTMs em microcápsulas, ausência de células marcadas próximas a lesão, objetiva de 20X, B'') Membrana sinovial, as setas indicam a presença das células marcadas adjacente ao local da lesão, objetiva de 20X; B''') Cápsula articular, observa-se pequena quantidade de células dispersas, objetiva de 20X.

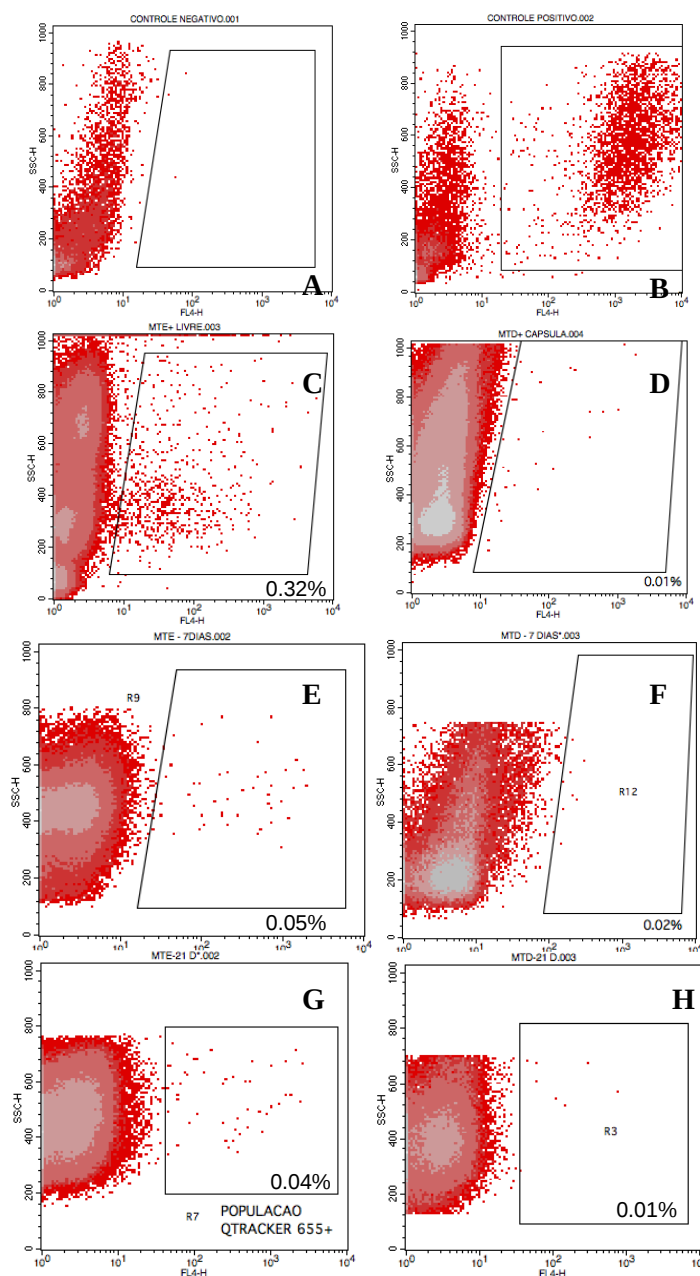


Fig 4 - Citometria de fluxo do líquido sinovial dos equinos dos grupos A (células livres) e B (microcápsulas) marcadas com Qtracker 655, avaliando 10 mil eventos, lidos em FL-4, utilizando o software Cell ProQuest BD nos dias 3, 7 e 21. (A) controle negativo, utilizando a autofluorescência das células; (B) controle positivo, células foram marcadas com o Qtracker 655; (C E G) grupo A aos 3 dias (0,32%), 7 dias (0,05%), 21 dias (0,04%); (D F H) grupo B aos 3 dias (0,01%), 7 dias (0,02%) e 21 dias (0,01%) respectivamente.

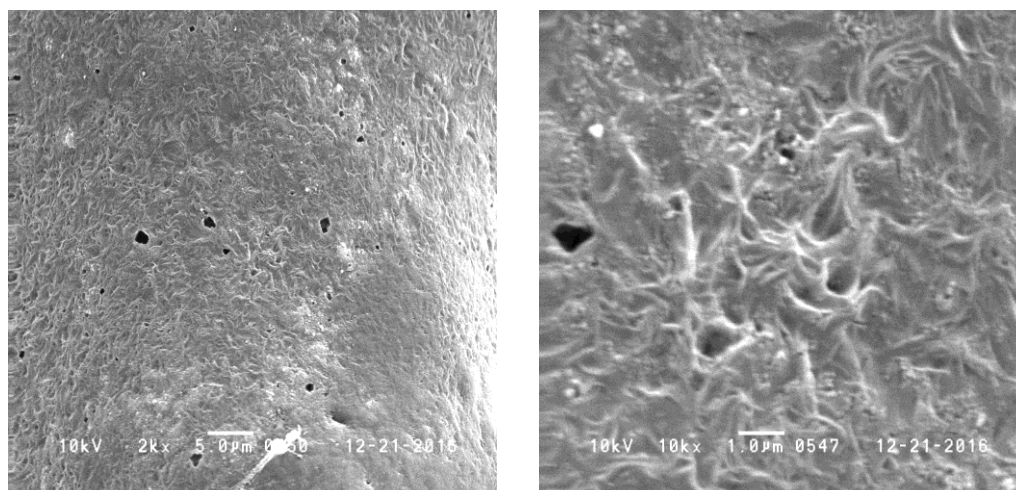


Fig 5 - Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas de alginato de sódio em aumento de 2k e 10k, obtidas do aparelho Topcon sm-300 Scanning Electron Microscope.

Tabela 1. Valor médio da expressão dos marcadores de caracterização das células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina, citometria de fluxo na 1ª passagem (P1) e 3ª passagem (P3)

|               | <b>P1</b>     | <b>P3</b>      |
|---------------|---------------|----------------|
| CD44          | 55.3% ± 12.31 | 38.43% ± 6.12  |
| CD90          | 92.49% ± 9.81 | 95.29% ± 5.19  |
| CD105         | 90.25% ± 8.00 | 87.50% ± 11.01 |
| MHC Classe II | 1.00% ± 5.23  | 2.50% ± 1.50   |