

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

**SINOVITE EM EQUINOS: EFEITO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
SOBRE A INFLAMAÇÃO ARTICULAR**

GUSTAVO DOS SANTOS ROSA

Botucatu, São Paulo
Junho de 2019.

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

**SINOVITE EM EQUINOS: EFEITO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
SOBRE A INFLAMAÇÃO ARTICULAR**

GUSTAVO DOS SANTOS ROSA

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

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, São Paulo
Junho de 2019.

Autor: Gustavo dos Santos Rosa

Data: 25 de Junho de 2019.

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

Rosa, Gustavo dos Santos.

Sinovite em equinos : efeito das células tronco mesenquimais sobre a inflamação articular / Gustavo dos Santos Rosa. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501003

1. Equino - Doenças. 2. Sinovite. 3. Membrana sinovial. 4. Proloterapia.

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

Comissão Examinadora

Prof^a Dra. Ana Liz Garcia Alves

Orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Prof^a Dra. Elenice Deffune

Membro

Hemocentro de Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu

FMB, UNESP, Botucatu

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca-Alves

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Agradecimentos

Agradeço à Prof^a Dra. Ana Liz Garcia Alves por me aceitar como orientado e por compartilhar seus conhecimentos, principalmente em terapias regenerativas e engenharia tecidual.

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

Aos colegas de pós-graduação por termos um ótimo convívio e sempre nos ajudarmos.

À CAPES e à FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e FAPESP – processo número 2017/01369-9.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografia dos ensaios de diferenciação, em objetiva de 20x. Figuras A, C, E, G e I representam os grupos-controle. Figura B: grupo diferenciação adipogênica; Figuras D, F e H: diferenciação condrogênica corada em Azul de Toluidina, Hematoxilina/Eosina e Alcian Blue, respectivamente. As setas indicam as células diferenciadas. Figura J: grupo diferenciação osteogênica.....20
- Figura 2. Resultados da citometria de fluxo. Nota-se positividade para os marcadores CD90 e CD73, e negatividade para CD34, CD11b, CD45 e MHC classe II.21
- Figura 3. Análise da celularidade do líquido sinovial no momento inicial, 4, 8, 24, 72 horas e 7 dias após a indução da sinovite. Os tratamentos foram realizados após a coleta do momento 8h.....24
- Figura 4. Quantificação da concentração sinovial de TGF- β e PGE₂. * indica diferença estatística (P=0,0467).25

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1	1
1. Introdução e Justificativa	1
2. Revisão bibliográfica.....	2
Referências	8
CAPÍTULO 2.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Delineamento Experimental.....	15
2.2 Otenção e Cultivo das CTMms	16
2.3 Indução experimental da sinovite e tratamento	17
2.4 Análises subsequentes e acompanhamento clínico	17
2.3 ELISA.....	18
2.6 Análise estatística	18
3. RESULTADOS	19
3.1 Caracterização celular.....	19
3.2 Exame físico e exame do sistema locomotor	22
3.3 Análise do líquido sinovial	22
3.4 Concentração sinovial de TGF β e PGE ₂	23
4. DISCUSSÃO	26
4.1 Células nucleadas totais e neutrófilos.....	28
4.2 Linfócitos e Macrófagos	29
4.3 TGF β e PGE ₂	31
5. CONCLUSÃO	34
Referências	35

ROSA, G.S. Sinovite em equinos: efeito das células tronco mesenquimais sobre a inflamação articular. Botucatu, 2019. Dissertação de Mestrado. 40 páginas. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, câmpus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A alta exigência do sistema locomotor de equinos atletas resulta em pequenas lesões articulares que, cumulativamente, provocam inflamação sinovial e liberação de diversos mediadores inflamatórios no microambiente articular, resultando no desenvolvimento da osteoartrite (OA). A utilização de células tronco mesenquimais (CTMs) nestes casos visa modificar a progressão desta enfermidade. O objetivo do presente trabalho foi verificar o comportamento das CTMs alogênicas derivadas da membrana sinovial (CTMms) frente aos eventos inflamatórios em casos de sinovite aguda em equinos. A sinovite foi induzida utilizando 0,5ng de LPS via intra-articular (IA) e os animais foram tratados 8 horas após a indução. O grupo controle recebeu como tratamento 2 ml de PBS IA, enquanto o grupo tratado recebeu 10^7 CTMms IA. Foram realizados, de maneira seriada, exames físicos, exames do aparelho locomotor, análise citológica do líquido sinovial e a determinação da concentração sinovial de TGF- β e PGE₂. Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à claudicação e parâmetros do exame físico. A análise citológica revelou diminuição significativa de linfócitos e macrófagos no grupo tratado ($P= 0,0059$ e $P= 0,0003$, respectivamente) que também apresentou menores níveis de TGF- β ($P= 0,0467$) no momento 24h. Os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa em nenhum momento. Os dados avaliados sugerem que a inflamação aguda tenha inicialmente causado inibição da capacidade imunomoduladora das CTMs, que foi retomada após 24h, com o declínio da inflamação articular, e que a interação das CTMs com os mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial está diretamente relacionada à condição inflamatória articular no momento da aplicação. Para a otimização do potencial imunomodulador das CTMs, os autores sugerem a adoção de estratégias para o controle da inflamação local antes de sua administração.

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

ROSA, G.S. Synovitis in horses: effect of mesenchymal stem cells on the articular inflammation. Botucatu, 2019. Master's Thesis. 40 pages. School of Veterinary Medicine and Animal Science, campus Botucatu, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

The high requirement of the locomotor system of equine athletes often results in small joint injuries that can cause synovial inflammation and release of several inflammatory mediators in the articular microenvironment, leading to the development of osteoarthritis (OA). Mesenchymal stem cells (MSCs) are used in these cases to modify the progression of this disease. This study aimed to verify the behavior of allogeneic synovial membrane derived MSCs (MSCsm) against inflammatory events in acute equine synovitis. Synovitis was induced by the intra-articular (IA) administration of 0.5 ng of LPS and the subjects were treated 8 hours post-induction. The control group received 2 ml of PBS IA as treatment, while the treated group received 10^7 MSCsm IA. Physical exams, lameness evaluations, cytological analysis of synovial fluid and determination of synovial concentrations of TGF- β and PGE₂ were performed. No differences were observed in lameness and physical exam parameters between the groups. Cytological analysis revealed a significant decrease in lymphocytes and macrophages in the treated group ($P = 0.0059$ and $P = 0.0003$, respectively), which also had lower levels of TGF- β ($P = 0.0467$) at 24 h. The other parameters did not present significant difference at any time. Our data suggest that acute inflammation initially caused inhibition of the immunomodulatory capacity of MSCs, which was resumed after 24h with the decline of joint inflammation, and that the interaction of MSCs with the inflammatory mediators present in the synovial fluid is directly related to the condition inflammatory at the time of application. To optimize the immunomodulatory potential of MSCs, the authors suggest the adoption of strategies to control local inflammation prior to its administration.

Keywords: regenerative therapy; synovial membrane; synovial inflammation.

CAPÍTULO 1

1. Introdução e Justificativa

Assim como em atletas humanos, as articulações de equinos atletas são constantemente expostas a impactos. A alta demanda biomecânica exigida nas competições pode predispor estes animais a inúmeras lesões ortopédicas (Brossi et al., 2015; Colbath et al. 2018).

A primeira estrutura a ser afetada é a membrana sinovial, dando origem à sinovite, que vem acompanhada pela liberação de uma série de mediadores inflamatórios, tornando-se um fator predisponente para o desenvolvimento da osteoartrite (OA) (Sellam e Berenbaum, 2010; Ross et al., 2012). Pesquisas sobre a OA geralmente possuem foco na cartilagem articular e no osso subcondral, porém reconhece-se que a OA causa alterações em todos os componentes articulares, inclusive na membrana sinovial, tornando o processo cíclico (Scanzello e Goldring, 2012).

O grande desafio no tratamento da sinovite consiste em debelar a reação inflamatória, que contribui com a degradação da cartilagem articular. Tendo em vista este propósito, diversas terapias são continuamente estudadas, incluindo a terapia com células tronco mesenquimais (CTM). Contudo, o comportamento *in vivo* das CTM e seus efeitos parácrinos após o transplante permanecem não totalmente estabelecidos, justificando a necessidade de mais pesquisas a fim de embasar cientificamente a aplicabilidade deste tipo de terapia.

As CTM possuem capacidade de interação com o ambiente no qual são administradas, podendo secretar fatores pró ou anti-inflamatórios, antiapoptóticos e mitogênicos quando devidamente estimuladas. Entretanto, a literatura atual apresenta-se contraditória em relação ao efeito das CTMs e sua interação com o ambiente ao qual são

expostas. Assim, pesquisas utilizando células tronco em processos inflamatórios são necessárias para a compreensão dos eventos ocorridos após sua administração, consequentemente embasando sua utilização clínica.

2. Revisão bibliográfica

Articulações sinoviais são consideradas diartroses, ou seja, articulações que possuem movimento livre. Via de regra, as diartroses apresentam em sua estrutura as cartilagens articulares, a cápsula articular fibrosa, a membrana sinovial e uma cavidade preenchida por líquido sinovial. As articulações do esqueleto apendicular, como a articulação rádio-cárpica, fêmur-tibial e tíbio-társica, são exemplos de articulações sinoviais (Spencer, 2020).

A cartilagem presente na superfície das articulações é do tipo hialina, caracterizada pela ausência de vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas, e presença de condrócitos em uma matriz extracelular abundante, rica em colágeno tipo II. É organizada em diferentes zonas ou camadas. A camada mais superficial, em contato direto com a cavidade sinovial, é a zona superficial ou tangencial, que possui condrócitos achatados e fibras colágenas condensadas e organizadas paralelamente à articulação. Seguindo em direção ao osso subcondral, encontra-se a zona intermediária ou transicional. Esta é a zona mais espessa, com condrócitos arredondados distribuídos em meio à matriz extracelular e fibras colágenas organizadas obliquamente à articulação. A zona profunda ou basal encontra-se imediatamente abaixo. Nesta camada os condrócitos são arredondados e organizados em colunas, com fibras colágenas perpendiculares. A última camada é a zona de cartilagem calcificada, onde ocorre o processo de ossificação endocondral durante o crescimento ósseo longitudinal. A zona de cartilagem calcificada demarca o limite entre o

osso subcondral e a cartilagem articular, possuindo atividade metabólica extremamente baixa (Johnston, 1997; Junqueira et al., 2017).

A cápsula articular é uma estrutura conjuntiva que envolve as extremidades ósseas, dando origem à articulação. Pode ser dividida em três camadas: a sinóvia (também chamada de íntima ou membrana sinovial), a membrana subsinovial (subíntima) e a cápsula articular fibrosa (Johnston, 1997).

A membrana sinovial é a estrutura responsável por produzir o líquido sinovial. Os sinoviócitos, células presentes na membrana sinovial, produzem um transudato do plasma e secretam glicoproteínas e ácido hialurônico para compor o líquido sinovial (Bartl e Bartl, 2019). O líquido sinovial possui importantes funções, como lubrificação articular e modulação da atividade dos condrócitos (Scanzello e Goldring, 2012).

A membrana sinovial possui, ainda, uma ampla população de células tronco mesenquimais (CTMs) capaz de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares. Assim, a membrana sinovial também possui um importante papel na resposta inflamatória articular, sendo fonte de células progenitoras que auxiliam seu processo de reparação (Fan et al., 2009; Scanzello e Goldring, 2012).

A inflamação tem início quando a membrana sinovial é exposta a moléculas específicas, advindas de micro-organismos ou mesmo em casos agressões estéreis, onde ocorre estresse celular e dano à matriz extracelular (Piccinini e Midwood, 2010). As moléculas podem ser ligadas ou não à presença de um agente infeccioso. São chamadas de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) ou DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos) (Arleevskaya et al., 2019). Receptores do tipo “toll-like” (TLR) da membrana plasmática dos sinoviócitos respondem à presença destas moléculas, ativando a via intracelular NFκB, que culmina com a produção e liberação de citocinas, como as interleucinas e o fator de transformação do crescimento-β (TGF-β). Tais citocinas

ativam o mecanismo de imunidade inata e atraem quimiotaticamente mais células inflamatórias para o local (Arleevskaya et al., 2019; Lorente-Sorolla et al., 2019).

A manifestação aguda de sinovite pode representar uma das primeiras mudanças ocorridas em estágios precoces de OA. Estabelece-se, assim, uma estreita ligação entre sinovite e osteoartrite, visto que os principais tipos celulares envolvidos na patogênese da OA são os sinoviócitos, condrócitos e leucócitos infiltrados. O papel da sinovite no desenvolvimento e progressão da OA tem sido relacionado à deposição direta de fibrina, formação de *pannus* e ativação do sistema imune inato (Sutton et al., 2009), causando liberação de citocinas como o Interferon γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que levam à ativação dos osteoclastos por estímulo dos macrófagos, gerando o comprometimento osteocondral (Lam et al., 2000).

Pesquisas recentes buscam métodos capazes de modificar o curso e progressão desta enfermidade. A terapia medicamentosa é baseada na administração de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), corticosteroides, glicosaminoglicanas polissulfatadas (PSGAGs), N-acetilglucosamina (NAG), ácido hialurônico (AH), ou ainda uma combinação entre alguns destes princípios (Frisbie et al., 2009a; Frisbie et al., 2009b). Terapias utilizando moléculas biológicas, como o soro autólogo condicionado (ACS), também possuem utilização frequente, elevando o número de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento. Em casos mais graves ou não responsivos à terapia medicamentosa isolada, o tratamento cirúrgico é requerido, realizado geralmente com técnicas cirúrgicas minimamente invasivas (Frisbie et al., 2009a; Frisbie et al., 2009b; Hraha et al., 2011; Kwan et al., 2012; King et al., 2017).

Apesar dos avanços realizados nas abordagens terapêuticas minimamente invasivas e fármacos utilizados, o tratamento de grandes defeitos condrais e lesões articulares crônicas permanecem desafiadores, principalmente devido às alterações no microambiente articular decorrentes da OA (Johnson e Frisbie, 2016) e à restrita

capacidade de regeneração condral, devido à sua natureza avascular (Reddi e Iwasa, 2019).

Grande parte das pesquisas sobre OA buscam a reparação condral, embora a interrupção do desenvolvimento e da progressão da enfermidade possam similar importância (van der Harst et al., 2006). A reparação articular depende de processos intrínsecos, limitados devido ao baixo potencial mitótico dos poucos condrócitos, e extrínsecos, restritos à escassa migração de elementos mesenquimais e células progenitoras do osso subcondral (McIlwraith et al., 2015). O resultado é a formação abundante de tecido fibroso e fibrocartilaginoso, contendo cerca da metade dos glicosaminoglicanos presentes em uma cartilagem normal, limitando suas características morfofuncionais (Coleman et al., 2010).

Neste contexto, pesquisas científicas sobre medicina regenerativa, incluindo terapias com células-tronco mesenquimais, têm emergido como uma alternativa terapêutica de grande viabilidade (Vinatier et al., 2009; Tang et al., 2015).

A terapia com CTMs também constitui uma importante ferramenta para o tratamento da sinovite devido à secreção de um grande número de fatores de crescimento e à sua ação parácrina anti-inflamatória, antiapoptótica, antifibrótica, angiogênica e mitogênica (Cassano et al., 2018). Todas estas características são extremamente desejáveis e sustentam sua utilização para tal propósito (Caplan, 2007).

Diversas são as fontes de isolamento de CTM, incluindo medula óssea, tecido adiposo, músculo esquelético, periósteo, dentes decíduos, sangue periférico, líquido sinovial e membrana sinovial (Barry e Murphy, 2004). Entretanto, estudos relatam a utilização de CTMs provenientes de membrana sinovial devido a seu alto potencial proliferativo e condrogênico (De Bari et al., 2001; Sakaguchi et al., 2005). As CTMs têm sido utilizadas para auxiliar o limitado potencial de reparação cartilaginosa, reduzir a formação de fibrocartilagem e bloquear o ciclo inflamatório articular, diminuindo a sinovite

e consequentemente atuando como adjuvante no tratamento da OA (Caplan, 2007). Outra característica importante das CTMs consiste na ausência de moléculas imunoestimulantes requeridas à ativação de linfócitos-T, tornando-as adequadas para transplantes alogênicos pela capacidade de evasão da resposta imune (Majumdar et al., 2014; Colbath et al., 2019).

A liberação de mediadores inflamatórios provenientes da sinovite gera a degradação enzimática da cartilagem articular (Barrachina et al., 2016a). O fator de necrose tumoral α (TNF α) e o interferon γ (IFN γ) induzem a expressão de características imunorreguladoras das CTMs de forma sinérgica, porém determinadas concentrações de citocinas e o tempo de exposição das CTMs às mesmas produzem uma diminuição em sua taxa de proliferação e diferenciação (Barrachina et al., 2016b; Zayed et al., 2016).

A ação parácrina das CTMs e seu potencial em secretar diversos fatores imunossupressores têm sido bastante explorados. Acredita-se que a exposição a algumas citocinas pró-inflamatórias, como o INF- γ , o TNF- α e a IL-6 (interleucina-6) é capaz de aumentar o potencial imunomodulador das CTMs (ter Huurne et al. 2012). Quando devidamente estimuladas, as células-tronco mesenquimais apresentam propriedades imunomoduladoras, sendo capazes de expressar moléculas anti-inflamatórias como a IL-10, o antagonista de interleucina 1 (IL-1ra), indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), TGF- β e PGE₂ (Yamada et al., 2011; Shi et al., 2012).

Para melhor compreender os mecanismos de ação das novas terapias direcionadas às enfermidades articulares, deve-se avaliar os efeitos articulares funcionais e fisiológicos resultantes de sua utilização (van Loon et al., 2010). Terapias voltadas para o controle da reação inflamatória da membrana sinovial apresentam-se vantajosas no controle dos sintomas e alterações estruturais ocorridos durante a progressão da OA (Goldring e Goldring, 2007; Joswig et al., 2017).

O presente trabalho teve como objetivo verificar o comportamento das CTMs alogênicas derivadas da membrana sinovial no tratamento da sinovite induzida experimentalmente em equinos.

Referências

- ARLEEVSKAYA, M.I., LARIONOVA, R.V., BROOKS, W.H. et al. Toll-Like Receptors, Infections, and Rheumatoid Arthritis. **Clinic Rev Allerg Immunol**, p1-10, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08742-z>
- BARRACHINA, L. et al. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived-mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 171, p. 57–65, 2016a.
- BARRACHINA, L. et al. Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implication in intra-articular treatments. **J Vet Sci.**, v.18, n.1, 2016b.
- BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.36, p. 568–84, 2004.
- BARTL R., BARTL C. The Normal Joint. In: _____ **The Osteoporosis Manual**. Springer, Cham. 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00731-7>
- BROSSI, P.M. et al. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. **BMC Vet Res.**, v.11, p.98, 2015. DOI 10.1186/s12917-015-0403-z.
- CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J Cell Physiol.**, v. 213, n. 2, p.341-7, 2007.
- CASSANO, J.M. et al. Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. **Stem Cell Research & Therapy.**, v.9, p.82, 2018. DOI 10.1186/s13287-018-08402.
- COLBATH, A.C. et al. Equine models for the investigation of mesenchymal stem cell therapies in orthopaedic disease. **Oper Tech Sports Med**, v.25, p.41-49, 2018. DOI 10.1053/j.otsm.
- COLEMAN, C.M. et al. Mesenchymal stem cells and osteoarthritis: remedy or accomplice? **Hum. Gene Ther.**, v. 2, p. 1239–50, 2010.

De BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum.**v.44, p.1928-42, 2001.

FAN, J.; VARSHNEY, R.R. ; REN, L. ; CAI, D. ; WANG, D.A Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 15, p. 75-86, 2009.

FRISBIE, D.D. et al. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. **Am J Vet Res.**v.70, p. 203-9, 2009b.

FRISBIE, D.D. et al. Evaluation of topically administered diclofenac liposomal cream for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. **Am J Vet Res.**v.70, p.210-5, 2009a.

GOLDRING, M.B.; GOLDRING, S.R. Osteoarthritis. **J. Cell. Physiol.**v.213, p. 626–34, 2007.

HRAHA, T.H.; DOREMUS, K.M.; MCILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D. Autologous conditioned serum: The comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. **Equine Vet. J.**, v.43, n.5, p. 516-21, 2011. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00321.x

JOHNSON, S.A.; FRISBIE, D.D. Cartilage Therapy & Repair in Equine Athletes. **Oper Tech Orthop.**, v.26, n.3, p.155-65, 2016.

JOHNSTON, S. A. Osteoarthritis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.27, n.4, p.699–723, 1997. doi:10.1016/s0195-5616(97)50076-3

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

KING, W.; BENDELE, A.; MAROHL, T.; WOODSELL-MAY, J. A human blood-based anti-inflammatory solution inhibits osteoarthritis progression in a meniscal-tear rat study. **J Orthop Res.**, v.35, n.10, p.2260-8, 2017. DOI: 10.1002/jor.23528.

KWAN C. et al. Effects of intra-articular sodium pentosan polysulphate and glucosamine on cytology, total protein concentration and viscosity of synovial fluid in horses. **Aust Vet J**, v.90, p.315-320, 2012.

LAM, J. et al. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **J Clin Invest.**, v. 106, p. 1481-8, 2000.

LORENTE-SOROLLA C.; NETEA M.G.; BALLESTAR, E. Epigenetics in Autoinflammation. In: HASHKES P., LAXER R., SIMON A. (eds). **Textbook of Autoinflammation**. Springer, Cham, 2019.

MAJUMDAR, A. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: safety and efficacy results of a randomized, double blind, phase 2, placebo controlled, dose finding study. **Cytotherapy.**, v.16, n.4, S105, 2014.

MCILWRAITH, C.W.; WRIGHT, I.; NIXON, A. **Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse**. 4 ed. Mosby-Elsevier, 2015. 464p. ISBN: 978-0-7234-3693-5

PICCININI, A.M.; MIDWOOD. K.S. DAMPening inflammation by modulating TLR signaling. **Mediators Inflamm**, v. 2010, article ID 672395, 21 pages, 2010. , DOI 10.1155/2010/672395.

REDDI, A. H.; IWASA, K. Morphogenesis, Bone Morphogenetic Proteins, and Regeneration of Bone and Articular Cartilage. **Principles of Regenerative Medicine**, 405–416, 2019.

ROSS, T.N.; KISIDAY, J.D.; HESS, T.; MCILWRAITH, C.W. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthr. Cartil.**, v.20, p. 1583-90, 2012

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.**, v. 52, p. 2521-9, 2005.

SCANZELLO, C.R.; GOLDRING, S.R. The Role of Synovitis in Osteoarthritis pathogenesis. **Bone.**, v. 51, n. 2, p. 249–57, 2012. DOI:10.1016/j.bone.2012.02.012.

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 6, n.11, p. 625-35, 2010. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.159.

SHI, Y. et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 3, p. 136-143, 2012.

SPENCER E. Animal Anatomy and Physiology, Cap 1. In: TIGHE, M.M.; BROWN, M. (ed). **Mosby's Comprehensive Review for Veterinary Technicians**, 5th ed, St Louis Missouri ELSEVIER, p.1-23, 2020.

SUTTON, S. et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. **Vet J.**, v.179, p. 10-24, 2009. DOI:10.1016/j.tvjl.2007.08.013

TANG, H.C.; CHEN, W.C.; CHIANG, C.W.; CHEN, L.Y.; CHANG, Y.C.; CHEN, C.H. Differentiation Effects of Platelet-Rich Plasma Concentrations on Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells from Pigs Cultivated in Alginate Complex Hydrogel. **Int. J. Mol. Sci.**, v.16, p. 18507-21, 2015.

ter HUURNE, M.; SCHELBERGEN, R.; BLATTES, R.; BLOM, A. et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 64, n. 11, p. 3604-13, 2012. doi: 10.1002/art.34626.

Van der HARST, M.; BULL, S.; BRAMA, P.A.; BARNEVELD, A.B.; Van WEEREN, P.R.; Van de LEST, C. Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. **J Rheumatol.**, v.33, n. 8, p. 1662-7, 2006.

Van LOON, J.P.A.M.; de GRAUW, J.C.; Van DIERENDONCK, M.; L'AMI, J.J.; BACK, W., Van WEEREN, P.R. Intra-articular opioid analgesia is effective in reducing pain and inflammation in an equine LPS induced synovitis model. **Equine vet. J.**, v. 42, n. 5, p. 412-9, 2010. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00077.x

VINATIER, C.; MRUGALA, D.; JORGENSEN, C.; GUICHEUX, J.; NOËL, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. **Trends Biotechnol.** v. 27, n. 5, p. 307-14, 2009. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.02.005

YAMADA, A.L.M. **Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em eqüinos.** 2011. 111p. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

ZAYED, M.N.; SCHUMACHER, J.; MISK, N.; DHAR, M.S. Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid. **Vet J.**, v. 217, p. 26-32, 2016. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tvjl.2016.05.014>.

CAPÍTULO 2

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

(sob as normas vigentes – disponíveis em <https://www.journals.elsevier.com/research-in-veterinary-science>)

**Título: “EFEITO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA SINOVITE AGUDA
EXPERIMENTAL EM EQUINOS”**

Observação: Embora as normas da revista exijam o envio das figuras ao final do texto, em forma de anexo, resolvemos expor as imagens juntamente aos resultados do artigo para fins didáticos.

“ EFEITO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA SINOVITE AGUDA EXPERIMENTAL EM EQUINOS ”

1. INTRODUÇÃO

A utilização de células tronco mesenquimais na engenharia tecidual têm sido o foco de pesquisas recentes (Vinatier et al., 2009; Tang et al., 2015). Em casos de enfermidades articulares esta terapia assume elevada importância, principalmente devido à secreção de um grande número de fatores de crescimento e à sua ação parácrina anti-inflamatória, antiapoptótica, antifibrótica, angiogênica e mitogênica (Cassano et al., 2018). Embora a reparação condral seja um dos focos da intervenção em casos de enfermidades articulares, o desenvolvimento e a instauração do processo da etiopatogenia possuem similar importância, uma vez que o bloqueio do ciclo inflamatório leva à supressão do desenvolvimento da enfermidade (van der Harst et al., 2006).

Em equinos atletas, a alta demanda necessária às competições vem acompanhada por uma infinidade de lesões ortopédicas (Brossi et al., 2015; Colbath et al. 2018). A primeira manifestação da inflamação articular ocorre na membrana sinovial, sendo denominada sinovite aguda. A sinovite leva à liberação de uma série de mediadores pró-inflamatórios, tornando-se um fator predisponente para o desenvolvimento da osteoartrite (OA) (Sellam e Berenbaum, 2010; Ross et al., 2012). Pesquisas sobre a OA geralmente abrangem a cartilagem articular e o osso subcondral, porém reconhece-se que ocorrem alterações em todos os componentes articulares, inclusive na membrana sinovial (Scanzello e Goldring, 2012), destacando a importância da interrupção da sinovite e sua consequente contribuição para o bloqueio do ciclo inflamatório que leva à OA.

A restituição da homeostase articular depende de processos intrínsecos, limitados devido ao baixo potencial mitótico dos poucos condrócitos, e extrínsecos, restritos à escassa migração de elementos mesenquimais e células progenitoras a partir do osso

subcondral (McIlwraith et al., 2005). Por este motivo, as CTMs têm sido utilizadas com o intuito de auxiliar o limitado potencial de reparação cartilaginosa, reduzir a formação de fibrocartilagem e bloquear o ciclo inflamatório articular, atuando como adjuvante no tratamento da inflamação articular (Caplan, 2007).

As CTMs podem ser isoladas de diversos tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, músculo esquelético, periósteo, dentes decíduos, sangue periférico, líquido sinovial e membrana sinovial (Barry e Murphy, 2004). Entretanto, as CTMs provenientes de membrana sinovial (CTMms) possuem ação mais direcionada para o tratamento de enfermidades articulares, devido à proximidade entre as CTMms e os condrócitos no processo de desenvolvimento e diferenciação celular durante a embriogênese, proporcionando às CTMms elevado potencial condrogênico e proliferativo (De Bari et al., 2001; Sakaguchi et al., 2005).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação das CTMs alogênicas derivadas da membrana sinovial em casos de sinovite társica experimentalmente induzida em equinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Este experimento foi conduzido conforme as diretrizes do Comitê de Ética e Utilização Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob o protocolo nº 0143/2017.

As articulações tibiotársicas (n=15) de 10 animais foram divididas em dois grupos, perfazendo um total de cinco articulações no grupo controle e dez articulações no grupo tratado com células tronco livres. Para reduzir o fator individual o mesmo animal foi utilizado por mais de uma vez, respeitando-se um período de *clearance* de 04 semanas entre elas e utilizando a articulação contra-lateral.

Todos os tratamentos foram realizados oito horas após a coleta de líquido sinovial inicial (tomado como “basal”). A sinovite foi induzida imediatamente após a coleta inicial, para todas as articulações. O detalhamento de cada grupo segue abaixo:

- Grupo um, controle (G1): administração intra-articular de 2 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS¹);
- Grupo dois, tratado (G2): implante intra-articular de 1×10^7 CTMms suspensas em 2 mL de PBS;

2.2 Obtenção e Cultivo das CTMms

Foram obtidas CTMs alogênicas derivadas de membrana sinovial equina, armazenadas em Freezer -80 °C (biobanco de células-tronco do Laboratório de Terapia Regenerativa do setor de Cirurgia de Grandes Animais, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ UNESP, Botucatu). A seleção dos criotubos utilizados ocorreu de forma aleatória. As CTMs foram cultivadas segundo Yamada (2011), em garrafas com meio de cultivo (DMEM² suplementado com soro fetal bovino (SFB)³, aminoácidos essenciais⁴ e não-essenciais⁵, L-glutamina⁶ e solução antibacteriana e antimicótica⁷ (anfotericina B, penicilina e estreptomicina) e expandidas até o número necessário (1×10^7), quinze dias antes do momento inicial. Todas as aplicações foram realizadas com CTMs em terceira passagem.

Para a confirmação da multipotência das células cultivadas, foram realizadas as diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica, além da imunofenotipagem celular por citometria de fluxo, seguindo metodologia previamente descrita por Carvalho et al. (2013), de modo a atender os critérios mínimos para a caracterização de células tronco mesenquimais segundo a Sociedade Internacional de Citoterapia (Dominici et al., 2006).

2.3 Indução experimental da sinovite e tratamento

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

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

A administração do LPS foi considerada como momento zero do experimento (M0), sendo precedida apenas pela coleta de líquido sinovial (considerada como “basal” para comparação com os resultados subsequentes). Os tratamentos foram realizados 8h após a indução experimental.

2.4 Análises subsequentes e acompanhamento clínico

Após a indução e tratamento ambos os grupos foram avaliados quanto aos parâmetros clínicos e as análises do líquido sinovial, incluindo o exame do sistema locomotor e artrocentese, realizados imediatamente antes da indução, 4, 8, 24 e 72 horas, e 7 dias após a mesma.

A claudicação foi avaliada em pista de concreto, avaliando os animais individualmente. Primeiramente, os animais eram conduzidos ao passo e ao trote. Após esta etapa, os animais eram submetidos à flexão da articulação tibiotársica durante 60 segundos, sendo imediatamente submetidos ao trote em linha reta. A avaliação foi feita pelos mesmos indivíduos em todos os casos, e então graduada em escores de 0 a 5,

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

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

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

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

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

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

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

segundo Stashak (2011). A análise laboratorial para a determinação da celularidade (contagem de células nucleadas totais, neutrófilos, linfócitos e macrófagos) do líquido sinovial obtido foi realizada nos mesmos momentos.

2.5 ELISA

A determinação da concentração sinovial dos mediadores inflamatórios (TGF- β e PGE₂) foi realizada em todos os momentos por teste imunoenzimático utilizando kits ELISA comerciais^{9, 10}, de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes. A curva de regressão da análise e a conversão das densidades ópticas obtidas na leitura foram realizadas pelo leitor de microplacas com o auxílio de um software¹¹.

2.6 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os dados passaram por teste de normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov). As aferições numéricas foram submetidas à análise de variância entre os tratamentos com medidas repetidas no tempo, e ao Teste de Tukey para múltiplas comparações de médias nos diferentes momentos. O software utilizado foi GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) Todas as avaliações foram consideradas ao nível de 5% de significância, e resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

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

⁹ Kit Parameter™ PGE₂, PGE₂ Assay. R&D Systems, Inc. Minneapolis, EUA. Distribuído por LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil.

¹⁰ Recombinant Equine TGF-beta 1 Protein. R&D Systems, Inc. Minneapolis, EUA. Distribuído por LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil.

¹¹ InStat Graph Pad InStat

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização celular

Os resultados dos ensaios de diferenciação estão demonstrados na figura 1. No cultivo controle do ensaio de diferenciação adipogênica, as CTMs mantiveram sua morfologia fibroblastoide, com pequenos e ocasionais depósitos intra-celulares de gordura. Já a avaliação do cultivo destinado à diferenciação permitiu a identificação de células globoides e algumas com morfologia transicional entre fibroblastoide e globoide, ambas demonstrando depósitos de gordura intra-celulares corados em vermelho.

O cultivo controle para a diferenciação osteogênica também permaneceu indiferenciado à microscopia óptica, enquanto as células do cultivo de diferenciação osteogênica demonstraram depósitos de cristais extracelulares, corados por Alizarin Red, confirmando a diferenciação.

A avaliação das lâminas resultantes da diferenciação condrogênica permitiu identificar células globoides em meio ao arcabouço tridimensional, com núcleo ovoide e cercadas de matriz cartilaginosa. Também foi possível observar metacromasia das células e formação de lacunas originadas pela retração dos condrócitos durante o processamento histológico.

A citometria de fluxo revelou positividade para os antígenos de superfície CD90 e CD73, e negatividade para os marcadores CD34, CD11b, CD45 e MHC-II, ilustrados na figura 2.

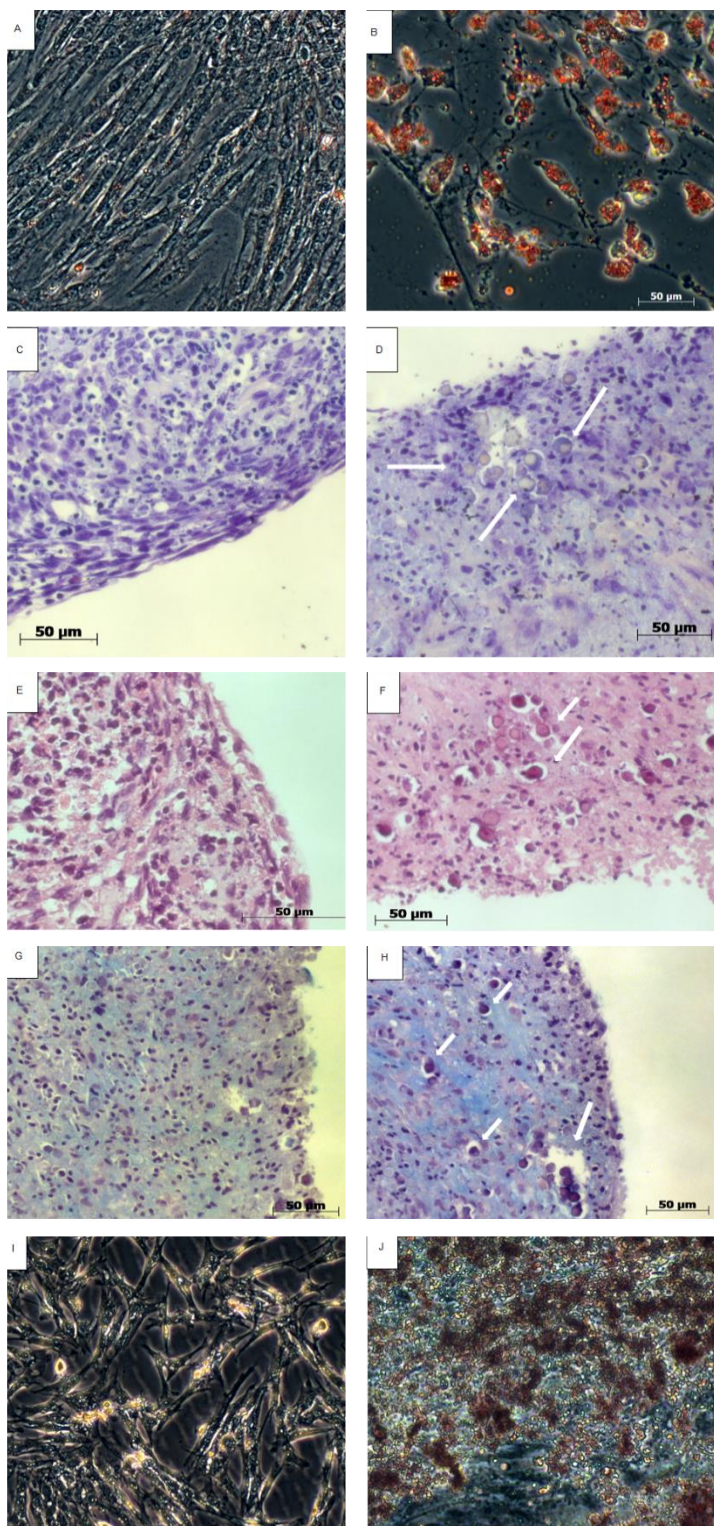


Figura 1. Fotomicrografia dos ensaios de diferenciação, em objetiva de 20x. Figuras A, C, E, G e I representam os grupos-controle. Figura B: grupo diferenciação adipogênica; Figuras D, F e H: diferenciação condrogênica corada em Azul de Toluidina, Hematoxilina/Eosina (setas indicam as células diferenciadas) e Alcian Blue (setas indicam matriz de glicosaminoglicanas), respectivamente. Figura J: grupo diferenciação osteogênica.

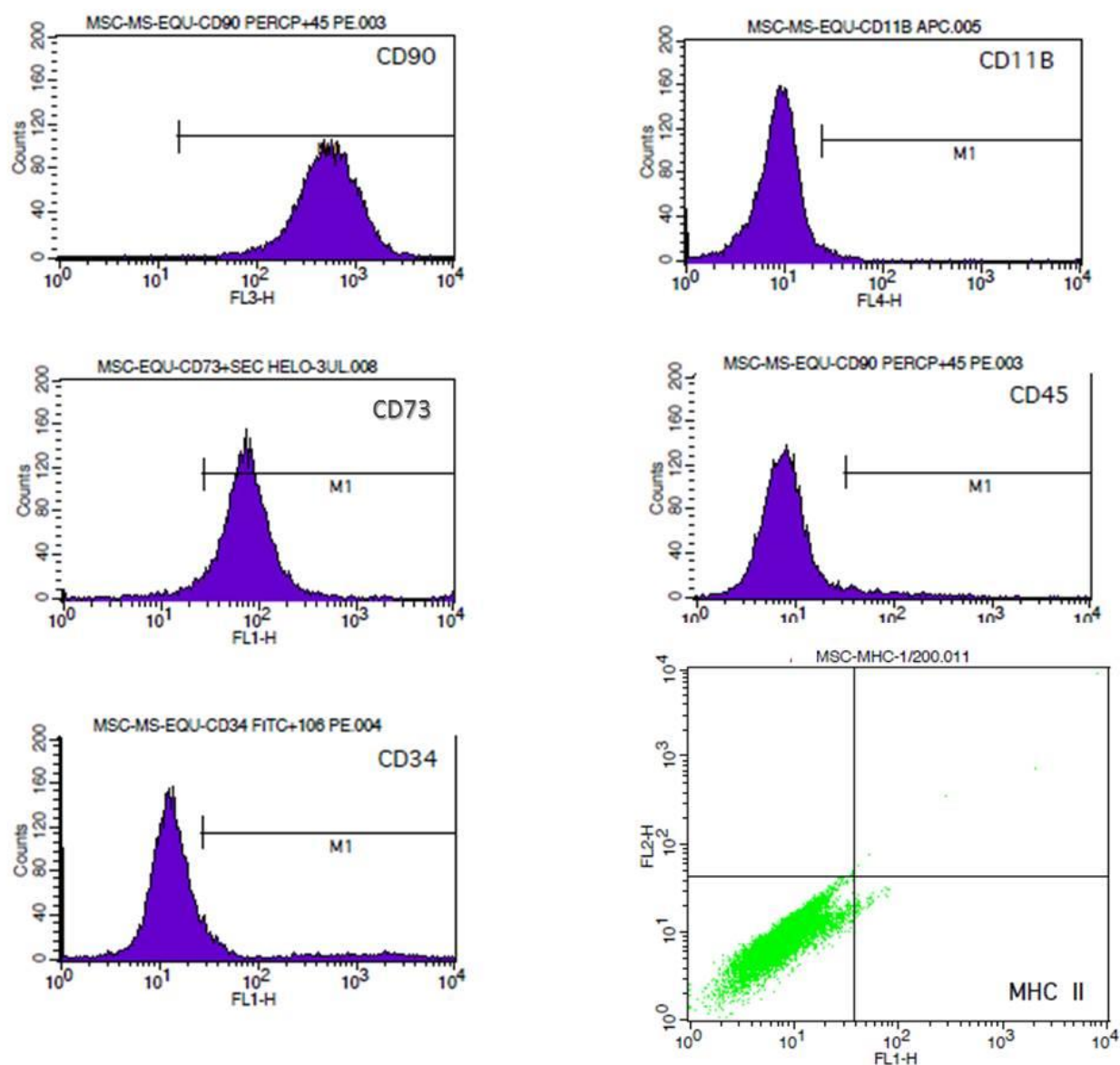


Figura 2. Resultados da citometria de fluxo. Nota-se positividade para os marcadores CD90 e CD73, e negatividade para CD34, CD11b, CD45 e MHC classe II.

3.2 Exame físico e exame do sistema locomotor

Os parâmetros avaliados no exame físico foram similares em ambos os grupos, mantendo-se dentro do intervalo fisiológico em todos os momentos. Não foram observadas reações adversas à administração de LPS, como episódios de desconforto abdominal ou sinais de toxemia.

A análise dos escores do exame do sistema locomotor não apresentou diferença entre os grupos. Em ambos, a claudicação se iniciou 4 horas após a indução da sinovite (grau II), progredindo gradativamente de modo a alcançar o pico (grau III) 24 horas após a indução. Após 7 dias, todos os animais apresentavam claudicação grau I.

3.3 Análise do líquido sinovial

Os resultados da análise do líquido sinovial encontram-se descritos na figura 3. Em relação à contagem total de células nucleadas no líquido sinovial, os dois grupos avaliados se comportaram igualmente, apresentando diferença significativa do M0 com o M4h, M8h e M24h no teste de Tukey ($P=0,0001$).

A concentração de neutrófilos no líquido sinovial não demonstrou variação entre G1 e G2 nos diferentes momentos. Notou-se um aumento significativo no número de neutrófilos no líquido sinovial 4, 8 e 24 horas após a indução da sinovite em ambos os grupos ($P<0,05$). Entretanto, após 72h não houve diferença significativa com o momento inicial em ambos os grupos.

Quando os dois grupos foram pareados momento a momento, estes não apresentaram diferença em relação à contagem de linfócitos no líquido sinovial. Ao avaliar cada grupo separadamente, comparando o momento inicial aos demais, foi possível observar um aumento significativo no número de linfócitos após 24h somente no G1 ($P=0,0059$). As demais comparações não apresentaram diferença significativa.

Foi possível observar diferença significativa ao comparar o M24h dos dois grupos quanto à contagem de macrófagos no líquido sinovial ($P= 0,0003$). Ao comparar o momento inicial de cada grupo com seus demais momentos, apenas o G1 demonstrou diferença entre M0 e M24 ($P= 0,0066$), enquanto o G2 não exibiu diferença entre os momentos.

3.4 Concentração sinovial de TGF β e PGE $_2$

Na comparação entre grupos notou-se que o G1 demonstrou maior concentração sinovial de TGF β em relação ao G2 no M24h ($P= 0,0467$). Não houve diferença entre os grupos nos demais momentos avaliados (Figura 4).

Em relação à PGE $_2$, os resultados demonstraram ausência de significância tanto na comparação dos grupos em diferentes momentos, quanto na comparação dos diferentes momentos de um mesmo grupo entre si (Figura 4).

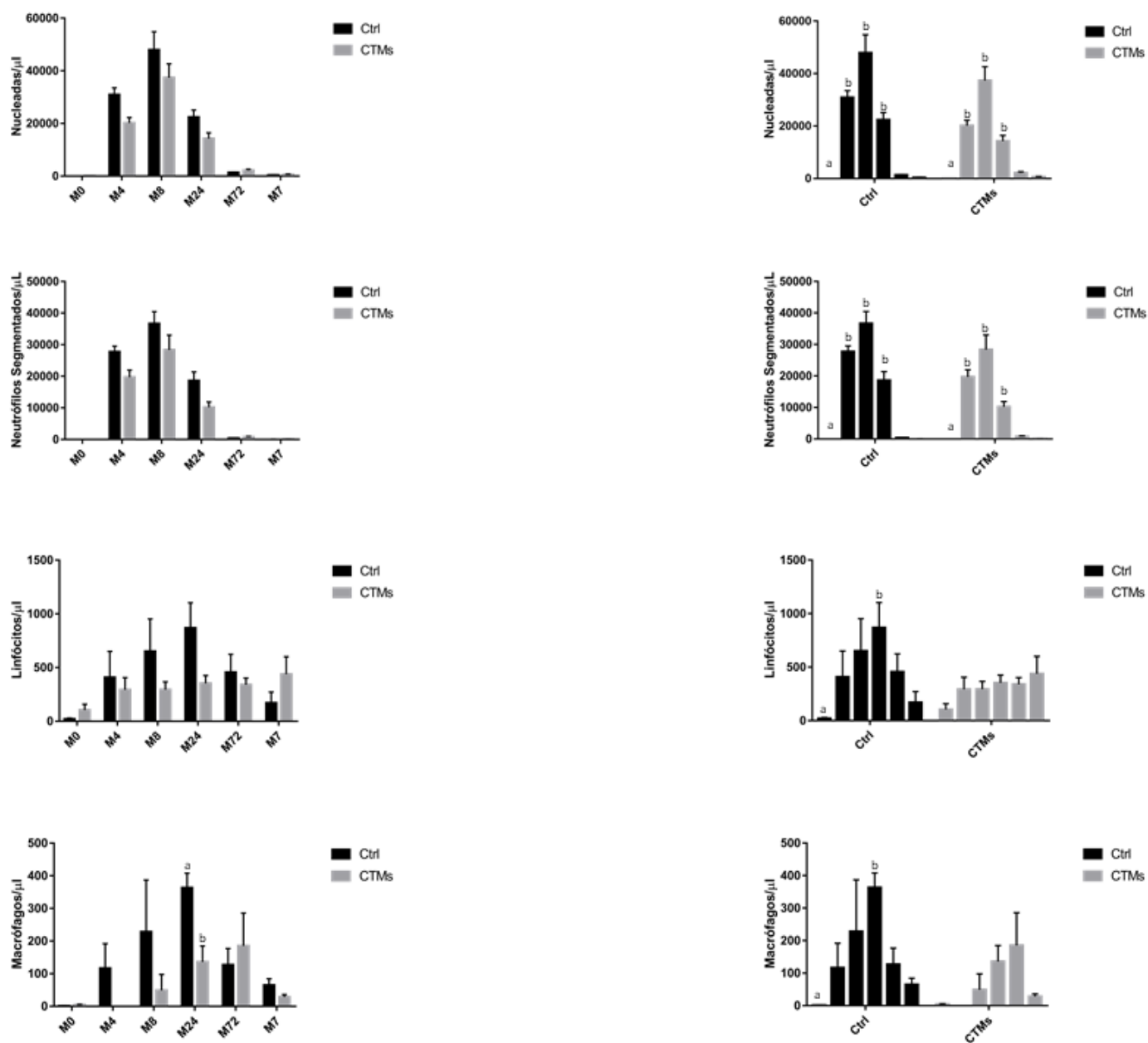


Figura 3. Análise da celularidade do líquido sinovial no momento inicial, 4, 8, 24, 72 horas e 7 dias após a indução da sinovite. Os tratamentos foram realizados após a coleta do momento 8h.

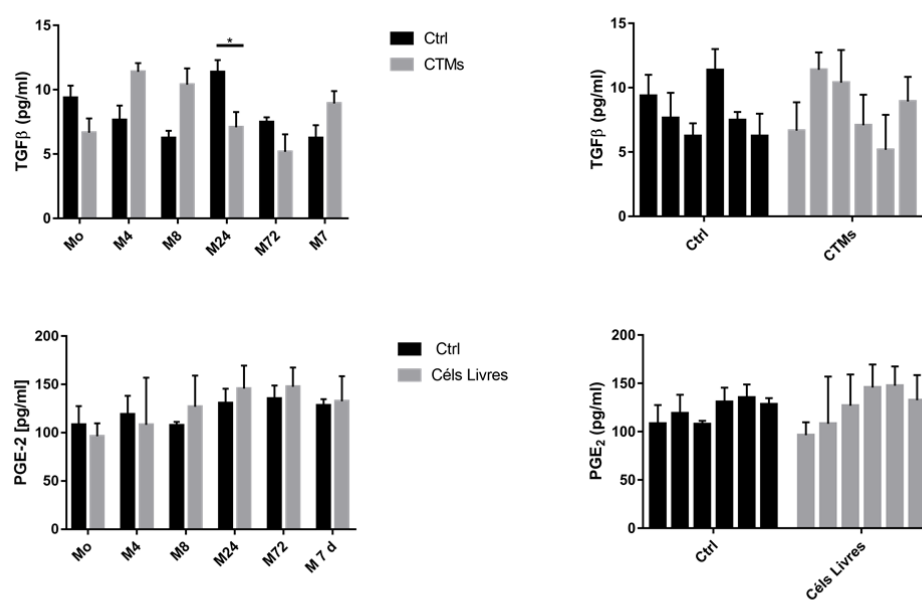


Figura 4. Quantificação da concentração sinovial de TGF-β e PGE₂. * indica diferença estatística (P=0,0467).

4. DISCUSSÃO

A sinovite é uma enfermidade comum em equinos. Constitui a causa primária de dor em grande parte dos casos de claudicação, originadas no tarso que não possuem alterações radiográficas (Kawcak, 2016), uma vez que a membrana sinovial é a primeira estrutura a ser afetada em casos de inflamação articular, causando a liberação de uma série de mediadores inflamatórios (Sellam e Berenbaum, 2010; Ross et al., 2012).

Diversos estudos destacam a capacidade imunomoduladora das células tronco mesenquimais (Gao et al., 2016; Kaundal et al., 2018; Silva-Carvalho et al., 2019). Entretanto, a inflamação também pode ser prejudicial à ação das CTMs devido à inativação das CTMs pelo sistema imune (De Bari et al., 2001; Sakaguchi et al., 2005). Adicionalmente, Santos et al. (2018) avaliaram a cinética das CTMs após marcação fluorescente, notando a ocorrência de dispersão periarticular após sua administração intra-articular. As CTMs podem ainda migrar para a circulação sistêmica, como comprovado por Oliveira et al. (2014).

A literatura diverge consideravelmente em relação ao efeito biológico do uso de CTMs alogênicas. Tendo em vista que as moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) possuem distinções entre cada indivíduo, a administração de CTMs alogênicas pode desencadear uma resposta imune mediada por células T, causando sua rejeição (Marino et al., 2016). A rejeição ainda pode ocorrer mesmo na ausência de expressão de MHC-II, dada a capacidade de ativação das células T por outros antígenos, como Oct-4 (Dhodapkar et al., 2010). Embora o Oct-4 seja tradicionalmente expresso por células tronco embrionárias, Riekstina et al., (2009) demonstraram sua expressão em CTMs humanas derivadas de tecido adiposo, derme, medula óssea e tecido cardíaco.

O perfil fenotípico das CTMs foi confirmado por citometria de fluxo, atendendo os critérios básicos de caracterização celular segundo a Sociedade Internacional de

Terapia Celular (ISCT). Carvalho et al. (2013) demonstraram alta expressão de CD44, CD90 e CD105 em CTMs derivadas de tecido adiposo de equinos. Ressalta-se que a caracterização celular é uma etapa fundamental para a confiabilidade e comparabilidade dos resultados obtidos. Os resultados do presente trabalho corroboram os resultados dos autores supracitados, atingindo os parâmetros mínimos para a caracterização celular.

A administração intra-articular de LPS pode levar à ocorrência de efeitos sistêmicos adversos, como hipertermia, desconforto abdominal e toxemia, entre outros, principalmente em doses maiores que 0,5 ng. Andreassen et al. (2017) notaram a ocorrência de hipertermia 8 e 16 horas após a administração de 3µg de LPS via intra-articular. Campebell et al. (2004) também relataram a ocorrência de hipertermia de 6 a 12 horas após a administração de 1,5ng de LPS via intra-articular. Palmer e Bertone (1994) relataram a ocorrência de hipertermia, efusão articular severa, depressão e inapetência 12h após a administração intra-articular de 5 µg e 25 ng de LPS. A dose de 0,5ng, utilizada pelo presente estudo, foi capaz de induzir a sinovite, com efusão articular moderada e presença de claudicação, porém sem apresentar os efeitos sistêmicos adversos ocorridos quando doses mais elevadas são utilizadas. A utilização de 0.25 ng de LPS intra-articular foi capaz de provocar sinovite moderada em múltiplas articulações de equinos (Meulyzer et al., 2009; Cokelaere et al., 2018). Deste modo, encoraja-se a utilização de doses entre 0.25 e 0.5 ng de LPS para a indução de sinovite aguda moderada experimental em equinos.

O LPS também é utilizado para induzir a expressão de moléculas anti-inflamatórias *in vitro*. Ulmer et al. (2000) utilizaram 1 µg/ml para estimular a produção de citocinas por linfócitos T. Yan et al. (2014) também utilizaram a mesma dose em cultivo de CTMs a fim de induzir a expressão do fator de ativação de células B via ativação de receptores TLR-4. Ao comparar as doses utilizadas pelos autores com o presente trabalho é possível perceber que doses maiores são requeridas para a ativação celular *in vitro*, dada a diferença de condições entre ambientes *in vitro* e *in vivo*. Podemos inferir que a

diversidade celular presente *in vivo*, somada às constantes oscilações de temperatura, pH, concentração de peptídeos e de oxigênio, proporcionam alta complexidade de interação entre células e metabólitos, característica inatingível em sistemas bidimensionais de cultivo *in vitro*, que contêm uma população homogênea mantida em ambiente controlado.

4.1 Células nucleadas totais e neutrófilos

A diferença na contagem de células nucleadas totais na análise citológica do líquido sinovial entre o momento inicial e após 4, 8 e 24 horas comprova a atividade pró-inflamatória do LPS, apresentando pico de atividade após 8 horas de contato com o ambiente articular. Andreassen et al. (2017) avaliaram os eventos inflamatórios articulares após administração intra-articular de LPS, relatando a ação máxima 8 horas após a aplicação, através da observação do aumento da contagem de células nucleadas totais neste momento. Embora tal estudo tenha utilizado uma dose notadamente mais elevada (3µg), podemos afirmar que o LPS também apresenta seu pico de ação pró-inflamatória após 8h, mesmo quando usado em menor concentração.

Williams et al. (2016) utilizaram dose semelhante de 0,5ng de LPS para indução de sinovite experimental, administrando CTMs derivadas de cordão umbilical no mesmo momento. Tal estudo demonstrou uma diminuição da contagem de células nucleadas no líquido sinovial 8h após a administração. Entretanto, o presente estudo não corrobora os achados destes autores, visto que o grupo tratado apresentou diferença significativa da contagem de células nucleadas totais em relação ao M0, mesmo após 16h do tratamento, no M24h do experimento. A causa da divergência entre os resultados obtidos pode estar fundamentada no momento de aplicação das CTMs. Assim, é possível que as CTMs, quando administradas juntamente com o agente indutor da inflamação, tenham mais tempo para interagir com os mediadores inflamatórios, que são liberados gradativamente pela

ação do LPS. Em contra-partida, visto que a inflamação pode sensibilizar as CTMs, alterando sua capacidade proliferativa e de diferenciação (Michael et al., 2016), é possível inferir que a inflamação previamente estabelecida no ambiente articular possa ter interferido na sua capacidade de modular os eventos inflamatórios locais. Adicionalmente, segundo Ardanaz et al. (2016) a aplicação intra-articular de CTMs *per se* resulta em um processo inflamatório de natureza transitória por até 5 dias, mesmo em articulações híidas. Em um ambiente inflamado, a liberação de citocinas capazes de induzir a expressão de MHC pelas CTMs e ativar direta ou indiretamente o sistema imune humoral (Schnabel et al., 2014) também pode ter colaborado com a persistência mais longa do processo inflamatório.

Em condições inflamatórias, os neutrófilos são as primeiras células a transpor a barreira endotelial e realizar diapedese, atraídos por quimiotaxia, possuindo importante papel na fase precoce da inflamação (Cruvinel et al., 2010). A ausência de diferença entre os grupos no presente trabalho não corrobora os resultados descritos por Williams et al. (2016), que descreveram uma diminuição da contagem total de neutrófilos no líquido sinovial 8h após a aplicação conjunta de LPS e CTMs.

Os neutrófilos são as principais células da inflamação aguda, aumentando sua proporção em milhares de vezes nas primeiras horas da inflamação, e constituem a maior parcela proporcional das células nucleadas totais. Assim, a ausência de diferença significativa na sua contagem provavelmente apenas reflita a mesma alteração ocorrida na contagem do número total de células nucleadas, compartilhando o motivo pelo qual não foram observadas diferenças.

4.2 Linfócitos e Macrófagos

Os linfócitos fazem parte do sistema imune adaptativo e possuem um grande papel nos processos inflamatórios, atraídos por uma série de quimiocinas (Cruvinel et al., 2010). Os resultados apresentados neste estudo demonstraram um aumento significativo,

24h após a indução da sinovite no G1 ($P=0,0059$). Não houve aumento significativo de linfócitos em nenhum momento G2. A resposta tardia dos linfócitos, quando comparada ao aumento na contagem de neutrófilos, também é esperada, uma vez que naturalmente estas células são recrutadas mais tardiamente no processo inflamatório. Os resultados do presente trabalho corroboram o reportado por Bartholomew et al. (2002), que demonstraram uma capacidade de redução da atividade proliferativa linfocitária em mais de 50% após co-cultivo com CTMs derivadas de medula óssea.

A ativação dos macrófagos em um ambiente inflamado leva à liberação de citocinas, como IL-1 e $TNF\alpha$, que ativam vias intracelulares pró-inflamatórias, resultando na diapedese de leucócitos e consequente aumento da condição inflamatória local (Kumar et al., 2015). O menor número de macrófagos no líquido sinovial no G2 após 24h indica que a interação entre as CTMs e o ambiente inflamatório ocorreu de forma a diminuir significativamente sua ativação.

Após a aplicação intra-articular de LPS, sua interação com as células ocorre com o envolvimento de várias proteínas, como a *LPS binding protein* (LPB), CD14, MD-2 e *Toll-like Receptor-4* (TLR4), culminando com a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células estimuladas pelo LPS (Lu et al., 2008). A sinalização dos receptores TLR-4, desencadeada pelo LPS, ativa a via p-53, que é responsável por diminuir a proliferação das CTMs e levá-las à apoptose (Afrazi et al., 2014). Deste modo, é possível que o LPS tenha causado uma sinalização exacerbada dos receptores TLR-4 contidos nas CTMs, contribuindo para a diminuição de seu efeito.

Uma vez que o pico de ação do LPS foi atingido 8 horas após sua aplicação, apresentando declínio gradativo deste ponto em diante, podemos afirmar que a ação inibitória do LPS sobre as CTMs também experimentou queda em sua potência a partir do momento 24 horas. Os linfócitos e macrófagos, presentes em grande quantidade neste momento, podem ter interagido com as CTMs, não mais superestimadas pelo LPS,

gerando a diminuição significativa na contagem destas células no M24h. Este fato pode ter ocorrido devido à capacidade de inibição da proliferação e função de linfócitos T e B, Natural Killers (NK), monócitos, macrófagos e células dendríticas apresentada pelas CTMs (Iyer e Rojas, 2008; Selmani et al., 2008; Spaggiari et al., 2009).

4.3 TGF β e PGE₂

O TGF- β é produzido pelos linfócitos e macrófagos, sendo capaz de promover crescimento e manutenção da homeostase condral no ambiente articular, estimulando a síntese de fibronectina e consequente condensação dos condrócitos (Finnson et al., 2012). O presente estudo demonstrou maior concentração de TGF- β no G1 após 24h. Este achado corrobora os resultados de Sousa et al. (2019), que encontraram maiores concentrações de TGF- β no líquido sinovial proveniente de articulações com OA. A exposição das CTMs sinoviais autólogas presentes naturalmente no organismo ao TGF- β promove estímulo à sua proliferação e ao seu potencial condrogênico (Kim et al., 2014). Desta maneira, os maiores níveis de TGF- β encontrados no G1 no M24h podem ser atribuídos à resposta do ambiente articular após a administração do LPS, de maneira a recrutar a população de CTMs residente na membrana sinovial e tecidos periarticulares. Em contra-partida, os menores níveis de TGF- β encontrados no G2 após 24h podem ser atribuídos à modulação da população de linfócitos e macrófagos no líquido sinovial no mesmo momento, uma vez que os linfócitos e os macrófagos são responsáveis pela produção de TGF- β .

As prostaglandinas, membros da família dos eicosanóides, são citocinas produzidas por quase todas as células do organismo por resposta a agressões químicas ou físicas (Smith, 1989; Park et al., 2006). São produzidas pela enzimas ciclo-oxigenases (COX) a partir do ácido araquidônico presente na membrana celular. A PGE₂ é uma das principais citocinas envolvidas na inflamação articular, podendo possuir ação pró-inflamatória (Frisbie et al., 2008) ou anti-inflamatória (Takayama et al., 2002), de acordo

com as circunstâncias. Frisbie et al. (2008) relataram ausência de diferença significativa nos níveis de PGE₂ do líquido sinovial após realizarem repetidas artrocenteses, comparando articulações híginas e portadoras de OA. Broeckx et al. (2019) também não relataram diferenças nos níveis de PGE₂ no líquido sinovial de animais com osteoartrite após tratamento com CTMs, quando comparado à administração de solução salina. A ausência de variação nos níveis de PGE₂ durante os momentos avaliados corrobora os dados dos autores, indicando também que a administração de 0.5ng de LPS intra-articular não foi capaz de alterar a concentração de PGE₂ sinovial.

A inflamação possui um papel central na organização da resposta das CTMs. A comparação de diversos resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa em experimentos anteriores (dados ainda não publicados) nos leva à constatação de que muitas variáveis influenciam o efeito biológico das CTMs, incluindo o tecido-alvo, o momento da aplicação, a forma da aplicação, a condição tecidual prévia e o grau de inflamação no momento da administração das CTMs, podendo ser favoráveis ou deletérias ao desempenho de sua função.

Os dados deste trabalho indicam, porém, que há um limiar inflamatório, a partir do qual as células começam a perder sua capacidade imunomoduladora. A adoção de medidas para primeiramente diminuir a inflamação, antes do início da terapia com CTMs, torna-se interessante para possibilitar maior atuação das CTMs, otimizando sua utilização. A administração das CTMs após o pico inflamatório, estratégia adotada por Molcanyi et al. (2007), também é uma forma de evitar sua inativação pela resposta imune. Entretanto, a persistência de células e de mediadores inflamatórios no líquido sinovial pode tornar a articulação suscetível a processos inflamatórios recidivantes, levando a maior degradação da matriz cartilaginosa e, em última instância, ao desenvolvimento da osteoartrite. São necessários estudos adicionais que visem encontrar métodos para impedir a dispersão sistêmica das CTMs e protegê-las (mecânica e imunologicamente) da reação inflamatória

exacerbada e consequente inativação, preservando assim sua ação imunomoduladora mesmo em ambientes notadamente inflamatórios.

5. CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos aponta uma interação entre o ambiente articular inflamado e as CTMs, causando diminuição de sua ação após sua administração intra-articular. Após a diminuição do pico inflamatório as CTMs apresentaram redução do número e regulação da atividade de linfócitos e macrófagos. Os resultados ainda indicam que a interação das CTMs com os mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial é diretamente relacionada à condição inflamatória articular no momento da aplicação. Por fim, a exploração de diferentes estratégias de controle da inflamação ou proteção das CTMs para que estas possam exercer plenamente seu efeito biológico é uma área potencial para estudos subsequentes que busquem explorar seu potencial imunomodulador sob diferentes condições.

Referências

- AFRAZI, A. et al. Toll-like receptor 4-mediated endoplasmic reticulum stress in intestinal crypts induces necrotizing enterocolitis. **J Biol Chem.**, v.289, n.14, p.9584–9599, 2014. doi:10.1074/jbc.M113.526517
- ANDREASSEN, S.M et al. Changes in concentrations of haemostatic and inflammatory biomarkers in synovial fluid after intra-articular injection of lipopolysaccharide in horses. **BMC Veterinary Research**, v.13, p.182, 2017.
- ARDANAZ, N. et al. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. **BMC Vet Res.**, v.12, p.65, 2016. doi:10.1186/s12917-016-0692-x
- BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.36, p. 568–84, 2004.
- BARTHOLOMEW, A. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, Volume 30, v.1, p.42-48, 2002.
- BROECKX, S.Y. et al. Evaluation of an osteochondral fragment–groove procedure for induction of metacarpophalangeal joint osteoarthritis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.80, n.3, p.246-258, 2019. <https://doi.org/10.2460/ajvr.80.3.246>
- BROSSI, P.M. et al. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. **BMC Vet Res.**, v.11, p.98, 2015. DOI 10.1186/s12917-015-0403-z.
- CAMPEBELL, R.C. et al. Effects of lidocaine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56 n.3, 2004.
- CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J Cell Physiol.**, v. 213, n. 2, p.341-7, 2007.
- CARVALHO, A.M. et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 65, n. 4, p. 939-945, 2013.

CASSANO, J.M. et al. Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. **Stem Cell Research & Therapy**, v.9, p.82, 2018. DOI 10.1186/s13287-018-08402.

COKELAERE, S.M. et al. Sustained intra-articular release of celecoxib in an equine repeated LPS synovitis model. **Eur J Pharm Biopharm** , v.128, p.327-336, 2018. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.05.001.

COLBATH, A.C. et al. Equine models for the investigation of mesenchymal stem cell therapies in orthopaedic disease. **Oper Tech Sports Med**, v.25, p.41-49, 2018. DOI 10.1053/j.otsm.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.50, n.4, p. 434-447, Aug. 2010.

DAVIES, P. et al. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation, **Annu. Rev. Immunol.**, v.2, p.335 – 357, 1984.

De BARI, C. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum**.v.44, p.1928-42, 2001.

DHODAPKAR, K.M. et al. Natural immunity to pluripotency antigen OCT4 in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A** , v.107, p.8718–23, 2010.. doi:10.1073/pnas.0915086107

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, v.8, p.315–317, 2006. doi: 10.1080/14653240600855905.

FINNISON, K.W. et al. TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. **Front Biosci (Schol Ed)**. v.4, p.251-68, 2012.

FRISBIE, D.D. et al. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses.**Osteoarthritis Cartilage**. v.16,n.10,p.1196-204, 2008 doi: 10.1016/j.joca.2008.03.008.

GAO, F. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death & Disease** v.7, p2062, 2016.

IYER S, ROJAS M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. **Expert Opin Biol Ther**; v. 8, p.569–582, 2008.

KAUNDAL U. et al. Immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells: a potential key to successful solid organ transplantation. **J Transl Med.**, v.16, n.1, p.31, 2018. Feb 15. doi:10.1186/s12967-018-1403-0

KAWCAK, C.E. Cap. 24 - Tarsus. In: McILWRAITH, C.W.; FRISBIE, D.D.; KAWCAK, C.E.; VAN WEEREN, P.R. **Joint Disease In The Horse**, 2nd ed. Elsevier: St. Louis, Missouri p. 340-353

KIM, Y. I. et al. Overexpression of TGF- β 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.450, n4, p1593–1599, 2014.

KUMAR, V. et al. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 9th edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2015.

LU, Y. et al. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, Volume 42, n.2, p. 145-151, 2008. ISSN 1043-4666.

MARINO, J. et al. Allorecognition by T lymphocytes and allograft rejection. **Front Immunol**, v. 7, p. 582, 2016. doi:10.3389/fimmu.2016.00582

MCILWRAITH, C.W. et al. **Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse**. 4 ed. Mosby-Elsevier, 2015. 464p. ISBN: 978-0-7234-3693-5

MEULYZER M. et al. Joint inflammation increases glucosamine levels attained in synovial fluid following oral administration of glucosamine hydrochloride. **Osteoarthritis Cartilage**. v.17, n.2, p.228-34, 2009. doi: 10.1016/j.joca.2008.06.018.

MICHAEL, S. et al. Inflammation Shapes Stem Cells and Stemness during Infection and Beyond. **Front Cell Dev Biol**.v.4, p.118, 2016. doi:10.3389/fcell.2016.00118

MOLCANYI, M. et al. Trauma-Associated Inflammatory Response Impairs Embryonic Stem Cell Survival and Integration after Implantation into Injured Rat Brain. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 4, p. 625-637, 2007. doi:10.1089/neu.2006.0180

OLIVEIRA, P.G.G. et al . Avaliação da migração das células progenitoras após terapia da tendinite equina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 66, n. 4, p. 1033-1038, Aug. 2014 .

PALMER, J.L.; BERTONE, A.L. Experimentally-induced synovitis as a model for acute synovitis in the horse. **Equine vet. J.**, v.26, n. 6, p.492-495, 1994.

RIEKSTINA, U. et al. Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. **Stem Cell Rev and Rep**, v.5, p. 378, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9>

ROSS, T.N. et al. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthr. Cartil.**, v.20, p. 1583-90, 2012.

SAKAGUCHI, Y. et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. **Arthritis Rheum.** , v. 52, p. 2521-9, 2005.

SANTOS, V.H. et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. **BMC Vet Res.**, v. 14, p.114, 2018. DOI 10.1186/s12917-018-1425-0.

SCANZELLO, C.R.; GOLDRING, S.R. The Role of Synovitis in Osteoarthritis pathogenesis. **Bone.**, v. 51, n. 2, p. 249–57, 2012. DOI:10.1016/j.bone.2012.02.012.

SCHNABEL, L.V. et al. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. **Stem Cell. Res. Ther.**, v.5, n.1,p.13, 2014. <http://doi.org/10.1186/scrt402>

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 6, n.11, p. 625-35, 2010. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.159.

SELMANI, Z. et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. **Stem Cells**, v. 26, p.212–222, 2008.

SILVA- CARVALHO A.E. et al. Mesenchymal stem cells immunomodulation: The road to IFN- γ licensing and the path ahead. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2019. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.05.006 ISSN 1359-6101.

SOUSA, E.B. et al. Osteoarthritic Synovial Fluid Modulates Cell Phenotype and Metabolic Behavior In Vitro. **Stem Cells International**, v.2019, Article ID 8169172, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/8169172>

SPAGGIARI, G.M. et al. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. **Blood**; v.113, p. 6576–6583, 2009.

STASHAK, T.D. **Adams and Stashak's lameness in horses**. 6th ed. Iowa, USA, Wiley-Blackwell publishing, 2011.

TAKAYAMA, K. et al. Prostaglandin E2 suppresses cytokine production in human macrophages through the EP4 receptor, **J. Biol. Chem.**, v.277, 2002.

TANG, H.C. et al. Differentiation Effects of Platelet-Rich Plasma Concentrations on Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells from Pigs Cultivated in Alginate Complex Hydrogel. **Int. J. Mol. Sci.**, v.16, p. 18507-21, 2015.

ULMER A.J. et al. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). **Toxicology**, v.152, p. 37–45, 2000.

Van der HARST, M. et al. Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. **J Rheumatol.**, v.33, n. 8, p. 1662-7, 2006.

VINATIER, C. et al. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. **Trends Biotechnol.** v. 27, n. 5, p. 307-14, 2009. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.02.005

WILLIAMS, L.B. et al. Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an lipopolysaccharide induced synovitis model. **EVJ.**, v. 48, p. 619–25, 2016. ISSN 0425-1644. DOI: 10.1111/evj.12477

YAMADA, A.L.M. **Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas (PRP) e**

células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em eqüinos. 2011. 111p. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

YAN, H. et al. Priming of Toll-like receptor 4 pathway in mesenchymal stem cells increases expression of B cell activating factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 448, n.2, p.212-217, 2014. ISSN 0006-291X,