ALINE AMBROGI FRANCO PRADO

**Obtenção e caracterização de linhagens celulares de membrana e líquido
sinoviais equinos**

São Paulo
2012

ALINE AMBROGI FRANCO PRADO

**Obtenção e caracterização de linhagens celulares de membrana e líquido
sinoviais equinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2655
FMVZ

Prado, Aline Ambrogi Franco

Obtenção e caracterização de linhagens celulares de membrana e líquido sinoviais equinos / Aline Ambrogi Franco Prado. -- 2012.
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Células-tronco. 2. Membrana sinovial. 3. Líquido sinovial. 4. Equinos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Obtenção e caracterização de linhagens celulares de membrana e líquidos sinoviais equino", protocolado sob o nº 2771/2012, utilizando 10 (dez) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/9/2012.

We certify that the Research "Obtention and characterization of cell lines from equine synovial membrane and synovial fluid", protocol number 2771/2012, utilizing 10 (ten) horses, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/19/2012.

São Paulo, 20 de setembro de 2012.

Alice Maria Melyville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PRADO, Aline Ambrogi Franco

Título: Obtenção e caracterização de linhagens celulares de membrana e líquido sinoviais equinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Marco Tullio, que me levou para assistir às consultas e cirurgias desde muito pequena e me incentivou a escolher essa profissão maravilhosa. Eu o admiro muito como pessoa e como profissional. Obrigada, pai, por sempre acreditar na minha capacidade e por ser meu melhor amigo. Essa luta por nosso sonho é uma busca incansável para ser cada dia mais igual a você.

À minha mãe, Maria da Penha, uma mulher inteligente, maravilhosa e dedicada. Agradeço por desejar a minha presença incansavelmente e por viver à espera da minha volta pra casa.

À minha irmã, Catarine, que me dá forças para ir cada vez mais longe. Com ela aprendi que a felicidade está nas pequenas atitudes e palavras.

Às minhas irmãs, Maria Victória e Maria Luíza, por me darem tanto amor e carinho.

Ao vovô Zezé que me ensinou que humildade é a maior virtude de uma pessoa.

À vovó Célia que é a mulher mais guerreira, me impressionando e mostrando, a cada dia, sua enorme força e seu amor pela família.

Ao vovô Chiquinho que me faz sentir a pessoa mais especial do mundo.

À vovó Ilma que me acompanha a todo o momento.

Ao meu noivo, Diego, que me faz acreditar que o amor é um sentimento que traz paz ao coração.

Ao meu anjinho da guarda, Bili, que me oferece um amor imenso e incondicional todos os dias.

E, especialmente, aos cachorros do Canil GRMD - Brasil que ajudaram a iluminar os meus dias em São Paulo, mostrando a todos que, mesmo diante das dificuldades, a alegria e amor prevalecem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família. Todos, sem exceção, ajudaram na minha educação.

Ao meu noivo, Diego, que é meu verdadeiro companheiro e teve toda a paciência e amor para me ajudar a dar mais esse passo.

Aos meus tios, Lúcia e Flávio, que acreditaram na minha capacidade. Eles abriram as portas para as melhores oportunidades da minha vida.

Ao tio Fernando que é um Médico Veterinário exemplar e me deu forças para seguir a sua profissão.

Aos meus tios Marta, Juarez, Zélia, Aldinho, Leley, Paulinho, Denise, Núbia, Magno, Elvira e José Pedro.

Aos meus primos Dudu, Nessa, Dani, Flávia, Bruno, Júlia, Sofia e Luciana.

À Cris e Pedrão que também são meus pais.

À Dona Cida, Seu Fernando, Tiago, Vanessa e Beatriz que me acolheram como novo membro da família.

À Prof. Maria Angélica que me deu a oportunidade de ingressar no apaixonante mundo da pesquisa.

Ao Prof. Luis Cláudio pela disponibilidade e pela enorme atenção durante todo o tempo de pesquisa e à Prof.^a Raquel Baccarin que acreditou no meu projeto.

À Cris Mantovani e Thaís Machado, grandes amigas que me ajudaram em todos os momentos dessa pesquisa.

Aos professores da Anatomia Assis, Patrícia, Paula Papa, Alan e Kfoury.

À Prof.^a Ligia Gomes, da Faculdade de Farmácia, por todo carinho e atenção.

À Prof.^a Ana Flávia de Carvalho que me ajudou e incentivou a seguir seus passos na área acadêmica.

Aos meus amigos de Campestre e aos da faculdade.

Aos amigos do Instituto Butantan Álvaro, Myriam, Fernanda, Manuela, Janaína, Thais, Kleber, Rosângela, Horácio, Lara, Ana Rita, Leandro, Eduardo, Rafael e Rose.

Aos amigos da Anatomia Márcio, Marina, Renata, Luiz, Amanda Martins, Sônia, Dayane, Dilayla, Sarmiento, Thaís, André, Rafael, Felipe, Juliana, Paula, Marcos Vinícius, Sílvia, João Leonardo, Carol, Greysson, Bruno Bertassoli, Amilton, Daniela Moraes, Delys,

Paulo, Vitória, Diego Viana, Matheus, Valdir, Jodonai, Joice, Renato Bergqvist, Laís Gontijo, Elaine, Lorena, Maicon, Jaque, Ronaldo, Augusto, Índio, Tia Bernadete e Rose.

Aos meus eternos amigos que foram minha família em São Paulo Camila, Hugo, Bárbara, Amanda e Bruno Vasconcelos.

À minha amiga Ana Hironimus que dividiu comigo várias risadas.

À Fernanda, Paloma, Luciana e Rosana pela paciência e confiança.

Aos funcionários da USP e do Instituto Butantan.

À CAPES pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço imensamente ao Prof. Durvanei Augusto Maria que me acolheu como orientador, pai e amigo.

Lembro-me da primeira vez que cheguei ao Laboratório e me encantei com a receptividade e alegria do professor. Senti uma segurança tão grande que pedi para que meu trabalho fosse realizado ali.

Felizmente, meu pedido foi aceito. Com seus conselhos, cresci pessoal e profissionalmente.

Obrigada pela paciência para explicar e entusiasmo com a minha pesquisa.

Serei eternamente grata ao senhor.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.”

Chico Xavier

RESUMO

PRADO, A. A. F. **Obtenção e caracterização de linhagens celulares de membrana e líquido sinoviais equinos.** [Obtention and characterization of cell lines from equine synovial membrane and synovial fluid]. 2012. 112 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A cartilagem articular é um tecido avascular, com baixa celularidade, composta principalmente de colágeno extracelular e proteoglicanos, com uma capacidade limitada de regeneração. Nos últimos anos, diversas abordagens clínicas e de pesquisa têm sido adotadas para reparar danos na cartilagem articular, como transplante de condrócitos, enxerto de periósteo, células-tronco mesenquimais e tecidos derivados dessas células. O isolamento de células-tronco mesenquimais foi relatado a partir de diferentes tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical, sangue periférico e saco vitelino em equinos. As células-tronco mesenquimais derivadas de líquido e membrana sinoviais foram obtidas em humanos, cães, suínos e caprinos e são fontes promissoras para regeneração articular, já que são tecido-específicas e de fácil obtenção e cultivo. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e caracterizar a linhagens de células obtidas de membrana e líquido sinoviais equinos. Os fragmentos foram obtidos por meio de artroscopias e cultivados em meios de cultura DMEM-H e MEM para obtenção das linhagens. Para análise da morfologia celular foi realizada a fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida. A expressão de marcadores de células-tronco (CD45RO, OCT3/4, NANOG, CD105, CD90, CD34, CD117, CD133, TRA-1-81, VEGF-R1 e Ly6a), marcadores inflamatórios (COX-2, TNF-R1-r, CD11, CD1a e MCP-1) e marcadores envolvidos na checagem e progressão do ciclo celular (Caspase-3 fosforilada, HSP-47, P21, Ki67, Ciclina D1 e P53) mostraram diferencialmente expressos, sugerindo que podemos considerá-las uma possível fonte de células-tronco mesenquimais. Devido ao grande impacto que patologias na articulação têm sobre o desempenho atlético em cavalos, os resultados demonstrados neste trabalho será uma base para conduzir outros experimentos na avaliação das aplicações terapêuticas dessas células.

Palavras-chave: Células-tronco, Membrana sinovial, Líquido sinovial, Equinos.

ABSTRACT

PRADO, A. A. F. **Obtention and characterization of cell lines from equine synovial membrane and synovial fluid.** [Obtenção e caracterização de linhagens celulares de membrana e líquido sinoviais equinos]. 2012. 112 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The articular cartilage is an avascular tissue with low cellularity composed of extracellular collagen and proteoglycans. It has a limited capacity of regeneration. Chondrocyte transplantation, mesenchymal stem cells and tissues derived from these cells has been used by several researches to repair damage to the articular cartilage. The isolation of mesenchymal stem cells has been reported from different tissues such as bone marrow, adipose tissue, blood, umbilical cord, and yolk sac. The mesenchymal stem cells from synovial fluid and synovial membrane were obtained from humans, dogs, pigs and goats. These cells are tissue specific and easy to obtain and cultivate. The objective of this research is to obtain and characterize cells from equine synovial fluid and synovial membrane. The samples were obtained by arthroscopy and cultivated in the DMEM-H and MEM media. Cell morphology analyses were made by photodocumentation in inverted microscopy. The expression of stem cell markers (CD45RO, OCT3/4, NANOG, CD105, CD90, CD34, CD117, CD133, TRA-1-81, VEGF-R1 and Ly6a), inflammation markers (COX-2, TNF-R1-r, CD11, CD1a and MCP-1) and markers involved in checking and cell cycle progression (Caspase-3, HSP-47, P21, Ki67, Ciclina D1 and P53) showed differentially expressed. Mesenchymal stem cells from synovial membrane and synovial fluid provide promise for cell-based therapies for articular cartilage repair. These results may lead other experiments to use these cells to new therapeutic applications.

Key words: Stem cells, Synovial membrane, Synovial fluid, Equine.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCG-2	Superfamília de proteínas transportadoras que se ligam ao ATP (cassetes);
AH	Ácido hialurônico
AR	Artrite reumatoide
CASPASE-3	Cisteíno-protease aspartato executora
CD	Grupo de diferenciação
CD 44	Glicoproteína envolvida na interação célula-célula, adesão e migração.
CD105	Ou endogлина é uma glicoproteína de membrana expressa em células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células musculoesqueléticas
CD106	Ou VCAM-1, proteína que media a adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos
CD11	Componente de integrinas; participa na quimiotaxia, na ativação celular, na citotoxicidade e na fagocitose
CD117	Ou c-Kit, receptor de tirosino-quinase expresso em células-tronco hematopoiéticas e em progenitores mielóides.
CD133	Proteína transmembrana expressa em células-tronco hematopoiéticas, gliais, de medula óssea e em células progenitoras endoteliais
CD14	Proteína presente em macrófagos, responsável por detectar lipolissacarídeos de bactérias
CD1a	Glicoproteína transmembrana, media a apresentação de antígenos para os linfócitos T
CD271	Pertence à superfamília do TNF-R1; são expressos em populações de células-tronco mesenquimais precursoras
CD34	Ou sialomucina, glicoproteína que funciona como fator de adesão celular
CD44	Glicoproteína que é um receptor para o ácido hialurônico e pode também interagir com o colágeno e as MMPs;
CD45RO	Proteína tirosina fosfatase, relacionada ao crescimento celular, diferenciação e ciclo mitótico.
CD68	Glicoproteína presente em macrófagos
CD73	Marcador expresso em células-tronco mesenquimais

CD75	Expresso em linfócitos B maduros, linfócitos T e eritrócitos
CD90	Ou Thy-1, marcador de células progenitoras multipotentes
CGP	Células germinativas primordiais
Ciclina D1	Proteína reguladora das CDK's (quinases dependente de ciclinas), envolvidas na fase G1/S
c-Myc	Gene regulador que faz a codificação de um fator de transcrição
COX-2	Ou ciclo-oxigenase-2, produzida em altas concentrações na inflamação, responsável pela produção de prostaglandinas
CT	Células-tronco
CTM(s)	Célula(s)-tronco mesenquimai(s)
DMEM	Meio de cultura Dulbecco Modified Essential Medium High Glucose
DMEM F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EGG	Éter-gliceril-guaicol
G1	Fase durante a qual a célula cresce devido às sínteses proteicas
G2	Fase de crescimento celular
GAG(s)	Glicosaminoglicano(s)
HSP-47	Chaperona molecular, está envolvida na síntese do pró-colágeno e na condrogênese
Ki67	Antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto G0
LS	Líquido sinovial
Ly6a	Expresso em populações de células progenitoras
M	Fase que representa a divisão celular (mitose)
MCI	Massa celular interna
MCP-1	Ou proteína quimiotática de monócitos-1, é produzida por macrófagos e células endoteliais
MDR-1	Ou ABCP-1, pertence a uma superfamília de proteínas transportadoras; protege células-tronco hematopoiéticas de toxinas
MEC	Matriz extracelular
MEM	Meio de cultura Minimum Essential Medium
MIF	Média de intensidade de fluorescência
ml	mililitro
MMPs	Matriz metaloproteinases

MS	Membrana sinovial
NANOG	Fator de transcrição de células-tronco embrionárias e germinativas pluripotentes
OA	Osteoartrites
OCD	Osteocondrite/osteocondrose dissecante
OCT3/4	Fator de transcrição de células-tronco embrionárias e germinativas pluripotentes
P21	Proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, reguladora da transição da fase G1-S e G2-M consecutivamente.
P53	Atua impedindo a progressão do ciclo celular na transição G1/S, na presença de danos à molécula de DNA
PBS	Solução tampão fosfato de sódio
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
S	Fase durante a qual a célula duplica seu DNA
SFB	Soro fetal bovino
SSEA-4	Glicoproteína expressa em células-tronco embrionárias
STRO-1	Proteína da superfície celular expressas pelas células-tronco de medula óssea e de precursores eritróides
TECs	Tissue Engineering Constructs
TNF-R1	Ou CD120 ou receptor fator de necrose tumoral, está envolvido com inflamação aguda, com a osteoclastogenese e com a indução de morte celular
TRA-1-81	Expresso em células-tronco embrionárias
UDPGD	Uma enzima necessária para a produção de AH, expressa por células-tronco derivadas da sinóvia
ug/ml	Unidade grama por mililitro
VEGF-R1	Proteína homodimérica, envolvida na angiogênese tumoral e metástase. Também estimula o recrutamento de células-tronco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representando a amputação, surgimento do blastema e regeneração do membro de um <i>Ambystoma mexicanum</i> (Axolotl).....	23
Figura 2 - Esquema representativo de uma articulação sinovial	28
Figura 3 - Esquema ilustrativo das fases do ciclo celular.....	40
Figura 4 - Demonstração do procedimento de artroscopia.....	44
Figura 5 - Imagens da membrana sinovial de um equino com OA.	44
Figura 6 - Fluxograma representativo do delineamento experimental para obtenção da membrana e líquido sinoviais por artroscopia e da cultura de células <i>in vitro</i>	47
Figura 7 - Aspecto morfológico do explante (seta preta contínua) da MS, após 20 dias de cultivo em meio MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos.	59
Figura 8 - Aspecto morfológico da cultura de LS após 35 dias..	59
Figura 9 - Aspecto morfológico da cultura de LS, cultivada em meio MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos, após 40 dias de cultura.	60
Figura 10 - Aspecto morfológico da cultura de MS, cultivada em meio MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos, após 40 dias de cultura..	60
Figura 11 - Aspecto morfológico da cultura de MS após 50 dias de cultivo..	61
Figura 12 - Imagens das culturas LS no período de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas, mostrando a disposição, organização e densidade celulares.....	63
Figura 13 - Imagens das culturas MS no período de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas, mostrando a disposição, organização e densidade celulares.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico dos valores das médias representativo da curva de crescimento celular LS.	62
Gráfico 2 - Gráfico de barras representando a média da viabilidade celular da cultura LS, durante 168 horas de cultura.	63
Gráfico 3 - Gráfico dos valores das médias representativo da curva de crescimento celular MS.....	64
Gráfico 4 - Gráfico de barras representando a média da viabilidade celular da cultura MS, durante 168 horas de cultura.	65
Gráfico 5 - Gráficos representativos do tipo <i>dotplot</i> mostrando a expressão de cada marcador de célula-tronco nas células LS.	67
Gráfico 6 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de células-tronco expressos pelas células LS.	67
Gráfico 7 - Gráficos representativos do tipo <i>dotplot</i> mostrando a expressão de cada marcador de células-tronco nas células MS.....	68
Gráfico 8 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de células-tronco expressos pelas células MS.	68
Gráfico 9 - Gráficos representativos do tipo <i>dotplot</i> mostrando expressão de cada marcador inflamatório nas células LS.	70
Gráfico 10 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores inflamatórios expressos pelas células LS.	70
Gráfico 11 - Gráficos representativos do tipo <i>dotplot</i> mostrando a expressão de cada marcador inflamatório nas células MS..	71
Gráfico 12 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores inflamatórios expressos pelas células MS.	71
Gráfico 13 - Gráficos representativos do tipo <i>dotplot</i> mostrando a expressão de cada marcador de proliferação e morte celular nas células LS.	72
Gráfico 14 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de proliferação e morte celular expressos pelas células LS.	72
Gráfico 15 - Gráficos representativos do tipo <i>dotplot</i> mostrando a expressão de cada marcador de proliferação e morte celular nas células MS.	73
Gráfico 16 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de proliferação e morte celular expressos pelas células MS.	73

Gráfico 17 - Histogramas representativos analisados pelo programa ModFit das aquisições obtidas por citometria de fluxo. Análise das distribuições populacionais das células LS mantidas em cultura por 48 e 144 horas nas diferentes fases do ciclo celular.	74
Gráfico 18 - Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das populações celulares da cultura LS nas diferentes fases do ciclo celular. As análises das culturas foram realizadas nos períodos de 48 horas e 144 horas.	75
Gráfico 19 - Histogramas representativos analisados pelo programa ModFit das aquisições obtidas por citometria de fluxo. Análise das distribuições populacionais das células MS mantidas em cultura por 48 e 144 horas nas diferentes fases do ciclo celular.	76
Gráfico 20 - Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das populações celulares da cultura MS nas diferentes fases do ciclo celular. As análises das culturas foram realizadas no período de 48 horas e 144 horas.	77
Gráfico 21 - Porcentagem do índice proliferativo de linfócitos normais estimulados com fitohemaglutinina utilizados como grupo controle para o cálculo do índice proliferativo. As células foram mantidas na presença e ausência de fitohemaglutinina por 144 horas.	79
Gráfico 22 - Curva da distribuição das populações celulares em proliferação obtidas pela distribuição do marcador CFSE das células LS e MS mantidas por 48 e 144 horas de cultivo.	80
Gráfico 23 - Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP dos índices proliferativos das células LS e MS	80
Gráfico 24 - Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial das células LS em 48 e 144 horas de cultivo, obtidos pela distribuição da sonda Rodamina 123.	81
Gráfico 25 - Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP do potencial elétrico mitocondrial das células LS e MS com 48 e 144 horas de cultivo.	82
Gráfico 26 - Histogramas representativos das populações celulares MS em 48 e 144 horas de cultivo	82
Gráfico 27 - Gráfico de barras representando a média $\pm$ DP do potencial elétrico mitocondrial das células LS e MS com 48 e 144 horas de cultivo.	83
Gráfico 28 - Gráficos do tipo <i>dotplot</i> representando o número de mitocôndrias por população de células LS e MS no período de 48 e 144 horas.	84
Gráfico 29 - Gráfico de barras representando a média $\pm$ DP do número de mitocôndrias por população de células LS e MS no período de 48 e 144 horas.	85

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Tabela representando o tempo de crescimento e morfologia das células MS e LS em diferentes meios de cultura.....	57
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos Gerais.....	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3.1 Articulação.....	27
3.2 Membrana Sinovial.....	29
3.3 Líquido Sinovial	29
3.4 Fisiopatogenia das lesões articulares.....	30
3.5 Osteocondrite Dissecante.....	32
3.6 Células-Tronco e Terapia Celular	33
3.6.1 Células-tronco mesenquimais derivadas de líquido e membrana sinoviais	36
3.7 Cultivo Celular	38
3.8 Citometria de Fluxo, Ciclo Celular e Marcadores Celulares.....	39
3.9 Análise do potencial elétrico mitocondrial	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Obtenção do Material	43
4.1.1 Artroscopia.....	43
4.1.2 Preparo do animal e técnica anestésica	45
4.1.3 Técnica cirúrgica	45
4.2 Estabelecimento das linhagens de células de LS e MS	46
4.2.1 Protocolo de cultivo celular para o LS	46
4.2.2 Protocolo de cultivo celular para a MS	46
4.2.3 Caracterização dos aspectos morfológicos.....	47
4.2.4 Dissociação enzimática das células aderentes.....	48
4.3 Avaliação do crescimento celular: curva de crescimento.....	48

4.4 Congelamento Celular	48
4.5 Descongelo Celular	49
4.6 Análises por citometria de fluxo	49
4.6.1 Análise dos marcadores de células-tronco	50
4.7 Análise das fases do ciclo celular	51
4.7.1 Incorporação do iodeto de propídio (PI) e leitura das amostras.....	52
4.7.2 Marcadores Envolvidos na Checagem e Progressão do Ciclo Celular	52
4.7.3 Marcadores Envolvidos na Inflamação	53
4.8 Forma de Análise dos Resultados	54
4.9 Análise do Potencial Elétrico da Membrana Mitocondrial.....	54
4.10 Análise Estatística	55
5 RESULTADOS	57
5.1 Características morfológicas do crescimento das culturas primárias do líquido e da membrana sinoviais	57
5.2 Curva de Crescimento de Líquido e Membrana Sinoviais	62
5.3 Análise Dos Marcadores Celulares Por Citometria De Fluxo	66
5.3.1 Marcadores de células-tronco.....	66
5.3.2 Marcadores inflamatórios.....	69
5.3.3 Marcadores de proliferação e morte celular	72
5.3.4 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo das linhagens de líquido e membrana sinoviais.....	74
5.3.5 Análise do índice proliferativo do crescimento das populações de células LS e MS	78
5.3.6 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial da Membrana Mitocondrial em Linhagens LS e MS	81
6 DISCUSSÃO	87
7 CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS.....	100

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os cavalos de competição de alto nível, que desempenham suas atividades próximas ao limite, podem ter sua performance afetada negativamente devido às alterações no aparelho locomotor (CANTO et al., 2006). Torna-se urgente uma aplicação clínica estratégica para tais lesões, em cartilagem, osso, tendão e músculos (FAN et al., 2009).

Doenças inflamatórias, degenerativas e reumáticas trazem como consequência a destruição da articulação, levando à incapacidade funcional grave. Sua alta prevalência e impacto sobre a capacidade de trabalho, aliada com os elevados custos dos procedimentos terapêuticos, fazem disso um grande problema para a clínica médica (DE BARI et al., 2001b).

O dano ao tecido resulta de um desequilíbrio entre dois componentes: fatores patológicos (inflamatório/imunológico; traumático/mecânico) e processos reparadores (DE BARI, 2001b).

A natureza avascular da cartilagem leva a uma difícil regeneração desse tecido. Assim, a terapia celular vem sendo largamente utilizada para o tratamento de patologias articulares (FAN et al., 2009).

O líquido sinovial (LS) é um fluido viscoso, amarelo claro, límpido, livre de material particulado e não coagulante por ser desprovido de fibrinogênio e outros fatores de coagulação (VAN PELT, 1967), e produzido pela membrana sinovial (MS). As três principais funções da MS são: fagocitose, regulação do conteúdo proteico e hialuronato do fluido sinovial e regeneração, além de se estender e contrair (STASHAK, 1994).

Apesar de por anos ter sido tratada como um material inerte, é evidente que a cartilagem articular é um tecido vivo que sofre regeneração constante. Células mesenquimais progenitoras são encontradas no interior da MS e no LS, o que pode explicar a reparação de cartilagem *in vivo* (GERTER; KRUEGEL; MIOSGE, 2012).

A osteocondrite/osteocondrose dissecante (OCD) é caracterizada pela presença de fragmentos cartilaginosos intra-articulares decorrentes da osteocondrose, que desencadeiam o processo inflamatório (VAN WEEREN, 2006). Na clínica, para a cura de pacientes com OCD, parte do fragmento precisa ser retirada por artroscopia. Isto proporciona uma oportunidade para extrair células-tronco (CT) autólogas a partir de tecido sinovial para a regeneração da cartilagem (GUALTIERI; GAMBRIOLI, 1978; FOERNER, 2003).

A regeneração tecidual pode ser vista há anos na natureza, como é o caso de algumas salamandras que são poderosos modelos porque podem reconstituir um membro totalmente funcional após uma lesão. A amputação em qualquer lugar dos membros torácicos ou pélvicos

do animal desencadeia na formação de uma zona de células progenitoras chamada de blastema, que regenera a porção perdida (figura 1) (UMANSKI, 1938).

Figura 1 - Esquema representando a amputação, surgimento do blastema e regeneração do membro de um *Ambystoma mexicanum* (Axolotl)

Fonte: KRAGL et al., 2009

As células-tronco mesenquimais (CTMs) podem ser definidas como uma população de células aderentes, fibroblastoides, multipotentes, com elevada capacidade proliferativa e são consideradas um tipo promissor de terapia para a reparação musculoesquelética. Além das células obtidas de medula óssea, melhorias recentes na tecnologia de isolamento de células permitiram a identificação de células-tronco mesenquimais a partir de vários tecidos adultos, tais como periósteo, músculo esquelético, tecido adiposo, membrana e líquido sinoviais (SAKAGUCHI et al., 2005).

Os condrócitos são os tipos celulares predominantes na cartilagem, mas têm uma capacidade proliferativa limitada. Fontes alternativas de células para a reparação de cartilagem têm sido o foco de muitos estudos (DARLING; ATHANASIOU, 2005).

Apesar das células de medula óssea serem uma fonte bem aceita de células-tronco, as de membrana e líquido sinoviais são fontes tecidos-específicas, levando a um potencial condrogênico e de expansão maiores do que as de outro tipo. Além disso, tais células podem ser obtidas por técnicas minimamente invasivas (DE BARI et al., 2001a; SAKAGUCHI et al., 2005; YOSHIMURA et al., 2007; LEE et al., 2012).

As osteoartrites trazem graves implicações e consequências aos equinos, tais como dificuldade de cura das articulações cronicamente acometidas, gerando prognóstico de recuperação, na maioria das vezes, reservado, causando dor persistente à locomoção e contribuindo para claudicações crônicas (FRISBIE; SMITH, 2010).

Novas estratégias devem ser desenvolvidas para tratar os danos generalizados e crônicos encontrados nas osteoartrites, em que a intervenção cirúrgica para alcançar a reparação focal não é viável (DEALY, 2012).

Objetivos

2 OBJETIVOS

Estudar o potencial de manutenção, diferenciação e atividade proliferativa de células da membrana e do líquido sinoviais equinos.

2.1 Objetivos Gerais

- Obtenção de linhagens celulares de membrana e líquido sinoviais equinos;
- Cultivo, expansão e caracterização dos marcadores das células de membrana e líquido sinoviais equinos.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção de culturas primárias de células de membrana e líquido sinoviais equinos;
- Manutenção e expansão das linhagens obtidas das culturas primárias de membrana e líquido sinoviais equinos, estabelecendo um banco de células;
- Caracterização das culturas de células (capacidade proliferativa e cinética de crescimento celular, com a expressão dos marcadores celulares);
- Analisar as vias de morte, progressão e fases do ciclo celular das culturas;
- Analisar a viabilidade celular por meio da avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial;
- Analisar uma possível fonte de células-tronco mesenquimais que poderão ser usadas como ferramenta de estudo da biologia celular para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Articulação

A cartilagem de uma articulação sinovial é formada por condrócitos, abundante matriz extracelular (MEC) de colágeno tipo II associadas ao ácido hialurônico (AH) e proteoglicanos com seus glicosaminoglicanos (GAGs). Os condrócitos são responsáveis pela regulação ativa da produção e da destruição dos componentes da MEC (TODHUNTER, 1996).

Os proteoglicanos, juntamente com o colágeno tipo II, constituem componentes orgânicos importantes da MEC e são responsáveis por várias propriedades físico-químicas do tecido (BAYLISS et al., 1999).

A capacidade de amortecimento da cartilagem é devida à alta retenção e repulsão de água dos grupos aniônicos dos proteoglicanos, principalmente pelo agrecan que é o maior e mais abundante proteoglicano no tecido articular (MCILWRAITH, 1996).

Histologicamente, as cartilagens são constituídas por células de origem mesodermal denominadas condrócitos e abundante material extracelular denominado matriz. As cartilagens articulares são do tipo hialina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os proteoglicanos são glicosaminoglicanos combinados com proteínas por covalência. Cada molécula de proteoglicano consiste em uma parte central periférica (cerne), de onde irradiam numerosas moléculas não ramificadas e relativamente curtas de glicosaminoglicanos sulfatados (condroitim-4-sulfatado, condroitim-6-sulfatado e queratam sulfato). O alto conteúdo de água de solvatação das moléculas de glicosaminoglicanos atua como um sistema de absorção de choques mecânicos, ou mola biomecânica, de grande significado funcional, principalmente nas cartilagens articulares. Outro componente importante nas cartilagens é a glicoproteína estrutural condronectina, uma macromolécula com sítios de ligação para condrócitos, fibras colágenas tipos II e glicosaminoglicanos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O papel da cartilagem articular é promover uma superfície de baixa fricção, transmitir e distribuir as forças na articulação. A cartilagem articular é mais efetiva do que o osso subcondral em reduzir picos de cargas quando comparado ao osso. O esquema representativo de uma articulação sinovial pode ser analisado na figura 2 (ANASTASIOU; 2003).

A cápsula articular é composta por duas partes, a camada fibrosa, que se localiza externamente e é contínua ao periósteo ou pericôndrio, e a MS, que reveste a cavidade sinovial onde não há cartilagem articulada. A porção fibrosa da cápsula articular é composta de tecido conjuntivo denso que dá alguma estabilidade mecânica à articulação. Numerosos vasos sanguíneos estão presentes. Parece que cada articulação possui uma inervação dupla que consiste em nervos articulares específicos, alcançando a cápsula articular como ramos articulares independentes dos nervos periféricos adjacentes e, secundariamente, por ramos articulares não específicos, originados dos nervos dos músculos relacionados à articulação. A maioria das terminações nervosas se localiza na cápsula articular fibrosa e não na MS. Dois tipos principais de órgãos terminais foram identificados na cápsula articular, enquanto um terceiro tipo (semelhante ao órgão tendíneo de Golgi) é exclusivo dos ligamentos e responde às tensões não fisiológicas (STASHAK, 1994).

A cartilagem articular é avascular (STASHAK, 1994; OSBOURNE et al., 1995; MCILWRAITH, 2005), não estando sujeita a ação do sistema imune. É formada de cartilagem hialina madura e as células para reparação não podem ser recrutadas. Existem limites para a divisão potencial das células da cartilagem e sua habilidade para ser reparada. Portanto, torna-se difícil tratar a osteoartrite quando esta progride e a cartilagem articular degenera (INOUE et al., 2006).

Nos adultos, as cartilagens articulares estão separadas dos espaços vasculares subcondrais por uma placa terminal de osso e a nutrição da cartilagem ocorre por difusão do fluido sinovial. Não há nervos nas cartilagens articulares e a superfície de apoio das cartilagens depende das terminações nervosas da cápsula articular, ligamentos, músculos e osso subcondral para uma apreciação da dor e propriocepção (STASHAK, 1994).

Figura 2 - Esquema representativo de uma articulação sinovial

3.2 Membrana Sinovial

As três principais funções da MS são: fagocitose, regulação do conteúdo proteico e hialuronato do fluido sinovial e regeneração, além de se estender e contrair. A inflamação pode levar a fibrose, que impede as propriedades fisiológicas da membrana, resultando em um enrijecimento da articulação. A MS se regenera facilmente após sinovectomia que se completa aos 35 dias (STASHAK, 1994).

Theoret et al. (1996) também mostraram que o tecido sinovial tem alta capacidade auto-regenerativa. Provaram a capacidade de cicatrização completa após sinovectomia em cavalos.

A inervação da MS parece ser principalmente autônoma (CARON et al., 1992; STASHAK, 1994).

As células presentes na MS são sinoviócitos do tipo A, sinoviócitos do tipo B (semelhantes a fibroblastos), adipócitos, mastócitos e células endoteliais. Os sinoviócitos do tipo A expressam marcadores como CD68 e CD14 (marcadores presentes também em macrófagos). As do tipo B mostram expressão de moléculas de adesão, além de sintetizarem uma matriz rica em colágenos do tipo III, V e VI (FITZGERALD; BRESNIHAN, 1995).

Bianco et al. (2001) afirmam que CTMs do líquido sinovial originam-se dos sinovócitos B presentes na membrana sinovial.

3.3 Líquido Sinovial

O líquido sinovial é um fluido viscoso, amarelo claro, límpido, livre de material particulado e que não coagula por ser desprovido de fibrinogênio e outros fatores de coagulação (VAN PELT, 1967). O tecido conjuntivo da substância basal, juntamente com a camada de ácido hialurônico (AH), secretada pelos sinoviócitos formam a membrana pela qual o plasma é dialisado, a MS (RICHARDSON, 1983). Admite-se que o AH origina-se da MS, sendo considerado o composto mais importante do LS, conferindo-lhe várias propriedades exclusivas, como a alta viscosidade e capacidade de lubrificação da MS (MCILWRAITH, 1980).

O LS existente nas cavidades articulares pode ser considerado um fluido especializado que reflete alterações no tecido sinovial e no metabolismo intra-articular ocasionadas pela patologia (VAN PELT, 1967). Informações obtidas pela análise do fluido podem indicar a

natureza e a extensão das lesões intra-articulares e contribuir com outras técnicas auxiliares na determinação do diagnóstico, na definição do tratamento e no seu acompanhamento possibilitando estabelecer prognóstico fidedigno (TEW; HOTCHKISS, 1981).

O AH fornece mecanismos fisiológicos e patológicos, pela modulação da quimiotaxia, resposta proliferativa e fagocitária de várias células inflamatórias, regula o dano oxidativo e inibe a liberação de proteoglicanas. Viscosidade é uma função da concentração e grau de polimerização do AH no fluido sinovial. O LS normal contém pequena quantidade de proteoglicanas de baixo peso molecular. A cartilagem degenerada libera grandes quantidades de proteoglicanas de baixo peso molecular e agregados de proteoglicanas que são liberadas dentro do fluido sinovial onde podem ser identificadas (TULAMO et al., 1996), sendo que cavalos com osteoartrite têm maior concentração de sulfato de ceratina no fluido (TODHUNTER et al., 1997).

3.4 Fisiopatogenia das lesões articulares

Importantes avanços têm sido conquistados nos últimos anos, no entendimento do mecanismo patológico envolvido e o que acontece após a lesão articular: aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade do endotélio e MS, como consequência da inflamação e redução do movimento, resultantes da dor e do aumento do líquido da cavidade articular (RIGGS, 2006).

A causa de artrite traumática tem sido relacionada a muitos fatores incluindo velocidade extrema, falha na conformação, fadiga, imaturidade, condicionamento inadequado, ferrageamento incorreto e condições inconsistentes da pista (STASHAK, 1994). Algumas doenças osteocondrais, incluindo fragmentação osteocondral, fratura e esclerose são comuns em cavalos e podem levar ao final de carreira esportiva (KAWCAK et al., 2000; MCILWRAITH, 2005).

A capacidade das articulações em atenuar cargas compressivas e axiais é primariamente a função do osso subcondral trabecular, sendo que a superfície articular dissipa forças axiais por transferir para ligamentos interósseos. Cargas repetidas causam remodelamento do osso subcondral em resposta às mudanças no estímulo mecânico, isto pode resultar em esclerose óssea e subsequente fortalecimento das áreas sobrecarregadas. Na esclerose óssea subcondral, onde o peso perde sua propriedade elástica, estas cargas são

transferidas de volta para a cartilagem e com aumento de carga pode resultar em ulceração e erosão progressivas da cartilagem (ANASTASIOU et al., 2003).

A proliferação óssea tem um ou dois padrões de crescimento na osteoartrite. As proliferações se desenvolvem no interior das inserções ligamentosas, da cápsula articular e do periósteo, e estão associadas ao rompimento e estiramento das inserções. Os osteófitos que surgem na região marginal de transição foram descritos como uma resposta para limitar e controlar as lesões patológicas iniciais (erosão da cartilagem), estendendo a área superficial da cartilagem articular e levando a um movimento limitado da articulação (STASHAK, 1994).

Formas degenerativas de artrite são comuns nos cavalos, constituindo aproximadamente 33% de toda a claudicação equina, entre as quais a osteoartrite é a mais importante. As possíveis causas incluem forças anormais em cartilagens normais ou forças normais em cartilagens alteradas (ALWAN et al., 1991; OSBOURNE et al., 1995).

A alta concentração de sulfato de condroitina no fluido sinovial em todos os grupos de doença articular confirma que o sulfato de condroitina contribui para o aumento total na concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas, sendo que isto pode estar relacionado com alta porcentagem deste sulfato (quando comparado ao sulfato de ceratina) na MS e na matriz superficial da cartilagem articular (PALMER et al., 1995).

Estas mudanças diminuem a resistência compressiva da cartilagem articular e as fibras colagenosas descobertas tornam-se vulneráveis às forças de tensão e flexão excessivas (STASHAK, 1994).

Um dos primeiros eventos moleculares na osteoartrite (OA) é a degradação do agrecan, o proteoglicano mais abundante no tecido articular (MAGDALOU et al., 2008).

Geralmente é aceito que quando há perdas de proteoglicanas e glicosaminoglicanas, estas estão associadas a degradação pelas enzimas lisossomais. As forças bioquímicas anormais causam danos aos condrócitos articulares que, então, liberam enzimas (STASHAK, 1994).

As MMPs (matriz metaloproteinases) são um grupo de enzimas dependentes de zinco (JOUGLIN et al., 2000; BOOM et al., 2005) sintetizadas pela sinóvia traumatizada e pelos condrócitos na cartilagem articular na doença degenerativa (BOOM et al., 2005).

As prostaglandinas (PGs) produzidas nas articulações inflamadas podem também causar uma diminuição no conteúdo de proteoglicanas da cartilagem da matriz articular. (STASHAK, 1994).

Os sinais clínicos variam com o grau e tipo de osteoartrite, assim como com a quantidade de inflamação aguda. Nas articulações de muita movimentação com inflamação aguda, haverá claudicação, calor, inchaço da articulação (efusão sinovial, componentes da

cápsula articular fibrosa e periarticulares) e dor que pode variar de intensidade, à flexão. Nos casos mais crônicos, o aumento de volume articular está associado à deposição de tecido de fibrose (pode também haver algum espessamento ósseo), mas os sintomas inflamatórios agudos podem persistir em grau variável, de qualquer forma, haverá diminuição da movimentação. As fraturas intra-articulares se apresentam acompanhadas por capsulite e sinovite, assemelhando-se clinicamente a uma artrite traumática aguda. Inchaço, calor e dor estarão presentes em graus variáveis. A flexão da articulação provoca dor nos estágios agudos, e a restrição da flexão ocorre nos casos mais crônicos (STASHAK, 1994).

O diagnóstico geralmente é feito pelos sintomas clínicos e imagens anormais, sendo que os estádios iniciais são mais difíceis de diagnosticar (JOUGLIN et al., 2000).

Adarrmes et al. (2006) mostraram que a concentração do produto da degradação de colágeno no fluido sinovial pode ser utilizado como um marcador de alterações iniciais da processo de osteoartrite.

A localização pode ser confirmada por bloqueios nervosos (TULAMO et al., 1996); radiografia (KWCAK et al., 2000); com diminuição do espaço interarticular, osteófitos marginais, esclerose do osso subcondral e cistos ósseos subcondrais (STASHAK, 1994); artrografia de contraste (STASHAK, 1994); exame do LS que indicará o grau de sinovite e desarranjo metabólico (STASHAK, 1994); artroscopia em casos mais difíceis de diagnosticar sempre associados aos sinais clínicos (MCILWRAITH, 2005); ressonância magnética e cintilografia nuclear (STASHAK, 1994).

3.5 Osteocondrite Dissecante

A osteocondrite ou osteocondrose dissecante (OCD) resulta de uma falha na ossificação endocondral e pode, portanto, afetar tanto o complexo articular-epifisário, como a placa metafisária de crescimento (JEFFCOTT, 1991). Esta falha pode originar várias situações; a área de cartilagem retida pela falha da ossificação endocondral pode: curar; necrosar, formando lesões quísticas subcondrais (quistos ósseos subcondrais); ou ainda, formar fissuras ou *flaps* cartilaginosos, podendo destacar-se e calcificar ou sofrer, secundariamente, ossificação (MCILWRAITH, 2001; STOCK et al., 2006). Isto pode acarretar a inflamação articular grave, que pode, subsequentemente, levar ao desenvolvimento de osteoartrite (GARVICAN et al., 2008).

A osteoartrite e a osteoartrose são entidades articulares degenerativas caracterizadas por uma destruição variável da cartilagem articular, frequentemente acompanhada por esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos. Sinovite e hidroartrose podem ocasionalmente estar associadas com a doença clinicamente caracterizada por dor e disfunção da articulação acometida (FOERNER, 2003).

A OA no cavalo é caracterizada por degeneração da cartilagem articular, esclerose do osso subcondral, necrose óssea, osteófitos marginais, e inflamação da MS, cápsula e ligamentos. A reação pode-se apresentar desde uma leve sinovite até a doença articular degenerativa. A osteoartrite ocorre mais comumente nas articulações do carpo, boleto e tarso (FOERNER, 2003).

Classifica-se a osteocondrose em três categorias, sendo a primeira aquela que determina tanto sinais clínicos como radiográficos. A segunda apresenta sinais clínicos, sem alterações radiográficas visíveis, mas as lesões são passíveis de serem identificadas na artroscopia. Na terceira, as lesões se evidenciam no exame radiográfico, porém, o animal não apresenta sinais clínicos de aumento de LS ou claudicação evidente. As osteocondroses das duas primeiras categorias são diagnosticadas com maior frequência (MCILWRAITH, 2002).

Rooney (1998) descreve a etiologia da osteocondrose como complexa, mas acredita-se que seja uma combinação de fatores nutricionais, biomecânicos, genéticos, velocidade rápida de crescimento, conformação, traumatismo, ou ainda, uma manifestação isolada de apenas um desses fatores. Segundo McIlwraith (2002), as articulações tibiotársicas e metacarpo/metatarsofalangeanas são os principais locais de manifestação de lesão do tipo osteocondrite dissecante.

Na clínica, para a cura de pacientes com OCD, parte do fragmento precisa ser retirado por artroscopia. Isto proporciona uma oportunidade para extrair CT autólogas a partir de tecido sinovial para a regeneração da cartilagem (GUALTIERI; GAMBRIOLI, 1978; FOERNER, 2003).

3.6 Células-Tronco e Terapia Celular

Nos últimos anos, o campo das células-tronco (CT) sofreu uma revolução científica (MCGONAGLE; JONES, 2008).

Tem ocorrido um progresso significativo na melhoria da reparação da cartilagem através da transferência de tecidos alógenos ou autógenos e através de procedimentos de transplante de células livres. A ressuperficialização da cartilagem por transplante de condrócitos autógenos ou alógenos, ou através do uso de células-tronco mesenquimais, apresenta várias vantagens sobre o transplante de tecido sólido ou procedimentos de debridamento local. Entretanto, condrócitos alógenos carregam um risco inerente de reação auto-imune e, portanto, o uso de condrócitos autógenos evita este risco. A falta de um local doador apropriado e a necessidade de grandes amostras de cartilagem limitam as aplicações de condrócitos autógenos. As células-tronco mesenquimais são células pluripotentes indiferenciadas capazes de diferenciação entre muitos tipos celulares e podem ser uma fonte de células autógenas apropriadas para reparação da cartilagem (WORSTER et al., 2001).

Os condrócitos autólogos também são largamente utilizados como terapia celular, porém, podem melhorar a regeneração articular em certa medida. Em longo prazo, tal terapia não é muito eficaz, devido à perda da funcionalidade e do fenótipo dos condrócitos depois de várias passagens de cultura *in vitro*. Os condrócitos podem-se diferenciar durante a cultura *in vitro* e resultam na formação de fibro-cartilagem *in vivo*. (DARLING; ANASTASIOU, 2005).

Segundo Zatz (2004), as células-tronco podem ser divididas em embrionárias e adultas.

Em animais, o desenvolvimento embrionário começa com a fecundação de um óvulo por um espermatozoide. Porém, à medida que o embrião se desenvolve, suas células iniciam um processo de diferenciação, comprometendo-se a dar origem a tipos específicos de tecido do indivíduo adulto. A primeira etapa de diferenciação visível no embrião se dá quando este atinge o estágio de blastocisto. Ali, observam-se duas populações distintas de células: aquelas que vão dar origem aos tecidos extraembrionários, como a placenta, e às células da chamada massa celular interna (MCI), que darão origem a todos os tecidos do embrião. Apesar destas células terem este potencial amplo, ainda não foi determinado em que tecido cada uma transformar-se-á, ou seja, elas são células indiferenciadas (FERREIRA et al., 2008).

As células da MCI do blastocisto podem ser retiradas do embrião e colocadas em placas de cultura. Em condições apropriadas, elas podem manter-se indiferenciadas e multiplicar-se indefinidamente no laboratório mantendo seu potencial. Essas células derivadas da MCI são chamadas de CT embrionárias. Elas foram derivadas pela primeira vez a partir de embriões de camundongos e têm como característica principal sua pluripotência. Ou seja, quando reintroduzidas em um embrião, as CT embrionárias possuem a capacidade de retomar o desenvolvimento normal colonizando diferentes tecidos do embrião (FERREIRA et al., 2008).

Zatz, 2004 também classifica as CT como:

- Totipotentes: capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários. Ex.: zigoto, células embrionárias na fase de mórula.
- Pluripotentes: capacidade de diferenciação em células pertencentes aos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma, assim como as células germinativas primordiais (CGP). Ex.: células embrionárias derivadas da massa interna do blastocisto.
- Multipotentes: diferenciação limitada a determinados tipos celulares. Ex.: células em estágio posterior ao desenvolvimento fetal e que persistem após o nascimento.
- Unipotentes: capacidade de gerar um único tipo de tecido. Ex.: células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, espermatogônias dos testículos.

As CT multipotentes também podem ser encontradas em diferentes órgãos e tecidos no período pós-natal, são as células-tronco adultas. Tais células participam na homeostase do tecido, substituindo células diferenciadas danificadas ou em senescência, promovendo a renovação fisiológica. CTMs têm o potencial de se diferenciarem em tecidos mesenquimais, incluindo cartilagem, osso, gordura e músculo (DE BARI et al., 2001a).

Na ausência de fatores de estresse, as células-tronco permanecem quiescentes em seus nichos. Quando há estresse, as CT sofrem divisões simétricas e assimétricas para dar origem a células-filhas especializadas e a novas CT para manter uma quantidade suficiente em seu nicho (MORRISON; KIMBLE, 2006).

As CTMs apresentam alta capacidade proliferativa e são promissoras para o reparo musculoesquelético. Estudos recentes identificaram e isolaram tais células de diversos tecidos adultos como músculo esquelético, tecido adiposo, perióstio e sinóvia (SAKAGUCHI et al., 2005).

Koerner et al. (2006) isolaram células pluripotentes com morfologia semelhante a fibroblastos de sangue periférico de equinos e compararam sua multipotência com as CTMs da medula óssea de humanos. As células pluripotentes foram testadas quanto ao seu potencial de diferenciação. A diferenciação condrogênica foi realizada em meio sem soro em culturas de células como um modelo tridimensional, enquanto a diferenciação osteogênica e adipogênica foram induzidas em cultura de monocamada. As células derivadas do sangue periférico tinham capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica parecida às CTMs. Ambos os tipos celulares mostraram uma capacidade limitada para produzir gota lipídica.

Vidal et al. (2006) analisaram as CTMs derivadas da medula óssea de equinos quanto à característica de crescimento e seu potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*. Nesse trabalho, as CTMs de equinos foram cultivadas até a 10^a passagem para determinar a característica de multiplicação celular. Limitadas análises de diluições foram realizadas em cultura para determinar a frequência de unidades formadoras de colônias com um fenótipo de fibroblastos e a frequência das CTMs se diferenciarem para adipócitos e osteoblastos.

Outro grupo de pesquisa realizou o isolamento e a caracterização de CTMs a partir do cordão umbilical de equinos. Koch et al. (2007) demonstraram que as culturas primárias de todas as amostras, isoladas a partir de sete potros, deram origem a células com morfologia semelhante a fibroblastos. O potencial de diferenciação foi analisado visando tanto a caracterização quanto a origem destas células.

De Bari et al. (2001a) caracterizaram células-tronco mesenquimais a partir da MS humana. Em seu estudo, mostraram que células oriundas de tecido sinovial humano, de doadores de várias idades, podem ser expandidas *in vitro*, ao longo de 10 passagens, com senescência celular limitada. Houve diferenciação condrogênica, osteogênica, miogênica e adipogênica nessas células, independente da idade do doador.

Jones et al. (2004) obtiveram células de líquido sinovial de pacientes humanos com artrite reumatoide (AR). Essas células foram capazes de se diferenciarem em condrócitos, osteoblastos e adipócitos.

Alguns estudos demonstram que MSCs podem ser extraídas a partir de tecido sinovial não saudável, derivado de pacientes humanos com artrites reumatóides e até mesmo osteoartrites. Futuramente, isso poderá ajudar na coleta de MSCs autólogas derivadas de MS de pacientes com osteoartrites para a regeneração articular (ZIMMERMANN et al., 2001).

3.6.1 Células-tronco mesenquimais derivadas de líquido e membrana sinoviais

Durante a última década, a membrana e o líquido sinoviais foram identificados como uma fonte de CTMs progenitoras, que são funcionalmente distintas das CT de medula óssea (KRAWETZ et al., 2012). As células da MS foram, pela primeira vez, identificadas e isoladas por De Bari e colaboradores em 2001. As de LS por Jones et al. em 2004. Agora, são um novo membro da família das células-tronco mesenquimais e têm sido cada vez mais

consideradas como uma fonte promissora para a regeneração musculoesquelética, principalmente na reconstrução de cartilagens, ossos, tendões e músculos (FAN et al., 2009).

Há claras evidências sobre a espontânea remodelação das articulações. Após as lesões, passam por uma cascata clássica de reparação. A sinóvia também tem um considerável poder de regeneração, devido a sua reparação após sinovectomia. Estudos mostram que células-tronco mesenquimais podem ser encontradas no periósteo (TULI et al., 2003), gordura articular (ENGLISH et al., 2007), cartilagem articular (BARBERO et al., 2003) e sinóvia (DE BARI et al., 2001b).

Evidências sobre o estudo *in vivo* em coelhos mostram que, quando há defeitos na cartilagem, uma camada contínua de células se estende a partir da MS que contribui para a reparação da cartilagem com ou sem a presença de indutores condrogênicos (HUNZIKER, 2001).

Kanamoto et al. (2008) afirmam que as células obtidas da MS podem auxiliar na reparação da cartilagem *in vitro* e *in vivo*. McGonagle et al. (2008) dizem que há provas convincentes de que estas células podem ser utilizadas de forma eficaz para promover a reparação da cartilagem.

Koga et al. (2007) demonstraram que a imobilização da articulação, por 10 minutos após a injeção de células em defeitos da articulação, resulta em 60% de aderência celular em coelhos. Esse método pode ser executado de maneira menos invasiva, quando comparado a outras técnicas, e sem *scaffolds* (matriz tridimensional).

Esta mesma técnica foi utilizada por Nakamura et al. (2012) em suínos e foi denominada de “técnica aderente local”, uma técnica simples e eficiente no modelo de defeito cartilágneo suíno. Uma matriz de cartilagem surgiu após o transplante de células.

Células obtidas a partir de membrana e líquido sinoviais de suínos e humanos foram utilizados na produção de *scaffolds*, denominados TECs (*Tissue Engineering Constructs*) que podem ser usados no reparo cartilágneo de suínos (ANDO et al., 2007; ANDO et al., 2008).

Uma série de novos estudos começou a explorar o papel de células derivadas de membrana e líquido sinoviais em diversas patologias, incluindo artrites. Tais estudos sugerem que não há diferença no potencial condrogênico das células derivadas de articulações saudáveis e com osteoartrite (OA) ou artrite reumatoide (AR). Não obstante, há aumento do número de células com potencial proliferativo nas articulações com OA (JONES et al., 2008).

Como a OA é considerada uma doença degenerativa e não uma doença articular inflamatória, nota-se que o ambiente das articulações com OA ou AR tem uma diferença fundamentalmente diferente na capacidade de proliferação e diferenciação celular (HUNZIKER, 2001).

3.7 Cultivo Celular

A manutenção de células humanas, animais ou vegetais vivas fora do organismo (*in vitro*) é conhecida como cultura de células. Fornecidas as condições apropriadas, as maiores partes destas células podem viver, multiplicar-se e até expressar propriedades particulares em uma placa ou garrafa de cultura (FRESHNEY, 1995).

De acordo com Banks (1992), a cultura celular é um método de observação direta das células vivas. Os antibióticos tornaram este método uma simples técnica rotineira. As técnicas de cultura permitem a observação, manipulação e testes contínuos das células semeadas sem qualquer risco ao doador. A diferenciação celular, as transformações celulares, a citogenética, o metabolismo celular, as interações intercelulares, as relações entre o parasita e os hospedeiros biológicos foram estudados por esta técnica.

O cultivo celular se desenvolveu a partir dos últimos anos do século XIX como uma continuação das técnicas de embriologia. O zoólogo americano Ross Harrison (1908) é considerado o iniciador dos cultivos de tecido de animais por ser o primeiro pesquisador a empregar técnicas *in vitro* para o estudo de fenômenos *in vivo*, realizando cultivos de medula espinhal embrionária de anfíbios. Neste experimento inicial foi possível observar o crescimento de axônios de neuroblastos (apud LIMA NETO, 2007).

A primeira limitação para o estabelecimento do cultivo celular foi a obtenção de um meio nutritivo adequado. O primeiro meio usado foi o plasma de galinha para nutrir os explantes de tecidos embrionários. Este meio permitiu observar o crescimento de tecido nervoso, coração e pele. Posteriormente foram realizadas as primeiras tentativas para estabelecer cultivos de células de mamíferos, conseguindo manter explantes obtidos a partir de células de cães e gatos, e demonstraram que através de subcultivos se pode prolongar o período do cultivo. Os meios empregados foram plasma e extrato embrionário (LIMA NETO, 2007).

Gey et al., em 1952, estabeleceram a primeira linhagem celular contínua, células HeLa. O meio utilizado era extremamente complexo e pouco definido: plasma de galinha, extrato de embrião de bovino e soro de cordão umbilical humano. Eagle (1955) realizou a primeira pesquisa sistemática da necessidade de nutrientes para o cultivo celular (apud LIMA NETO, 2007).

A cultura celular vem sendo utilizada com sucesso em diferentes áreas como: obtenção de vacinas mais eficientes, métodos diagnósticos, reprodução humana, preservação de espécies animais ameaçadas de extinção, conhecimento de processos infecciosos e da

biologia da célula tumoral, terapia gênica direcionando genes normais para substituir genes defeituosos em células tumorais, clonagem de embriões, entre outros (FRESHNEY, 1995).

3.8 Citometria de Fluxo, Ciclo Celular e Marcadores Celulares

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, sendo conhecida também por citometria de fluxo multiparamétrica. Através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico, são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula (SAELENS et al., 2004).

A vida de uma célula é ritmada pelo ciclo celular, onde cada célula de um organismo sofre modificações cíclicas que a conduzem à divisão celular e à formação de duas células-filhas. O ciclo celular está dividido em 4 fases: a fase G1 (G para *gap*, que significa intervalo) durante a qual a célula cresce devido às sínteses proteicas, a fase S (síntese) durante a qual a célula duplica seu DNA, a fase G2 que é outra fase de crescimento e a fase M (mitose) que representa a divisão celular propriamente dita. O esquema do ciclo celular foi ilustrado na figura 3 (BRUCE et al., 2009).

Figura 3 - Esquema ilustrativo das fases do ciclo celular, onde: G0-reposou; G1-produção de enzimas necessárias para produção de DNA, outras proteínas e RNA; S - síntese de DNA; G2-período pré-mitótico; M-Mitose

Os marcadores estudados neste trabalho foram divididos em:

- Marcadores de células-tronco: CD45RO, OCT3/4, NANOG, CD105, CD90, CD34, CD117, CD133, TRA-1-81, VEGF-R1, Ly6a;
- Marcadores de inflamação: COX-2, TNF-R1, CD11, CD1a e MCP-1;
- Marcadores de proliferação e ciclo celular: Caspase-3, HSP-47, P21, Ki67, Ciclina D1 e P53.

3.9 Análise do potencial elétrico mitocondrial

Este ensaio foi realizado em paralelo ao teste da expressão de proteínas de checagem de progressão do ciclo celular. A quantificação do potencial mitocondrial foi realizada no citômetro de fluxo (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizando-se o programa *Cell Quest*, versão 3.1, com aquisição de 10.000 eventos, empregando-se uma janela/quadrante definido (*gate*) de análise a partir dos parâmetros de espalhamento luminoso (volume/ FSC) x (complexidade/ SSC). A partir do *gate* das células em estudo, foram obtidos histogramas de intensidade de fluorescência no canal FL1-H. Os resultados do teste funcional de fluxo da

sonda Rodamina-123 foram analisados na forma de média de intensidade de fluorescência (MIF), na razão entre a MIF da amostra em estudo e do respectivo controle negativo.

Após a aquisição da intensidade de fluorescência arbitrária, emitida pela sonda rodamina 123, os resultados foram analisadas pelo programa *Win MID 2.9* e representados nos histogramas, evidenciando as mitocôndrias inativas e ativas nas culturas LS e MS.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do Material

As amostras foram coletadas a partir de artroscopias realizadas em animais apresentando OCD, atendidos no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, através da colaboração do Prof. Dr. Luís Cláudio Silva. Foram utilizados dez animais, de ambos os sexos, adultos, de diferentes raças, atendidos no Departamento de Cirurgia do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, dos quais foram obtidos fragmentos de MS de amostras de LS das articulações tibiotársica e metatarsofalangeana direita e esquerda por artroscopia (figuras 4 e 5).

4.1.1 Artroscopia

A artroscopia foi realizada utilizando-se os seguintes materiais:

1. Artroscópio com 4 mm de diâmetro, 18 cm de comprimento e lente com 30°, modelo 11, marca Karl Storz;
2. Camisa artroscópica com válvula, marca Karl Storz;
3. Videocâmera modelo telecan DX NTSC, marca Karl Storz;
4. Fonte de luz modelo Xênon Nova, marca Karl Storz;
5. Cabo de luz, com 200 centímetros de comprimento, marca Karl Storz;
6. Insuflador de CO₂, com gás pré-aquecido, marca WISAP;
7. Lâmina motorizada (“shaver”) marca DMC;
8. Lâminas descartáveis (marca DMC - modelo abrasiva);
9. Monitor trinitron 14 polegadas modelo PVM 14N2E, marca Sony;
10. Videoimpressora térmica modelo UP 2300, marca Sony;
11. Filmadora digital DCR-TRV 330, marca Sony;
12. Compressor de ar – Modelo Ar – Max, NS Aparelhos Médicos LTDA.

Figura 4 - Demonstração do procedimento de artroscopia, realizado nas dependências do Departamento de Cirurgia do Hospital Veterinário da FMVZ-USP. (A) articulação tibiotársica preparada para o procedimento cirúrgico; (B) introdução da videocâmera e (C, D) disposição da equipe no centro cirúrgico

Figura 5 - Imagens da membrana sinovial de um equino com OA. Imagens obtidas pela filmadora e videocâmera durante o procedimento de artroscopia. (A) visão geral da cavidade articular e (B) introdução da lâmina de bisturi

4.1.2 Preparo do animal e técnica anestésica

Os animais permaneceram em jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 6 horas. Uma ampla área em ambas as articulações metatarsofalangeanas foi preparada de maneira rotineira para artroscopia. Antecedendo o procedimento anestésico, foram administradas amicacina na dose de 15 mg/kg e fenilbutazona na dose de 4,4 mg/kg, ambas por via intravenosa. Para a sedação foi usado cloridrato de xilazina 10% (0,8 mg/kg), administrado pela via intravenosa 15 minutos antes da indução anestésica. Para a indução da anestesia foi utilizado diazepam (0,05mg/kg) associado à quetamina 10% (2,0 mg/kg), seguido de éter-gliceril-guaiacol (EGG) 10% (100 mg/kg), ambos pela via intravenosa, possibilitando assim a intubação orotraqueal. Para manutenção anestésica foi utilizado o isofluorano vaporizado em oxigênio 100%.

4.1.3 Técnica cirúrgica

O animal foi posicionado em decúbito dorsal. Os membros foram estendidos de modo que as articulações metatarsofalangeanas direita e esquerda ficassem mantidas em angulação de aproximadamente 110°. As articulações foram submetidas à antissepsia e colocação de campos operatórios. Sobre a bolsa dorsomedial foi inserida uma agulha 40x10, permitindo a colheita de LS e infusão de solução de ringer lactato para distensão articular. Foram criados dois acessos. O primeiro foi feito com auxílio de bisturi (lâmina nº 11), incisando a pele, tecido subcutâneo e cápsula articular sobre a bolsa dorsolateral para introdução da camisa artroscópica e artroscópio. Na camisa artroscópica, foi acoplado um equipo para entrada da solução de ringer lactato e, ao artroscópio, foi acoplada uma videocâmera. O segundo acesso foi feito na bolsa dorsomedial para permitir introdução dos instrumentos à superfície medial. Por este portal, foi introduzida uma pinça de biópsia para colheita de amostras da MS. Ao término, a pele suturada com fio de náilon nº 1, em modelo de sutura tipo Sultan. Durante exame artroscópico, as imagens foram capturadas e impressas para estudo comparativo.

No pós-operatório, houve antibioticoprofilaxia sistêmica com amicacina na dose de 15 mg/kg, por via intravenosa, a cada 24 horas, totalizando três aplicações. Como agente anti-inflamatório foi utilizada a fenilbutazona (4,4 mg/kg), via intravenosa, uma vez ao dia, durante três dias. A ferida foi mantida com penso protetor e os curativos foram realizados a

cada troca com Líquido de Dakin, até a retirada dos pontos de sutura, que acontecerá no 10º dia do pós-operatório. Em caso de observação de dor por alteração de comportamento e exame clínico, foi administrado dipirona sódica na dose de 0,5 mg/kg cada 8 horas.

As artroscopias foram realizadas no Centro Cirúrgico do Serviço de Cirurgia de Grandes Animais da FMVZ-USP. Os animais foram mantidos em baias durante todo o período experimental.

4.2 Estabelecimento das linhagens de células de LS e MS

4.2.1 Protocolo de cultivo celular para o LS

As amostras coletadas em seringas estéreis de 10 ml foram transferidas para garrafas de cultivo de 25 cm², as quais foram preenchidas com 5ml de meio de cultivo meio MEM (Minimum Essential Medium - GIBCO™), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de estreptomicina/penicilina, e incubadas a uma temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. A câmara de fluxo laminar é sempre previamente esterilizada com álcool 70% e UV durante 20 minutos. As amostras foram cultivadas em um período menor do que 24 horas contado a partir do momento da coleta.

4.2.2 Protocolo de cultivo celular para a MS

Foram utilizadas amostras coletadas das articulações por artroscopia. Após a lavagem em solução salina contendo 10% de antibióticos (Garamicina e Estreptomicina). O tecido foi dividido em duas porções: a primeira, recortada com o auxílio de um bisturi em pequenos fragmentos de 0,01 cm² e aderidos a placas de Petri, por 30 minutos em solução de soro fetal em estufa de cultura a 37°C e 5% de CO₂. A segunda porção do material foi debridada e a ela adicionada solução de colagenase 0,1% para separação enzimática das células. As culturas iniciais e subcultivos foram mantidos em garrafas de cultura de 25cm² e mantidos em meio de MEM suplementado com SFB a 10%, pH = 7.4, em estufa umidificada a 37°C com CO₂ a 5%.

A subcultura das células foi realizada habitualmente a partir de culturas confluentes, em torno de 3 dias e, expandidas após a tripsinização das células da monocamada. As amostras foram cultivadas em um período menor do que 24 horas contado a partir do momento da coleta. O fluxograma representando o processo desde a coleta do tecido até o cultivo celular está esquematizado na figura 6.

Figura 6 - Fluxograma representativo do delineamento experimental para obtenção da membrana e líquido sinoviais por artroscopia e da cultura de células *in vitro*

4.2.3 Caracterização dos aspectos morfológicos

Todos os aspectos de crescimento celular foram acompanhados pela fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida acopladas a um sistema de captura de imagem CCD-Sony.

4.2.4 Dissociação enzimática das células aderentes

As células derivadas da MS, por apresentarem característica de adesão ao substrato, necessitam sofrer desagregação enzimática, quando atingem confluência ($\pm 80\%$). Retirou-se o meio de cultivo existente na garrafa; estas foram lavadas com PBS, para a retirada de todo o resíduo do meio de cultivo. Foi adicionado 1ml de tripsina (GIBCO®) a 0,25%, permanecendo encubada por 5 minutos a 37°C.

Após este período, adicionamos 2ml de meio de cultivo suplementado com SFB para a inativação da tripsina; toda suspensão celular foi aspirada e transferida para um tubo tipo falcon. Seguidamente, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. O “pellet” resultante da centrifugação foi ressuspensionado em 1ml de meio de cultura, para a contagem celular, sendo posteriormente transferidos para garrafas de cultivo com meio de cultivo. As células foram novamente incubadas sob as mesmas condições de cultivo a 37°C com umidade relativa próxima a 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.3 Avaliação do crescimento celular: curva de crescimento

Com a finalidade de avaliar a capacidade de expansão e replicação celular, padronizar a concentração ideal de células para o crescimento celular e avaliação do seu comportamento cinético, foram realizadas curvas de crescimento. Após estabelecimento inicial de cultura, sem alterar as condições ambientais prévias (CO₂ 5% a 37°C), obtivemos amostras nos períodos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. A avaliação do número de células e sua viabilidade foram realizadas através de contagem celular em câmara de Neubauer, com auxílio da coloração Azul de Tripán 0,2% (v:v). Este processo foi realizado em triplicata.

4.4 Congelamento Celular

A cultura de células provenientes do cultivo do tecido sofreu desagregação enzimática com tripsina a 0,25%. O “pellet” celular foi ressuspensionado em meio de congelamento. O meio utilizado é composto por SFB e 10% de DMSO, sendo posteriormente distribuídas em

criotubos (1ml para cada criotubo); os criotubos permanecerão em isopor com gelo triturado, durante todo o processamento da amostra.

Seguido este procedimento, os criotubos com meio de congelamento passaram pelo protocolo: 30 minutos a -4°C , 4 horas a -20°C , 12 horas a -40°C para, depois, serem transferidos para um tambor de nitrogênio líquido, onde permanecerão armazenados a uma temperatura de -196°C .

4.5 Descongelamento Celular

Os criotubos foram retirados cuidadosamente do tambor de nitrogênio líquido e descongelados, adicionando meio de cultura a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram transferidas para tubos tipo falcon, a que foi adicionado meio de cultivo com 10% de SFB. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscitado em 5 ml de meio de cultivo suplementado com 10% SFB, posteriormente transferido para garrafas de cultivo, com meio de cultivo celular. As garrafas foram acondicionadas em estufa a 37°C com umidade relativa próxima a 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO_2 .

4.6 Análises por citometria de fluxo

Após o crescimento, a cultura foi tripsinizada, inativada com SFB e colocada em tubos tipo falcon de 15 ml; todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. O tubo foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos para a formação de precipitado celular. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado em 5 ml solução salina 0,9% para lavagem, centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, foi descartado novamente o sobrenadante e acrescentado tampão FACs Flow; a suspensão foi transferida para tubos de citometria e, para análise dos marcadores de células-tronco foram acrescentados, os anticorpos: CD45RO, OCT3/4, NANOG, CD105, CD90, CD34, CD117, CD133, TRA-1-81, VEGF-R1 e Ly6a. Para os marcadores de proliferação e ciclo celular, foram usados os anticorpos: Capase-3 fosforilada, HSP-47, P21, Ki67, Ciclina-

D1 e P53. Para a análise dos marcadores de inflamação, foram utilizados os anticorpos: COX-2, TNF-R1, CD11, CD1a e MCP-1.

Os anticorpos foram, então, incubados por 15 minutos a 4°C e finalmente analisados em Citômetro de Fluxo FACSCalibur em 10.000 eventos e, para análise, foi utilizado o programa CELLQUEST. A expressão de marcadores de membrana e líquido foi determinada pela comparação com um isotipo controle analisado em histograma.

4.6.1 Análise dos marcadores de células-tronco

Após o crescimento e expansão das culturas, as células de membrana e líquido sinoviais foram incubadas com os seguintes marcadores reguladores dos pontos de checagem e progressão do ciclo celular:

CD45RO (Santa Cruz): proteína tirosina fosfatase, relacionada ao crescimento celular, diferenciação e ciclo mitótico. São expressas em células-tronco hematopoiéticas e, principalmente, linfócitos T (KORETZKY et al., 1990).

OCT3/4 e NANOG (Santa Cruz): determinantes em células-tronco embrionárias e germinativas são fatores de transcrição envolvidos na regulação da supressão de genes que levam à diferenciação e manutenção da pluripotência (SICLARI; QIN, 2010).

CD105 (Santa Cruz): a endoglina é uma glicoproteína de membrana expressa na superfície de células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células músculo-esqueléticas (SANZ-RODRIGUEZ et al., 2004).

CD90 (R&D Systems): tem mostrado interação com integrina, tirosinas quinases, fatores de crescimento e citocinas, promovendo eventos celulares, como adesão, apoptose, proliferação e migração. Normalmente, o CD90 é utilizado como marcador de células-tronco mesenquimais, embora também seja expresso em células como neurônios, células endoteliais, células T e outros tipos celulares imunes e não imunes (BARKER; HAGOOD, 2009). Recentemente, o CD90 vem sendo utilizado como marcador de células progenitoras multipotentes, como as de medula óssea, tecido sinovial, âmnio, gordura e outros (MAFI et al., 2011).

CD34 (R&D Systems): é uma molécula de adesão, sialomucina, expressa em células endoteliais e células progenitoras hematopoéticas. Pode estar expressa em alguns tipos de tumor indicando potencial de angiogênese (BRUCE et al., 2009).

CD117 (Santa Cruz): ou c-Kit é um receptor de tirosino-quinase expresso em células-tronco hematopoéticas, em progenitores mielóides e tumores gastrointestinais (SARLOMO-RIKALA et al., 1998).

CD133 (Santa Cruz): é uma proteína transmembrana, expressa em células-tronco hematopoéticas, gliais, de medula óssea e células progenitoras endoteliais (SHMELKOV et al., 2008).

TRA-1-81 (Santa Cruz): expresso em células-tronco embrionárias (SCHOPPERLE; DEWOLF, 2007).

VEGF-R1 (Santa Cruz): ou fator de crescimento endotelial vascular é uma proteína homodimérica, envolvida na angiogênese tumoral e metástase. Também estimula o recrutamento de células-tronco (KAYA et al., 2002; ERIKSSON; ALITALO, 2002).

Ly6a (Abcam): expresso em populações de células progenitoras. (GAMWELL, COLLINS; VANDERHYDEN, 2012).

4.7 Análise das fases do ciclo celular

As células em cultivo foram tripsinizadas, centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em tampão para citometria (FACs Flow - BD). As células foram novamente centrifugadas durante 3 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante, descartado. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 1ml de etanol 70% RNase, transferidas para microtubos e armazenadas a uma temperatura de -20° C.

4.7.1 Incorporação do iodeto de propídio (PI) e leitura das amostras

O iodeto de propídio (PI) é um fluorocromo que se intercala estequiometricamente às duplas fitas de DNA. A fluorescência foi captada em FL-2 e é proporcional ao conteúdo de DNA na célula. Células diploides que não estejam replicando (fases G0/G1 do ciclo celular) possuem conteúdo de células 2n, emitindo sinais de menor intensidade do que as células situadas na fase S, durante a qual ocorre o aumento do conteúdo de DNA. Células em fase S, por sua vez, geram sinais de menor intensidade do que aquelas situadas em G2/M até que completem a replicação do conteúdo de DNA para 4n, permanecendo assim durante a fase G2 até a mitose, na qual cada célula-mãe dá origem a duas células-filhas.

As células situadas no pico hipodiploide (Sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que 2n e podem representar aumento na ocorrência de debris celulares e DNA fragmentado, característicos de eventos de morte celular.

Todos os sinais gerados são amplificados e convertidos pelo aparelho em pulsos, permitindo a construção dos gráficos de distribuição das células no ciclo celular, considerando a existência de uma relação proporcional entre o aumento do conteúdo de DNA e a área do pulso gerado.

As amostras fixadas e armazenadas previamente foram centrifugadas a 2000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1ml de tampão de citometria e centrifugadas novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células, ressuspensas em solução de PI, preparada a partir de 5ml de PBS ao qual foram adicionados 5µl de triton 100 (0,01% v/v), 50µl de RNase A (2mg/ml) e 20µl de iodeto de propídio (5mg/ml). Em seguida, a aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACSCalibur foram obtidos em 10.000 eventos e, para análise, foi utilizado o programa Win Mdi 2.8.

4.7.2 Marcadores Envolvidos na Checagem e Progressão do Ciclo Celular

As células de membrana e líquido sinoviais foram incubadas com os seguintes marcadores reguladores dos pontos de checagem e progressão do ciclo celular:

Caspase-3 Fosforilada FITC (Santa Cruz): cisteíno-protease aspartato executora; sinaliza para que ocorra a apoptose. Cliva substratos levando à condensação e fragmentação

nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. Indica morte celular por apoptose (GRIVICICHI; REGNER; ROCHA, 2007).

HSP-47 (Santa Cruz): é uma chaperona molecular, está envolvida na síntese do pró-colágeno e na condrogênese (HOSOKAWA et al., 1998).

P21 FITC (Santa Cruz): proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, reguladoras da transição da fase G1-S e G2-M, consecutivamente (COQUERET, 2003).

Ki-67 (Santa Cruz): antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 (PEÑA et al., 1998).

Ciclina D1 (Santa Cruz): proteína reguladora das CDK's (quinases dependente de ciclinas), envolvidas na fase G1/S. A amplificação ou aumento da expressão altera a progressão do ciclo celular (COQUERET, 2003).

P53 PE (Santa Cruz): atua impedindo a progressão do ciclo celular na transição G1/S, na presença de danos à molécula de DNA (TRIEB; KOTZ, 2001).

4.7.3 Marcadores Envolvidos na Inflamação

Após o crescimento e expansão das culturas, as células de membrana e líquido sinoviais foram incubadas com os seguintes marcadores reguladores dos pontos de checagem e progressão do ciclo celular:

COX-2 (Cayman Chemical Co./EUA): ou ciclo-oxigenase-2 é produzida em altas concentrações na inflamação, produzindo prostaglandinas (PGs) (COLVILLE-NASH; WILLOUGHBY, 2002).

TNF-R1(BioVision Incorporated): ou fator de necrose tumoral, também está envolvido na osteoclastogênese (MERKEL et al., 1999).

CD11 (Abcam): está presente em células apresentadoras de antígenos, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas e em células da resposta imune inata, como

granulócitos e Natural Killers. Participam na quimiotaxia, na ativação celular, na citotoxicidade e na fagocitose (HAN et al., 2010).

CD1a (Abcam): está associada à ativação de linfócitos T (GOGOLAK et al., 2007).

MCP-1 (Abcam): ou proteína quimiotática de monócitos-1. Esta citocina é produzida predominantemente por macrófagos e células endoteliais e é um potente fator quimiotático para monócitos. Pode estar aumentada em lesões ateroscleróticas (OGURA et al., 2010).

4.8 Forma de Análise dos Resultados

Para análise das células, foi realizado a fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida acopladas a um sistema de captura de imagem CCD - Sony. As análises realizadas por citometria de fluxo foram analisadas no programa CELLQUEST. A expressão de marcadores de superfície foi determinada pela comparação com um isotipo controle analisado em histograma pelo programa CELLQUEST.

4.9 Análise do Potencial Elétrico da Membrana Mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi utilizado o fluorocromo Rodamina 123 (Invitrogen, EUA). A mitocôndria é uma organela citoplasmática relacionada ao metabolismo energético. Na membrana mitocondrial interna, está localizada a cadeia transportadora de elétrons que produz energia a partir do fluxo de elétrons e consequente fosforilação oxidativa. A Rodamina 123 é uma sonda fluorescente que é captada quando elétrons são doados para a cadeia respiratória. Quando o gradiente eletroquímico é formado, a Rodamina 123 é captada ocorrendo a diminuição da emissão de sua fluorescência. A Rodamina 123 permeia a membrana da mitocôndria e inibe processos de transporte, especialmente a cadeia transportadora de elétrons, retardando a respiração interna.

As células LS e MS foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e adicionados 5 μ l de Rodamina 123 (5 mg/ml). A seguir, as células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%), a 37°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados; o sobrenadante, descartado e o precipitado, ressuspendido em

100µl de solução tampão para citometria, FACsFlow (BD). A análise da marcação com a Rodamina 123 nas células tumorais foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) pela aquisição de 10.000 eventos. Os dados foram analisados pelo programa Win MDI 2.8.

4.10 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER. Todos os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, considerando-se como nível crítico para significância valores $p < 0.05$. As diferenças significantes entre os grupos foram indicados por: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Características morfológicas do crescimento das culturas primárias do líquido e da membrana sinoviais

Testes para padronizar os meios de cultivo adequados para manutenção das células de membrana e líquido sinoviais foram realizados neste estudo. Aos meios de cultura testados, foram adicionados 10% SFB e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina).

Os meios MEM (*Minimum Essential Medium*) e DMEM-H (*Dulbecco Modified Essential Medium High Glucose*) foram eficientes na manutenção das células, apresentando uma resposta proliferativa e aspectos de crescimento celular satisfatórios. As células de membrana e líquido sinoviais, mantidas em meio MEM, apresentaram aspecto fusiforme do tipo *fibroblast like*.

As células cultivadas em meios de cultivo RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) e DMEM/F12 (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) apresentaram resposta proliferativa insatisfatória, com crescimento lento, no entanto, também apresentaram morfologia fusiforme do tipo *fibroblast like*. Porém, após a expansão da cultura, as células apresentaram perda de adesão celular ao substrato e formação de agregados multicelulares no sobrenadante da cultura, resultando em morte celular. Os dados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Tabela representando o tempo de crescimento e morfologia das células MS e LS em diferentes meios de cultura

Meio de cultura	SFB	Tempo de Crescimento	Morfologia	Eficiência (%)
DMEM-H	10%	rápido	fibroblastoide	80±12
MEM	10%	rápido	fibroblastoide	97±2
RPMI-1640	10%	lento - morte	perda de adesão	10±8,3
DMEM-F12	10%	lento - morte	perda de adesão	5±1,2

As linhagens celulares foram obtidas e cultivadas em capela de fluxo laminar, em frascos de cultura de 75 cm² com meio de cultura MEM, suplementado com 10% de SFB inativado e 1% de antibióticos. A MS foi obtida pela técnica de explante (figura 7), enquanto o LS foi somente inserido na garrafa, preenchida com meio de cultura. O meio de cultura foi

trocado a cada 2 ou 3 dias, sendo que, nas duas primeiras semanas de obtenção, não houve troca e, sim, adição de meio.

As células atingiram confluência celular no período de 60 dias. Os aspectos morfológicos e de crescimento celulares foram acompanhados por microscópio invertido, fotodocumentados nos diferentes períodos e mostraram células aderentes à superfície da garrafa de cultura, crescendo em monocamada, ou “tapete celular”, com aspecto fusiforme do tipo *fibroblast like* (figura 8), produzindo secreção viscosa – fato percebido no momento da troca de meios.

Quando as células se mostravam confluentes, foi realizado o repique (passagem) dessas células para novas garrafas de cultura, sendo necessário para isto que as células fossem colhidas com auxílio de solução de tripsina. Após nova confluência, as células foram novamente repicadas até atingirem a 7^a passagem, quando foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo.

Observamos que as linhagens de membrana e líquido possuem capacidades proliferativas satisfatórias, sendo seu crescimento otimizado quando há um aumento na densidade celular até atingirem confluência.

O crescimento e a expansão das células do LS mostram que estas se organizam paralelamente, sendo que projeções citoplasmáticas ocorrem entre as células até a formação do tapete celular (figura 9). Já as células obtidas da MS se organizam em pequenas formações agrupadas, sem que aja a suas sobreposições (figura 10).

Figura 7 - Aspecto morfológico do explante (seta preta contínua) da MS, após 20 dias de cultivo em meio MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos. Notam-se a presença de células aderentes fusiformes (seta preta pontilhada) e organização ao longo do substrato da placa. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com aumento de 40X

Figura 8 - Aspecto morfológico da cultura de LS após 35 dias. Notam-se a organização e o redirecionamento ao longo da superfície da garrafa de cultura. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido, com aumento de 40X

Figura 9 - Aspecto morfológico da cultura de LS, cultivada em meio MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos, após 40 dias de cultura. Notam-se a distribuição e a confluência das células (seta). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido, com aumento de 40X

Figura 10 - Aspecto morfológico da cultura de MS, cultivada em meio MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos, após 40 dias de cultura. Notam-se a distribuição e a confluência das células (seta). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido, com aumento de 40X

Figura 11 - Aspecto morfológico da cultura de MS após 50 dias de cultivo. Nota-se a formação de um agregado central (micromassa; seta contínua), com ordenação das células centripticamente, sem sobreposição (seta pontilhada). Fotomicrografia obtida em microscópio invertido, com aumento de 40X

5.2 Curva de Crescimento de Líquido e Membrana Sinoviais

As células LS e MS possuem um padrão de crescimento representado por uma curva sigmoidal. Essa curva refletiu as fases de adaptação das células às condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes do meio e ao suporte à adesão celular.

Para a cultura LS, foram obtidos os seguintes aspectos da curva de crescimento: a fase lag é um período de adaptação no qual não ocorre proliferação após adição das células ao meio de cultivo, nesta fase, ocorre intensa atividade metabólica. Esta fase foi de aproximadamente 50 horas de cultura e foi dependente da densidade e adesão celular. A fase de crescimento exponencial, na qual a multiplicação celular é máxima e constante, ocorreu até 150 horas de cultura. Sua fase estacionária, ou plateau, quando a velocidade de crescimento diminui, não foi determinada nessas condições de cultivo. Entretanto, ocorreram progressivamente o aumento da mortalidade e desprendimento das células ao substrato. E, por último, a fase de declínio ou morte celular, onde ocorre diminuição drástica na densidade e na viabilidade celular, foi em média de 168 horas (gráfico 2). Nestas condições, a redução foi em média de 56%. A curva dose, tempo e densidade celular mostrou correlação positiva significativa, com r^2 de 0,80, como representado no gráfico 1. Imagens das culturas LS no período de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas, mostrando a disposição, organização e densidade celulares podem ser observadas na figura 12.

Gráfico 1 - Gráfico dos valores das médias representativo da curva de crescimento celular LS. As células foram cultivadas e analisadas a cada 24 horas, por 7 dias. As curvas e equação da reta foram obtidas pela interpolação dos dados em função do tempo, o aumento do crescimento foi significativamente diferente ($p=0,0075$)

Gráfico 2 - Gráfico de barras representando a média da viabilidade celular da cultura LS, durante 168 horas de cultura

Figura 12 - Imagens das culturas LS no período de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas, mostrando a disposição, organização e densidade celulares. Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido, com aumento de 40X

Após a expansão, congelamento, estocagem em nitrogênio líquido e recultivo das células obtidas da MS, aliquotas de diferentes linhagens primárias foram utilizadas para a determinação da cinética de crescimento celular. Foram obtidos os seguintes aspectos da curva de crescimento para a cultura MS: a fase lag foi de aproximadamente 24 horas de cultura. A fase de crescimento exponencial ocorreu de 50 a 150 horas (gráfico 4). A fase estacionária, ou plateau, também não foi determinada nessas condições de cultivo, onde ocorreram progressivamente o aumento da mortalidade e despreendimento das células ao substrato. E, por último, a fase de declínio, ou morte celular, nas culturas das células MS foi em média de 160 horas, neste caso, a redução foi de 68%. A curva dose, tempo e densidade celular mostrou correlação positiva significativa, com r^2 de 0,84, como representado pelo gráfico 3. Imagens das culturas MS no período de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas, mostrando a disposição, organização e densidade celulares podem ser observadas na figura 13.

Gráfico 3 - Gráfico dos valores das médias representativo da curva de crescimento celular MS. As células foram cultivadas e analisadas a cada 24 horas por 7 dias. As curvas e equação da reta foram obtidas pela interpolação dos dados em função do tempo, o aumento do crescimento foi significativamente diferente ($p=0,0016$)

Gráfico 4 - Gráfico de barras representando a média da viabilidade celular da cultura MS, durante 168 horas de cultura

Figura 13 - Imagens das culturas MS no período de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 horas, mostrando a disposição, organização e densidade celulares. Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido, com aumento de 40X

5.3 Análise Dos Marcadores Celulares Por Citometria De Fluxo

A Citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, sendo conhecida também por citometria de fluxo multiparamétrica. Através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico, são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula.

Após o crescimento, expansão, congelamento e recultivo das células LS e MS, foram realizadas as análises dos marcadores por citometria de fluxo.

5.3.1 Marcadores de células-tronco

Os marcadores envolvidos na capacidade de células-tronco foram estudados por citometria de fluxo. Nas células das culturas primárias da linhagem LS, ocorreu baixa expressão do marcador CD45RO, demonstrando a inexistência de auto-reatividade imunológica e de células T de memória. Foram significativamente expressos os marcadores CD117 ou c-Kit, demonstrando o potencial dessa população celular, com capacidade hematopoiética, e o receptor para o VEGF-R1, sendo um importante mediador no recrutamento, mobilização, angiogênese e inflamação de células com potencial pluripotente. Os demais marcadores de pluri e totipotência, apesar de estarem expressos, não mostraram diferença nas linhagens LS e MS. Os *dotplots* representativos da aquisição de cada marcador no citômetro de fluxo, as médias e desvio padrão estão apresentados nos gráficos 5 a 8.

Gráfico 5 - Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando a expressão de cada marcador de célula-tronco nas células LS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

Gráfico 6 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de células-tronco expressos pelas células LS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

Gráfico 7 - Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando a expressão de cada marcador de células-tronco nas células MS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

Gráfico 8 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de células-tronco expressos pelas células MS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

* Valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA, entre os valores de expressão das células LSxMS.

5.3.2 Marcadores inflamatórios

Corroborando com o potencial inflamatório da expressão do receptor VEGF-R1 nas células LS e MS, foi avaliada a expressão dos marcadores pró-inflamatórios. O receptor de TNF-R1 e da proteína quimiotática MCP-1 mostrou diminuição nos valores de expressão nas células MS, enquanto os demais marcadores analisados (COX-2, CD11 e CD1a), apesar de não diferirem significativamente, apresentaram positivos nas culturas celulares LS e MS. Esses dados justificam a origem inflamatória persistente na articulação. Os *dotplots* representativos da aquisição de cada marcador no citômetro de fluxo, as médias e desvio padrão estão apresentados nos gráficos 9 a 12.

Gráfico 9 - Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando expressão de cada marcador inflamatório nas células LS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

Gráfico 10 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores inflamatórios expressos pelas células LS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

Gráfico 11 - Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando a expressão de cada marcador inflamatório nas células MS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*.

Gráfico 12 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores inflamatórios expressos pelas células MS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

* Valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA, entre os valores de expressão das células LSxMS.

5.3.3 Marcadores de proliferação e morte celular

A expressão dos marcadores envolvidos com a proliferação, progressão e morte célula não mostrou valores diferentes nas células LS e MS mantidas em cultura. A chaperona HSP-47, responsável pela síntese de colágeno, remodelagem de proteínas e atividade condrogênica, apresentou valores significativamente aumentados de expressão nas culturas de células do LS. As culturas LS e MS apresentaram aumento significativo no marcador Ki67 que está envolvido na capacidade proliferativa. Os dotplots representativos da aquisição de cada marcador por citometria de fluxo, as médias e desvio padrão estão apresentados nos gráficos de 13 a 16.

Gráfico 13 - Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando a expressão de cada marcador de proliferação e morte celular nas células LS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

Gráfico 14 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de proliferação e morte celular expressos pelas células LS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

Gráfico 15 - Gráficos representativos do tipo *dotplot* mostrando a expressão de cada marcador de proliferação e morte celular nas células MS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

Gráfico 16 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP dos marcadores de proliferação e morte celular expressos pelas células MS. Os resultados foram obtidos por citômetro de fluxo, adquiridos pelo programa *CellQuestPro* e analisados no programa *WinMDI 2.9*

* Valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA, entre os valores de expressão das células LSxMS.

5.3.4 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo das linhagens de líquido e membrana sinoviais

Células de líquido e membrana sinoviais foram mantidas em cultura por 48 e 144 horas, posteriormente, fixadas em álcool em RNase e as distribuições das fases do ciclo celular, analisadas por citometria de fluxo.

Os resultados foram expressos em gráfico do tipo *dotplot* com porcentagem média de células nas diferentes fases do ciclo celular: DNA fragmentado, G0/G1 quiescente, fase S de síntese e fase G2/M em divisão.

Não houve diferença significativa nas proporções das células distribuídas nas fases do ciclo celular entre as culturas de 48 e 144 horas de LS, mostrando a manutenção do seu potencial proliferativo; esses dados corroboram os resultados de cinética de crescimento celular e viabilidade.

Os histogramas representativos, adquiridos pelo programa de análise ModFit, das diferentes fases do ciclo celular, estão representados no gráfico 17. Os valores das médias e os cálculos estatísticos estão representados no gráfico 18.

Gráfico 17 - Histogramas representativos analisados pelo programa ModFit das aquisições obtidas por citometria de fluxo. Análise das distribuições populacionais das células LS mantidas em cultura por 48 e 144 horas nas diferentes fases do ciclo celular. Os resultados das análises das culturas estão demonstrados no período de 48 e 144 horas, respectivamente

Gráfico 18 - Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das populações celulares da cultura LS nas diferentes fases do ciclo celular. As análises das culturas foram realizadas nos períodos de 48 horas e 144 horas. Não foram observadas diferenças significativas entre as células LS x MS

Entretanto, nas culturas de 48 e 144 horas de MS, houve diferença significativa nas proporções das células distribuídas nas fases do ciclo celular. Há uma diminuição significativa na população de células em G2/M; esses dados corroboram os resultados de cinética de crescimento celular e viabilidade: as células MS mantidas em cultura diminuem significativamente a sua capacidade proliferativa, após 144 horas de cultivo.

Os histogramas representativos, adquiridos pelo programa de análise ModFit, das diferentes fases do ciclo celular estão representados no gráfico 19. Os valores das médias e os cálculos estatísticos estão representados no gráfico 20.

Gráfico 19 - Histogramas representativos analisados pelo programa ModFit das aquisições obtidas por citometria de fluxo. Análise das distribuições populacionais das células MS mantidas em cultura por 48 e 144 horas nas diferentes fases do ciclo celular. Os resultados das análises das culturas estão demonstrados no período de 48 e 144 horas, respectivamente

Gráfico 20 - Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das populações celulares da cultura MS nas diferentes fases do ciclo celular. As análises das culturas foram realizadas no período de 48 horas e 144 horas. Diferença significativa na fase G2/M obtida pelo teste de variância de ANOVA entre as células LS x MS

5.3.5 Análise do índice proliferativo do crescimento das populações de células LS e MS

O protocolo utilizado com o CFSE permitiu avaliar da maneira fácil e com grande precisão como o marcador foi dividido igualmente entre as células-filhas com cada divisão celular. O CFSE tem fluorescência muito brilhante e, portanto, localiza as células em populações de grande heterogeneidade, permitindo a análise simultânea de número celular, posição, bem como o status de divisão. As aquisições obtidas pelo citômetro de fluxo foram analisadas pelo programa Wizard Proliferation e estão apresentados no gráfico 23.

Os histogramas representativos de cada condição de cultura LS e MS estão apresentados no gráfico 22.

Os valores obtidos mostram maior capacidade de multiplicação celular das células LS, mantidas por 48 e 144 horas em comparação às células MS, que apresentaram menor índice proliferativo após 144 horas de cultivo.

Neste estudo, foi utilizado como grupo controle linfócitos de camundongos normais da linhagem BALB-c obtidos de gânglios linfáticos estimulados com o mitógeno fitohemaglutinina na concentração de 5 µg/ml por 144 horas. Os valores obtidos mostram a resposta proliferativa após a estimulação com fitohemaglutinina, tendo um aumento de até 3 vezes no número de células, em relação ao controle não estimulado; no período de 144 horas, como esperado para este tipo celular, há uma redução na capacidade proliferativa e viabilidade em torno de 78%. Os dados estão apresentados no gráfico 21.

Gráfico 21 - Porcentagem do índice proliferativo de linfócitos normais estimulados com fitohemaglutinina utilizados como grupo controle para o cálculo do índice proliferativo. As células foram mantidas na presença e ausência de fitohemaglutinina por 144 horas. As barras representam a média $\pm$ DP das culturas realizadas nos diferentes períodos

Gráfico 22 - Curva da distribuição das populações celulares em proliferação obtidas pela distribuição do marcador CSFE das células LS e MS mantidas por 48 e 144 horas de cultivo. As curvas contidas em cada figura representam o número de células em proliferação. Os histogramas foram obtidos pelo programa CellQUEST e as proporções celulares, analisadas pelo programa *Wizard Proliferation*

Gráfico 23 - Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP dos índices proliferativos das células LS e MS, obtidos pelo programa de análise *Wizard Proliferation*

* Valores de significância obtidos pelo teste de variância de ANOVA, pelos valores de expressão das células LSxMS.

5.3.6 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial da Membrana Mitocondrial em Linhagens LS e MS

As linhagens de LS e MS foram submetidas à análise do potencial da membrana mitocondrial pelo fluorocromo rodamina 123. A técnica de análise da rodamina 123 permite analisar a viabilidade das mitocôndrias celulares, fornecendo parâmetros como células viáveis e/ou mitocôndrias metabolicamente ativas ou células inviáveis e/ou mitocôndrias metabolicamente inativas em que as células permanecem preservadas ou sofrem alterações que levem à morte. Ou seja, as células marcadas com Rodamina não tiveram a função mitocondrial inibida pela ligação das membranas mitocondriais no transporte de elétrons. As células que não foram marcadas ou com intensidade de fluorescência menor, não possuíam transporte ativo de elétrons com consequente inibição da utilização das mitocôndrias. Estas determinações foram obtidas com base na intensidade de fluorescência captada pela citometria, em que a população com maior intensidade foi identificada como viável e com menor intensidade foi identificada como a população inviável.

Após a aquisição e análise pelo programa WinMDI das células LS cultivadas após 48 e 144 horas, não foram observadas diferenças em seu potencial elétrico. Os histogramas representativos adquiridos por citômetro de fluxo e as médias das populações com alto potencial elétrico (M1) e baixo potencial elétrico (M2) mitocondrial estão apresentados nos gráficos 24 e 25.

Gráfico 24 - Histogramas representativos do potencial elétrico mitocondrial das células LS em 48 e 144 horas de cultivo, obtidos pela distribuição da sonda Rodamina 123. Os resultados foram analisados pelo programa *CellQUEST* e as proporções celulares, pelo programa *Wizard Proliferation*

Gráfico 25 - Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP do potencial elétrico mitocondrial das células LS e MS com 48 e 144 horas de cultivo. Não houve diferenças significativas do potencial elétrico mitocondrial após 48 e 144 horas de cultivo

Não foram observadas diferenças no potencial elétrico das células MS cultivadas após 48 e 144 horas. Os histogramas representativos adquiridos por citômetro de fluxo e as médias das populações com alto potencial elétrico (M1) e baixo potencial elétrico (M2) mitocondrial estão apresentados nos gráficos 26 e 27.

Gráfico 26 - Histogramas representativos das populações celulares MS em 48 e 144 horas de cultivo obtidos pelo programa *CellQUEST* e as proporções celulares analisadas pelo programa *Wizard Proliferation*

Gráfico 27 - Gráfico de barras representando a média $\pm$ DP do potencial elétrico mitocondrial das células LS e MS com 48 e 144 horas de cultivo

A distribuição do número de mitocôndrias por células também foi avaliada, considerando a mediana da intensidade de fluorescência por célula. Os gráficos do tipo *Dotplot*, das culturas das células LS e MS, estão apresentados no gráfico 28. Os valores obtidos das culturas celulares LS e MS, realizadas após 48 e 144 horas, mostraram uma quantidade expressiva de mitocôndrias distribuídas por células, entretanto, sem haver diferenças matemáticas significantes (gráfico 29).

Gráfico 28 - Gráficos do tipo *dotplot* representando o número de mitocôndrias por população de células LS e MS no período de 48 e 144 horas. Não houve diferença significativa entre as culturas celulares. Os resultados foram obtidos pelo programa CellQUEST e as proporções celulares, analisadas pelo programa *Wizard Proliferation*

Gráfico 29 - Gráfico de barras representando a média $\pm$ DP do número de mitocôndrias por população de células LS e MS no período de 48 e 144 horas.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A cultura celular, atualmente, é uma ferramenta essencial e uma importante alternativa à experimentação animal. Os sistemas de cultura “*in vitro*” têm possibilitado estudos direcionados ao comportamento de crescimento e diferenciação celular, a modulação do ciclo celular, o crescimento viral, as interações célula-célula e as manipulações genéticas com vista ao estudo da estrutura e expressão gênica utilizadas na terapia celular, como no uso de células-tronco. Existem inúmeras vantagens com relação à obtenção das células *in vitro*, como o controle das condições ambientais, a análise independente de parâmetros, a execução de grande número de testes em pequeno intervalo de tempo, a redução dos ensaios com modelos animais e principalmente o menor número de animais em experimentação. Entretanto, existem também desvantagens como a perda das características fenotípicas, um sistema biológico em desenvolvimento fora do ambiente natural e a ausência de sinais extracelulares reguladores importantes em vias de sinalização (FRESHNEY, 2000).

De Bari (2001) e Sakaguchi et al. (2005) colheram o tecido sinovial fresco que foi rapidamente transferido para tubos contendo solução fosfato tamponada (PBS) estéril. Foi, então, quebrado em pedaços por uma tesoura, seguido de digestão em solução de collagenase. Após várias horas de digestão, as células são libertadas a partir do tecido sinovial e, subsequentemente, cultivadas em garrafas com densidade de 10^3 ou 10^4 células.

No nosso trabalho, foram coletadas amostras de MS que foram lavadas em solução salina contendo 10% de antibióticos (estreptomicina/penicilina). O tecido foi dividido em duas porções: a primeira, recortada com o auxílio de um bisturi em pequenos fragmentos de $0,01 \text{ cm}^2$ e aderidos a placas de Petri por 30 minutos em solução de soro fetal em estufa de cultura; a segunda porção do material foi debridada e adicionada solução de collagenase 0.1% para separação enzimática das células. A concentração ideal de células é de 10^4 células para a realização das curvas de crescimento, notando-se que as células da membrana e líquido sinoviais apresentaram crescimento e confluência no período de sete dias.

Jones et al. (2004) coletaram as amostras de líquido sinovial de humanos com OA, centrifugaram em 2000rpm por 10 minutos e o “pellet” foi cultivado em garrafas com meio DMEM (Gibco®), suplementadas com 10% de SFB.

No nosso experimento, as amostras de LS foram coletadas em seringas estéreis de 10 ml e transferidas para garrafas de cultivo de 25 cm^2 sem centrifugação. As garrafas foram

preenchidas com 5ml de meio de cultivo MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de estreptomicina/penicilina.

Atualmente, os avanços no desenvolvimento de cultivo de células permitiram a formulação de uma variedade de meios de cultura, acrescidos de substâncias, fatores de crescimento ou aminoácidos essenciais, possibilitando o cultivo de células da maioria dos tecidos e órgãos. Existem inúmeras críticas sobre a validade do cultivo celular como modelo biológico com função fisiológica, por frequentemente não expressarem as mesmas propriedades e características das células de origem, devido às mudanças no ambiente celular quando mantidas e amplificadas *in vitro* (FRESHNEY, 2000).

O meio de cultivo DMEM com 10% soro fetal contém poucos nutrientes, além de ser considerado não seletivo, uma vez que as células com característica *fibroblast like* ou com aparência fibroblastoide não são exigentes e crescem facilmente aderindo ao plástico, expandindo-se e formando colônias. Para a sua proliferação favorável *in vitro*, as células devem ser cultivadas em meio de crescimento contendo alta concentração de glicose (HDMEM) ou em meio mínimo essencial (MEM) suplementados com 10% soro fetal bovino, segundo De Bari (2001a), Sakaguchi (2005) e Nagase et al. (2008).

No presente trabalho os meios MEM (*Minimum Essential Medium*) e DMEM-H (*Dulbecco Modified Essential Medium High Glucose*) foram eficientes na manutenção das células, apresentaram uma resposta proliferativa e aspectos de crescimento celular satisfatórios. As células de membrana e líquido sinoviais, mantidas em meio MEM, apresentaram aspecto fusiforme do tipo *fibroblast like*. Já as células cultivadas em meios de cultivo RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) e DMEM/F12 (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) apresentaram resposta proliferativa insatisfatória, com crescimento lento, no entanto, também apresentaram morfologia fusiforme do tipo *fibroblast like*. Além disso, após a expansão da cultura, as células apresentaram perda de adesão celular ao substrato e formação de agregados multicelulares no sobrenadante da cultura, resultando em morte celular.

Alguns autores utilizam um “coquetel” de fatores de crescimento e substâncias no meio de cultura para acelerar a proliferação das células (CHEN, 2012), mas no presente trabalho não foi utilizado nenhum tipo de indutor de crescimento celular.

Bertram e Krawetz (2012) mostraram que a osmolaridade do ambiente em que as células se encontram regulam o seu potencial condrogênico. Eles provaram que a alteração na osmolaridade de células obtidas de indivíduos com OA ou AR, alteram a regulação gênica dos

condrócitos. As células, que crescem em meio com a osmolaridade igual à de onde elas vieram, têm seu potencial condrogênico aumentado.

As células-tronco mesenquimais possuem capacidade de aderir ao plástico e expandir *in vitro* (PITTENGER et al., 1999). Uma das condições para sua expansão é a presença de soro fetal bovino (YOUNG et al., 2002).

As células MS e LS, após a expansão, congelamento e cultivos sucessivos, foram ampliadas até a 11^o passagem. Porém, as células na 7^a passagem foram analisadas e seus os diferentes aspectos morfofuncionais foram apresentados. No nosso trabalho, as linhagens celulares de membrana e líquido sinoviais equinos apresentaram aspecto morfológico fusiforme do tipo *fibroblast like*.

O crescimento celular foi avaliado após a adesão e multiplicação. Ao longo do tempo, as células utilizam os nutrientes do meio e os resíduos modificam pH do meio. Quando as células MS e LS atingiram a confluência de aproximadamente 70-80%, o meio de cultura foi substituído em sua totalidade e parte da suspensão celular foi novamente cultivada. O meio de cultura torna-se viscoso durante a cultura, fato percebido no momento da troca de meios. Isso pode ser explicado devido à produção de AH dessas células.

As células obtidas de humanos adultos são capazes de reter uma curva de crescimento linear durante pelo menos 30 replicações (SAKAGUCHI et al., 2005). Uma curva de crescimento sigmoidal foi obtida neste estudo, entretanto estudamos essa cinética de diferentes células na 7^a passagem.

De Bari et al. (2001b) afirmam que sua capacidade multipotente não é influenciada pela idade do doador, passagens celulares ou criopreservação, possuem senescência limitada e podem ser expandidas para grandes números de cultura em monocamada *in vitro*. Em seu estudo, esse grupo mostrou que células humanas mantiveram sua capacidade proliferativa após a 10^a passagem. Em nosso estudo, percebemos a capacidade proliferativa das células até a 11^a passagem.

A palavra condrogênese se refere ao processo pelo qual há a formação da cartilagem, envolvendo células pré-condrogênicas. A condrogênese envolve condensação de células mesenquimais, diferenciação em condrócitos, proliferação, hipertrofia e ossificação, resultando na formação da cartilagem. No embrião, há a formação de um agregado de células mesenquimais indiferenciadas que se condensam para a formação do esqueleto. No período pós-natal, a condrogênese ocorre no local da lesão (KHAN et al., 2007).

Segundo Koga et al. (2007), as células de membrana e líquido sinoviais têm maior potencial condrogênico, já que têm elevada produção de UDPGD, uma enzima necessária para a produção de AH que não são expressas por outros tipos de células-tronco.

Chen (2012) afirma que CT obtidas de membrana sinovial e líquido sinovial, demonstram as mesmas características fenotípicas, como produção de colágeno do tipo II, agregan e potenciais de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Em nosso trabalho, as células de LS e MS demonstram características semelhantes durante a cultura e na expressão de marcadores celulares.

Pei e He (2012) afirmam que a MEC depositada pelas células de membrana sinovial é um tecido específico, com um microambiente tridimensional, ideal para a expansão *ex vivo* de condrócitos articulares, mantendo a capacidade de rediferenciação. Eles sugerem que a MEC pode proporcionar uma nova abordagem para terapia celular autóloga.

Lee et al. (2012) desenvolveram um gel composto por colágeno do tipo I, ácido hialurônico e fibrinogênio que encapsula as células derivadas de membrana que serão usadas para a reparação da cartilagem articular de ratos. Os autores afirmam que o transplante direto das células, sem uma matriz, pode induzir a formação de fibrose.

Yoshimura et al. (2007) mostraram que células derivadas de MS de rato têm maior eficiência em formar colônia, em cinética de crescimento e no aumento de replicações do que as células de rato derivadas de periósteo, medula, gordura e tecido do músculo esquelético. Chen (2012) investigou a capacidade condrogênica de células obtidas de sinóvia, medula óssea e de tecido adiposo sob condições de cultura idênticas e perceberam maior potencial condrogênico em células obtidas da sinóvia. Assim como De Bari et al. (2001b), Sakaguchi et al. (2005) perceberam que, sob meio de cultura específico, as células são capazes de se diferenciarem em várias linhagens mesenquimais, incluindo condrócitos, osteoblastos, adipócitos e miócitos. No entanto, são particularmente eficientes em se submeter à diferenciação condrogênica.

As osteoartrites representam aproximadamente 60% dos problemas com claudicação em equinos. Essa patologia compromete a homeostasia da cartilagem articular e até perda de tecido da articulação (CHEN, 2012). A osteocondrite/osteocondrose dissecante é caracterizada pela presença de fragmentos cartilagosos intra-articulares decorrentes da osteocondrose, que desencadeiam o processo inflamatório (VAN WEEREN, 2006). Na clínica, para a cura de pacientes com OCD, parte do fragmento precisa ser retirado por artroscopia. Isto proporciona uma oportunidade para extrair CT autólogas a partir de tecido sinovial para a regeneração da cartilagem (GUALTIERI; GAMBRIOLI, 1978; FOERNER,

2003). Como a membrana e o líquido sinoviais podem ser obtidos de tecidos patológicos, o procedimento cirúrgico para o tratamento dessa patologia torna-se uma oportunidade para coleta do material.

Jones et al. (2008) afirmam que não há diferença no potencial condrogênico das células derivadas de articulações saudáveis e com osteoartrite (OA) ou artrite reumatoide (AR). Não obstante, há aumento do número de células com potencial proliferativo nas articulações com OA, devido à comunicação celular e liberação de fatores de crescimento e proliferação (JONES et al., 2008). Esse fato também é comprovado por McGonagle e Jones (2008), que provaram que as células provenientes de indivíduos com osteoartrites são 20 vezes mais numerosas do que as de pessoas com articulações hígidas.

Tem sido demonstrado que o tecido sinovial pode ser obtido a partir de locais diferentes da articulação do joelho (NISHIMURA et al., 1999). Porém, um estudo relatou que células derivadas da região medial do membro têm mais potencial de formação de colônia do que os derivados das outras regiões (NAGASE et al., 2008). No presente trabalho, foram obtidos fragmentos de MS de amostras de LS das articulações metatarsofalangeanas e tibiotársicas, direita e esquerda, das regiões mediais e laterais das articulações.

Os marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares envolvidos com pluripotência das células, inflamação, checagem e progressão do ciclo celular foram avaliados por citometria de fluxo, ferramenta utilizada para caracterização e origem das células de membrana e líquidos sinoviais.

Krawetz et al. (2012) usaram as células derivadas de LS normal e com OA de humanos, expressando CD105, CD73 (marcador expresso em células-tronco mesenquimais) e CD44 (receptor para o ácido hialurônico e pode também interagir com o colágeno e as MMPs; pode também marcar células-tronco mesenquimais) e negativas para CD45RO e CD11 e de cães negativas para CD45RO e CD34 para avaliação do seu potencial condrogênico.

Fickert, Fiedler, Brenner (2003) e Jones et al. (2004) e De Bari (2008) mostraram que células de membrana e líquido humanos têm um fenótipo semelhante imune como o expresso por CT de medula óssea, incluindo a expressão negativa de genes como CD45RO, CD34, CD117 e a expressão positiva de genes como CD105, CD90, CD44.

O CD90 é expresso em 40-60% das células durante os primeiros 7 dias de cultura, depois, a sua expressão diminui gradualmente. Curiosamente, o potencial condrogênico também diminui, o que significa que o CD90 pode ser um importante indicador do potencial de diferenciação condrogênica (NAGASE et al., 2008).

Krawetz et al. (2008) mostraram que células CD90+ têm o seu potencial condrogênico aumentado quando comparadas às células CD90-. Mostraram também que células obtidas de articulações saudáveis de humanos e caninos não exigem a etapa com o sistema de micromassa (agregados celulares obtidos por centrifugação) para que a condrogênese seja eficaz, já as células obtidas de líquidos sinoviais com OA exigem tal etapa para a diferenciação condrogênica.

Teramura et al. (2008) mostraram que as CT de MS expressam marcadores como CD34, CD117, VEGF-R1, ABCG-2 (superfamília de proteínas transportadoras que se ligam ao ATP; é um progenitor hematopoiético) e MDR-1 (superfamília de proteínas transportadoras; protege células-tronco hematopoiéticas de toxinas).

As células obtidas de sinóvia humana são geralmente caracterizadas utilizando tais anticorpos: CD105, CD90, CD73, que estão presentes na superfície das células, enquanto que o CD45RO e o CD11 não são expressos por esse tipo celular, segundo Dominici et al. (2006).

McGonagle e Jones (2008) obtiveram MSC de gordura sinovial, com amostras obtidas a partir de fragmentos de humanos com osteoartrite e artrite reumatoide. Eles comparam células de gordura sinovial com de medula óssea e identificaram que ambas são fenotipicamente semelhantes, expressando marcadores de superfície como o CD105, CD75 (expresso em linfócitos B maduros, linfócitos T e eritrócitos), CD271 (expresso em células-tronco mesenquimais, como as de medula óssea).

Crovace et al. (2008) mostraram um aumento de células CD34 + em amostras obtidas de medula óssea de ovelhas.

Longo et al. (2012) afirmam que as células-tronco mesenquimais apresentam imunopositividade para STRO-1 (proteína da superfície celular expressas pelas células-tronco de medula óssea e de precursores eritroides), CD73 e CD105 e imunorreatividade negativa para CD11, CD34, CD45RO e CD117.

Carvalho et al. (2009) isolaram e cultivaram células a partir de tecido adiposo de equinos. Observaram que tais células expressam positivamente CD90 e CD44.

Células obtidas de cordão umbilical equino apresentam positividade para os marcadores OCT3/4, SSEA-4 (expresso por células-tronco embrionárias), CD117, TRA-1-60, c-Myc (desempenha um papel muito importante na regulação do crescimento celular, a apoptose e na diferenciação de células-tronco), CD54, CD90 e CD105 e foram negativas para CD34, CD45RO e CD133, segundo Hoynowski et al. (2007).

Gamwell, Collins e Vanderhyden (2012) observaram a expressão de Ly6a em células progenitoras nas superfícies de ovários de ratas.

Pei e He (2012) mostraram que o CD90 e o CD105 podem servir como marcadores indicativos de proliferação e de capacidade de rediferenciação dos condrócitos desdiferenciados.

Kolf, Cho e Tuan (2007) afirmam que a co-expressão de STRO-1, CD73 e CD106 (expressos em células de adesão) é a combinação de marcadores mais eficiente para células-tronco mesenquimais.

Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) apud Dominici et al. (2006) propôs um critério para definir CTMs humanas. Elas devem ser aderentes ao plástico, expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90 e não expressar CD45RO, CD34 e o CD11.

Em equinos, ainda não foi estabelecido um imunofenótipo para CT, já que não existem muitos anticorpos espécie-específicos e podem surgir resultados falso-negativos (CHEN, 2012).

Neste estudo, nas células das culturas primárias da linhagem LS ocorreu baixa expressão do marcador CD45RO, demonstrando a inexistência de auto-reatividade imunológica. Além de serem significativamente expressos os marcadores CD117, demonstrando o potencial dessa população celular, com capacidade hematopoiética; e o receptor para o VEGF-R1, sendo um importante mediador no recrutamento, mobilização, angiogênese e inflamação de células com potencial pluripotente.

Os demais marcadores de pluri e totipotência OCT3/4, NANOG, CD105, CD90, CD34, CD117, CD133, TRA1-81, VEGF-R1, Ly6a não mostraram diferença nas linhagens LS e MS, entretanto, são marcadores que indicam a pluripotência dessas linhagens. Tais resultados concordam com o que afirmam os autores citados acima.

A inflamação é um processo complexo e altamente regulado iniciado em resposta a uma lesão tecidual. Uma vez ativada, há uma liberação sequencial de mediadores que resulta no desenvolvimento clássico dos sinais de inflamação: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da temperatura e ativação da dor sensorial. Células inflamatórias são atraídas para o local pela ativação da expressão de moléculas de adesão. A produção local de quimioatrativos orienta a migração celular (COLVILLE-NASH; WILLOUGHBY, 2002).

Murphy et al. (2003) analisaram a expressão de TNF-R1 em articulações de caprinos tratados com células derivadas de medula óssea após um trauma induzido e perceberam uma queda na concentração desse fator durante o tratamento. Kobayashi et al. (1999) já afirmam que o TNF-R1 induz a proliferação de sinoviócitos de indivíduos com OA.

Colville-nash e Willoughby, em 2002, analisaram a COX-2 em um modelo de artrite aguda e observaram que o marcador está correlacionado aos sinais da doença. Ogura et al.

(2010) mostraram que o MCP-1 estava presente em indivíduos com patologias na articulação têmporo-mandibular e os valores eram maiores nos que apresentavam dor.

Merkel et al. (1999) afirmam que o TNF-R1 é indutor da osteoclastogênese e é fundamental na regeneração óssea, após uma artroplastia. Han et al., em 2010, relatam que a deficiência de CD11 torna os camundongos mais suscetíveis ao choque de endotoxinas de *Escherichia coli*, causando sepse.

Neste trabalho, houve uma diminuição nos valores da expressão do receptor TNF-R1 nas células MS, assim como o valor da expressão da proteína quimiotática MCP-1. Os demais marcadores analisados COX-2, CD11 e CD1a, apesar de não diferirem significativamente, apresentaram positivos nas culturas celulares LS e MS. Esses dados justificam a origem inflamatória persistente na articulação.

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. As caspases são responsáveis pela liberação da p53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos. A proteína p53 participa da regulação do ponto de checagem de G1, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose. Essa proteína regula a expressão de p21, que por sua vez regula a fase G1-S do ciclo celular. Danos no DNA promovem a superexpressão e consequente ativação da p53 e p21, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. A p21 inibe o complexo de ciclinas, parando o ciclo celular em G1 para permitir o reparo do DNA, caso esteja danificado. Quando os danos ao DNA não são passíveis de reparo, ocorre a ativação da apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Os valores expressos nos resultados deste trabalho mostram que há a morte programada das células LS e MS, indicando que há um constante processo de renovação celular e homeostase do tecido. Não há inexpressão desses marcadores, indicando divisão descontrolada das células, como o que acontece em processos tumorais.

As culturas LS e MS apresentaram aumento significativo no marcador Ki67 que está envolvido na capacidade proliferativa, estando presente nas fases G1, S, G2 e M. Houve uma diminuição significativa na população de células em G2/M; esses dados corroboram os resultados de cinética de crescimento celular e viabilidade, onde as células MS mantidas em cultura diminuem significativamente a sua capacidade proliferativa, após 144 horas de cultivo. Durante o cultivo celular, as células de LS apresentaram facilidade maior em se aderirem ao plástico e em se multiplicarem.

A chaperona HSP-47, responsável pela síntese de colágeno, remodelagem de proteínas e atividade condrogênica é expressa nos dois tipos celulares. Essa proteína *heat chock* é indispensável para a organização da cartilagem e formação normal do osso endocondral, segundo Masago et al. (2012). Entretanto, a HSP-47 foi significativamente maior em seu valor de expressão nas culturas de células de LS, indicando que tais células são mais eficientes na maturação de colágeno, atividade condrogênica e há mais replicação do que morte celular.

Portanto, as células do LS possuem maior regulação nas cascatas do ciclo celular, além de seu potencial condrogênico também ser maior.

Tak et al. (2000) avaliaram o número de células apoptóticas e a expressão de p53 em articulações de ratos com AR e perceberam um aumento significativo do p53 nos últimos estágios da doença.

Perlman et al. (2003) afirmam que a ativação do ciclo celular e a inflamação estão ligadas e que a expressão de p21 é também reduzida em células sinoviais de indivíduos com AR quando comparadas com células de indivíduos com OA.

Kobayashi et al. (1999) mostraram que há regulação na caspase-3 em sinoviócitos tratados com TNF-R1, diminuindo a morte celular por apoptose.

Izquierdo et al. (2011) analisaram a expressão de HSP-47 em células obtidas de tecido sinovial humano com AR. Os autores afirmam que tal marcador pode ainda mostrar a fase em que a patologia se encontra.

Huch et al. (2002) analisaram a expressão de Ki67 como um marcador de proliferação celular em osteocondromas e células de articulações humanas normais e perceberam que este se apresenta aumentado em células em alta proliferação.

As mitocôndrias são organelas celulares que convertem a energia em uma forma biologicamente utilizável nas reações celulares. Essas organelas são formadas por duas membranas, uma externa, responsável por controlar o fluxo de íons e metabólitos para o espaço intermembranas, e a membrana interna, altamente especializada e rica em proteínas,

dentre as quais, componentes da cadeia respiratória e proteínas responsáveis pelo transporte de metabólitos. São responsáveis pela síntese de quase todo o ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular, porém, são também importantes fontes intracelulares de espécies reativas de oxigênio. A lesão do genoma mitocondrial causa mutações ou deleções dos produtos genéticos mitocondriais, levando a um aumento na concentração dos intermediários reduzidos da cadeia respiratória, levando à formação de radicais livres através da sua auto-oxidação. Essa situação proporcionaria um distúrbio no fluxo de elétrons na cadeia respiratória e provocaria um escape de elétrons, resultando em um aumento na geração de radicais livres. De acordo com os dados descritos, propôs-se um ciclo vicioso: lesão do DNA mitocondrial afetaria a função da cadeia respiratória, levando à geração de mais radicais livres que, por sua vez, provocariam lesão adicional ao DNA mitocondrial (BOVERIS; CHANCE, 1973). Os resultados mostraram uma quantidade expressiva de mitocôndrias distribuídas pelas linhagens celulares. A presença de mitocôndrias ativas nas células de MS e LS mostram as suas altas capacidades proliferativas.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

As estratégias experimentais e metodológicas no estabelecimento da culturas de líquido e membrana sinoviais, utilizando os meios de cultivo DMEM-H e MEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos foram eficientes para a obtenção, manutenção e expansão das células *in vitro*.

Os aspectos morfológicos encontrados foram de células fusiformes do tipo *fibroblast like* nas culturas de membrana e líquido sinoviais.

A expressão de marcadores de células-tronco, marcadores inflamatórios e marcadores envolvidos na checagem e progressão do ciclo celular mostraram-se diferencialmente expressos, sugerindo que podemos considerá-las uma possível fonte de células-tronco mesenquimais.

As células do líquido sinovial possuem maior regulação nas cascatas do ciclo celular, além de seu potencial condrogênico também ser maior, devido à sua alta expressão de HSP-47.

Devido ao grande impacto que patologias na articulação têm sobre o desempenho atlético em cavalos, os resultados demonstrados neste trabalho servirão de base para conduzir outros experimentos na avaliação da utilidade dessas células sinoviais em aplicações terapêuticas.

Referências

REFERÊNCIAS

ADARMES, H.; CROXATTO, A.; GALLEGUILLOS, M.; GONZÁLEZ, E. Contenido de glicosaminoglicanos, aldehydos y proteínas en el LS de La articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 38, p.47-52, 2006.

ALWAN, W. H.; CARTER, S. D.; BENNETS, D.; EDWARDS, G. B. Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, p. 44-47, 1991.

ANASTASIOU, A.; SKIOLDEBRAND, E.; EKMAN, S.; HALL, L. D. Ex vivo magnetic resonance imaging of the distal row of equine carpal bones: Assessment of bone sclerosis and cartilage damage. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 44, p. 501-512, 2003.

ANDO, W.; TATEISHI, K.; HART, D. A.; KATAKAI, D.; TANAKA, Y.; NAKATA, K.; HASHIMOTO, J.; FUJIE, H.; SHINO, K.; YOSHIKAWA, H.; NAKAMURA, N. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 28, p. 5462–5470, 2007.

ANDO, W.; TATEISHI, K.; KATAKAI, D.; HART, D. A.; HIGUCHI, C.; NAKATA, K.; HASHIMOTO, J.; FUJIE, H.; SHINO, K.; YOSHIKAWA, H.; NAKAMURA, N. In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. **Journal of Tissue Engineering**, part A, v. 14, p. 2041–2049, 2008.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Manoele, 1992. 629 p.

BARBERO A, PLOEGERT S, HEBERER M, MARTIN I. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. **Arthritis e Rheumatism**, v. 48, p. 1315-1325, 2003.

BARKER, T. H.; HAGOOD, J. S. Getting a grip on Thy-1 signaling. **Biochimica e Biophysica Acta**, v. 1793, n. 5, p. 921–923, 2009.

BAYLISS, M. T.; OSBORNE, D.; WOODHOUSE, S.; DAVIDSON, C. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 15892-15900, 1999.

BERTRAM, K. L.; KRAWETZ, R. J. Osmolarity regulates chondrogenic differentiation potential of synovial fluid derived mesenchymal progenitor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 422, p. 455-461, 2012.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p.180-192, 2001.

BOOM, R.; HARST, M.R.; BROOMER, H.; BRAMA, P. A.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R.; DEGROOT, J. Relationship between synovial fluid levels of glycosaminoglycans, hydroxylproline and general MMP activity and the presence and severity of articular cartilage change on the proximal articular surface of P1. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 1, p. 19-35, 2005.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, p. 707-716, 1973.

BRUCE, A.; ALEXANDER, J.; JULIAN, L.; MARTIN, R.; KEITH, R.; PETER, W.; BURDEN, R. E.; GORMLEY, J. A.; JAQUIN, T. J.; SMALL, D. M.; QUINN, D. J.; HEGARTY, S. M.; WARD, C.; WALKER, B.; JOHNSTON, J. A.; OLWILL, S. A.; SCOTT, C. J. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6042-6051, 2009.

CANTO, L. S.; LA CORTE, F. D.; BRASS, K. E.; RIBEIRO, M. D. Frequência de problemas de equilíbrio nos cascos de cavalos crioulos em treinamento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n. 4, p. 489-495, 2006

CARON, J. P.; BOWKER, R. M.; ABHOLD, R. H.; TOPPIN, D. S.; SONEA, I. M.; VEX, K. B. Substance P in synovial membrane and fluid of the equine middle carpal joint. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 5, p. 364-366, 1992.

CARVALHO, A. M.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, p. 303-306, 2009.

CHEN, Y. Chondrogenic capacities of equine synovial progenitor populations. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy Veterinary Clinical Medicine - Graduate College of the University of Illinois, Urbana-Champaign, 118 p. 2012.

COLVILLE-NASH, P. R.; WILLOUGHBY, D. A. COX-1, COX-2 and articular joint disease: a role for chondroprotective agents. **Biorheology**, v. 39, 171-179, 2002.

COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell cycle inhibitors: a function for each cell compartment? **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 65-70, 2003.

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; FRANCIOSO, E.; ROSSI, G. Histology and immunohistochemistry study of ovine tendon grafted with cBMSCs and BMMNCs after collagenase-induced tendinitis. **Veterinary and Comparative Orthopaedics Traumatology**, v. 21, p. 329-336, 2008

DARLING, E. M.; ATHANASIOU, K. A. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 425, 2005.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; NEYS, J.; LUYTEN, F. P. Human synovial membrane derived mesenchymal stem cells for skeletal muscle repair. **Arthritis e Rheumatism**, v. 44, p. 1928-1942, 2001a.

_____.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P. Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. **Arthritis e Rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001b.

_____.; DELL'ACCIO, F.; KARYSTINO, A.; GUILLOT, P. V.; FISK, N. M.; JONES, E. A.; MCGONAGLE, D.; KHAN, I. M.; ARCHER, C. W.; MITSIADIS, T. A.; DONALDSON, A. N.; LUYTEN, F. P.; PITZALIS, C. A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells. **Arthritis e Rheumatism**, v. 58, p. 240, 2008.

DEALY, C. N. Chondrogenic Progenitors for Cartilage Repair and Osteoarthritis Treatment. **Rheumatology: Current Research**, v.1, p. 2-4, 2012. Supplement 3.

DOMINICI, M.; LE, B. K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

ENGLISH, A.; JONES, E. A.; CORSCADDEN, D.; HENSHAW, K.; CHAPMAN, T.; EMERY, P.; MCGONAGLE, D. A comparative assessment of cartilage and joint fat pad as a potential source of cells for autologous therapy development in knee osteoarthritis. **Rheumatology**, v. 46, 1676-1683, 2007.

ERIKSSON, U.; ALITALO, K. VEGF-R1 receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies. **Nature Medicine**, v. 8, p. 775-777, 2002.

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 Engineering**, Part B, v. 15, n. 1, p. 75-86, 2009.

FERREIRA, L.; KARP, J. M.; NOBRE, L.; LANGER, R. New Opportunities: The Use of Nanotechnologies to Manipulate and Track. **Stem Cells**, v. 3, p. 136-146, 2008.

FICKERT, S.; FIEDLER, J.; BRENNER, R. E. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. **Osteoarthritis Cartil**, v. 11, p. 790, 2003.

FITZGERALD, O.; BRESNIHAN, B. Synovial membrane cellularity and vascularity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 54, p. 511, 1995.

FOERNER, J. J. Osteochondrosis in the horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, n. 4, p. 142-145, 2003.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 4 ed. New York: Wiley-Liss, 1995.

FRISBIE, D. D.; SMITH, R. K. W. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 1, 86-89, 2010.

GAMWELL, L. F.; COLLINS, O.; VANDERHYDEN, B. C. The Mouse Ovarian Surface Epithelium Contains a Population of LY6A (SCA-1) Expressing Progenitor Cells That Are Regulated by Ovulation-Associated Factors. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 80, 2012.

GARVICAN, E. R.; VAUGHAN-THOMAS, A.; REDMOND, C.; CLEGG, P. D. Chondrocytes harvested from osteochondritis dissecans cartilage are able to undergo limited in vitro chondrogenesis despite having perturbations of cell phenotype in vivo. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 8, p. 1133-1140, 2008.

GERTER, R.; KRUEGEL, J.; MIOSGE, N. New insights into cartilage repair - The role of migratory progenitor cells in osteoarthritis. **Matrix Biology**, v. 31, p. 206-213, 2012.

GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. v. 2, 1967 p.

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Research**, v.12, p. 264-265, 1952.

GOGOLAK, P.; RETHI, B.; SZATMARI, I.; LANYI, A.; DEZSO, B.; NAGY, L.; RAJNAVOLGYI, E. Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR. **Blood**. v. 109, 643-652, 2007.

GRIVICICHI, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUALTIERI, G.; GAMBRIOLI, P. L. Surgical treatment of rheumatoid arthritis. **Chirurgia Italiana Journal**, v. 30, p. 642, 1978.

HAN, C.; JIN, J.; XU, S.; LIU, H.; LI, N.; CAO, X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. **Nature immunology**, v. 11, n. 8, p. 734-742, 2010.

HOSOKAWA, N.; HOHENADL, C.; SATOH, M.; KIIHN, K.; NAGATA, K. HSP47, a Collagen-Specific Molecular Chaperone, Delays the Secretion of Type III Procollagen Transfected in Human Embryonic Kidney Cell Line 293: A Possible Role for HSP47 in Collagen Modification. **The Journal of Biochemistry**, v. 124, n. 3, p. 654-662, 1998.

HOYNOWSKI, S. M.; FRY, M. M.; GARDNER, B. B.; LEMING, M. T.; TUCKER, J. R.; BLACK, L.; SAND, T.; MITCHELL, K. E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, p. 347-353, 2007.

HUCH, K.; MORDSTEIN, V.; STÖVE, J.; NERLICH, A. G.; ARNHOLDT, H.; DELLING, G.; PUHL, W.; GÜNTHER, K. P.; BRENNER, R. E. Expression of collagen type I, II, X and Ki-67 in osteochondroma compared to human growth plate cartilage. **European Journal of Histochemistry**, v. 46, p. 249-258, 2002.

HUNZIKER, E. B. Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 9, p. 22-32, 2001.

INOUE, A.; TAKAHASHI, K. A.; ARAI, Y.; TONOMURA, H.; SAKAO, K.; SAITO, M.; FUJIOKA, M.; FUJIWARA, H.; TABATA, Y.; KUBO, T. The therapeutic effects of basic fibroblast growth factor contained in gelatin hydrogel microspheres on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 1, p. 264-270, 2006.

IZQUIERDO, E.; CAÑETE, J. D.; CELIS, R.; DEL REY, M. J.; USATEGUI, A.; MARSAL, S.; SANMARTÍ, R.; CRIADO, G.; PABLOS, J. L. Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 9, p. 2575-2583, 2011.

JEFFCOTT, L. B. Osteochondrosis in the horse - searching for the key to pathogenesis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 5, p. 331-338, 1991.

JONES, E. A.; CRAWFORD, A.; ENGLISH, A.; HENSHAW, K.; MUNDY, J.; CORSCADDEN, D.; CHAPMAN, T.; EMERY, P.; HATTON, P.; MCGONAGLE, D. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. **Arthritis Rheum**, v. 58, p. 1731-1740, 2008.

_____.; ENGLISH, A.; HENSHAW, K.; KINSEY, S. E.; MARKHAM, A. F.; EMERY, P.; MCGONAGLE, D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 50, p. 817, 2004.

JOUGLIN, M.; ROBERT, C.; VALETTE, J. P.; GAVARD, F.; QUINTIN-COLONNA, F.; DENOIX, J. M. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. **Veterinary Research**, v. 31, n. 5, p. 507-515, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogar, 2004.

KANAMOTO, T.; NAKAMURA, N.; NAKATA, K.; YOSHIKAWA, H. Articular cartilage regeneration using stem cells. **Clinical Calcium Journal**, v. 18, p. 1744-1749, 2008.

KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W.; NORDDIN, R. W.; PARK, R. D.; STEYN, P. S. Clinical effects of exercise on subchondral bone of carpal and metacarpophalangeal joints horses. **American Veterinary Research**, v. 61, p. 1252-8, 2000.

KAYA, M.; WADA, T.; KAWAGUCHI, S.; NAGOYA, S.; SHINDOH, M.; HIGASHINO, F.; MEZAWA, F.; OKADA, F.; ISHII, S. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. **British Journal of Cancer**, v. 86, p. 864-869, 2002.

KHAN, I. M.; REDMAN, S. N.; WILLIAMS, R.; DOWTHWAITE, G. P.; OLDFIELD, S. F.; ARCHER, C. W. The development of synovial joints. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 79, p. 1-36, 2007.

KOBAYASHI, T.; OKAMOTO, K.; KOBATA, T.; HASUNUMA, T.; SUMIDA, T.; NISHIOK, K. Tumor necrosis factor α regulation of the Fas-mediated apoptosis-signaling pathway in synovial cells. **Arthritis & Rheumatism**, v. 2, n. 3, p. 519–526, 1999.

KOCH, T. G.; HEERKENS, T.; THOMSEN, P. D.; BETTS, D. H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. **BMC Biotechnology**, v. 7, n. 26, p. 7-26, 2007.

KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J. D.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P.; GROGAN, S. P. Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 1613-1619, 2006.

KOGA, H.; MUNETA, T.; JU, Y. J.; NAGASE, T.; NIMURA, A.; MOCHIZUKI, T.; ICHINOSE, S.; VON DER MARK, K.; SEKIYA, I. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. **Stem Cells**, v. 25, p. 689–696, 2007.

_____.; SHIMAYA, M.; MUNETA, T.; NIMURA, A.; MORITO, T.; HAYASHI, M.; SUZUKI, S.; JU, Y.; MOCHIZUKI, T.; SEKIYA, I. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. **Arthritis Research Therapy**, v. 10, p.4, 2008.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007.

KORETZKY, G. A.; PICUS, J.; MATTHEW, L.; THOMAS, M. L.; WEISS, A. Tyrosine phosphatase CD45RO is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidylinositol pathway. **Nature**, v. 346, p. 66-68, 1990.

KRAGL, M.; KNAPP, D.; NACU, E.; KHATTAK, S.; MADEN, M.; EPPERLEIN, H. H.; TANAKA, E. M. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. **Nature**, v. 460, p.60-65, 2009.

KRAWETZ, R. J.; WU, Y. E.; MARTIN, L.; RATTNER, J. B.; MATYAS, J. R.; HART, D. A. Synovial Fluid Progenitors Expressing CD90+ from Normal but Not Osteoarthritic Joints Undergo Chondrogenic Differentiation without Micro-Mass Culture. **PLoS One**, v. 7, p. 8, 2012.

LEE, J. C.; LEE, S. Y.; MIN, H. J.; HAN, S. A.; JANG, J.; LEE, S.; SEONG, S. C.; LEE, M. C. Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in a Novel Injectable Gel can Repair Osteochondral Defects in a Rabbit Model. **Tissue Engineering**, Part A, v. 18, p.19-20, 2012.

LIMA NETO, J. F. **Análise da viabilidade e ciclo celular de fibroblastos eqüinos cultivados in vitro**: comparação pré- e pós-descongelção. 73p. Dissertação (Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

LONGO, U. G.; PETRILLO, S.; FRANCESCHETTI, E.; BERTON, A. N.; DENARO, V. Stem Cells and Gene Therapy for Cartilage Repair. **Stem Cells International**, v. 2012, p.1-9, 2012.

MAFI, P.; HINDOCHA, S.; MAFI, R.; GRIFFIN, M.; KHAN, W. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. **The Open Orthopedics Journal**, v.5, p. 253–260, 2011. Supplement, 2.

MAGDALOU, J.; NETTER, P.; FOURNEL-GIGLEUX, S.; OUZZINE, M. Agrecan and articular cartilage: assessment of glycosyltransferases for the restoration of cartilage matrix in osteoarthritis. **Society of Biology**, v. 202, n. 4, p. 281-288, 2008.

MASAGO, Y.; HOSOYA, A.; KAWASAKI, K.; KAWANO, S.; NASU, A.; TOGUCHIDA, J.; FUJITA, K.; NAKAMURA, H.; KONDOH, G.; NAGATA, K. The molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. **Journal of Cell Science**, v. 125, p.1118–1128, 2012.

MCGONAGLE, D.; JONES, E. A potential role for synovial fluid mesenchymal stem cells in ligament regeneration. **Rheumatology**, v. 47, p. 1114–1116, 2008.

MCILWRAITH, C. W. From arthroscopy to gene therapy - 30 years of looking in the joints. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v. 51, p. 65-113, 2005.

_____. General pathobiology of the joint and response to injure. In: G.W. Trotter. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996.

_____. Overview of bone disease. In: **Advances In Equine Nutrition III**, v.3, p. 365-372, 2001.

_____. Synovial fluid analysis in the diagnosis of equine joint disease. **Equine Practice**, v. 2, n. 2, p. 44-48, 1980.

_____. Diseases of joints, tendons, ligaments, and related structures. In: STASHAK, T. S. **Adam's lameness in horses**. cap. 7, p. 543-56. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002

MERKEL, K. D.; ERDMANN, J. M.; MCHUGH, K. P.; ABU-AMER, Y.; ROSS, P.; F. P.; TEITELBAUM, S. L. Tumor necrosis factor- α mediates orthopedic implant osteolysis. **The American Journal Pathology**, v. 154, n. 1, p. 203–210, Jan. 1999.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068-1074, 2006.

MURPHY, J. M.; FINK, D. J.; HUNZIKER, E. B.; BARRY, F. P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis e Rheumatism**, v. 48, p. 3464-3474, 2003.

NAGASE, T.; MUNETA, T.; JU, Y. J.; HARA, K.; MORITO, T.; KOGA, H.; NIMURA, A.; MOCHIZUKI, T.; SEKIYA, I. Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. **Arthritis e Rheumatism**, v. 58, p. 1389, 2008.

NAKAMURA, T.; SEKIYA, I.; MUNETA, T.; HATSUSHIKA, D.; HORIE, M.; TSUJI, K.; KAWARASAKI, T.; WATANABE, A.; HISHIKAWA, S.; FUJIMOTO, Y.; TANAKA, H.; KOBAYASHI, E. Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs. **Cytotherapy**, v. 14, p. 327-338, 2012.

NISHIMURA, K.; SOLCHAGA, L.A.; CAPLAN, A.I.; YOO, J.U.; GOLDBERG, V.M.; JOHNSTONE, B. Chondroprogenitor cells of synovial tissue. **Arthritis e Rheumatism**, v. 12, p. 2631, 1999.

OGURA, N.; SATOH, K.; AKUTSU, M.; TOBE, M.; KUYAMA, K.; KUBOYAMA, N.; SAKAMAKI, H.; KUJIRAOKA, H.; KONDOH, T. MCP-1 production in temporomandibular joint inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 10, p. 1117-22, 2010.

OSBOURNE, A. C.; CARTER, S. D.; MAY, S. A.; BENNETT, D. Anti-collagen antibodies and immune complexes in equine joint disease. **Veterinary Immunology and Immunopatology**, v. 45, p. 19-30, 1995.

PALMER, J. L.; MCCLAIN, H. Assessment of glycosaminoglycan concentration in equine synovial fluid as marker of joint disease. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 45, p. 205-312, 1995.

PEI, M.; HE, F. Extracellular Matrix Deposited by Synovium-Derived Stem Cells Delays Replicative Senescent Chondrocyte Dedifferentiation and Enhances Redifferentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, p. 2163–2174, 2012.

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PEREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTANO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Jornal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 237-246, 1998.

PERLMAN, H.; BRADLEY, K.; LIU, H.; COLE, S.; SHAMIYEH, E.; SMITH, R. C.; WALSH, K.; FIORE, S.; A. E.; GARY; FIRESTEIN, S.; HAINES, K.; POPE, R. M. IL-6 and Matrix Metalloproteinase-1 are Regulated by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 in Synovial Fibroblasts. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 2, p. 838-845, 2003.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p.143-147, 1999.

RICHARDSON, D. W. Function and pathology of synovial fluid. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, Georgia. **Proceedings...** S.1: American Association of Equine Practitioners, p.117-120, 1983.

RIGGS, C. M. Osteocondral injury and joint disease in athletic horse. **Equine Veterinary Education**, v. 8, n. 2, p. 128-144, 2006.

ROONEY, D. K. Clinical nutrition. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Equine internal medicine**. Philadelphia: Saunders, 1998. cap. 5, p. 232-234.

SAELEN, X.; FESTJENS, N.; VANDE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 6, p. 2861-2874, 2004.

SAKAGUCHI, Y.; SEKIYA, I.; YAGISHITA, K.; MUNETA, T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissue: superiority of synovium as a cell source. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 8, p. 2521-2529, 2005.

SANZ-RODRIGUEZ, F.; GUERRERO-ESTEO, M.; BOTELLA, L. M.; BANVILLE, D.; VARY, C. P. H.; BERNABÉU, C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through

binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32858-32868, 2004.

SARLOMO-RIKALA, M.; KOVATICH, A. J.; BARUSEVICIUS, A.; MIETTINEN, M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. **Modern Pathology Journal**, v. 11, n. 8, p. 728-734, 1998.

SCHOPPERLE, W. M.; DEWOLF, W. C. The TRA-1-60 and TRA-1-81 Human Pluripotent Stem Cell Markers Are Expressed on Podocalyxin in Embryonal Carcinoma. **Stem Cells**, v. 25, p. 723-730, 2007.

SHMELKOV, S. V.; BUTLER, J. M.; HOOPER, A. T.; HORMIGO, A.; KUSHNER, J.; MILDE, T.; ST. CLAIR, R.; BALJEVIC, M.; WHITE, I.; JIN, D. K. ; CHADBURN, A.; MURPHY, A. J.; VALENZUELA, D. M.; GALE, N. W.; THURSTON, G.; YANCOPOULOS, G.D.; D'ANGELICA, M.; KEMENY, N.; LYDEN, D.; RAFII, S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133⁺ and CD133⁻ metastatic colon cancer cells initiate tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, p. 2111–2120, 2008.

SICLARI, V.; QIN, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, p. 78, 2010.

STASHAK, T. S. **Claudicação em equinos segundo Adams**. 4^a ed. São Paulo: Roca, 1994. p. 943.

STOCK, K. F.; DISTL, O. Genetic correlations between conformation traits and radiographic findings in the limbs of German Warmblood riding horses. **Genetic Selection Evolution**, v. 38, n. 6, 657-671, 2006.

TAK, P. P.; KLAPWIJK, M. S.; BROERSEN, S. F. M.; GEEST, D. A.; OVERBEEK, M.; FIRESTEIN, G. S. Apoptosis and p53 expression in rat adjuvant arthritis. **Arthritis Research**, v. 2, 229–235, 2000.

TERAMURA, T.; FUKUDA, K.; KURASHIMO, S.; HOSOI, Y.; MIKI, Y.; ASADA, S.; HAMANISHI, C. Isolation and characterization of side population stem cells in articular synovial tissue. **Biomedcentral Musculoskeletal Disorders**, v. 9, n. 86, 2008.

TEW, W. P.; HOTCHKISS, R. N. Synovial fluid analysis and equine joint disorders. **J. Equine Veterinary Science** v. 1, p. 163-170, 1981.

THEORET, C. L.; BARBER, S. M.; MOYANA, T.; TOWNSEND, H. G.; ARCHER, J.F. Repair and function of synovium after arthroscopic synovectomy of the dorsal compartment of the equine antebrachicarpal joint. **Veterinary Surgery**, v. 25, n. 142, 1996.

TODHUNTER, R. J. Anatomy and physiology of synovial joints. In: MCILWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. (Ed.). **Joint disease in the horse**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996.

TODHUNTER, R. J.; FUBINI, S. L.; FREEMAN, K. P.; LUST, G. Concentrations of ketatin sulfate in plasma and synovial fluid from clinically normal horses and horses with joint disease. **Journal American Veterinary Association**, v. 210, p. 369-374, 1997.

TRIEB, K.; KOTZ, R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 11-17, 2001.

TULAMO, R.M.; HOUTTU, J.; TUPAMAKI, A.; SALONEN, M. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in sinovial fluids form horse with varos arthrides. **American Journal Veterinay Research**, v. 57, p. 927-937, 1996.

TULI, R.; TULI, S.; NANDI, S.; WANG, M. L.; ALEXANDER, P. G.; HALEEM-SMITH, H.; HOZACK, W. J.; MANNER, P. A.; DANIELSON, K. G.; TUAN, R. S. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. **Stem Cells**, v. 21, 681–693, 2003.

UMANSKI, E. E. The regeneration potencies of axolotl skin studied by means of exclusion of the regeneration capacity of tissues through exposure to x-rays. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. USSR, v. 6, p. 141–145, 1938.

VAN PELT, R. W. Characteristics of normal equine tarsal synovial fluid. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 31, n. 10, p. 342-347, 1967.

VAN WEEREN, W. R. Etiology, Diagnosis and treatment of the OCD. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 5, p. 248-58, 2006.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; JOHNSON, J. R.; LOPEZ, M. J.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Cell Growth Characteristics and Differentiation Frequency of Adherent Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 601-610, 2006.

WORSTER, A. A. ; BROWER-TOLAND, B. D.; FORTIER, L. A.; BENT, S. J.; WILLIAMS, J.; NIXON, A. J. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells

sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 19, p. 738-749, 2001.

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 Research**, v. 327, n. 449, 2007.

YOUNG, C. S.; TERADA, S.; VACANTI, J. P.; HONDA, M.; BARTLETT, J. D.; YELICK, P. C. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. **Journal Dental Research**, v. 81, n. 10, p. 695-700, 2002.

MASAGO, Y.; HOSOYA, A.; KAWASAKI, K.; KAWANO, S.; NASU, A.; TOGUCHIDA, J.; FUJITA, K.; NAKAMURA, H.; KONDOH, G.; NAGATA, K. The molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 1118-1128, 2012.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.18, n. 51, 2004.

ZIMMERMANN, T.; KUNISCH, E.; PFEIFFER, R.; HIRTH, A.; STAHL, H.D.; SACK, U.; LAUBE, A.; LIESAUS, E.; ROTH, A.; PALOMBO- KINNE, E.; EMMRICH, F.; KINNE, R. W. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture—primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. **Arthritis Research**, v. 3, n. 72, p. 72-76, 2001.