JOICE FÜLBER

Estudo in vitro do potencial de diferenciação condrogênico e osteogênico
de células mesenquimais obtidas de líquido e membrana sinovial de equinos

São Paulo

2015

JOICE FÜLBER

Estudo *in vitro* do potencial de diferenciação condrogênico e osteogênico de células
mesenquimais obtidas de líquido e membrana sinovial de equinos

São Paulo

2015

JOICE FÜLBER

Estudo *in vitro* do potencial de diferenciação condrogênico e osteogênico de células mesenquimais obtidas de líquido e membrana sinovial de equinos

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

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof.^a Dr.^a Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2015

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.3128
FMVZ

Fülber, Joice

Estudo *in vitro* do potencial de diferenciação condrogênico e osteogênico de células mesenquimais obtidas de líquido e membrana sinovial de equinos / Joice Fülber. -- 2015.
115 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Equino. 2. Líquido sinovial. 3. Membrana sinovial. 4. Terapia celular. 5. Célula-tronco mesenquimal. I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo *in vitro* do potencial de diferenciação condrogênica e osteogênica de células mesenquimais obtidas de líquido e membrana sinovial de equinos”, protocolado sob o nº 2871/2013, utilizando 10 (dez) camundongos e 18 (dezoito) equinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin 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 13/3/2013.

We certify that the Research “Chondrogenic and osteogenic differentiation potential of mesenchymal cells from equine synovial fluid and synovial membrane - *in vitro* study”, protocol number 2871/2013, utilizing 10 (ten) mice and 18 (eighteen) equine, under the responsibility Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethical 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 3/13/2013.

São Paulo, 31 de março de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FÜLBER, Joice

Título: Estudo *in vitro* do potencial de diferenciação condrogênica e osteogênica de células mesenquimais obtidas de líquido e membrana sinovial de equinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária 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

Aos meus pais, Jorge e Irlene, pela confiança, incentivo, apoio incondicional. Uma singela homenagem, pois vocês não mediram esforços para me ajudar a chegar aqui.

Ao Lion meu “filhote” de quatro patas, por sua verdadeira amizade e amor, que a cada dia me mostra que a felicidade está nos simples gestos.

Ao meu amor João Paulo que acompanhou de perto esta jornada, com muita paciência, cumplicidade, ajuda e dedicação e por tornar as pequenas vitórias tão especiais.

AGRADECIMENTOS

À FMVZ-USP por consagrar minha vida na Pós-graduação.

À minha orientadora Raquel Baccarin, pela confiança e paciência. Difícil expressar em palavras o meu agradecimento por ter viabilizado esta conquista, me proporcionando crescimento pessoal e profissional.

À professora Cristina Massoco, que com muito carinho e atenção me ensinou a técnica de citometria de fluxo e pelas diversas explicações sobre o “mundo do cultivo celular”.

Ao professor Durvanei, colaborador desta pesquisa e que gentilmente cedeu seu laboratório nas etapas iniciais deste estudo.

Ao professor Luis Cláudio, pelas coletas das amostras durante artroscopia.

À professora Carla Belli, pelo acolhimento no início da minha jornada na Pós-graduação.

Ao enfermeiro Cícero, que esteve disposto a me ajudar e sempre de bom humor.

Ao técnico de histopatologia Luciano, que colaborou imensamente confeccionando as lâminas deste estudo.

Ao Geraldo, pelas intermináveis buscas de nitrogênio líquido.

Às “meninas” do laboratório, Samantha, Cláudia, Maria Helena, Marli e Clara, pelo ótimo convívio durante o tempo de “internato laboratorial” no cultivo celular.

À Nicole e Herculano por toda ajuda nos momentos que precisei.

Aos professores Paulo Brandão e Bruno Cogliati, por cederem espaço no laboratório durante algumas etapas desta pesquisa.

À Fernanda Agreste, que me ajudou imensamente durante as fases deste estudo e pelo laço de amizade que se formou a partir de então.

À minha amiga Juliana, por toda sua ajuda, pelo companheirismo, apoio moral e por compartilhar momentos alegres durante este período.

À minha amiga Mônica, que antes de iniciar esta pesquisa, já me ajudava com muitas ideias. Obrigada pela ajuda durante a ultrassonografia.

À minha amiga Talissa, pela amizade, companheirismo e por me propiciar os momentos mais descontraídos na nossa tão sonhada Pós-graduação.

À Thaís pelo incentivo e conselhos.

À Patrícia, que me ajudou imensamente com o Abstract.

À Marilene, pelas muitas risadas no hospital e por me ajudar com os primeiros exames de imagem.

À equipe “Raquelzetes”.

À Nicole, sem sua ajuda não conseguiria realizar sozinha os exames radiográficos.

À minha amiga Francene, que sempre me incentivou e confiou na minha caminhada.

Aos meus colegas do Instituto Butantan, pela ótima recepção e convivência.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, do Hospital de equinos e equipe de residentes (2013 e 2014) pela recepção e convívio.

Aos animais, por permitir que este estudo fosse possível.

EPÍGRAFE

“A vida muda na proporção da sua coragem”

(Autor desconhecido)

RESUMO

FÜLBER, J. **Estudo *in vitro* do potencial de diferenciação condrogênico e osteogênico de células mesenquimais obtidas de líquido e membrana sinovial de equinos.** [Chondrogenic and osteogenic differentiation potential of mesenchymal cells from equine synovial fluid and synovial membrane - *in vitro* study]. 2015. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Na espécie equina, as enfermidades osteoarticulares causam prejuízo econômico e impacto negativo no desempenho atlético, devido aos danos causados na cartilagem articular. A regeneração da cartilagem hialina e a manutenção da integridade das estruturas que a compõe norteiam a busca do tratamento ideal. Neste contexto, este estudo foi delineado com o objetivo de investigar a presença de células-tronco mesenquimais (CTMs) no líquido sinovial (LS) e na membrana sinovial (MS) de equinos com articulações hígdas, com osteocondrite dissecante (OCD) e com osteoartrite (OA) e compará-las, visando estabelecer qual fonte celular possui melhor característica fenotípica e capacidade de diferenciação celular, mais especificamente, aquela que seja superior em relação à capacidade condrogênica. Foram utilizados equinos machos e fêmeas de diferentes idades, totalizando 97 articulações. O LS e MS foram coletados durante artroscopia e as células foram cultivadas, e avaliadas por citometria de fluxo com os anticorpos CD44, CD90, CD105, CD34; e por imunocitoquímica com os anticorpos nanog, oct4, PGP 9.5, lisozima, vimentina e citoqueratina. Adicionalmente, o potencial de diferenciação das células foi avaliado para as linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica. Foi realizado teste de tumorigenicidade em camundongos Balb-C^{nu/nu}, para comprovar aplicabilidade clínica, e posteriormente, as CTMs provenientes de LS de articulações hígdas foram aplicadas em articulações de equinos. A identidade das células foi comprovada durante o cultivo demonstrando características de adesão ao plástico e morfologia fibroblastóide. A média percentual das populações positivas para CD90 foi de 64,9% (LS-H), 48,3% (LS-OCD), 48,1% (LS-OA), 66,6% (MS-H), 40,2% (MS-OCD) e 40,3% (MS-OA). A porcentagem de células positivas para CD44 foi de 1,18% (LS-H), 3,98% (LS-OCD), 14,2% (LS-OA), 1,9% (MS-H), 2,17% (MS-OCD) 8,56% (MS-OA). Não foi observada expressão dos anticorpos CD34 e CD105. Na análise imunocitoquímica foi detectada expressão positiva para os anticorpos: lisozima, PGP 9.5, PCNA e vimentina, e

negativa para nanog, oct4 e citoqueratina. A multipotência (osteogênica, condrogênica e adipogênica) das células foi confirmada através da coloração Alizarin Red para detecção de matriz de cálcio, Oil Red O para detecção de gotículas de gordura e azul de toluidina, alcian blue e hematoxilina eosina para detecção de matriz de proteoglicanos. Com relação aos resultados do teste tumorigênico, nenhum órgão dos camundongos foi afetado, assegurando a aplicabilidade das células estudadas. Ainda, as articulações de equinos tratadas, não apresentaram quaisquer sinais de reação inflamatória após aplicação de células alogênicas. Por fim, concluímos que, a fenotipagem positiva de CD44 e CD90 somada à capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica e condrogênica confirma a presença de CTMs nas populações celulares obtidas de LS e MS de equinos. Também foi observado que as células de LS provenientes de articulações híginas, são as de melhor utilização clínica, uma vez que apresentaram maior expressão de CD90 e demonstraram melhor capacidade de diferenciação celular em relação às células derivadas de articulações enfermas. Além disso, possuem método mais fácil de colheita em relação à colheita de MS, visando futura terapia celular na rotina clínica.

Palavras-chave: Equino. Líquido sinovial. Membrana sinovial. Terapia celular. Célula-tronco mesenquimal

ABSTRACT

FÜLBER, J. **Chondrogenic and osteogenic differentiation potential of mesenchymal cells from equine synovial fluid and synovial membrane - *in vitro* study.** [Estudo *in vitro* do potencial de diferenciação condrogênico e osteogênico de células mesenquimais obtidas de líquido e membrana sinovial de equinos]. 2015. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In the equine species, osteoarticular diseases cause significant economic losses and negative impact on equine athletic performance. The hyaline cartilage regeneration and the maintenance of integrity of its components guide the search for the ideal treatment. In this scenario, this study aimed to investigate the presence of mesenchymal stem cell (MSCs) in the synovial fluid (SF) and in the synovial membrane (SM) of healthy equine joints, osteoarthritic (OA) and osteochondritic joints (OCD), comparing their potential as cellular sources, according to their differentiation ability, in particular with superior chondrogenic potential and the phenotypic characteristics of the MSCs. Ninety-seven equine joints from males and females of different ages were used to harvest cells. SF and SM were obtained during arthroscopy and the cells SF and SM were cultured and assessed for CD90, CD44, CD105 and CD34 markers by flow cytometry, and nanog, oct4, PGP 9.5, lysozyme, vimentin and cytokeratin were assessed by immunocytochemistry. Additionally, cells were evaluated *in vitro* for their osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation potential. The tumorigenicity test was carried in Balb-C ^{nu/nu} mice, to verify the safety of cell sources and, later, mesenchymal stem cells harvested from healthy equine joints were injected into equine joints. The identity of these cells was confirmed during cell growth, through properties of plastic adhesion and fibroblastoid morphology. The mean percentage of CD90 positive cells was 64.9% (SF-H), 48.3% (SF-OCD), 48.1% (SF-OA), 66.6% (SM-H), 40.2% (SM- OCD) and 40.3% (SM-OA). The percentage of CD44 positive cells was 1.18 % (SF-H), 3.98% (SF-OCD), 14.2% (SF-OA), 1.9% (SM-H), 2.17% (SM-OCD) and 8.56% (SM-OA). The expression of CD34 and CD105 antibodies was not observed. Through immunocytochemical analysis, expression for lysozyme, PGP9.5, PCNA e vimentin antibodies was detected and negative expression for nanog, oct4 e cytokeratin was observed. The multipotent capacity of mesenchymal stromal cells for lineage differentiation (osteogenic, chondrogenic and

adipogenic) was confirmed with different staining techniques: Alizarin Red enabled detection of the calcium matrix, Oil Red O enabled the detection of fat droplets and Toluidin Blue, Alcian Blue and haematoxylin eosin enabled detection of proteoglycan matrix. Results of tumorigenic tests in mice showed no compromise of any internal organ, assuring applicability of the studied cells. Furthermore, equine joints treated with MSC harvested from healthy joints did not show any signs of an inflammatory reaction after injection of the allogeneic cells. The presence of cells with positive CD44 and CD90 phenotypes and with the ability to differentiate into osteogenic and chondrogenic lineages confirms the presence of MSCs in equine SF and SM. Cells obtained from healthy SF were more suitable for clinical application, for they presented higher CD90 expression and demonstrated greater differentiation capabilities, when compared to that of cells retrieved from compromised joints. In addition to that, SF derived cells are easier to obtain when compared to SM cells, aiming their future application clinical.

Keywords: Equine. Synovial fluid. Synovial membrane. Cellular therapy. Mesenchymal stem cells

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Figura 1 - Fotomicrografias representativas do cultivo celular proveniente dos grupos LS e MS, durante a 3ª passagem	101
Apêndice B -	Tabela 3 - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos LS pela técnica de citometria de fluxo para os marcadores CD90 e CD44	102
Apêndice C -	Tabela 4 - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos MS pela técnica de citometria de fluxo para os marcadores CD90 e CD44	103
Apêndice D -	Tabela 5 - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos LS pela técnica de citometria de fluxo para os marcadores CD105 e CD34	104
Apêndice E -	Tabela 6 - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos MS pela técnica de citometria de fluxo para os marcadores CD105 e CD34	105
Apêndice F -	Figura 2 - Fotomicrografias representativas da caracterização celular dos grupos LS e MS pela técnica de imunocitoquímica.....	106
Apêndice G -	Figura 3 -Fotomicrografias representativas da análise por imunocitoquímica dos grupos LS e MS	107
Apêndice H -	Figura 4 - Fotomicrografias representativas do grupo LS após diferenciação osteogênica.....	108
Apêndice I -	Figura 5 - Fotomicrografias representativas do grupo MS após a diferenciação osteogênica.....	109
Apêndice J -	Figura 6 - Fotomicrografias representativas da diferenciação adipogênica dos grupos LS e MS	110
Apêndice K -	Figura 7 - Fotomicrografias representativas da diferenciação condrogênica do grupo LS.....	111
Apêndice L -	Figura 8 - Fotomicrografias representativas da diferenciação condrogênica no grupo MS	112
Apêndice M -	Figura 9 - Fotomicrografias representativas do teste de potencial tumorigênico após aplicação por via subcutânea nos camundongos Balb-C ^{nu/nu}	113
Apêndice N -	Figura 10 - Fotos radiográficas representativas das articulações radiocárpicas antes e após tratamento intra-articular com cultura de células do LS-H	114

Apêndice O -	Figura 11 - Fotos representativas do exame ultrassonográfico das articulações radiocárpicas antes e após tratamento por via intra-articular da cultura de células do LS.....	115
--------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e erro padrão das populações de células de LS e MS	66
Tabela 2 - Mensurações por ultrassonografia do diâmetro e profundidade dos defeitos osteocondrais das articulações tratadas e controles	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo de estudos que avaliaram o uso de terapia celular com CTMs em animais com OA induzida na espécie equina.....	50
Quadro 2 - Divisão dos grupos de acordo com a condição articular.....	54
Quadro 3 - Descrição dos anticorpos utilizados durante caracterização celular	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
μl	Microlitro
μm	Micrometro
AH	Ácido hialurônico
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
CD44	Glicoproteína receptor de ácido hialurônico
CD90	Thy-1: expressa em células multipotentes
CD105	Endoglinta: Glicoproteína de membrana expressa em células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células músculo esqueléticas
CD34	Sialomucina: Glicoproteína que expressa fator de adesão
CD73	ecto 5 nucleotidase
CD14	Expressos em monócitos e macrófagos
CD11b	Expressos em monócitos e macrófagos
CD79	Marcador de células B
CD19	Marcador de células B
CD45	Marcador de leucócitos
CK	<i>Natural Killer</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COMP	proteína oligomérica da matriz da cartilagem (<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>)
CT	Célula-tronco
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMEM	<i>Dulbecco Modified Essential Medium</i>
GAG	Glicosaminoglicano
HE	Hematoxilina eosina
HGF	fator de crescimento hepatoide
IDO	enzima indoleamina 2,3-dioxigenase
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL-1-β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10

INF- γ	interferon gama
ITS	insulina transferrina sódico
LS	Líquido sinovial
LS-CTM	Célula-tronco mesenquimal de líquido sinovial
LSH-CTM	Célula-tronco mesenquimal de líquido sinovial hígido
LSOA-CTM	Célula-tronco mesenquimal de líquido sinovial com osteoartrite
LSOCD-CTM	Célula-tronco mesenquimal de líquido sinovial com osteocondrite dissecante
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
MHC I	Complexo de histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo de histocompatibilidade classe II
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinase
MS	Membrana sinovial
MS-CTM	Célula-tronco mesenquimal da membrana sinovial
MSH-CTM	Célula-tronco mesenquimal da membrana sinovial hígida
MSOA-CTM	Célula-tronco mesenquimal da membrana sinovial com osteoartrite
MSOCD-CTM	Célula-tronco mesenquimal da membrana sinovial com osteocondrite dissecante
Nanog	Fator de transcrição celular
NF- κ B	fator de transcrição nuclear Kb
NO	Óxido nítrico
OA	Osteoartrite
OC	Osteocondrose
OCD	Osteocondrite dissecante
Oct-4	Fator de transcrição
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pH	Potencial de hidrogênio
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGs	Proteoglicanos
pH	Potencial de hidrogênio
SFB	Soro fetal bovino
TFDS	Tendão flexor digital superficial
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	ARTICULAÇÕES DIARTRODIAIS	23
2.1.1	Líquido sinovial	25
2.1.2	Membrana sinovial	26
2.2	OSTEOCONDROSE (OC)	27
2.3	OSTEOARTRITE (OA)	29
2.3.1	Etiopatogenia da OA	30
2.3.2	Patogenia da OA	30
2.4	DIAGNÓSTICO POR IMAGEM	32
2.5	CÉLULAS-TRONCO	34
2.5.1	Células-tronco mesenquimais	36
2.5.2	Células-tronco mesenquimais da membrana sinovial (MS-CTMs)	41
2.5.3	Células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (LS-CTMs)	42
2.6	APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE CTMs NA MEDICINA EQUINA	44
2.6.1	Aplicações terapêuticas de CTMs nas enfermidades articulares de equinos	46
3	JUSTIFICATIVA	51
4	OBJETIVOS	52
5	MATERIAL E MÉTODOS	53
5.1	ANIMAIS	53
5.1.1	Seleção das células	54
5.2	CULTIVO CELULAR	54
5.2.1	Isolamento das células do líquido sinovial	55
5.2.2	Isolamento das células da membrana sinovial	55
5.2.3	Passagem das células – Tripsinização	56
5.2.4	Congelamento e descongelamento	56
5.3	CARACTERIZAÇÃO CELULAR	57

5.3.1	Avaliação fenotípica por Citometria de fluxo	57
5.3.2	Avaliação fenotípica por imunocitoquímica.....	58
5.4	DIFERENCIAÇÃO CELULAR	60
5.4.1	Diferenciação adipogênica	60
5.4.2	Diferenciação osteogênica.....	60
5.4.3	Diferenciação condrogênica.....	61
5.5	TESTE TUMORIGÊNICO	61
5.6	APLICAÇÃO DE CÉLULAS EM EQUINOS POR VIA INTRA-ARTICULAR.....	62
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
7	RESULTADOS	65
7.1	CULTIVO CELULAR.....	65
7.2	CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO	65
7.3	CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR IMUNOCITOQUÍMICA	67
7.4	POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO	67
7.4.1	Potencial de diferenciação osteogênica	67
7.4.2	Potencial de diferenciação adipogênica.....	68
7.4.3	Potencial de diferenciação condrogênica	68
7.5	POTENCIAL TUMORIGÊNICO.....	69
7.6	TRATAMENTO INTRA-ARTICULAR COM CÉLULAS ALOGÊNICAS	69
8	DISCUSSÃO	71
9	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICES	100

1 INTRODUÇÃO

O sistema musculoesquelético dos equinos é de ampla importância por permitir a sustentação e a dinâmica da locomoção da espécie. Os desafios físicos nos cavalos, em especial os atletas, dependem de inúmeros fatores, incluindo a sua condição física, vulnerabilidade individual pré-existente e dos programas de treinamento, dos quais o total de carga e a intensidade de trabalho exercem significativo destaque (EGENVALL et al., 2013). Nesta visão, as lesões articulares ocorrem conseqüentemente ao estresse mecânico, provocado após cargas excessivas, que ultrapassam os limites fisiológicos articulares (RIGGS, 2010).

Uma vez diagnosticada lesão articular, sua recuperação dependerá de tratamento específico, pois há pouca capacidade intrínseca de regeneração cartilaginosa, progredindo muitas vezes para perda da sua função. Isto se torna um sério problema na Medicina Equina, demonstrado através da dor e claudicação. Por conseguinte, têm sido feitas diversas tentativas na busca pelo tratamento ideal, principalmente tratando-se de enfermidades articulares, como a osteocondrite dissecante e a osteoartrite, que juntas, incidem na maioria dos problemas musculoesqueléticos na espécie equina (FRISBIE, 2006). Visando contribuir para a reparação tecidual, a fim de restaurar a integridade da cartilagem articular nasceu um novo conceito embasado na terapia celular, das quais atualmente, as células-tronco mesenquimais ocupam espaço científico significativo e são abordadas nos grandes centros de pesquisa. Suas propriedades são reveladas em cada estudo, aparentando ser uma promissora fonte terapêutica (BOEUF; RICHTER, 2010; ORTH et al., 2014).

A escolha mais adequada da população de células-tronco para a regeneração da cartilagem depende da sua disponibilidade, facilidade de manipulação e manutenção em cultura e principalmente no seu potencial de diferenciação condrogênica (ORTH et al., 2014).

A medicina regenerativa lança a oportunidade, não apenas de controlar a evolução das doenças, mas sim promover a regeneração dos tecidos, envolvendo uma organizada remodelação tecidual. Neste contexto, a utilização de células-tronco mesenquimais oriundas de tecido adequado parece ser crucial para apropriada regeneração de estruturas articulares previamente comprometidas (DE BARI et al., 2001).

As células-tronco mesenquimais podem ser isoladas de uma variedade de tecidos como medula óssea, tecido adiposo, líquido amniótico, cordão umbilical, líquido sinovial e membrana sinovial (DE BARI et al., 2001; KOGA et al., 2007; JONES et al., 2008;

NIMURA et al., 2008; ZHANG et al., 2008; KIM et al., 2011; KOYAMA et al., 2011; LEE et al., 2012a; SEKIYA et al., 2012). A fascinante descoberta de que o tecido sinovial é uma fonte de células-tronco mesenquimais, as caracterizaram como grande promessa para tratamento de enfermidades de origem osteoarticulares. Isto se deve, em parte, por se tratarem de células com habilidades comparáveis às outras fontes e essencialmente por seu alto potencial condrogênico. Estas características as distinguem das demais e sustentam a hipótese de que são principais candidatas para a regeneração da cartilagem (MCGONAGLE; JONES, 2008; ARUFE et al., 2009; JONES, 2011; KRAWETZ et al., 2012)

A fração celular presente tanto no líquido sinovial (LS), quanto na membrana sinovial (MS) são conhecidas por sinoviócitos do tipo A (MAPP; REVELL, 1987), do tipo B (KITAMURA et al., 1999, 2001) e recentemente, foram encontradas células-tronco mesenquimais, que são facilmente expandidas em cultura celular, um método simples que promove a proliferação e concentração mais abundante das células, favorecendo o estudo *in vitro* e conduzindo para futura utilização clínica (KOYAMA et al., 2011).

O papel que estas células exercem, assim como suas características e propriedades, ainda é palco de muitas dúvidas, por isso, uma série de estudos cresce a cada momento. Neste cenário, já foi identificado a existência de células-tronco mesenquimais no LS e na MS em humanos.

Atualmente, surgiram alguns trabalhos utilizando células humanas (JONES et al., 2008; ARUFE et al., 2009; KRAWETZ et al., 2012; SEKIYA et al., 2012) e somente um utilizando células de equinos (MURATA et al., 2014). Este último comparou as populações celulares derivadas de articulações híbridas com as obtidas de articulações com fratura intra-articular ou com osteocondrite dissecante, com o intuito de investigar a capacidade de proliferação, características fenotípicas e de diferenciação celular.

De maneira semelhante o presente estudo objetivou encontrar células-tronco mesenquimais no LS e MS de equinos com doenças articulares, porém a partir de articulações acometidas por osteoartrite e por osteocondrite dissecante. Além disso, pretendeu-se investigar o potencial tumorigênico destas células, visando o tratamento intra-articular a partir de células alogênicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARTICULAÇÕES DIARTRODIAIS

As articulações sinoviais ou diartrodiais compreendem as superfícies articulares ósseas. Estas são revestidas pela cartilagem hialina (articular) e fixadas pela cápsula articular e ligamentos, formando uma cavidade preenchida pelo líquido sinovial (LS). A cápsula articular é formada por uma camada fibrosa contínua ao periósteo e por um revestimento interno chamado de membrana sinovial (MS) ou sinóvia. A função da cartilagem é propiciar a movimentação e suportar cargas compressivas, permitindo deslizamento entre as superfícies ósseas, além de fornecer proteção mecânica ao osso subcondral (HUI et al., 2013; ORTH et al., 2014).

A cartilagem hialina é uma estrutura altamente especializada, composta por tecido conjuntivo denso elástico, (CARON, 2003) resistentes às cargas, pressão e ao movimento entre as superfícies ósseas (HUI et al., 2013; DEMOOR et al., 2014). É um tecido avascular, aneural e desprovido de drenagem linfática (ORTH et al., 2014), sendo assim, todo oxigênio e nutrientes são fornecidos por difusão através do osso subcondral e também pelo LS (BEEKUIZEN, 2014; DEMOOR et al., 2014).

Microscopicamente, a cartilagem hialina é composta de 65 a 80% de água, 10 a 30% de colágeno, 5 a 10% de proteoglicanos e aproximadamente 2% de condrócitos (CARON, 2003; GOODRICH; NIXON, 2006; BEEKUIZEN, 2014). Ela é composta por quatro camadas: a camada superficial contendo condrócitos achatados ou arredondados, a intermediária com condrócitos arredondados e distribuídos, a camada profunda com condrócitos dispostos em colunas orientadas perpendicularmente à superfície e a calcificada que é composta por cartilagem mineralizada e condrócitos em vários estágios de degeneração, (CARON, 2003) ligada intimamente ao osso subcondral subjacente (MCILWRAITH, 2005; ORTH et al., 2014).

A cartilagem já foi considerada um tecido contendo somente um tipo celular conhecido, o condrócito. Entretanto, a ciência demonstrou a existência em pequena quantidade de células progenitoras com potencial de diferenciação em condrócitos maduros, contribuindo para o reparo local em situações de microlesões (DEMOOR et al., 2014). Os condrócitos são responsáveis pela síntese abundante de matriz extracelular cartilaginosa

(MEC), formada pelo colágeno tipo II, agregam e outros proteoglicanos (MCILWAITH, 2005). Estas células também regulam as propriedades estruturais e funcionais de acordo com as cargas aplicadas na cartilagem. (CARON, 2003; ORTH et al., 2014). Na idade adulta seu ciclo celular é mantido na fase pós-mitótica, sendo este um dos motivos pelo qual a cartilagem possui capacidade limitada de se autorreparar, ou seja, nesta fase, as células são impedidas de divisão (DEMOOR et al., 2014).

A MEC é rica em proteoglicanos e fibras de colágeno, predominantemente do tipo II, mas também estão presentes os tipos VI, IX, XI, XII e XVI que fornecem ajuda na formação e estabilidade da rede de fibrilas do tipo II, promovendo resistência à tração (ORTH et al., 2014). O colágeno presente na cartilagem lhe fornece estrutura através da presença da rede fibrilar e não fibrilar. O colágeno fibrilar é originalmente paralelo à superfície articular na camada superficial. O colágeno tipo II é o mais abundante, representando cerca de 90% da rede fibrilar e metade do peso seco da cartilagem. É composto por três cadeias de aminoácidos idênticas, disposta em uma tripla hélice, sendo pouco solúvel (CARON, 2003; BEEKUIZEN, 2014). A organização das fibrilas as quais o colágeno está organizado forma uma rede tridimensional ou esqueleto da matriz. Durante o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, ocorre degradação e ressíntese das fibrilas, conhecido como *turnover*. Entretanto este equilíbrio entre o anabolismo e catabolismo das fibrilas de colágeno parece ser limitado em indivíduos adultos (CARON, 2003; MCILWAITH, 2005).

Enquanto o colágeno confere força elástica resistindo à tensão, um grupo completamente diferente de macromoléculas na MEC fornece função complementar, resistindo à compressão e preenchimento de espaço. Estes são os proteoglicanos (PGs), definidos como macromoléculas que possuem um esqueleto proteico, ligado de forma covalente a uma classe de polissacarídeos chamados de glicosaminoglicanos (GAGs), que são complexos carregados negativamente (ALBERTIS et al., 2011).

Os GAGs consistem em unidades repetidas de dissacarídeos, nas quais um dos açúcares é uma hexosamina (glucosamina ou galactose), alternados com outro açúcar não nitrogenado (ácido glucorônico, ácido idurônico ou galactose). Eles são sulfatados em várias posições e graus (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O AH é o único glicosaminoglicano não sulfatado, e que não se encontra na forma de PG. A molécula de AH também é composta pela repetição de dissacarídeos e pode atingir peso molecular entre 104 - 107 Dalton (PRIETO et al., 2005). No LS, estas moléculas de alto peso molecular são mantidas entrelaçadas e desta forma garantem boa viscosidade, ou seja, a

principal característica que contribui para a lubrificação da cartilagem articular (HUI et al., 2013).

Os PGs podem ser encontrados como monômeros e na forma agregada. O agregado de PGs é composto por uma molécula de ácido hialurônico (AH), sendo que a ligação é estabilizada através de uma proteína de ligação. O principal PGs presente na cartilagem articular é o agregam, e sua estrutura é influenciada pelo comprimento do AH, pela parte da proteína ligada e pelo grau de seu processamento. Os principais GAGs que compõem o agregam são condroitim-6-fosfato e queratam sulfato (MCILWRAITH; TROTTER, 1996). Eles são os principais responsáveis pela função e estrutura cartilágnea. O condroitim-4-fosfato está presente na cartilagem imatura, sendo assim, conforme maturidade da cartilagem há diminuição da sua concentração (MCILWRAITH, TROTTER, 1996).

Logo, a resistência às cargas compressivas da cartilagem articular é dependente de altas concentrações de agregam (GOLDRING, 2000; GOODRICH; NIXON, 2006; BEEKUIZEN, 2014; ORTH et al., 2014).

A cartilagem articular também é constituída por PGs de baixo peso molecular, os quais representam de 1 a 4% da massa total de PGs e são denominados decorim, biglicam e fibromodulim. Eles integram a matriz de colágeno, são organizados estruturalmente de forma semelhante e regulam uma infinidade de processos metabólicos (CARON, 2003).

2.1.1 Líquido sinovial

O LS é um lubrificante biológico, considerado um ultrafiltrado do plasma sanguíneo, que em condições normais é amarelo claro, viscoso e com moléculas importantes como AH, que é encontrado em alta concentração (GOODRICH; NIXON, 2006; STEEL, 2008).

A quantidade proteica no LS é em torno de 25 a 35% em relação à concentração plasmática (STEEL, 2008), e a glicose presente atravessa a membrana através de difusão, em quantidade semelhante à encontrada no plasma. O LS é composto por células mononucleares, células de revestimento, monócitos e linfócitos, que representam 90% da totalidade celular, o restante é composto por leucócitos polimorfonucleares (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

A troca de fluidos entre o plasma e o LS, ocorre por pressão hidrostática e diferença de pressão osmótica coloidal, conhecido como forças de *Starling*. O AH é o único glicosaminoglicano não sulfatado presente no LS, atuando principalmente como barreira de

troca entre pequenas moléculas, e na manutenção do volume constante de LS. Quando em solução, o AH, adota uma configuração entrelaçada aleatoriamente, com elevada afinidade pela água, mantendo a viscosidade alta, o que permite que a cartilagem suporte tensões e absorva impactos gerados pelo movimento. A viscosidade do LS depende da concentração e do grau de polimerização de AH, fornece lubrificação ao tecido como uma propriedade vital à saúde da cartilagem (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; SMITH, 2011).

2.1.2 Membrana sinovial

As características morfológicas da MS, bem como de suas vilosidades podem ser avaliadas durante artroscopia, e sua aparência é variável, desde mais espessa até delgada e transparente. A membrana sinovial equina é branca a branco-amarelada, com aparência lisa e brilhante em algumas regiões, e em outras formadas somente por vilosidades (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Histologicamente, a MS é um tecido de origem mesodérmico, composto por uma camada íntima, constituída de tecido conjuntivo fibroso, areolar ou adiposo, e camada subíntima, formado por tecido conjuntivo frouxo que permite a sua mobilidade. A MS é vascularizada por inúmeros vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas que chegam à cápsula articular (SMITH, 2011).

Os sinoviócitos pertencentes à MS compõem a camada íntima. Foram definidos e classificados de acordo com a sua estrutura e função, através de microscopia eletrônica, nomeados como tipo A (semelhantes aos macrófagos) e tipo B (semelhantes aos fibroblastos) (GOODRICH; NIXON, 2006; SMITH, 2011; HUI et al., 2013). As células mais abundantes são do tipo B, que sintetizam importantes macromoléculas, incluindo colágeno, AH e PGs (STEEL, 2008). Células do tipo A compreendem apenas 10 a 20% das células de revestimento e são responsáveis pela fagocitose (CARON, 2003).

A MS é capaz de regular passivamente o ambiente articular bioquímico através da difusão de substâncias dos capilares e ativamente através da secreção de substâncias derivadas dos sinoviócitos. A fagocitose, regulação da quantidade de proteína e de AH, bem como propriedades de autorregeneração são funções bem esclarecidas da MS. Ainda, é classificada como uma importante barreira permeável mantendo o controle da composição de moléculas presentes no LS (MCILWRAITH, TROTTER, 1996).

O revestimento sinovial não exerce função biomecânica conhecida, mas é capaz de resposta ao estresse mecânico através do aumento e/ou alterações na produção do colágeno, alteração na difusão de íons entre o LS, tal como alterações no metabolismo dos sinoviócitos, afetando o ambiente articular. Imediatamente após um trauma articular, ocorrem danos endoteliais, vasodilatação e consequentemente efusão sanguínea (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

2.2 OSTEOCONDROSE (OC)

A OC é uma doença ortopédica de desenvolvimento que acomete articulações de indivíduos jovens de diferentes espécies, incluindo o cavalo. É descrita como uma falha focal de ossificação endocondral e pode afetar o complexo articular epifisário, como a placa metafisária de crescimento e osso subcondral. Esta falha pode originar várias situações, entre as quais: área de cartilagem retida pela falha da ossificação endocondral que pode evoluir para a cura, ou, necrosar, formando lesões císticas subcondrais (cistos ósseos subcondrais); ou ainda, formar fissuras ou flaps cartilaginosos, que podem destacar-se, calcificar e sofrer, secundariamente, ossificação, caracterizada como lesão de dissecação e nomeada como osteocondrite dissecante (OCD) (STOCK et al., 2006).

Entre as causas de enfermidade articular em equinos a OCD é responsável por 10 a 30% de incidência, dependentes da raça e/ou esporte. Quando um fragmento ósseo se destaca completamente e a superfície articular é lesionada, os sinais clínicos da doença se desenvolvem. Desta maneira, a OCD é uma grande preocupação na indústria equina (DESJARDIN et al., 2014).

A etiologia é considerada uma condição multifatorial das quais influências biomecânicas, falhas na vascularização, fatores nutricionais e genéticos são apontados como fatores causais. Todos estes podem desempenhar papel importante, em contrapartida, nem todos estes fatores precisam estar presentes ao mesmo tempo para contribuir com a manifestação da doença. A influência biomecânica é explicada pela predileção de certas articulações e locais anatômicos bem definidos e consistentes. As articulações mais acometidas são: femoropatelar, metacarpofalangeana, metatarsofalangeana e tibiotársica (VAN WEEREN, 2006). Os locais anatômicos que a doença comumente se desenvolve são na porção crânio distal da crista intermédia da tíbia, na crista troclear lateral do talus, no maléolo

medial da tíbia, na tróclea lateral do fêmur e na crista sagital do III metacarpiano/metatarsiano (VAN WEEREN, 2006).

Já as articulações interfalangeanas proximal e distal e a escapuloumeral são pouco afetadas e são raras as lesões de OCD nas articulações do carpo, radioumeral, coxofemoral e vértebras cervicais (FOERNER, 2003).

O exercício está intimamente ligado às influências biomecânicas, devido ao acúmulo de carga. Os efeitos dos fatores vasculares são observados após o término da ossificação com o desaparecimento de canais de cartilagem, portanto a partir da cessação vascular, neste processo gera a incompatibilidade e evolui para a ossificação irregular somado aos defeitos (VAN WEEREN, 2006).

Quanto às influências nutricionais a pesquisa ainda não está totalmente comprovada, mas é voltada principalmente ao consumo de energia e oferta mineral. O desenvolvimento de OC é observado em animais de grande porte com crescimento rápido e é fortemente relacionado com o consumo energético. Este mecanismo é fundamentado pelo efeito de alimentos que contenham carboidratos facilmente digestíveis. A insulina e os fatores de crescimento possuem efeitos diretos na ossificação endocondral. Estes fatores, de certa forma são influenciados pela genética, pois a taxa de crescimento é determinada pela nutrição, genética e resposta hormonal. A conformação também é marcada fortemente pela herdabilidade genética que consequentemente afeta a biomecânica (JEFFCOTT, 1996; VAN WEEREN; BARNEVELD, 1999; VAN WEEREN, 2006; LEPEULE et al., 2009).

A patogênese da OC é relacionada à qualidade do colágeno, da cartilagem, do osso subcondral e da junção osteocondral (DENOIX et al., 2013). A junção osteocondral nos animais em crescimento é constituída por zonas de reabsorção hipertróficas e áreas de ossificação imatura, logo, esta articulação é considerada frágil nos animais jovens. Junto à hipertrofia, verifica-se morte de condrócitos, reduzindo a capacidade mecânica da matriz intercelular. Diferenças na orientação das fibras de colágeno as tornam favoráveis a traumas, bem como em processos de modificação da ossificação endocondral que conduz ao seu espessamento resultando em lesões subcondrais, fraturas, cistos e fragmentos (DISTL, 2013).

A vascularização da cartilagem ossificante jovem é especialmente vulnerável frente ao processo de ossificação e envolve uma mudança de seus vasos sanguíneos a partir de arteríolas no pericôndrio para arteríolas que cruzam a frente de ossificação. Tem sido mostrado, que muitas lesões desenvolvem-se durante o processo desta transição. Como consequência, qualquer forma de carga excessiva da superfície articular pode acarretar em lesões entre a cartilagem e zonas de remodelação de ossificação (DISTL, 2013).

Além da perda econômica diretamente ligada à manifestação da doença, há ainda um custo maior, uma vez que muitos livros genealógicos não aprovam cavalos com certo grau (maior ou menor, dependendo da política do livro genealógico) de OC. Além da perda financeira direta para os criadores, elimina também uma grande parte do *pool* genético (VAN WEEREN, 2006), desta forma o impacto econômico devido à perda no valor de animais que apresentam evidências radiográficas de OC, independentemente das suas capacidades atléticas são capazes de grandes prejuízos. Por conseguinte, a incidência clínica de OC é associada a uma perda econômica global (DENOIX et al., 2013; DISTL, 2013).

2.3 OSTEOARTRITE (OA)

A OA é a doença musculoesquelética mais comum em seres humanos, assim como é a doença articular mais debilitante nos equinos. Aproximadamente 60% dos casos de claudicação são relacionados com a incidência de OA, conseqüentemente causa queda no nível atlético do cavalo tornando-o incapaz de competir nos torneios esportivos (GOODRICH; NIXON, 2006; MCILWRAITH, 2010; LEE et al., 2013). Assim como na OC, a alta prevalência de OA contribui com uma perda econômica significativa na indústria de cavalos atletas (MCILWRAITH, 2005).

A OA é uma enfermidade complexa, originada por fatores genéticos, metabólicos, bioquímicos e biomecânicos, seguida de exacerbada resposta inflamatória, que compromete estruturas articulares, como erosão da cartilagem, lesão da cápsula articular (LEE et al., 2013), esclerose de osso subcondral, formação de osteófitos marginais, fibroses dos tecidos periarticulares e inflamação da membrana sinovial (HASEEB; HAQQI, 2013). Estas alterações contribuem para destruição progressiva da cartilagem hialina, associada ao aumento dos níveis de citocinas e secreção de enzimas proteolíticas, provocando muita dor e incapacidade funcional (HUI et al., 2013; BEEKUIZEN, 2014).

A OA é um processo que ocorre num tecido desprovido de inervação sensorial, sendo assim a claudicação é tipicamente atribuída ao envolvimento de tecidos moles periarticulares e ao osso subcondral que é o primeiro tecido ricamente innervado. Pode ocorrer em qualquer articulação, mas notavelmente é observada em articulações que suportam maior carga (CARON, 2003).

A compreensão da biologia e patogenia permite ao clínico, melhor conduta terapêutica, bem como recomendações preventivas, a fim de minimizar o prejuízo econômico e proporcionar bem estar ao paciente (CARON, 2003).

2.3.1 Etiopatogenia da OA

Inicialmente, as lesões podem ser causadas após trauma, sobrecarga ou casos de cargas repetitivas (MCILWRAITH, 2005; ZHU et al., 2013). Interações de vários mecanismos biológicos e mecânicos contribuem para o desenvolvimento da OA. A primeira hipótese baseia-se fundamentalmente em uma cartilagem deficiente com propriedades biomecânicas anormais. A segunda hipótese retrata alteração no osso subcondral, em decorrência de uma cartilagem de espessura delgada, sendo deficiente ao absorver impacto, desta forma, somente os tecidos moles peri-articulares, músculos, osso subcondral e osso trabecular atenuam o impacto. A terceira hipótese é considerada de maior aceitação científica e fundamenta-se na atuação de forças mecânicas promovendo danos à cartilagem articular saudável. A lesão celular, resultante destas forças, inicia alterações metabólicas nos condrócitos, levando a liberação de enzimas proteolíticas que causam fibrilação da cartilagem e degradação de proteoglicanos (CARON, 2003).

A cartilagem é considerada resistente à força de cisalhamento, mas é susceptível a impactos e traumas repetitivos. Provavelmente a causa mais comum de OA em equinos, está associada aos microtraumas, sobretudo é dependente do esporte em que participam (CARON, 2003).

2.3.2 Patogenia da OA

A homeostasia da cartilagem compreende um equilíbrio dinâmico entre força mecânica e mediadores químicos. Ao longo dos anos, a OA foi considerada uma enfermidade de característica não inflamatória, essencialmente pela ausência de neutrófilos no LS, entretanto visto que os condrócitos e células sinoviais podem sintetizar uma variedade de mediadores inflamatórios, que por sua vez, aumentam os níveis de metaloproteinases

degradadoras de matriz (MMPs), trouxe à tona uma característica de origem inflamatória da qual exerce importante papel na evolução da OA (SOKOLOVE; LEPUS, 2013).

O principal evento ocorrido na cartilagem durante a OA é um desequilíbrio bioquímico entre anabolismo e catabolismo, impulsionado por uma cascata de mediadores inflamatórios, sintetizados pelos condrócitos e células sinoviais, dos quais as principais citocinas inflamatórias responsáveis são a interleucina-1-beta (IL-1- β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Elas ativam o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), que consequentemente induz a produção de IL-1 β , TNF- α , prostaglandina E₂ (PGE₂), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), óxido nítrico (NO) e enzimas proteolíticas da MEC, as MMPs. Este desequilíbrio promove a perda da integridade da MEC, além de inibição da síntese de colágeno e agregam (GOODRICH; NIXON, 2006; KRASNOKUTSKY et al., 2008; GOLDRING; GOLDRING, 2010; MCILWRAITH, 2010; HUI et al., 2013; DEMOOR et al., 2014).

O primeiro alvo no processo osteoartrítico é a cartilagem articular, devido a falta de suprimento sanguíneo. Características críticas envolvem perda cartilágnea associada a lesões, comprometendo também a cápsula articular e osso subcondral (MORTELLARO, 2003; LEE et al., 2013). Alterações morfológicas resultam em degeneração condral (MCILWRAITH, 2010), dentre elas as macroscópicas, ou seja, fibrilação da superfície, erosão, desgaste, produção de fibrocartilagem (GOLDRING; GOLDRING, 2010) e congestão da membrana sinovial (GOODRICH; NIXON, 2006; MCLLWRAITH; TROTTER, 1996; MCILWAITH, 2005). Histologicamente, as modificações são representadas por fibrilação superficial, que pode evoluir para formação de fendas verticais até o osso subcondral (MCILWAITH, 2005) e hiperplasia da membrana sinovial associada ao aumento de células de revestimento, sinoviócitos hipertróficos e infiltração de células inflamatórias, sendo as últimas geralmente macrófagos (HAN et al., 2014).

A patogênese da degeneração condral pode ser explicada pela atividade metabólica de condrócitos. Sua função fisiológica é manter equilíbrio na síntese e degradação da matriz, através da secreção de macromoléculas, colágeno, AH, GAGs e modulação na concentração de citocinas, radicais livres, proteases e prostaglandinas que são prejudiciais ao tecido. Logo, os condrócitos são responsáveis por controlar síntese anabólica e atividades catabólicas necessários ao *turnover* da matriz, contribuindo na regulação destas moléculas degradativas (MAUMUS et al., 2013).

Os condrócitos, por sua vez, sofrem alterações patológicas nos padrões de expressão gênica com excessiva produção de mediadores destrutivos e citocinas pró-inflamatórias,

resultando em aumento de catabolismo e lise progressiva da cartilagem articular. Assim, desencadeia-se a perpetuação inflamatória, o que pode contribuir significativamente para aumento da degradação da matriz, apoptose e senescência celular (MORTELLARO, 2003; KRASNOKUTSKY et al., 2008; ORTH et al., 2014).

Alterações macroscópicas do osso subcondral, incluem reações osteogênicas, aumento da rigidez e densidade (eburnação e esclerose subcondral), principalmente em áreas de suporte de cargas. Geralmente as saliências aparecem na periferia intra-articular, mas também podem exibir ao longo das inserções da cápsula articular. Alterações ósseas incluem erosão, microfratura e desenvolvimento de cistos subcondrais (MORTELLARO, 2003).

Em condições fisiológicas há equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, sendo o ciclo de remodelação iniciado a partir da ativação de superfícies ósseas quiescentes e associada à reabsorção óssea pelos osteoclastos. Na OA ocorrem alterações ósseas periarticulares, aumento da espessura da placa subcondral e modificação na arquitetura do osso trabecular, formando osteófitos e desenvolvimento de cistos subcondrais. Todos estes eventos são ocasionados por inadequada função dos osteoclastos (GOLDRING; GOLDRING, 2010; BEEKUIZEN, 2014).

2.4 DIAGNÓSTICO POR IMAGEM

O exame radiográfico ainda é a técnica de imagem, de maior utilização para o diagnóstico de doença osteocondral, porém este método é pouco sensível, pois a cartilagem saudável propriamente dita, não é observada radiograficamente, exceto em condições de alteração estrutural, perda extensa da cartilagem e diminuição do espaço articular (DENOIX, 1996; MCILWRAITH, 2010).

Na radiografia, os tecidos moles periarticulares e estrutura articular possuem a mesma densidade, juntos demonstram a mesma silhueta, sendo assim, é difícil a precisa diferenciação entre os tecidos (DENOIX, 1996; MCILWRAITH, 2010). A radiografia foi a modalidade de imagem pioneira utilizada para avaliar estruturas ósseas, porém a sobreposição destas estruturas e a pouca distinção dos tecidos moles é uma grande desvantagem (VANDERPERREN; SAUNDERS, 2009).

Já o exame ultrassonográfico complementa as informações obtidas por radiografias, elucida informações sobre estruturas dos tecidos moles da articulação, de forma não invasiva,

permitindo avaliação de doenças articulares. É mais sensível do que a radiografia para detectar precocemente mudanças associadas com doenças degenerativas, remodelação periarticular e osteófitos (DENOIX, 1996; REEF et al., 2004). Pode ser usado para avaliação de cápsula articular, MS e LS (comumente sua imagem é anecóica) (VANDERPERREN; SAUNDERS, 2009). A ultrassonografia articular deve ser realizada com transdutor linear com frequência de 7.5 MHz e para as estruturas mais superficiais devem ser avaliadas com frequência de 10 MHz (DENOIX, 1996; REEF et al., 2004; KEEN; CONAGHAN, 2009).

A cartilagem é visualizada como uma linha estreita hipoecóica por cima de uma superfície óssea lisa. É possível realizar a mensuração de sua espessura. As superfícies ósseas são naturalmente curvas, sendo assim, para realizar o exame e avaliar a articulação se faz necessário flexionar o membro, pois será maior a exposição articular (WRIGLEY, 2006). Normalmente a cápsula articular e o LS não são observados com facilidade por ultrassonografia, porém, quando a articulação apresenta efusão excessiva, a cápsula é vista deslocada da superfície. A MS é menos ecogênica e difícil de ser diferenciada, mas quando em processo inflamatório, torna-se espessa e hiperecóica. Ligamentos e ossos próximos à inserção articular, na epífise, pode revelar irregularidade quando lesionados (WRIGLEY, 2006). O espessamento da cápsula articular é frequentemente constatado em cavalos com lesão articular com aparência mais hipoecóica do que quando em condições normais, mas também pode aparecer mais anecóica devido à fibrose. Os defeitos na cartilagem podem ser analisados a partir de áreas apresentando irregularidades da superfície (REEF et al., 2004).

A profundidade da cartilagem articular é delimitada pelo osso subcondral por uma imagem hiperecogênica. No cavalo adulto, a superfície do osso subcondral forma uma linha hiperecogênica lisa e regular e se torna ecogênica em casos de reduzida mineralização de matriz, assim como em situações de falhas focais de ossificação, podendo apresentar superfície irregular. Imagens ecogênicas radioluscentes, podem indicar lesões condrais com comprometimento articular, característico de OC (DENOIX, 1996).

O uso combinado de diferentes técnicas de imagens permite uma melhor análise diagnóstica, considerando as vantagens e limitações de cada um. Os exames de radiografia e ultrassonografia apresentam vantagens complementares e devem ser utilizados em conjunto na maioria das situações clínicas (DENOIX; AUDIGIÉ, 2004).

2.5 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) são definidas a partir de três principais propriedades fisiológicas, como: autorrenovação, explicada como a capacidade de uma única célula gerar uma célula filha, com as mesmas habilidades da célula-mãe; diferenciação em outras linhagens; e potencial para reconstituir funcionalmente tecidos *in vivo* (VERFAILLIE, 2002).

As CT são classificadas de acordo com sua origem, potencial de diferenciação e atualmente com base em alguns anticorpos de superfície celular. Teoricamente, seu potencial de diferenciação se refere à habilidade e ao número de diferentes tecidos, em que podem produzir (KOCH; BERG; BETTS, 2008). Assim, são classificadas em totipotentes, pluripotentes, e multipotentes. Células multipotentes originam quatro ou mais linhagens celulares, mas possuem potencial limitado. São pluripotentes quando são capazes de originar células dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma). A capacidade de uma única célula gerar um organismo inteiro é dita biologicamente como totipotente, propriedade que somente o zigoto possui (TAYLOR; SMITH; CLEGG, 2007; KOCH; BERG; BETTS, 2008). Esta célula pode se diferenciar em qualquer célula do corpo, além de se desenvolver em qualquer célula embrionária ou extra-embrionária (NÖTH et al., 2010; HONGBAO; MA, 2014).

Células unipotentes, são definidas como células adultas, responsáveis pela renovação contínua dentro de sua especificidade. Elas são fundamentais para conservação da integridade do tecido durante renovação tecidual fisiológica, (VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002) e existem em vários órgãos, por exemplo, na pele, fígado e intestino (KOCH; BERG; BETTS, 2008). Porém, células unipotentes são definidas como células progenitoras e não devem ser classificadas como CT (SCHWINDT; BARNABÉ, 2005), pois por mais que elas mantenham capacidade proliferativa e de diferenciação, não possuem potencial de autorrenovação.

No que concerne à sua origem, são categorizadas em células-tronco embrionárias (derivadas comumente do blastocisto), células-tronco fetais e células-tronco adultas. Novamente, outra distribuição ocorre quando se trata de células-tronco adultas, divididas em células de origem hematopoiética e células de origem mesenquimal (KOCH; BERG; BETTS, 2008).

Células-tronco embrionárias representam uma fonte potencial para tratamento regenerativo de diversas doenças, representada por sua vantagem de capacidade ilimitada de

autorrenovação, desde que em condições adequadas de cultura e devidamente caracterizadas pela sua habilidade de pluripotência (STEWART, 2011). Entretanto, existem grandes desvantagens, como necessidade de aplicação de células alogênicas, que as tornam fonte susceptível de rejeição imunológica do paciente, a quantidade de células viáveis e predisposição para formação de teratomas. Quando a terapêutica em humanos envolve células-tronco embrionárias, traz à tona muita polêmica do ponto de vista ético, político e religioso, consequentemente, representam um grande desafio e limitação de aplicabilidade clínica (NÖTH et al., 2010; ORTH et al., 2014).

A medula óssea é considerada como a maior fonte de células-tronco hematopoiéticas que renovam a linhagem celular sanguínea e as células do sistema imunológico (STENDERUP et al., 2003; REZZA; SENNETT; RENDL, 2014). Ela é responsável pela produção de eritrócitos, plaquetas, granulócitos, monócitos e pequeno número de linfócitos. As células-tronco hematopoiéticas residem na medula óssea após o nascimento e estão presentes no sangue do cordão umbilical, placentário, e também no sangue periférico, a partir dos quais são isoladas (HUSS et al., 2000). Historicamente foram as primeiras células a serem caracterizadas e utilizadas para tratamento em humanos de uma infinidade de doenças, como exemplo, imunodeficiência congênita, leucemia e linfoma (HO; PUNZEL, 2003). Quanto à característica fenotípica, expressam marcadores de superfície CD34 (HUSS et al., 2000), CD14 e CD45 (KOCH; BERG; BETTS, 2008).

Outra população de células cada vez mais estudadas são as de origem mesenquimal. Estas células são multipotentes e encontradas em inúmeras fontes de tecido adulto (SAKAGUCHI et al., 2005; WHITWORTH; BANKS, 2014). Células-tronco mesenquimais (CTM) foram devidamente caracterizadas em humanos, a partir de fontes como medula óssea (PITTENGER et al., 1999), tecido adiposo, líquido amniótico, cordão umbilical, tecido muscular, polpa dentária, líquido e membrana sinovial (JORGENSEN, 2013; ANDO et al., 2014; CHIANG et al., 2014; DEMOOR et al., 2014), demonstrando capacidade de proliferação e diferenciação celular (PITTENGER et al., 1999; ROZEMULLER et al., 2010). Investigações nessa área devem determinar se CTMs isoladas de diferentes tecidos e localização anatômica, apresentam atividade biológica vantajosa à aplicação clínica (STEWART, 2011).

2.5.1 Células-tronco mesenquimais

Na década de 1970 Friedenstein e colaboradores descreveram pela primeira vez populações de células que, inicialmente, foram nomeadas unidades formadoras de colônia fibroblastóide (CFU-F, *colony forming uni fibroblastic*), cuja morfologia apresentava grande semelhança com os fibroblastos, além de possuírem capacidade de adesão à superfície plástica (PROCKOP, 1997; BROOKE et al., 2007). Tal estudo foi essencial para novas investigações na área, as quais elucidaram a multipotência destas células, ou seja, a característica para diferenciação em tecidos oriundos do mesoderma embrionário, como exemplo, osso, cartilagem e tecido adiposo (PROCKOP, 1997).

A medula óssea foi a primeira fonte estudada na Medicina para isolamento de CTMs, posteriormente, outros tecidos demonstraram a presença de tais células, como no tecido musculoesquelético, derme (YOUNG et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2005; HERMIDA-GÓMEZ et al., 2011; STEWART; STEWART, 2011; SOUSA et al., 2014), líquido sinovial (JONES et al., 2008; MORITO et al., 2008; JONES, 2011; KRAWETZ et al., 2012; LEE et al., 2012a; SEKIYA et al., 2012; MURATA et al., 2014), cordão umbilical (SHI et al., 2015), sangue do cordão umbilical (YANG et al., 2014), ligamento periodontal (IWASAKI et al., 2013) e cartilagem articular (SALAMON et al., 2013).

Em equinos as CTMs foram obtidas a partir da medula óssea, tecido adiposo (DE MATTOS CARVALHO et al., 2009), cordão umbilical (TOUPADAKIS et al., 2010; RANERA et al., 2011; CARRADE HOLT et al., 2012; BARBERINI et al., 2014), sangue do cordão umbilical (KOCH et al., 2007; MOHANTY et al., 2014), membrana amniótica (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013), sangue periférico (KOERNER et al., 2006) e recentemente encontrado no líquido sinovial (MURATA et al., 2014). Vantagens em relação a quantidade de células obtidas, a capacidade e eficiência para diferenciação, a facilidade no procedimento durante a coleta, bem como uma possível morbidade associada ao momento da coleta, são questões importantes a considerar para estabelecer uma fonte benéfica do tecido de origem de CTMs (FRISBIE; SMITH, 2010; TOUPADAKIS et al., 2010).

A vida útil de CTMs em cultura é dependente de sua idade e pode ser dividida em três fases: crescimento rápido quando completa aproximadamente 50% do tempo de vida e são consideradas células jovens, seguida por uma fase de redução da taxa de crescimento, na qual

50 a 80% das células concluíram a proliferação, e a última fase, ausente de expansão celular, o que indica senescência, envolvendo perda de proliferação, assim como diminuição da multipotencialidade (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005). A senescência celular envolve fenótipo complexo, com mudanças na função e capacidade de multiplicação (SETHE; SCUTT; STOLZING, 2006).

Em cultura a característica morfológica de CTMs é apresentada com crescimento em monocamada (PITTENGER et al., 1999), aderência ao plástico, aparência fibroblastóide ou fusiforme e células alongadas (KOCH et al., 2007; LOVATI et al., 2011), com núcleo eucromático, oval grande e central, nucléolo proeminente, associado a um abundante citoplasma, observado à microscopia. Maiores detalhes são detectados com microscopia eletrônica, exibindo organelas bem desenvolvidas incluindo, mitocôndrias, complexo de Golgi, lisossomos, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, grande quantidade de ribossomos livres no citoplasma e retículo endoplasmático rugoso dilatado, além de filamentos de actina organizados em suas extremidades (TAGAMI et al., 2003). Ao longo do cultivo, ocorrem mudanças na morfologia celular, de células alongadas, torna-se achatadas e largas, com proliferação lenta, característica a qual frequentemente é associada à senescência (SETHE; SCUTT; STOLZING, 2006).

Células mantidas em cultura com baixa densidade, isto é, aproximadamente 1,5 células/cm² são capazes de originar colônias, sendo que, cada colônia é derivada da proliferação de uma única célula. Durante cultura celular, exibem pelo menos três fases de crescimento: fase *lag*, com duração de três a quatro dias após o plaqueamento, com crescimento lento, fase logarítmica de crescimento rápido, com pelo menos duas mitoses em vinte e quatro horas, ou seja, são necessárias doze horas para a duplicação celular, seguida de uma fase estacionária, que sinaliza quando a célula atinge senilidade, devido à perda de capacidade proliferativa (COLTER et al., 2000). Recentemente, estudos de CTMs de equinos, provenientes de medula óssea, tecido adiposo e de cordão umbilical, avaliaram a senescência celular a partir da taxa de proliferação, em torno de trinta, sessenta e oitenta duplicações da população respectivamente, o que pode ser afirmado que na medula ocorre senilidade mais rapidamente (TAYLOR; CLEGG, 2011).

Dentre as propriedades de CTMs a sua natureza imunomoduladora chama atenção de pesquisadores, pois são capazes de suprimir *in vitro*, a ativação e proliferação de linfócitos. Por meio de contato direto das CTMs com o tecido ou através de interação parácrina com interferon gama (INF- γ) produzidos por células do sistema imunológico, as CTMs desencadeiam a liberação de fatores solúveis que inibem a atividade de linfócitos e de células

dendríticas apresentadoras de antígenos (NAUTA; FIBBE, 2008). Os principais fatores incluem a PGE₂, IL-4, IL-6, IL-10, o fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e o fator de crescimento hepatoide (HGF) (AGGARWAL; PITTENGER, 2004), que por sua vez modificam as funções de células T reativas, são envolvidos na supressão de células *Natural Killer* (NK) (CHEN et al., 2008) e também da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Estes fatores inibem a proliferação dos linfócitos T, B e NK (BOUFFI et al., 2010; VAN LENT; VAN DEN BERG, 2013).

A PGE₂ representa outra molécula produzida por CTMs capaz de inibir a produção de TNF-α, de INF-γ e de MMPs (JORGENSEN, 2013), e de estimular a produção de IL-10 (PERONI; BORJESSON, 2011; CARRADE HOLT et al., 2012). Estes efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores são importantes no que se refere ao futuro uso terapêutico de células alogênicas, classificadas como grande promessa no tratamento de doenças, sem acarretar resposta imunológica no paciente (NAUTA; FIBBE, 2008).

Até o presente momento, os estudos com CTMs de equinos independente da fonte, expressam complexo de histocompatibilidade (MHC-I), mas não expressam MHC-II em sua superfície (GUEST; OUSEY; SMITH, 2008), semelhante ao que ocorre com CTMs humanas. Os mecanismos de modulação de células provindas de tecidos equinos ainda é o foco de muitos estudos, entretanto parece haver grande semelhança entre as espécies (PERONI; BORJESSON, 2011; CARRADE HOLT et al., 2012). A definição do imunofenótipo (mediadores liberados por CTMs que modulam o sistema imunológico) de equinos será importante ferramenta para adequar o uso de terapia celular na Medicina Equina (BOUFFI et al., 2010; CARRADE HOLT et al., 2012).

Para adequada caracterização das CTMs é necessário o uso de marcadores de superfície, que são moléculas bioativas presentes na superfície celular. Funcionam como receptores utilizados na identificação de tipos celulares particulares, incluindo CTMs. A singularidade biológica de cada célula é caracterizada através de “*cluster of differentiation*” (CD), termo referente aos marcadores que definem tipos celulares (MAIA et al., 2013). Esta nomenclatura é baseada na identificação de glicoproteínas de superfície celular presentes em leucócitos e estendidos para células endoteliais e do estroma (BORJESSON; PERONI, 2011). Contudo, as CTMs não apresentam marcador CD específico, portanto, é fundamental uma combinação de marcadores para caracterização de uma população mais homogênea (TAYLOR; CLEGG, 2011).

Em 2006 a Sociedade Internacional de terapia celular estabeleceu alguns critérios para identificar CTMs, com objetivo de definir sua identidade, dentre os quais destacam-se: a

aderência ao plástico quando mantidos em condições de cultura; a expressão de marcadores de superfície CD90 (conhecido como Thy-1), CD73 (ecto 5 nucleotidase) e CD105 (endoglina); a ausência de expressão de CD45 (marcador de leucócitos), CD34 (células hematopoiéticas), CD14 e CD11b (expressos em monócitos e macrófagos), CD79a ou CD19 (marcadores de células B) por citometria de fluxo. Estes critérios são recomendados para assegurar uma cultura de populações homogêneas e descartar a possibilidade de células de origem hematopoiética. Futuramente, novos marcadores de superfície poderão ser identificados, cursando para atualizações neste perfil. O outro critério inclui a diferenciação *in vitro* na linhagem mesodermal, basicamente em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (DOMINICI et al., 2006).

Estas exigências são referidas para células humanas, já em outras espécies, a caracterização é restrita a adesão celular, associada à diferenciação nas três linhagens (DOMINICI et al., 2006; ROZEMULLER et al., 2010). A identificação de marcadores de superfície é desafiadora, pela falta de marcadores específicos para diversas espécies, além de mudança na porcentagem de expressão após algumas passagens na cultura, dependentes da fase evolutiva em que são avaliadas (STEWART; STEWART, 2011). Nesse contexto a eficácia para caracterizar CTMs equinas é dificultada pela restrita disponibilidade de anticorpos e variabilidade nas reações cruzadas (ARNHOLD et al., 2007; BORJESSON; PERONI, 2011; PASCUCCI et al., 2011). A expressão dos marcadores pode ser diferente entre as espécies, sendo assim, definir um conjunto de marcadores (CD) que possam ser aplicados uniformemente para a identificação de células equinas, torna-se caráter obrigatório (BORJESSON; PERONI, 2011).

Até o momento, os anticorpos comerciais que reconhecem epítomos equinos, estão disponíveis apenas para CD13, CD44 e MHC-II. Fundamentado no conhecimento atual na área de investigação de CTMs de equinos, assim como em humanos, foi proposto critérios para identificação destas células, a partir de requisitos semelhantes, como adesão ao plástico, diferenciação celular e expressão de CD29, CD44 e CD90 (ARNHOLD et al., 2007), em conjunto da ausência de expressão de CD14, CD79 e MHC-II (GUEST; OUSEY; SMITH, 2008; BORJESSON; PERONI, 2011; CARVALHO et al., 2014). Outros marcadores poderiam ser incluídos, mas são necessárias novas pesquisas, através de rigorosa validação para demonstrar reação cruzada sem efeitos de dúvidas (BORJESSON; PERONI, 2011).

A diferenciação celular é um processo onde ocorrem mudanças no tamanho, morfologia, potencial de membrana e atividade metabólica das células, em resposta a modificações na expressão genética. A característica fundamental das CTMS é o potencial

que possuem para se diferenciarem em osso, adipócitos e condrócitos (TAYLOR; CLEGG, 2011).

Para induzir a diferenciação na linhagem osteogênica, o meio de diferenciação requer agentes indutores, como betaglicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino (DOMINICI et al., 2006; STEWART; STEWART, 2011). Esta linhagem pode ser detectada após três semanas, identificada pela coloração positiva de Alizarin Red que é específica para marcação de depósitos de cálcio (TAYLOR; CLEGG, 2011), ou coloração de Von Kossa para identificação de matriz mineralizada (DOMINICI et al., 2006) e pelo cloreto de tetrazólio nitroazul, que identifica a atividade de fosfatase alcalina. Outras técnicas para a confirmação da diferenciação osteogênica podem ser realizadas, pela expressão dos genes Runx2 (relacionado ao fator de transcrição 2), do colágeno tipo I, da osteopontina, da osteonectina, da osteocalcina, e da $\beta 1$ integrina (TAYLOR; CLEGG, 2011).

A diferenciação condrogênica requer cultura tridimensional, em forma de micromassa, cultivada dentro de tubos cônicos. O meio indutor é constituído de fator de crescimento transformador beta (TGF- β), proteína morfogênica óssea, ácido ascórbico, soro fetal bovino, insulina transferrina sódico (ITS) e dexametasona. A detecção de PGs é identificada histologicamente pela coloração positiva de azul de toluidina e alcian blue. A expressão gênica inclui análise de fator de transcrição SOX9, matriz de colágeno tipo II e agregam (STEWART; STEWART, 2011).

Quanto ao meio indutor utilizado para diferenciação adipogênica, este deve ser enriquecido com isobutilxantina, fosfodiesterase, pantotenato, biotina, insulina, dexametasona, soro fetal bovino, indometacina e rosiglitazona (GUEST; OUSEY; SMITH, 2008). Os agentes indutores para células de equinos são ligeiramente diferentes aos utilizados para diferenciação de CTMs humanas, devido à necessidade de adicionar soro de coelho ao meio de cultura das células equinas. O cultivo celular em monocamada é ativado pelo gene de receptores ativadores de proliferação de peroxissomos gama (PPAR- γ), desta forma, acumulam gotículas lipídicas no citoplasma, evidenciadas pela coloração positiva de Oil Red O. Outra forma de detecção adipogênica, envolve a expressão do gene PPAR- γ para identificação de proteínas adiponectina e $\beta 1$ integrina (TAYLOR; CLEGG, 2011).

A descrição de todas as habilidades de CTMs fornece um conhecimento sobre as células de valor inestimável, tanto para pesquisa, quanto para aplicação clínica, como no desenvolvimento da regeneração tecidual; e tem por finalidade a cura de lesões provocadas por doenças congênitas ou degenerativas. A terapia celular propõe especialmente, a substituição de células doentes ou incapazes por células saudáveis.

2.5.2 Células-tronco mesenquimais da membrana sinovial (MS-CTMs)

Crescentes evidências sustentam a hipótese de que CTMs estão disponíveis no tecido adulto em diferentes órgãos e tecidos, com participação na homeostase a partir da constante renovação tecidual, repovoando o tecido após processo de apoptose de células diferenciadas em decorrência do *turnover* tecidual (CHEN, 2008).

Em meados de 2001, foi identificada pela primeira vez uma população celular presente na MS de humanos definida como pertencentes ao grupo de CTMs (DE BARI et al., 2001). Esta identificação baseou-se no perfil fenotípico, potencial de diferenciação, características ultraestruturais e morfológicas destas células, as quais foram isoladas e caracterizadas, correspondendo às características de populações de fontes de CTMs já conhecidas como na medula óssea (MCGONAGLE; JONES, 2008; ARUFE et al., 2009). Foram capazes de expansão por mais de dez passagens com atividade semelhante de proliferação e senescência limitada (DE BARI et al., 2001), mesmo em células após criopreservação (ARUFE et al., 2009).

Para a extração de CTMs de membrana sinovial (MS-CTM) a colheita é realizada durante artroscopia (DE BARI et al., 2001; HERMIDA-GÓMEZ et al., 2011; LEE et al., 2012a, b; SANTHAGUNAM et al., 2014), em seguida, o tecido é acondicionado em tubos contendo PBS e encaminhado para o laboratório, onde o tecido é triturado mecanicamente com instrumentos cirúrgicos, seguido de digestão com colagenase (BORJESSON; PERONI, 2011; ANDO et al., 2014). Para recolher a fração celular de interesse e mantê-las em cultura, geralmente é utilizado o meio *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), suplementado com soro fetal bovino (SFB), antibiótico e antifúngico (DE BARI et al., 2001; ARUFE et al., 2009; ICHINOSE et al., 2010; HERMIDA-GÓMEZ et al., 2011; SANTHAGUNAM et al., 2014).

O cultivo realizado é baseado na habilidade destas células em aderirem ao plástico e formarem colônias. O procedimento de colheita é minimamente invasivo, principalmente ao comparar com coletas de outros tecidos, como na medula óssea e tecido adiposo.

A caracterização fenotípica das MS-CTMs apresenta expressão positiva para os marcadores de superfície CD90, CD44, CD105 (HARNOVÁ et al., 2011), CD147 e ausência ou baixa expressão de marcadores hematopoiéticos, dentre os quais, CD45 (HARNOVÁ et al., 2011), CD34, CD117 e CD31 (DE BARI et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2005).

MS-CTMs apresentam maior potencial condrogênico e de proliferação *in vitro* do que as CTMs de medula óssea, periósteo, músculo esquelético e tecido adiposo (SAKAGUCHI et al., 2005; MOCHIZUKI et al., 2006; SHIRASAWA et al., 2006; YOSHIMURA et al., 2007; KOGA et al., 2008), pois os *pellets* formados a partir da população de MS são maiores e depositam matriz de cartilagem, indicando superioridade condrogênica. Todavia, seu potencial condrogênico parece não diferir entre MS coletadas de articulações híginas e com OA (ARUFE et al., 2009; HARNOVÁ et al., 2011).

A comparação entre CTMs proveniente de diferentes tecidos divergem em termos de função, principalmente no que se refere à capacidade de diferenciação condrogênica, embora a comparação entre as fontes envolva padronização *in vitro* de diferentes características para estabelecer verdadeira definição e ainda não é fundamentado *in vivo* (SAKAGUCHI et al., 2005; SHIRASAWA et al., 2006; KRAWETZ et al., 2012).

Contudo, a exigência de biópsias de uma área saudável bem como a necessidade de intervenção cirúrgica antes do transplante de células são desvantagens evidentes desta terapia, quando comparadas com células cultivadas de LS (BOEUF; RICHTER, 2010).

2.5.3 Células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (LS-CTMs)

Apenas uma década se passou desde a descoberta original de CTMs provenientes de tecido sinovial e esta fonte já se tornou principal candidata para terapia regenerativa (JONES et al., 2004; JONES et al., 2008).

CTMs podem ser isoladas do líquido sinovial (LS-CTMs), porém o rendimento da fração celular é baixo, pois a contagem de células nucleadas é geralmente inferior a 1000 células/ml (CHEN et al., 2006). Embora raras, a população de LS-CTMs, são capazes de considerável expansão proliferativa (normalmente um milhão de células durante o cultivo primário) e considerável potencial de diferenciação, que provavelmente seja suficiente para a reparação de pequenas lesões na cartilagem, mesmo considerando sua baixa celularidade inicial (JONES et al., 2008).

LS-CMTs foram isolados e analisados a partir de humanos, ratos (YOSHIMURA et al., 2007), coelhos (KOGA et al., 2007; LEE et al., 2012b), suínos (ANDO et al., 2014), bovinos (SHINTANI; HUNZIKER, 2007) e também equinos (CHEN et al., 2006). Há especulações quanto sua origem, presumidamente LS-CTMs residem nas camadas da própria

membrana sinovial, pois são definidas da mesma forma e comparáveis com as células de MS, em relação a morfologia, tamanho da colônia e expressão gênica, portanto, devido às semelhanças, a presença desta população no LS possivelmente seja procedente da própria sinóvia ou do interior da cartilagem (MORITO et al., 2008).

LS-CTMs podem ser coletadas com métodos minimamente invasivos através de artrocentese e requer menos processamento do que a MS, desta forma, reduz o risco de contaminação celular quando em cultura (MORITO et al., 2008; MURATA et al., 2014). Outro método para a colheita é realizado durante cirurgia artroscópica de pacientes com doença articular. Para a cultura o LS pode ser transferido diretamente para garrafas de cultivo (CHEN et al., 2006), ou pode ser diluído em PBS, filtrado com nylon 70 mm para remover *debris*, seguido de centrifugação a 160 g durante cinco minutos a temperatura ambiente. O botão celular é então ressuspensionado e semeado num frasco de cultura de 25 cm² em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina (100U/ml), estreptomicina (100ug) e anfotericina (0,25 mg/ml). Após, aproximadamente nove dias as células são visualizadas microscopicamente aderidas ao plástico (CHEN et al., 2006; MORITO et al., 2008; MATSUKURA et al., 2014; MURATA et al., 2014).

Até o momento, os marcadores estudados que apresentam expressão positiva para esta fonte celular foram CD73, CD90, CD105, CD166, CD40 e MHC-I (BOEUF; RICHTER, 2010; KRAWETZ et al., 2012; MURATA et al., 2014); e os marcadores de superfície ausentes ou com baixa expressão foram CD11a, CD11b, CD34, CD 45, CD271 (BOEUF; RICHTER, 2010; KRAWETZ et al., 2012), CD14 e MHC-II (MORITO et al., 2008; LEE et al., 2012b; MURATA et al., 2014).

O crescimento de LS-CTMs é ainda controverso entre os autores, pois apresenta expansão celular tanto de crescimento rápido quanto lento (LI et al., 2014), sem qualquer correlação com seu potencial de multipotencialidade (JONES et al., 2008). As CTMs derivadas de LS e MS são atualmente muito atraentes por se tratar de um tecido contendo células específicas para condrogênese. Devido à facilidade e menor manipulação, as células derivadas de LS podem ser fonte ideal para aplicações na prática clínica (ANDO et al., 2014; MURATA et al., 2014), entretanto, os desafios permanecem no tempo de cultura prolongado pra obter um número de células suficiente (LI et al., 2014).

2.6 APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE CTMs NA MEDICINA EQUINA

As CTMs são comumente utilizadas em Medicina Veterinária para aplicações terapêuticas nas doenças de origem musculoesqueléticas, essencialmente na clínica de equinos (CLEGG; PINCHBECK, 2011; FORTIER; TRAVIS, 2011; CARRADE HOLT et al., 2012). O objetivo das terapias regenerativas é restaurar a arquitetura estrutural normal e a função biomecânica de um tecido lesionado (FORTIER; SMITH, 2008; LOPEZ; JARAZO, 2015), favorecendo uma melhor condição de regeneração, controle de inflamação (LACITIGNOLA et al., 2008), além de restaurar a função, principalmente quando possuem capacidade limitada de cicatrização, tais como tendão, ligamentos, meniscos e cartilagem (LACITIGNOLA et al., 2008; GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011). A principal hipótese é baseada em uma resposta celular de diferenciação espontânea na qual repovoam o tecido e fornecem fatores de crescimento para estimular células residentes na reestruturação tecidual após aplicação intralesional (MARFE et al., 2012; BURK et al., 2013).

Atualmente as CTMs derivadas de medula óssea e de tecido adiposo são as mais utilizadas nas abordagens terapêuticas. Elas são facilmente coletadas em cavalos e mantidas em cultura para isolamento e expansão (VIDAL et al., 2008).

CTMs derivadas de medula óssea e tecido adiposo, comercializadas na América do Norte e disponíveis para a compra (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011; SCHNABEL et al., 2013) são utilizadas clinicamente no tratamento de diversas lesões, demonstrando resultados encorajadores (BRETON et al., 2012). Elas são aplicadas por diversas vias, como intra-articular, intralesional e intravenosa (CARRADE et al., 2011). Mesmo que já comercializadas, a terapia é ainda tipicamente realizada com células autólogas, isto é, do próprio paciente. Esta conduta é uma desvantagem para o tratamento de pacientes com lesão aguda, uma vez que a expansão do cultivo primário demora pelo menos vinte dias para obter quantidade razoável de células (CARRADE et al., 2011).

O uso de CTMs derivado da medula óssea é apoiado por estudos experimentais em animais de laboratório com a implantação de células em lesões cirúrgicas e têm mostrado efeitos favoráveis na composição e organização do tecido. Existem três formas para tratamento: na primeira a aplicação imediata de células heterogêneas é realizada a partir do aspirado da medula óssea, na segunda, é utilizado a fração mononuclear centrifugada logo após aspiração da medula óssea, e a terceira depende de uma população de células cultivadas.

A técnica de punção é feita em animais contidos no tronco após sedação, tricotomia do esterno e identificação da quinta esternébra guiada por ultrassonografia (LIZ et al., 2009).

A técnica de punção de CTMs provenientes de tecido adiposo é realizada após sedação, tricotomia, assepsia e bloqueio anestésico no músculo glúteo dorsal na base da cauda. As células obtidas também podem ser utilizadas na forma cultivada ou não cultivada, isto é, quando o tratamento é feito com a fração mononuclear e com a fração vascular estromal logo após a aspiração (MAIA et al., 2013).

Dentre as enfermidades musculoesqueléticas de equinos em que se faz o uso de aplicação de CTMs, destaca-se a tendinite, por ser uma importante causa de claudicação e queda de desempenho no equino atleta. A problemática é voltada para sua alta incidência, prolongado período de recuperação, bem como alta taxa de recorrência. O tendão possui uma difícil reparação tecidual, pois é um tecido minimamente vascularizado e apresenta células que exibem diminuição da taxa mitótica, apesar de apresentar células progenitoras (GUERCIO et al., 2015).

Segundo Smith et al. (2003) as CTMs apresentam capacidade de diferenciação em tenócitos, com regeneração de fibras tendíneas após lesão. O tratamento é seguro, viável (LACITIGNOLA et al., 2008; DE MATTOS CARVALHO et al., 2011) e reduz a taxa de reincidência em lesões de tendão flexor digital superficial (TFDS), principalmente em cavalos de corrida, evidenciada por um longo prazo após implante em tendinopatias (SMITH et al., 2003; GODWIN et al., 2012).

Renzi et al. (2013) utilizaram CTMs derivadas de medula óssea de equinos para avaliar o tratamento de 19 cavalos com tendinite e desmíte. Demonstraram que 68% do grupo tratado com CTMs voltaram à atividade atlética, e confirmaram a capacidade das CTMs na recuperação funcional do membro acometido após lesões traumáticas.

O tratamento com o uso de CTMs derivadas de tecido adiposo foi avaliado em oito cavalos com tendinite do TFDS induzida por collagenase. Houve melhora significativa da lesão na avaliação histopatológica e imunohistoquímica, demonstrada pela capacidade de reorganização das fibras tendíneas, diminuição do infiltrado inflamatório e promoção do aumento da expressão de colágeno I, com boa evolução na cicatrização qualitativa da matriz extracelular do tendão (DE MATTOS CARVALHO et al., 2009).

Um estudo com nove cavalos obteve sucesso após aplicação de CTMs derivadas de tecido adiposo, associado ao uso de plasma rico em plaquetas (PRP). Após 120 dias transcorridos à aplicação, a avaliação ultrassonográfica demonstrou alinhamento completo das fibras. Entre sete a nove meses após a aplicação, sete cavalos retornaram à atividade

competitiva normalmente, um não fez a reabilitação como recomendado e outro retornou ao esporte, porém após o período de um ano, retornou com lesão em outro segmento do tendão (GUERCIO et al., 2015).

O tratamento de tendinite do TFDS induzida por colagenase também foi avaliado no estudo de Lacitignola et al. (2008). Três semanas após a indução, realizaram aplicação intralesional de células mononucleares, ou CTMs da medula óssea nos grupos tratados e solução fisiológica no grupo controle. Tanto as células mononucleares quanto as CTMs proporcionaram regeneração qualitativa da matriz extracelular do tendão em relação à orientação das fibras e de colágeno do tipo I/III e expressão da proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP).

O tratamento com CTMs também já foi relatado em aplicações para a reparação de palato de um cavalo adulto após sinfisiotomia mandibular (CARSTANJEN et al., 2006), na pele (SPAAS et al., 2013) e na córnea (MORIYAMA et al., 2014), demonstrando organização tecidual semelhante ao tecido nativo.

2.6.1 Aplicações terapêuticas de CTMs nas enfermidades articulares de equinos

É notória a limitação da regeneração da cartilagem hialina, em parte como consequência de sua natureza relativamente hipocelular e avascular (MCCARTHY et al., 2012; ROELOFS; ROCKE; DE BARI, 2013) e que se agrava em animais de alto nível de desempenho atlético, devido extremas tensões de carga que são colocadas na superfície articular (FRISBIE; STEWART, 2011; BURK et al., 2013), promovendo assim, uma cicatrização intrínseca lenta e ineficiente. O tecido geralmente é substituído por fibrocartilagem, que não possui propriedade mecânica para suportar as tensões fisiológicas da articulação (TAYLOR; SMITH; CLEGG, 2007; WILKE; VYDAM; NIXON, 2007).

Impulsionado pelo significativo impacto que as doenças articulares desempenham no cavalo, associado à ineficácia no tratamento cirúrgico (SOUSA et al., 2014) e medicamentoso, estas enfermidades se tornaram um grande desafio para o clínico. A partir disso as pesquisas com terapia celular cresceram exponencialmente durante as últimas décadas (FRISBIE; STEWART, 2011) enfatizadas pelo potencial que CTMs possuem para reparar um tecido, especialmente por sua habilidade de diferenciação condrogênica (FRISBIE; SMITH, 2010).

A aplicação de CTMs no tratamento de lesões de cartilagem foi avaliada a partir de lesões induzidas experimentalmente, e também em ensaios clínicos para terapia de OA de ocorrência natural. Porém, ainda se faz necessário aumentar o número de estudos clínicos para determinar os efeitos da administração de CTMs, principalmente em cavalos que não respondem bem aos tratamentos rotineiros (FRISBIE; SMITH, 2010; FRISBIE; STEWART, 2011).

Os condrócitos e as CTMs provenientes de medula óssea e tecido adiposo são as principais fontes utilizadas para reparação da cartilagem, todavia células isoladas a partir da própria cartilagem de equinos parece ser uma fonte mais favorável para o tratamento das enfermidades de origem articular. Tal suposição baseia-se no fato das células obtidas de medula óssea, em situações de diferenciação condrogênica *in vitro*, resultarem em cartilagem hipertrófica formada durante os estágios finais da ossificação. Este fenótipo celular demonstra síntese de colágeno X, e nessas condições a fibrocartilagem possui propriedade funcional inferior, que pode originar mineralização e consequentemente, seria nocivo a qualquer processo de regeneração (MCCARTHY et al., 2012).

McIlwraith et al. (2011) avaliaram o implante intra-articular de CTMs obtidas da medula óssea após indução de microfraturas nos côndilos mediais do fêmur de cavalos. Após um mês da indução dos defeitos condrais, foram administrados 20×10^6 células associadas com ácido hialurônico nas articulações tratadas, e somente ácido hialurônico nas articulações controle. Os animais foram avaliados por um período de doze meses, com radiografias bimestralmente e avaliação artroscópica no sexto mês e sacrificados no décimo segundo mês. As articulações foram submetidas a exames de ressonância magnética, histologia, análise histomorfométrica, imunohistoquímica e exames bioquímicos. Concluíram que o uso clínico de CTMs intra-articular pode ser benéfico para regeneração do tecido, após demonstrar que o grupo tratado exibiu melhor qualidade tecidual e resistência cartilágnea (avaliação artroscópica) e também devido ao aumento na concentração de agregam na cartilagem articular (análise imunohistoquímica).

Segundo Fortier et al. (2010) o tratamento com CTMs pode resultar na cura de defeitos criados durante artroscopia resultando em integração de tecido e aumento no preenchimento tecidual localmente a lesão, bem como reparação em torno da cartilagem, com maior teor de colágeno II, melhor orientação de suas fibras e aumento de GAGs.

O implante de CTMs (20×10^6) intra-articular em lesão induzida na articulação femoropatelar apresentou potencial regenerativo mais rápido quando avaliado 30 dias após a cirurgia. As articulações tratadas demonstram maior preenchimento cartilágneo em relação

ao membro controle, porém sem diferença significativa na avaliação histológica referente à composição do novo tecido formado constituído principalmente por colágeno II e PGs. Entretanto, na observação a longo prazo, ou seja, após oito meses, tais benefícios não persistiram (WILKE; VYDAM; NIXON, 2007).

Os efeitos clínicos, bioquímicos e histológicos da aplicação de CTMs provenientes de medula óssea e tecido adiposo foram avaliados para o tratamento de OA induzida. Foi demonstrado que os níveis de PGE_2 e efusão de líquido sinovial foram menores nas articulações tratadas com CTMs de medula óssea quando comparadas com o controle (placebo) e CTMs de tecido adiposo (FRISBIE et al., 2009).

Segundo Stewart (2011) as CTMs implantadas por via intra-articular são mediadas por fatores solúveis ou primários sobre os tecidos articulares; e condições de inflamação, CTMs inibem a ativação de linfócitos T, secreção de citocinas inflamatórias e antagonizam a atividade de MMPs. Estas atividades são benéficas e estabelecem suporte no metabolismo dos condrócitos.

Para o tratamento da osteoartrite, CTMs podem ser injetadas por via intra-articular isoladamente ou em conjunto com produtos rotineiramente recomendados, tais como ácido hialurônico e condroprotetores. A frequência de aplicação varia individualmente em resposta ao tratamento. Para o tratamento trans-operatório as células podem ser injetadas com orientação artroscópica, contudo há necessidade do uso de gás para distensão da articulação no momento do implante (SCHNABEL et al., 2013).

Um estudo projetado com 33 equinos, com lesão na articulação femorotibial e lesão de menisco, foram tratados cirurgicamente por artroscopia seguido de administração intra-articular de CTMs autólogas derivados de medula óssea. Após 24 meses do tratamento, 43% dos cavalos voltaram ao nível de trabalho anterior, 33% voltaram ao trabalho e 24% não retornaram ao trabalho. Em cavalos com lesão de menisco, 75% dos cavalos tratados com CTMs retornaram ao trabalho. Dos cavalos que foram tratados unicamente com artroscopia, 63% retornaram ao trabalho. Esses dados sugerem que a aplicação de CTMs intra-articular é um tratamento seguro e resulta em melhores condições de retorno ao desempenho atlético em relação a cavalos tratados exclusivamente com artroscopia (FERRIS et al., 2014).

O uso de CTMs em enfermidades articulares é uma terapia em evolução e aparentemente pode proporcionar benefícios aos pacientes, com potencial clínico eficaz para regeneração da cartilagem (FORTIER et al., 2010), porém ainda há muito que aprender (STEWART, 2011). Ainda não está claro qual é a quantidade ideal de células, tão pouco qual

a melhor fonte para o tratamento de enfermidades articulares, essencialmente a OA (FORTIER; TRAVIS, 2011; SCHNABEL et al., 2013).

A literatura revela alguns estudos realizados em equinos tratados com CTMs após enfermidade articular induzida, desta forma o quadro 1 resume alguns destes trabalhos.

Quadro 1 - Resumo de estudos que avaliaram o uso de terapia celular com CTMs em animais com OA induzida na espécie equina

Estudo	Animais	Lesão	Tratamento	Métodos de avaliação	Período do estudo	Resultados
(SEO et al., 2013)	N=6 articulação contralateral controle	Defeito osteocondral lateral	Concentração de 5×10^4 e 5×10^6 de células cultivadas da medula óssea, associadas a moléculas indutoras osteogênicas e condrogênicas	Macroscópica, histologia, radiografia, imunohistoquímica e análise quantitativa	4 meses	Foi observada regeneração nas articulações tratadas com CTMs.
(MCILWRAITH et al., 2011)	N=10 articulação contralateral usada como controle	Defeito osteocondral articulação femorotibial (medial) com microfratura	Concentração de 2×10^7 de células autólogas cultivadas de medula óssea.	Clínico, histologia, imunohistoquímica, radiografia e MRI	12 meses	* Sem diferença estatística significativa
(FRISBIE et al., 2009)	N=8 experimental N=8 controle	Fragmento induzido durante artroscopia articulação intercárpica	Concentração de $5.6 - 15 \times 10^6$ de células autólogas cultivadas de medula óssea.	Clínica, histologia, radiografia	70 dias	* Sem diferença estatística significativa
(WILKE; VYDAM; NIXON, 2007)	N=6 Articulação contralateral usada como controle	Remoção de <i>plug</i> da articulação femoropatelar	Concentração de 1.2×10^7 células autólogas cultivadas da medula óssea.	Macroscópica, histologia e imunohistoquímica	8 meses	* Sem diferença estatística significativa

Fonte: Adaptado de (WHITWORTH; BANKS, 2014) *autores relatam melhora na reparação tecidual, dos membros tratados, quando observados macroscopicamente e através de lâminas histológicas

3 JUSTIFICATIVA

A melhor fonte tecidual para obtenção de CTMs ainda não está bem estabelecida e pouco se conhece sobre as propriedades das CTMs cultivadas principalmente de equinos, independente da sua fonte. Visando a terapêutica para enfermidades osteoarticulares, essencialmente a OA, a busca de CTMs que apresente melhor potencial condrogênico, torna-se plausível.

Ao comparar as características fenotípicas e de diferenciação celular das células cultivadas de articulações híginas com as de articulações acometidas por OA ou OCD, poderemos estabelecer qual fonte celular é a mais indicada para se utilizar no tratamento destas enfermidades. Um estudo em equino investigou as características fenotípicas e de diferenciação celular utilizando-se LS de articulações com OCD ou com fraturas intra-articulares, mas em nenhum foi estudado articulações acometidas por OA. Também, em nenhum estudo até o momento a comparação proposta em nossa pesquisa foi realizada, ou seja, a comparação entre as enfermidades e as diferentes fontes celulares.

Ainda, a comparação entre células oriunda de LS com as de MS baseia-se no fato da colheita de LS ser mais facilmente realizada, não necessitando de procedimento artroscópico, ao contrário da colheita de MS.

4 OBJETIVOS

1. Isolar e cultivar células oriundas de líquido e membrana sinovial de articulações de equinos híidas, com osteocondrite dissecante e osteoartrite; caracterizá-las de acordo com seu potencial proliferativo e com marcadores celulares; analisar sua expansão e seu potencial de diferenciação condrogênico, osteogênico e adipogênico *in vitro*.
2. Analisar as células provenientes do cultivo celular de líquido e membrana sinovial em camundongos imunossuprimidos Balb-C^{nu/nu}, quanto a um possível potencial tumorigênico.
3. Avaliar clinicamente e por meio de exames radiográficos e ultrassonográficos os efeitos da aplicação intra-articular em equinos das células provenientes do cultivo celular que apresentaram melhor desempenho.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o protocolo de número 2871/2013.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa/cultivo celular no Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

5.1 ANIMAIS

Este estudo foi realizado ao longo de dois anos de coletas de LS e MS de equinos com articulações híidas, ou diagnosticados com OCD e OA durante a rotina hospitalar dos Serviços de Clínica Médica de Equinos e Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

Foram coletadas amostras de 97 articulações de 68 equinos, com idade entre 2 a 10 anos, sem restrição quanto à raça, articulação e sexo. As amostras de LS e MS de articulações com OCD (45) ou OA (22) foram coletadas durante tratamento artroscópico. O LS foi obtido por artrocentese com agulhas hipodérmicas 40x10 acopladas em seringas de 10 ml imediatamente antes do procedimento. Já as amostras de MS foram obtidas no trans-operatório por meio de pinça artroscópica convencional.

As 30 amostras de LS e MS de articulações híidas foram coletadas no início de procedimentos artroscópicos de experimentos que ocorriam paralelamente.

Todas as amostras foram processadas em laboratório, onde ocorreu início da primeira linhagem de células, em ambiente propício para crescimento celular. O cultivo foi realizado a partir da expansão celular, ao longo de até três passagens, quando as células foram analisadas e então congeladas.

5.1.1 Seleção das células

As amostras de LS e de MS foram mantidas em cultura até atingirem um número mínimo de células, em torno de 10^6 , para posterior análise e congelamento das alíquotas.

A divisão dos grupos foi realizada de acordo com os materiais biológicos colhidos, quais sejam, LS e MS, divididos entre as enfermidades diagnosticadas (articulações hígidas, OCD e OA), conforme quadro 2.

Quadro 2 - Divisão dos grupos de acordo com a condição articular

ARTICULAÇÕES	Líquido sinovial (LS)	Membrana sinovial (MS)
Hígidas	30	30
OCD	45	45
OA	22	22
Total	97	97

A análise fenotípica das populações foi realizada por meio de citometria de fluxo e imunocitoquímica. Entretanto, o número final de articulações utilizadas para esta avaliação, foi: para o grupo LS foram utilizadas 12 articulações hígidas (LS-H), 19 com OCD (LS-OCD) e 11 com OA (LS-OA), ao passo que, no grupo MS o número de articulações utilizadas foi de 15 hígidas (MS-H), 13 com OCD (MS-OCD) e 11 com OA (MS-OA).

Em análise realizada por meio de diferenciação celular nas linhagens osteogênica, adipogênica e osteogênica, foram utilizadas seis articulações hígidas, seis com OCD e seis com OA para ambos os grupos (LS e MS).

5.2 CULTIVO CELULAR

As etapas do cultivo celular foram realizadas no laboratório do Departamento de Clínica Médica.

5.2.1 Isolamento das células do líquido sinovial

Após a colheita o LS foi processado no laboratório de cultivo celular, em fluxo laminar vertical, iniciando a cultura primária, o isolamento e a expansão das células. O LS foi transferido para frascos de cultivo¹ de 25 cm², preenchidos com 5 ml de meio de cultivo DMEM², suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina (200Mmol), 1% de ácido pirúvico e 0,25% de anfotericina B, incubadas a uma temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. A primeira troca de meio de cultura foi no quarto dia após observação da formação de aderência ao plástico. Para esta troca, foi descartado metade do meio, e adicionado 2,5 ml de meio novo. Os cuidados com o cultivo celular se mantiveram durante longo período para acompanhar o crescimento celular, mediante uso de microscopia invertida. As trocas de meio de cultura foram realizadas a cada 48 horas, até atingirem 70 a 80% de confluência celular.

5.2.2 Isolamento das células da membrana sinovial

Ainda no centro cirúrgico, a MS foi colocada em solução fisiológica 0,9% com 1% de amicacina e levada em isopor com gelo triturado ao laboratório. Em seguida, foi lavada com tampão fosfato-salino (PBS) e penicilina, debridada e distribuída em garrafas de cultivo de 25cm², fixando-a nos frascos com 200µl de soro fetal bovino (SFB), tendo sido incubadas por 20 minutos. Após incubação, foi acrescido cuidadosamente 5 ml de DMEM suplementado e procedeu-se a cultura da mesma maneira descrita para o LS.

¹ Garrafas para cultura celular TPP

² Dulbecco's modified eagle medium

5.2.3 Passagem das células – Tripsinização

Todas as amostras passaram por este procedimento ao atingirem 70 a 80% de confluência. Foi realizada a primeira passagem da população de células, onde o meio de cultivo foi removido, e as células lavadas com 2 ml de PBS. Posteriormente foi adicionado 1 ml de tripsina 0,25%, e as amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2 ml de meio de cultivo suplementado com SFB para inativação da tripsina. A suspensão celular foi aspirada e transferida para um tubo cônico de 15 ml, centrifugada durante 5 minutos a 287 X g. O botão celular foi ressuspensionado em 1 ml de DMEM suplementado, sendo posteriormente transferidos para frascos de 75cm² e adicionado mais 9 ml de meio, seguida de incubação nas mesmas condições já descritas.

5.2.4 Congelamento e descongelamento

O congelamento das células foi realizado assim que as células atingiram 70 a 80% de confluência, observadas tanto nos frascos de cultura de 25cm², quanto de 75cm². Foram tripsinizadas, conforme descrito anteriormente. As células foram congeladas em meio composto por SFB contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO)³. Alíquotas de 1 ml foram armazenados em criotubos mantidos em gelo triturado. Os criotubos foram congelados no ultrafreezer a uma temperatura de -80°C, durante uma semana. Após este período, os criotubos foram transferidos para nitrogênio líquido a -196°C.

Para o descongelamento foi acrescido ao criotubo 1 ml meio de cultura a temperatura ambiente. Em seguida as células foram transferidas para tubos cônico de 15 ml e centrifugadas durante 5 minutos a 287 X g. O sobrenadante foi descartado e logo após o botão celular foi ressuspensionado em 5 ml de DMEM suplementado, para nova incubação em estufa de CO₂.

³ Sigma - Aldrich

5.3 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

A caracterização celular foi realizada através de citometria de fluxo e imunocitoquímica.

5.3.1 Avaliação fenotípica por Citometria de fluxo

A análise fenotípica das células foi realizada para caracterizá-las com marcadores de superfície reconhecidos na literatura, os quais são utilizados para estabelecer uma possível fonte de CTMs. As células de LS e MS (hígidas, OCD e OA) foram então preparadas para devida avaliação. Para tanto, foi necessário descongelar as células presentes nos criotubos do nitrogênio líquido em nosso banco de células. As células foram descongeladas, centrifugadas e então foram lavadas com PBS.

Após contagem celular na câmera de Newbauer, foi estabelecida a utilização de 10^5 /células por tubo de plástico descartável próprio para citometria. O concentrado celular foi ressuspenso em 100 µl de PBS dando início à caracterização propriamente dita. Os anticorpos utilizados foram titulados e testados anteriormente em estudo piloto de duas populações, para definição da concentração ideal de anticorpo que deveria ser utilizado.

Para a fenotipagem em citometria de fluxo os seguintes anticorpos foram analisados: anti-CD44⁴, anti-CD90⁵, anti-CD105⁶ para caracterização de células de origem mesenquimal, anti-CD34 para identificar possíveis células de origem hematopoiética, anti-PGP 9.5⁷ que é um marcador de sinoviócitos do tipo B e anti-lisozima⁸, um marcador de superfície que expressa sinoviócitos do tipo A. Para calibração do citômetro as células foram marcadas com isotipo controle anti-IgG1 PE e anti-IgG1 FITC.

A fluorescência utilizada (FITC e PE) permitiu que as análises fossem realizadas em tubos em comum, sendo assim: anti-CD44 (FITC) juntamente com anti-CD90 (PE) e anti-

⁴ AbD Serotec, A Bio Rad Company, USA

⁵ BD Pharmingen, USA

⁶ AbD Serotec, A Bio-Rad Company, USA

⁷ Spring Bioscience – clone N/A, USA

⁸ Dako, USA

CD105 (PE) analisado concomitante ao anti-CD34 (FITC), desta forma, as avaliações destas populações celulares foram analisadas como duplamente positivas.

Os anticorpos anti-lisozima e anti-PGP 9.5 foram analisados em tubos separados, pois os anticorpos secundários apresentavam na constituição a mesma fluorescência (anticorpo anti-cabra alexa-fluor 488).

Ao término da marcação, os tubos foram incubados a 4°C (geladeira) por 40 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados e lavados com PBS, fixados com paraformoldeído⁹ e retornam à geladeira durante mais 15 minutos, seguido de nova lavagem com PBS para leitura no citômetro. Foram adquiridos 5000 eventos no aparelho FACSCalibur¹⁰ e analisados através do programa FlowJow.

5.3.2 Avaliação fenotípica por imunocitoquímica

Para análise de imunocitoquímica, as células foram semeadas em placas de seis poços¹¹, adicionado 3 ml de DMEM previamente suplementado. Após confluência de 70% o meio DMEM foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com 2 ml de PBS. As células foram então fixadas em paraformoldeído 4% durante 30 minutos a 4°C.

Após fixação, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os anticorpos primários: anti-lisozima (expressa em sinoviócitos A), anti-PGP 9.5 (expressa em sinoviócitos B), anti-oct4¹² (expressa em células com característica pluripotente), anti-nanog¹³ (expressa em células com característica pluripotentes), anti-vimentina¹⁴ (expressa em células mesenquimais) e anti-citoqueratina¹⁵ (expressa no citoesqueleto de células de origem mesenquimal, assim como em fibroblastos) na diluição de 1:100 a 4°C *overnight*. Para detectar os anticorpos primários, foi utilizado o polímero Super-Picture¹⁶ e as reações foram reveladas em solução de diaminobenzina¹⁷, contra coradas com Hematoxilina de Harris. A

⁹ Marca Sigma - Aldrich

¹⁰ Becton – Dickinson, CA, USA

¹¹ Placas 6 well - TPP

¹² Antibody conjugated to FITC – Byorbyt, USA

¹³ Santa Cruz Biotechnology, Europe

¹⁴ Dako, USA

¹⁵ Dako, USA

¹⁶ Poly HRP conjugate – Zimed San Francisco, USA

¹⁷ DAB, Sigma, St. Louis/USA

análise qualitativa foi realizada ao microscópio óptico acoplado a sistema de câmeras¹⁸ e obtidas fotomicrografias digitalizadas.

Os anticorpos utilizados para caracterização celular estão descritos no quadro 3.

Quadro 3 - Descrição dos anticorpos utilizados durante caracterização celular

Anticorpo	Marca	Isotipo	Concentração/Diluição	Clone
CD44:FITC Camundongo anti-cavalo	AbD Serotec/ monoclonal	IgG1	0,5µl/ 100µl amostra	CVS18
CD90:PE Camundongo anti-rato	BD Pharmingen/ monoclonal	IgG1	1µl/ 100µl amostra	OX-7
CD105:RPE Camundongo anti-humano	AbD Serotec/ monoclonal	IgG1	1µl/ 100 µl amostra	SN6
CD34:FITC camundongo anti-humano	BD Pharmigen/ monoclonal	IgG1	1µl/ 100 µl amostra	581
OCT4:FITC Coelho anti- humano	Biorbyt/ polyclonal	IgG	1µl/ 100 µl amostra	N/A
NANOG Cabra anti- humano	Santa Cruz Biotechnology/ polyclonal	IgG	1µl/ 100µl amostra	N-17
PGP 9.5 Coelho anti- humano	Spring Bioscience	IgG	1 µl/ 100µ amostra	N/A
Lisozima Coelho anti- humano	Dako policlonal	-----	1 µl/ 100µl amostra	N/A
Citoqueratina	Dako	IgG1	1 µl/ 100µl amostra	AE1 / AE3
Vimentina Mouse	Dako monoclonal	IgG1	1µ/ 100µl amostra	V9

¹⁸ Nikon eclipse E800

5.4 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A confirmação do potencial multipotente das populações celulares foi realizada por meio de indução *in vitro* nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica.

5.4.1 Diferenciação adipogênica

Para diferenciação adipogênica, foi realizada a tripsinização das células em cultura e em seguida tais células foram semeadas em placas de seis poços numa concentração de 10^5 células/poço. Todas as amostras aderiram ao plástico e receberam 2 ml de meio DMEM suplementado por um período de 48 horas. Transcorrido este tempo, o meio DMEM foi substituído por 2 ml de meio indutor adipogênico comercializado¹⁹. As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas durante 14 dias. Posteriormente o período de diferenciação, as placas foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído durante 30 minutos e coradas com Oil Red O²⁰ para a visualização de gotículas de gordura e Hematoxilina & Eosina (HE) para coloração dos núcleos celulares. Após coloração, as placas foram analisadas e fotografadas no microscópio invertido²¹. A análise das populações controle, das quais não receberam meio indutor, foi demonstrada após cultura em meio DMEM sob as mesmas condições em termos de tempo de cultivo e coloração.

5.4.2 Diferenciação osteogênica

Para o processo de indução osteogênica as células foram cultivadas e plaqueadas com a mesma metodologia aplicada à indução adipogênica. Após 48 horas de cultivo, o meio DMEM foi substituído por meio indutor osteogênico industrializado²², que foi trocado a cada

¹⁹ StemPro adipogenesis Kit, GIBCO, USA

²⁰ Sigma

²¹ Nikon

²² StemPro osteogenesis Kit, GIBCO, USA

48 horas, durante 21 dias. Passado o intervalo necessário de indução as células foram fixadas em paraformoldeído a 4% por 30 minutos seguido de duas lavagens com água destilada e imediatamente coradas com Alizarin Red a 2% pH 4,2²³. A constatação da matriz de cálcio foi analisada e fotografada em microscopia invertida. As populações controle foram igualmente verificadas como especificado na indução adipogênica.

5.4.3 Diferenciação condrogênica

A indução condrogênica foi elaborada a partir de culturas em micromassa. Para tanto, foi necessário cultivar células em frascos a fim de obter um volume de 2×10^6 /células, e remove-las a partir de tratamento enzimático com tripsina (tripsinização), seguido de centrifugação. A seguir, o botão celular foi obtido e cultivado em tubo cônico com 2 ml de meio DMEM durante 48 horas. A etapa indutora propriamente dita teve início após mudança do meio de manutenção para o meio condrogênico comercial²⁴. As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas, no decurso de 21 dias. A micromassa obtida após a indução de diferenciação foi lavada com PBS e fixada em paraformoldeído 4% durante 24 horas. Posterior à fixação, foi confeccionado lâminas histológicas, coradas com azul de toluidina, alcian blue e HE. O resultado de diferenciação foi verificado e retratado em microscopia óptica²⁵.

5.5 TESTE TUMORIGÊNICO

O teste de tumorigenicidade foi desenvolvido para assegurar que as fontes de células de LS e MS não são capazes de ocasionar tumor ou qualquer outra reação indesejada no paciente.

O ensaio foi realizado com nove camundongos Balb-C^{nu/nu}, fêmeas, de seis meses de idade, com peso entre 19 a 28 g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas apropriadas,

²³ Corante marca Sigma - Aldrich

²⁴ StemPro chondrogenesis, Kit, GIBCO, USA

²⁵ Nikon eclipse E800

receberam água e alimentação *ad libitum* e foram preservados em sala climatizada com luminosidade controlada artificialmente para ciclos de claro e escuro de 12 horas.

As células cultivadas derivadas de LS e MS de articulações hígidas e provenientes de enfermidades articulares (OCD e OA) foram injetadas no tecido subcutâneo da região dorsal, numa densidade de 10^6 /células por animal.

Durante o período experimental todos os animais foram pesados semanalmente e monitorados a cada 24 – 48 horas para relatar eventual caquexia ou qualquer outra doença adquirida.

Transcorrido o tempo pré-estabelecido de 3 meses, os animais foram sacrificados através da aplicação de xilazina intraperitoneal, seguida, após 10 minutos de permanência em câmara de CO₂. A necropsia foi realizada e amostras de pulmão, rim, fígado, tecido subcutâneo e baço foram coletadas, pesadas e fixadas em formol a 10% e, encaminhadas para análise histológica. As amostras foram processadas pela técnica de inclusão em parafina sendo obtidos blocos, cortados em espessura de 5 µm, e as lâminas coradas com HE para posterior análise.

As imagens microscópicas das lâminas foram escaneadas utilizando-se um microscópio óptico²⁶ e um programa de computador²⁷.

5.6 APLICAÇÃO DE CÉLULAS EM EQUINOS POR VIA INTRA-ARTICULAR

Nesta fase do experimento foram utilizadas 12 articulações radiocárpicas de seis equinos, fêmeas, com idade entre 7 a 10 anos, que haviam sido submetidas a procedimento artroscópico prévio para realização de duas biópsias osteocondrais de 5 mm cada, na articulação radiocárpica. Estes animais faziam parte de outro estudo experimental que ocorria em paralelo. As biópsias haviam sido feitas na faceta articular do rádio que faz contato com o osso carpo intermédio, topograficamente localizada medial ao tendão do músculo extensor radial do carpo.

Para a etapa em que se concerne a presente investigação, os animais foram avaliados através de exame físico e por meio de exame radiográfico²⁸ e ultrassonográfico²⁹, quando

²⁶ Nikon

²⁷ Nikon - Olyvia

²⁸ Sound Eklín, emissor min x Ray, Mark 2

²⁹ Ultrassom ESAOTE MyLab 30 VET GOLD

transcorridos 30 dias das biópsias osteocondrais para mensuração dos defeitos osteocondrais e verificar a presença de alterações articulares. Os exames foram realizados com os animais em estação, e para o exame ultrassonográfico, as articulações foram tricotomizadas e o membro avaliado foi mantido flexionado.

A partir de então, o procedimento para aplicação intra-articular, iniciou-se de células de LS em cultura, provenientes de articulações híidas do banco de células formado no decorrer do experimento (decisão baseada após análise dos resultados de caracterização e diferenciação celular). Estas células foram mantidas em cultura até atingirem 80% de confluência, quando procedeu-se a tripsinização e centrifugação a 287 X g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 ml de solução fisiológica. Os tubos cônicos foram então, envolvidos em parafilme e encaminhados ao Hospital Veterinário.

No dia do tratamento sete articulações foram preparadas para receber a aplicação de células por via intra-articular e outras cinco articulações foram preservadas e mantidas como controle. Previamente, os equinos tratados foram sedados com detomidina, seguida de tricotomia no local da aplicação e antisepsia com iodopovidona degermante (PVPI) seguida de álcool 70%. Para injeção das células foi utilizada agulha hipodérmica 30x8 acoplada em seringa de 5 ml contendo o volume celular. Cada articulação recebeu o preparado de células em solução fisiológica em um volume de 2 ml com concentração de 10^5 /células alogênicas.

A partir da aplicação, os equinos foram monitorados todos os dias, durante uma semana, para identificar possíveis alterações físicas nas articulações (aumento de volume, de calor e de sensibilidade) ou presença de claudicação. Percorridos 90 dias em que os equinos submeteram-se a aplicação de células, novamente outras avaliações radiográficas e ultrassonográficas foram realizadas para graduar o diâmetro e profundidade da lesão osteocondral e compará-las com o primeiro exame.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov; em seguida foram utilizados o teste t não pareado ou o modelo de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad InStat 3, e valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

7 RESULTADOS

Todos os resultados obtidos nesse estudo estão demonstrados em tabelas e fotomicrografias (Figuras).

7.1 CULTIVO CELULAR

As células provenientes de LS demonstraram sua capacidade de aderência ao plástico durante a primeira semana de cultura entre quatro a sete dias, sendo possível notar uma pequena população visualizada à microscopia invertida. Já a população celular derivadas de MS aderiu ao plástico somente após 15 dias de cultura, iniciando sua expansão nas garrafas. Ambas as populações apresentaram morfologia fibroblastóide desde as primeiras células aderidas, e crescimento em monocamada, originadas a partir de pequenas colônias.

A permanência da cultura primária até atingir confluência celular de 70 a 80% variou entre as amostras, tanto entre o grupo LS, quanto MS. Portanto, este período delongou em média 56 dias para LS-H, 63 dias para LS-OCD e 39 dias para LS-OA. Quanto ao grupo MS a média de confluência foi de 45 dias para MS-H, 38 dias para MS-OCD e 35 para MS-OA. Após a primeira tripsinização a confluência em torno de 70% foi alcançada entre 7 a 15 dias para ambos os grupos (LS e MS).

A característica morfológica fibroblastóide bem como o crescimento em monocamada dos grupos LS e MS são semelhantes às descritas na literatura para células tronco mesenquimais e estão evidenciadas através de fotomicrografias encontradas no apêndice A, figura 1.

7.2 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os resultados demonstrados na análise por citometria de fluxo indicam que as células provenientes do cultivo de LS e MS possuem populações heterogêneas, no entanto apresentam características fenotípicas compatíveis com CTMs. Tal afirmação é confirmada

por meio da expressão positiva de anti-CD90 e anti-CD44, os quais são antígenos de superfície que caracterizam células de origem mesenquimal. A média percentual das populações positivas para CD90, CD44 e a dupla positividade das amostras estão demonstradas na tabela 1.

O resultado de expressão de CD105, um marcador de superfície de células mesenquimais foi baixo ou ausente nas células de LS e MS. A inexistência da expressão de células hematopoiéticas foi confirmada com CD34 e estão demonstradas na tabela 1.

Foram utilizados 5000 eventos durante a análise por citometria de fluxo. As médias e erros-padrão de cada animal individualmente são demonstrados nos apêndices B, C, D e E, tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 1 - Média e erro padrão das populações de células de LS e MS

Fonte	Expressão			
	CD90+CD44-	CD90-CD44+	CD90-CD44-	CD44+CD90+
LS-H	64,9±6,4 a	1,18±0,37 a	27,3±5,98	6,65±2,37 a
LS-OCD	48,3±5,7 b	3,98±1,31 b	31,2±5,4	16,5±3,67 b
LS-OA	48,1±5,7 b	14,2±6,43 c	26,5±4,8	11,2±2,7 b
MS-H	66,6±7,52 a	1,49±0,8 a	29,7±6,91	2,2±0,74 a
MS-OCD	40,2±6,79 b	2,17±0,66 a	48,7±7,53	8,9±4,63 ab
MS-OA	40,3±6,67 b	8,56±2,76 b	39,9±4,63	11,2±3,02 b
Fonte	Expressão			
	CD105+CD34-	CD105-CD34+	CD105-CD34-	CD105+CD34+
LS-H	0,25±0,14	0,02±0,01	99,7±0,14	0,03±0,01
LS-OCD	0,22±0,10	0,09±0,06	98,7±0,77	0,96±0,62
LS-OA	0,25±0,13	0,11±0,09	99,3±0,34	0,37±0,2
MS-H	0,28±0,21	0,02±0,01	99,7±0,22	0,02±0,01
MS-OCD	0,36±0,21	0,10±0,07	99,4±0,26	0,17±0,07
MS-OA	0,36±0,17	0,04±0,04	99,4±0,17	0,11±0,04

Letras minúsculas distintas na mesma coluna denotam diferença estatística dentro do grupo LS ou do grupo MS (P<0,05).

7.3 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR IMUNOCITOQUÍMICA

Os resultados da análise por imunocitoquímica das células dos grupos de LS e MS confirmaram imunomarcagem positiva para os anticorpos anti-Lisozima, anti-PGP 9.5, anti-PCNA e anti-vimentina, assegurando a existência de sinoviócitos tipos A e B, intensa proliferação celular e também células de origem mesenquimal. A ausência de fibroblastos e de células pluripotentes foi confirmada por imunocitoquímica negativa para citoqueratina, oct4 e nanog. As fotomicrografias são evidenciadas nos apêndices F e G, figuras 2 e 3.

7.4 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO

O Potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica estão demonstrados em fotomicrografias nos apêndices H, I, J, K, e L, figuras, 4, 5, 6, 7 e 8.

7.4.1 Potencial de diferenciação osteogênica

As células de ambos os grupos (LS e MS) demonstraram capacidade de diferenciação *in vitro* para linhagem osteogênica. Entretanto, as amostras de cultura providas de LS-OA e MS-OA não foram capazes de apresentar grande quantidade de deposição de cálcio, sendo microscopicamente menor em relação às amostras de LS-H, LS-OCD, MS-H e MS-OCD. O período de cultura induzida para que todas as populações sofressem diferenciação osteogênica foi de 21 dias. Durante este processo, não foi observado mudança na morfologia celular, entretanto a variação foi unicamente no meio indutor que se tornou levemente turvo após aproximadamente 15 dias de diferenciação.

A diferenciação osteogênica foi comprovada após coloração positiva com Alizarin Red que identificou matriz de cálcio produzido pelas células. As células semeadas e cultivadas como controle não formaram matriz de cálcio, certificado pela coloração negativa com Alizarin Red.

7.4.2 Potencial de diferenciação adipogênica

A diferenciação adipogênica ocorreu em 14 dias após a indução. O resultado de ambos os grupos foi semelhante, ou seja, a diferenciação foi visualizada em pequenos pontos isolados às margens das placas onde foram semeadas. Isto representa pouca habilidade para esta linhagem. Ainda, após a indução observou-se morte celular, a partir do descolamento das células nas placas. A diferenciação adipogênica das pequenas colônias foi confirmada após mudança na morfologia, de fusiforme para poligonal, e evidenciada após visualização de gotículas de lipídeo, corados em Oil Red O. Não houve mudança na morfologia da população controle, evidenciadas pela coloração negativa.

7.4.3 Potencial de diferenciação condrogênica

A capacidade de diferenciação condrogênica foi demonstrada após 21 dias a partir da formação de micromassa esférica de aspecto endurecido. O tamanho das micromassas variou entre os grupos LS e MS.

Foram observadas à microscopia óptica, matriz hialina rica em PGs e células semelhantes à condrócitos, confirmados após coloração positiva de Alcian Blue, Azul de Toluidina e HE e demonstrados em lâminas histológicas, assegurando sua capacidade para diferenciação na linhagem condrogênica.

No entanto, foi notória a diferença de coloração, ou seja, mais enfraquecida na população OA em relação à OCD e esta, em relação ao grupo hígido (H), em ambos os grupos (LS e MS).

Um sexto de LS-H, dois sextos de LS-OA, um sexto de MS-OCD e três sextos de MS-H das micromassas, apresentaram consistência gelatinosa. Parte do material gelatinoso foi irrecuperável durante o processamento histológico, ou seja, aparentemente a massa gelatinosa foi dissolvida. A outra fração foi guardada e obtida lâminas citológicas coradas positivamente com os mesmos corantes, sugerindo a presença de condrócitos e ausência de matriz de PGs.

7.5 POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Os camundongos submetidos à inoculação de cultura celular dos grupos LS e MS, não apresentaram alterações em relação ao comportamento, apetite, aumento de temperatura local à inoculação (tecido subcutâneo), durante todo o período experimental. Um camundongo foi a óbito 48 horas após inoculação de células em cultura derivadas de MS-H. A causa morte não foi avaliada e este dado foi perdido, pois não foi possível a realização de necropsia, considerando um possível episódio de disputa entre os outros dois animais da mesma gaiola. O peso dos 8 animais restantes variou entre 16 – 28 g, certificando condições de normalidade de acordo com a fisiologia da espécie.

A avaliação necroscópica dos camundongos, não revelou alterações macroscópicas e as amostras dos órgãos e tecidos coletados (fígado, pulmão, rim, baço e tecido subcutâneo) foram enviados ao Departamento de Patologia da FMVZ – USP, e não mostraram alteração histológica quanto à característica tecidual e morfologia das células. Estes dados são pertinentes para comprovação de que a cultura celular dos grupos LS e MS não são capazes de induzir formação tumoral, atestando segurança destas células. As fotomicrografias são demonstradas no apêndice M, figura 9.

7.6 TRATAMENTO INTRA-ARTICULAR COM CÉLULAS ALOGÊNICAS

Os animais que receberam tratamento com células alogênicas, oriundas do cultivo de LS de articulações híginas, não apresentaram claudicação ou dificuldade de apoio dos membros. No decorrer de uma semana após aplicação das células não houve mudanças quanto à temperatura, sensibilidade e volume articular, sugestivo de que as células alogênicas, não foram capazes de causar processo inflamatório.

As medidas das lesões osteocondrais foram obtidas por mensuração do diâmetro e profundidade durante análise ultrassonográfica e comparadas entre as articulações tratadas e controles, anterior ao tratamento (D0) e 90 dias após a aplicação de células cultivadas de LS (D90). As médias das porcentagens de diminuição do diâmetro das lesões foram de: 15% e 24% nas articulações tratadas e 23% e 38% nas articulações controle. As médias das

porcentagens de diminuição da profundidade das lesões foram de: 30 e 26% nas articulações tratadas e 16 e 25% nas articulações controles. Não houve diferença estatística entre as lesões nas articulações tratadas e controles ($P>0,05$). Os resultados são constatados na tabela 2. As fotografias digitalizadas são demonstradas nos apêndices N e O, figuras 10 e 11.

Tabela 2 - Mensurações por ultrassonografia do diâmetro e profundidade dos defeitos osteocondrais das articulações tratadas e controles

Dias	D0					D90			
	Articulações	Ø 1	P 1	Ø 2	P 2	Ø 1	P 1	Ø 2	P 2
Articulações tratadas	1	----	----	3,9	3	----	----	3,9	2,2
	2	4,5	3,3	4,5	3,3	----	----	3,4	1,6
	3	----	----	5,6	3,2	2,4	1,1	3,2	0,8
	4	5,3	3,9	5,8	4,1	----	----	4,3	3,3
	5	4,7	4,1	5,2	4,6	5,8	4,4	4,3	4,7
	6	4,1	3,5	5,2	4,3	4	3,4	4,6	3,5
	7	5,1	4,3	4,7	3,6	3,9	1,8	2,7	3,1
Articulações controles	Média	4,7	3,8	5,0	3,7	4,0	2,7	3,8	2,7
	EP	0,18	0,16	0,25	0,23	0,53	0,57	0,26	0,49
	8	5,4	3,3	6,7	3,1	4,1	3,1	3	1,8
	9	4,9	4,4	4,7	4,4	4,3	4,7	3,3	3,2
	10	6	3,8	5,2	3,8	3,3	3,2	2,2	2,7
	11	4,8	3	5,5	3,9	4,6	2,1	4,2	2,8
	12	4,8	3,9	5	3,3	3,6	2,4	4,2	3,3
	Média	5,2	3,7	5,4	3,7	4,0	3,1	3,4	2,8
	EP	0,23	0,24	0,35	0,23	0,24	0,45	0,38	0,27

Ø1 = Diâmetro da lesão 1. P1 = Profundidade da lesão 1.

Ø2 = Diâmetro da lesão 2. P2 = profundidade da lesão 2.

Mensuração em milímetros.

Não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$).

8 DISCUSSÃO

A procura de uma terapia eficiente para a regeneração musculoesquelética, principalmente nos casos de enfermidades osteoarticulares, se tornou necessidade fundamental, visto que as atuais abordagens cirúrgicas e clínicas não são totalmente eficazes a longo prazo. Consequentemente, a pesquisa abrangendo a utilização de CTMs cresceu exorbitantemente por considerá-las células promissoras para a regeneração tecidual. A crescente melhoria na tecnologia de isolamento de células permitiu a identificação de CTMs a partir de vários tecidos adultos, tais como as derivadas de tecido sinovial (FAN et al., 2009).

No presente estudo, utilizamos células de LS e MS para adquirir uma possível fonte de CTMs, que foram avaliadas por expressão de marcadores de superfície e diferenciação celular. Nossas fontes foram comparadas a fim de conhecer qual a melhor procedência, para futura aplicação clínica, semelhante a outros trabalhos recentemente descritos em humanos (KOYAMA et al., 2011).

De Bari et al. (2001) isolaram pela primeira vez CTMs a partir da colheita de MS de pacientes humanos com doença articular degenerativa, as quais foram lavadas com PBS e antibióticos, sendo as células libertadas com o emprego de collagenase a partir da digestão do tecido. Este grupo de pesquisadores cultivaram as células com DMEM suplementados com SFB e antibióticos, e verificaram uma cultura em monocamada, aderentes de morfologia fusiforme. O isolamento de CTMs a partir de MS obtidas em nosso estudo se deu de forma similar, através de colheitas assépticas durante procedimento cirúrgico de células originárias de enfermidades articulares (OCD e OA). Adicionalmente também houve coleta de células a partir de animais com articulações híginas. Foi demonstrado o crescimento em monocamadas de todas as populações (MS), sem a necessidade de digestão enzimática com collagenase.

De fato, o isolamento da primeira colônia de MS-CTMs aqui observado, delongou por um período inicial de aproximadamente 15 dias, somados a incubação necessária de pelo menos 45 dias para obter confluência aproximada de 70%, isto pode ser associado a não utilização de collagenase, diferentemente do ocorrido em vários trabalhos publicados, nos quais sua utilização é unânime e a expansão e confluência celular são verificadas a partir da segunda semana (KOGA et al., 2007; KURTH et al., 2007).

A cultura *in vitro* de células derivadas de LS, demonstrada neste estudo, mostrou a característica de adesão ao plástico, bem como crescimento em monocamada a partir de unidades formadoras de colônias de morfologia fibroblásticoide, a partir de processamento

relativamente mais fácil quando comparadas à MS. Estes resultados são consistentes com os achados na literatura (JONES et al., 2004; MORITO et al., 2008; KRAWETZ et al., 2012; MATSUKURA et al., 2014; MURATA et al., 2014). Entretanto, os autores citados utilizaram uma metodologia distinta no momento inicial ao cultivo, em que o LS foi diluído em PBS, seguido de centrifugação, e utilizaram o botão celular para início da cultura com DMEM. No presente estudo, o LS foi obtido e usado *in natura* sendo, desta forma, colocados diretamente nos frascos juntamente com DMEM suplementado, e exibiram características em comum.

Comparativamente ao cultivo de MS, a cultura de células derivadas de LS apresentou aderência ao plástico mais rapidamente, em torno de sete dias, contudo tanto as células derivadas de LS-H quanto as de LS-OCD precisaram de um período maior para atingir confluência de 70-80%. Já as células oriundas de LS-OA e MS-OA necessitaram do mesmo tempo para apresentar a mesma porcentagem de confluência. Também, após a primeira tripsinização a confluência em torno de 70% foi alcançada igualmente entre os grupos (MS e LS).

Os critérios de caracterização de CTMs de equinos, estabelecidos até o momento buscam a consolidação dos dados para desenvolver resultados consistentes, a partir de um painel de marcadores para que a definição para CTMs se torne plausível (DE SCHAUWER et al., 2011), assim como é determinado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006). Desta forma para estabelecer a expressão fenotípica de células de LS e MS, o atual estudo analisou as células pela expressão de marcadores de superfície CD90, CD44, CD34, CD105, oct4, nanog, vimentina e citoqueratina.

A expressão positiva com diferença significativa entre os grupos se deu para o CD90, confirmadas pelas porcentagens 64,9% para LS-H, 48,3% para LS-OCD, 48,1% para LS-OA, 66,6% para MS-H, 40,2% para MS-OCD e 40,3% para MS-OA, considerando assim, que as células de LS e MS híbridas representam melhor fonte de CTMs ($P < 0,05$).

A baixa expressão de CD44 foi uma surpresa, pois durante os primeiros testes realizados com o anticorpo, cerca de 90% das células mostraram expressão, e desta forma foi determinado a utilização da concentração de 0,5 μ l para caracterização por citometria de fluxo. Mesmo assim, este resultado é consoante ao encontrado no trabalho de Ranera et al. (2011) em que constataram a ausência de expressão deste marcador nas células da medula óssea e tecido adiposo. Ressalta-se que a dupla marcação foi realizada e pode ter ocorrido competição nos epítomos favorecendo maior expressão para CD90 e uma menor expressão de CD44. Mesmo que em menor expressão, todas as populações celulares observadas

apresentaram expressão de CD44, porém em maior porcentagem de expressão nos grupos OA comparadas aos grupos de articulações OCD e hígdas ($P < 0,05$).

Lee et al. (2012) verificaram a expressão de marcadores de superfície CD90, CD44 e CD34, e caracterizaram as células de LS e MS de humanos com OA grave, que necessitavam de artroplastia total, e OA moderada em que foi somente realizado menissectomia parcial. Ambas as enfermidades foram capazes de apresentar alta expressão para os marcadores CD90 e CD44, e ausência de CD34. Djouad et al. (2005) verificaram a expressão dos marcadores CD90, CD105, CD44, CD73, CD14, CD34 e CD45 nas CTMs de MS em comparação com CTMs derivadas da medula óssea e averiguaram maior expressão para o marcador CD90 nas CTMs de MS em relação às células de medula óssea.

Murata et al. (2014) identificaram CTMs de LS em equinos portadores de OCD e fratura intra-articular com sinovite, visando investigar a multipotencialidade celular. Estes autores verificaram a expressão de CD90, CD44, CD105 e ausência de CD34, os mesmos achados foram obtidos no estudo de Harnová et al. (2011) a partir de colheitas de LS e MS de pacientes humanos. Já Alsalameh et al. (2004) confirmaram aumento de expressão de CD105 em células humanas, oriundas de pacientes com OA quando comparadas com amostras das articulações normais.

Entre os resultados na literatura, a expressão de CD105 é positiva nas populações provenientes de LS e MS de humanos, porém nossos resultados foram divergentes (SAKAGUCHI et al., 2005; SEKIYA et al., 2012; SALAMON et al., 2013), ou seja, nossas células apresentaram pouca expressão para CD 105 (0,25% para LS-H, 0,22% para LS-OCD, 0,25% para LS-OA, 0,28% para MS-H, 0,36% para MS-OCD e 0,36% para MS-OA) ($P > 0,05$). Acreditamos que o anticorpo não funcionou nas populações estudadas, assim como relatado por De Schauwer et al. (2012), que verificaram variação de expressão entre 0,1 a 20% de células oriundas de sangue do cordão umbilical de equinos e também no estudo de Corradetti et al. (2011), em que todas as populações foram negativas para CD105 em tecidos derivados do cordão umbilical de equinos.

Devido à falta de anticorpos específicos para equinos e a baixa reatividade de marcadores de outras espécies para a espécie equina (DE SCHAUWER et al., 2011), diversos anticorpos são constantemente testados. Logo, a falta de expressão de CD105 no presente estudo pode estar relacionada à esta falta de anticorpo anti-CD105 específico para a espécie equina. Adicionalmente realizamos análises com o marcador CD34, visando investigar a presença de células hematopoiéticas na cultura LS e MS. Relatamos aqui a baixa expressão de CD34 (0,02% LS-H, 0,09% LS-OCD e 0,11% LS-OA, 0,02% MS-H, 0,10% MS-OCD e

0,04% para MS-OA); também não observamos diferença estatística entre os grupos analisados ($P>0,05$). Nossos resultados foram congruentes com os achados de vários estudos em humanos que confirmam que as CTMs de LS e MS apresentam baixa expressão ou ausência de marcação de CD34 (SAKAGUCHI et al., 2005; ZHANG et al., 2008; SEKIYA et al., 2012; SUN et al., 2014). Recentemente um único estudo com CTMs derivados de LS de equinos também mostrou ausência de expressão de CD34 (MURATA et al., 2014).

Segundo Doran et al. (1983) a localização seletiva do anticorpo PGP 9.5 é conhecida no cérebro e nos neurônios de humanos. A partir deste conhecimento, Kitamura et al. (1999) relataram a imunomarcação positiva do anticorpo PGP 9.5 em sinoviócitos do tipo B, documentando de forma clara sua distribuição na MS. Esta especificidade em sinoviócitos tipo B foi possível pela comparação com a imunorreação encontrada nas fibras nervosas distribuídas na MS e com os resultados obtidos em cérebro humano e de cavalos.

Neste contexto, Kitamura et al. (2001) estudaram as células equinas de LS híginas e portadores de OA. Os autores certificaram o uso de PGP 9.5 como marcador bioquímico para enfermidade articular na espécie equina, visto que utilizando-se ensaio enzimático (ELISA) foi demonstrada elevação significativa na concentração de PGP 9.5 no LS procedente de OA em comparação com LS-H. O presente estudo também retrata que células de LS e MS de todos os grupos sob as condições de cultura apresentaram expressão positiva para o anticorpo PGP 9.5 através de imunocitoquímica qualitativa, mostrando desta forma, a perpetuação de sinoviócitos B na cultura de LS e MS de articulações híginas e naturalmente doentes (OCD e OA), juntamente com a população de CTMs.

A distribuição de lisozima no tecido sinovial de pacientes humanos com enfermidade articular foi descrita após processamento de tecido sinovial, fixação em paraformaldeído, utilização do anticorpo lisozima, e observação pela técnica de imunomicroscopia. Por meio deste procedimento demonstrou-se marcação positiva em sinoviócitos do tipo A, que são células presentes no LS e semelhantes aos macrófagos (MAPP; REVELL, 1987). No atual estudo identificamos a presença de sinoviócitos A em todos os grupos mantidos em cultura pela técnica de imunocitoquímica qualitativa, comprovando imunomarcação positiva pelo anticorpo lisozima.

Ainda na análise imunocitoquímica das células de cultivo de LS e MS, verificou-se a marcação positiva para vimentina e para o marcador de proliferação celular PCNA, e ausência de expressão de citoqueratina, constatando a origem mesenquimal e capacidade de proliferação de todos os grupos estudados.

Apesar da ausência de expressão para oct4 em nosso estudo ser semelhante aos achados no líquido amniótico de equinos por De Vita et al. (2013) a ausência de expressão para marcadores de pluripotência oct4 e nanog foi oposto aos resultados relatados em outros trabalhos com CTMs de líquido amniótico, como em caprinos (PRATHEESH et al., 2013), e com a expressão positiva de oct4 encontrada em CTMs de medula óssea, matriz do cordão umbilical e também líquido amniótico de equino (LOVATI et al, 2011). A expressão de oct4 em CTMs derivadas da matriz intervacular e perivascular do cordão umbilical de equinos também foram demonstradas no estudo de Corradetti et al. (2011), e em CTMs derivadas de medula óssea e membrana amniótica através de análise por imunocitoquímica (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013). Gao et al. (2014) demonstraram populações positivas para oct4 e nanog nas CTMs de tecido adiposo de humanos, tanto por imunocitoquímica, quanto através de transcriptase reversa (PCR).

Na análise de Uranio et al. (2011) foi constatado que as células do cordão umbilical de caninos durante a primeira e segunda passagem, apresentam variações quanto à expressão de oct4. Durante a primeira passagem as CTMs do líquido amniótico expressaram oct4, já na segunda passagem não houve mais expressão. Para a membrana amniótica, as CTMs expressaram oct4 durante a primeira e segunda passagem e para matriz do cordão umbilical as células expressaram oct4 apenas na primeira passagem. Já a ausência da expressão de nanog foi relatada em todas as fontes de CTMs.

Reed e Johnson (2008) confirmam a presença do fator de transcrição oct4 nas células do cordão umbilical de potros recém-nascidos, no entanto as tentativas para detecção de nanog foram frustradas quando demonstradas por imunocitoquímica. Contudo, até o presente momento, ainda não há relatos publicados a respeito da expressão positiva ou negativa dos anticorpos oct4 e de nanog através de imunocitoquímica em células do LS e MS de qualquer outra espécie. Sendo assim, devido a esta escassez de dados, os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com publicações de outras fontes de CTMs. Recentemente, Murata et al. (2014) descreveram a expressão de nanog nas células do líquido sinovial de equinos através de PCR.

Além das características fenotípicas, a autenticidade de CTMs é validada de acordo com o potencial de diferenciação celular. Tanto o LS, quanto a MS foram capazes de diferenciação em osteoblastos e condrócitos. Na comparação entre articulações hígidas, com OCD ou OA, sem dúvidas os melhores resultados foram obtidos a partir de articulações hígidas, visto que a placa na qual foi realizada a diferenciação, apresentou melhor qualidade e intensidade na coloração para cálcio assim como para matriz de PGs, apesar de todas as

populações serem capazes de diferenciação para as duas linhagens de interesse. Este dado coincide com nossos achados em relação à expressão fenotípica para CD90 do LS e MS de animais hígidos, os quais apresentaram marcação superior aos grupos OCD e OA.

Estes resultados sugerem que o LS e MS representam uma fonte atraente de CTMs para uso terapêutico baseado na cura de enfermidades musculoesqueléticas.

Atualmente inúmeros estudos relatam uma variedade de fontes teciduais em que são obtidas CTMs. Yoshimura et al. (2007) compararam propriedades de rendimento, proliferação e potencial de diferenciação condrogênico de CTMs obtidas de medula óssea, MS, periósteo, tecido adiposo e muscular. Estes autores demonstraram principalmente a superioridade de CTMs a partir da MS para o potencial condrogênico, devido à maior produção de matriz cartilágnea em relação aos outros grupos. Semelhante ao estudo supracitado, Mochizuki et al. (2006) compararam as CTMs de sinóvia e também de tecido adiposo a partir de ensaio padrão (capacidade de autorrenovação e diferenciação) para caracterização, e constataram uma melhor capacidade condrogênica de células oriundas de MS. A explicação dada surge a partir da hipótese de que estas células já são predispostas a diferenciação em condrócitos, sugerindo que o microambiente ancestral direciona o “destino” celular no momento da diferenciação.

Estudos divergentes ao nosso, não demonstraram diferença frente à análise condrogênica de CTMs humanas obtidas de MS hígida e acometidas por OA (ARUFE et al., 2009), de LS de cavalos com OCD e hígidos (MURATA et al., 2014), de LS de humanos com OA e hígidos, bem como em CTMs derivadas da medula óssea (SEKIYA et al., 2012). Apesar disso, os achados deste trabalho são compatíveis em relação ao aumento no número de células obtidas de articulações doentes. A cultura representativa de articulações com OCD e OA atingiu confluência em um tempo menor quando comparadas com articulações sadias (JONES et al., 2008; ARUFE et al., 2009; SEKIYA et al., 2012; MURATA et al., 2014). Atualmente, esse fato pode ser explicado pelo impulso de uma resposta acentuada de proliferação celular na tentativa de reparação cartilágnea, através do aumento no número de células frente aos distúrbios articulares (JONES et al., 2008).

Em relação à capacidade das células para diferenciação adipogênica, observou-se neste estudo que as células cultivadas do LS e MS apresentaram pouca habilidade para esta linhagem, pois mostraram baixa intensidade de coloração de gotículas de lipídeos intracitoplasmática e ocorrência de morte celular durante o processo de indução. No entanto, ocorreram mudanças na morfologia das células, caracterizando-as com capacidade limitada para diferenciação em adipócitos. Independente da fonte de CTMs obtida, o processo de diferenciação adipogênico em células de equinos, parece ser dependente de componentes

encontrados no soro de coelho (BURK et al., 2013). Koch et al. (2007) e Giovannini et al. (2008) verificaram que a diferenciação adipogênica de CTMs de equinos derivadas de sangue do cordão umbilical ou sangue periférico apresentam pouca capacidade para tal linhagem quando induzidas em meio de cultura padrão, porém quando este meio é suplementado com soro de coelho, a diferenciação ocorre. Durante o estudo de CTMs da cartilagem articular e da medula óssea, descrito no trabalho de McCarthy et al. (2012) o meio indutor já era composto com soro de coelho. De certa forma, estes resultados podem explicar a baixa taxa de diferenciação encontrada no atual estudo, pois a realização de indução se deu a partir de meio comercial padrão e não foi suplementado com soro de coelho.

Mochizuki et al. (2006) realizaram a diferenciação adipogênica de células derivadas de MS e obtidas de tecido adiposo e relataram que as células cultivadas de tecido adiposo possuem melhor habilidade para esta diferenciação. As células diferenciadas foram coradas com Oil Red O para comprovação de gotículas de gordura intracitoplasmática e a comparação foi realizada através da contagem das colônias diferenciadas, após coloração com cristal de violeta. Novamente esses achados implicam na hipótese de que o microambiente ancestral pode favorecer ou predispor as células à diferenciação para o tecido originário.

No estudo de Hoynowski et al. (2007) foi confirmada a diferenciação adipogênica em células da matriz do cordão umbilical de equinos com meio de cultura padrão; Barberini et al. (2014) demonstraram capacidade adipogênica nas células da medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo de equinos; Lovati et al. (2011) conseguiram demonstrar a diferenciação adipogênica nas células cultivadas provenientes da medula óssea, líquido amniótico e matriz do cordão umbilical de equinos; e Arnhold et al. (2007) realizaram a diferenciação adipogênica de células cultivadas derivadas da medula óssea equina, com meio de cultura indutora padrão suplementado com 20% de soro fetal bovino.

Células do LS e MS demonstraram características compatíveis com resultados da caracterização provenientes de outras fontes, por isso podem ser nomeadas como CTMs. Além da caracterização e diferenciação as CTMs de LS e MS oriundas de articulações hígidas, com OCD e com OA, neste trabalho, foi realizada inoculação destas células em camundongos imunossuprimidos para análise tumorigênica, definidos aqui como um teste padrão na contribuição quanto a segurança das CTMs para futuro uso clínico no tratamento de doenças musculoesqueléticas de equinos.

Tais células não foram capazes de induzir tumor, confirmado durante necropsia e após examinar lâminas histológicas. Este é o primeiro trabalho que demonstra que as CTMs de LS e MS são seguras e não são capazes de provocar crescimento tumoral no hospedeiro. Os

relatos que traduzem a segurança e característica imunomoduladora das CTMs tratam-se de experimentos *in vitro*, que através da supressão da atividade de linfócitos T, confirmam que CTMs possuem a competência de desencadear a liberação de fatores que os inibem (AGGARWAL; PITTENGER, 2004; NAUTA; FIBBE, 2008; PERONI; BORJESSON, 2011; VAN LENT; VAN DEN BERG, 2013).

Em virtude do teste tumorigênico negativo, assim como dos resultados favoráveis obtidos durante a caracterização e diferenciação celular, a aplicabilidade clínica de CTMs alogênicas de LS hígido foi testada em equinos, visando: avaliar se as células possuem capacidade de induzir reação inflamatória, ou provocar alterações físicas na articulação, e também, acelerar o curso da reparação cartilágnea de animais submetidos a duas biopsias de 5 mm em cada articulação.

Não foram observadas alterações inflamatórias nas articulações que receberam as CTMs oriundas de LS de articulações hípidas, contudo também não houve diferença estatística quanto ao tempo de reparação dos defeitos osteocondrais nas articulações tratadas e controles, quando comparados diâmetro e profundidade pela mensuração ultrassonográfica ($P < 0,05$). As avaliações físicas e por meio de diagnóstico de imagem foram importantes para confirmar a real competência da terapia alogênica quanto à segurança.

Contudo, ainda não foi estabelecido um número mínimo de CTMs que contribua na regeneração do tecido (FORTIER; TRAVIS, 2011), mas possivelmente a quantidade de células injetadas intra-articular (10^5 / LSH-CTMs) não foi suficiente para resultar na redução do tempo de regeneração osteocondral.

Seo et al. (2013) utilizaram CTMs provenientes de medula óssea numa concentração de 5×10^4 e 5×10^5 /células, nas articulações de equinos após defeito osteocondral e verificaram a regeneração tecidual nos membros tratados. McIlwraith et al. (2011) trataram os defeitos osteocondrais a partir da concentração de 2×10^7 /células oriundas da medula óssea, Frisbie et al. (2009) utilizaram $5.6 - 15 \times 10^6$ células e Wilke, Vydarn e Nixon (2007) aplicaram 1.2×10^7 /células derivadas da medula óssea. Estes resultados, assim como relatado no presente estudo, não demonstraram diferença estatística entre os membros tratados e não tratados, mas todos os autores afirmaram melhora significativa na reparação tecidual quando observado macroscopicamente por via artroscópica e também através de lâminas histológicas.

É evidente que em estudos futuros, a concentração de CTMs derivadas de LS-H deverá ser utilizada em maior quantidade, porém não pretendemos utilizar concentrações maiores do que as já reportadas em relatos anteriores que utilizaram CTMs oriundas de outras fontes, em razão de que acreditamos que as CTMs de tecido sinovial possuem melhores

habilidades no decurso da diferenciação condrogênica, como já observado por outros autores (MOCHIZUKI et al., 2006; NIMURA et al., 2008).

9 CONCLUSÕES

As células cultivadas do LS e da MS de articulações de equinos híidas, com OCD ou OA são fontes viáveis de CTMs, confirmado pela caracterização fenotípica e potencial de diferenciação das células.

A melhor fonte de CTMs foi encontrada nas células cultivadas do LS e MS híidas, considerando-se a maior expressão de CD90 (marcador de CTM), associado à melhor coloração, visualizada nas placas e lâminas das células diferenciadas, quando comparadas às células cultivadas de articulações com OCD e OA.

Fundamentado nos resultados da avaliação tumorigênica, tanto as CTMs de LS, quanto as de MS podem ser usadas em ensaios clínicos. Em especial as CTMs de LS demonstraram, por meio do tratamento intra-articular em equinos, que podem ser utilizadas em indivíduos que não foram seus doadores, ou seja, envolvendo a terapia alogênica.

Os resultados conduzem para recomendação na utilização de CTMs do LS-H, devido seus melhores resultados na definição de CTMs, assim como, pela facilidade de obtenção das células comparadas com a MS, considerando a rotina clínica de equinos.

REFERÊNCIAS

ALBERTIS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Comunidades celulares: tecidos, células-tronco e câncer. In: _____. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 698-699.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Transplantation**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2004.

ALSALAMEH, S.; AMIN, R.; GEMBA, T.; LOTZ, M. Identification of Mesenchymal Progenitor Cells in Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 5, p. 1522–1532, 2004.

ANDO, W.; KUTCHER, J. J.; KRAWETZ, R.; SEN, A.; NAKAMURA, N.; FRANK, C. B.; HART, D. a. Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage. **Cytotherapy**, v. 16, n. 6, p. 776–788, 2014.

ARNHOLD, S. J.; GOLETZ, I.; KLEIN, H.; STUMPF, G.; BELUCHE, L. A.; ROHDE, C.; ADDICKS, K.; LITZKE, L. F. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 10, p. 1095–1105, 2007.

ARUFE, M. C.; DE LA FUENTE, M. C.; FUENTES-BOQUETE, I.; DE TORO, F. J.; BLANCO, F. J. Differentiation of synovial CD-105+ human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 108, p. 145–155, 2009.

BARBERINI, D. J.; FREITAS, N. P.; MAGNONI, M. S.; MAIA, L.; LISTONI, A. J.; HECKLER, M. C.; SUDANO, M. J.; GOLIM, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. Da; AMORIM, R. M. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, p. 25, 2014.

BEEKUIZEN, M. **Inflammatory mediators in critical illness. Identification and role in cartilage repair**. Holanda, 2014. 147 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Utrecht, Holanda, 2014.

BOEUF, S.; RICHTER, W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, p. 31, 2010.

BORJESSON, D. L.; PERONI, J. F. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 109–123, 2011.

BOUFFI, C.; BONY, C.; COURTIES, G.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 6485-6493, 2010.

BRETON, A.; SHARMA, R.; DIAZ, A. C.; PARHAM, A. G.; GRAHAM, A.; NEIL, C.; WHITELAW, C. B.; MILNE, E.; DONADEU, F. X. Derivation and Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells from Equine Fibroblasts. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 4, p. 611–621, 2012.

BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON, K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, p. 846–858, 2007.

BURK, J.; BADYLAK, S. F.; KELLY, J.; BREHM, W. Equine cellular therapy-from stall to bench to bedside? **Cytometry Part A**, v. 83 A, n. 14, p. 103–113, 2013.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W., DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Saunders Company, 2003. p. 572-594.

CARRADE, D. D.; OWENS, S. D.; GALUPPO, L. D.; VIDAL, M. a; FERRARO, G. L.; LIBRACH, F.; BUERCHLER, S.; FRIEDMAN, M. S.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. **Cytotherapy**, v. 13, p. 419–430, 2011.

CARRADE HOLT, D. D.; W., L. M.; S, K. M.; CLARK, K. C.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Cell Med**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2012.

CARSTANJEN, B.; DESBOIS, C.; HEKMATI, M.; BEHR, L. Successful engraftment of culture autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 143–147, 2006.

CARVALHO, A. M.; YAMADA, A. L. M.; GOLIM, M. A.; ÁLVAREZ, L. E. C.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, p. 635–638, 2014.

CHEN, Y.; KUYKENDALL, T. D.; CAPORALI, E.; STEWART, M. C. Cells in equine synovial fluid exhibit chondrogenic capacity without evidence of an endochondral phenotype. In: **55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society**, Las Vegas, USA, **Anais...** 2006. p. 937.

CHEN, Y.; SHAO, J. Z.; XIANG, L. X.; DONG, X. J.; ZHANG, G. R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 40, p. 815–820, 2008.

CHIANG, C. W.; CHEN, W. C.; LIU, H. W.; CHEN, C. H. Application of synovial fluid mesenchymal stem cells: platelet-rich plasma hydrogel for focal cartilage defect. **Journal of Experimental and Clinical Medicine (Taiwan)**, v. 6, n. 4, p. 118–124, 2014.

CLEGG, P. D.; PINCHBECK, G. L. Evidence-based medicine and stem cell therapy: how do we know such technologies are safe and efficacious? **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, p. 373–382, 2011.

COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M.; PROCKOP, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3213–3218, 2000.

CORRADETTI, B.; LANGE-CONSIGLIO, A.; BARUCCA, M.; CREMONESI, F.; BIZZARO, D. Size-sieved subpopulations of mesenchymal stem cells from intervacular and perivascular equine umbilical cord matrix. **Cell Proliferation**, v. 44, p. 330–342, 2011.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1928–1942, 2001.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, a. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; DE 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.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A. L. G.; DE OLIVEIRA, P. G. G.; CISNEROS ÁLVAREZ, L. E.; AMORIM, R. L.; HUSSNI, C. A.; DEFFUNE, E. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 1, p. 26–34, 2011.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G. R.; VAN SOOM, A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1431–1443, 2011.

DE SCHAUWER, C.; PIEPERS, S.; VAN DE WALLE, G. R.; DEMEYERE, K.; HOOGEWIJS, M. K.; GOVAERE, J. L. J.; BRAECKMANS, K.; VAN SOOM, A.; MEYER, E. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 81 A, n. 5, p. 312–323, 2012.

DE VITA, B.; CAMPOS, L. L.; LISTONI, A. J.; MAIA, L.; SUDANO, M. J.; CURCIO, B. R.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PRESTES, N. C. Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 535–542, 2013.

DEMOOR, M.; OLLITRAULT, D.; GOMEZ-LEDUC, T.; BOUYOUCHEF, M.; HERVIEU, M.; FABRE, H.; LAFONT, J.; DENOIX, J. M.; AUDIGIÉ, F.; MALLEIN-GERIN, F.; LEGENDRE, F.; GALERA, P. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. **Biochimica et Biophysica Acta: general subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2414–2440, 2014.

DENOIX, J. M.; AUDIGIÉ, F. Imaging of the musculoskeletal system in horses. In: HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J.; GEOR, R. J. **Equine Sport Medicine and Surgery**. Philadelphia: Saunders, 2004. p.161–187.

DENOIX, J. M. Ultrasonographic examination in the diagnosis of joint disease. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 165-202.

DENOIX, J. M.; JEFFCOTT, L. B.; MCILWRAITH, C. W.; VAN WEEREN, P. R. A review of terminology for equine juvenile osteochondral conditions (JOCC) based on anatomical and functional considerations. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 1, p. 29–35, 2013.

DESJARDIN, C.; CHAT, S.; GILLES, M.; LEGENDRE, R.; RIVIERE, J.; MATA, X.; BALLIAU, T.; ESQUERRÉ, D.; CRIBIU, E. P.; BETCH, J. M.; SCHIBLER, L. Involvement of mitochondrial dysfunction and ER-stress in the physiopathology of equine osteochondritis dissecans (OCD). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 96, n. 3, p. 328–338, 2014.

DISTL, O. The genetics of equine osteochondrosis. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 1, p. 13–18, 2013.

DJOUAD, F.; BONY, C.; HÄUPL, T.; UZÉ, G.; LAHLOU, N.; LOUIS-PLENCE, P.; APPARAILLY, F.; CANOVAS, F.; RÈME, T.; SANY, J.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 6, p. R1304–R1315, 2005.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, a; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DORAN, J. F.; JACKSON P.; KYNOCH, P. A. M.; THOMPSON, R. J. Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. **Journal of Neurochemistry** v. 40 p. 1542–1547, 1983.

EGENVALL, A.; TRANQUILLE, C. A.; LÖNNELL, A. C.; BITSCHNAU, C.; OOMEN, A.; HERNLUND, E.; MONTAVON, S.; FRANKO, M. A.; MURRAY, R. C.; WEISHAUPT, M. A.; WEEREN, V. R.; ROEPSTORFF, L. Days-lost to training and competition in relation to workload in 263 elite show-jumping horses in four European countries. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, n. 3-4, p. 387–400, 2013.

FAN, J.; VARSHNEY, R. R.; REN, L.; PH, D.; CAI, D.; PH, D.; WANG, D.; PH, D. Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. **Tissue engineering Part B**, v. 15, n. 1, p. 75–86, 2009.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Experimental Gerontology**, v. 40, p. 926–930, 2005.

FERRIS, D. J.; FRISBIE, D. D.; KISIDAY, J. D.; MCILWRAITH, C. W.; HAGUE, B. a; MAJOR, M. D.; SCHNEIDER, R. K.; ZUBROD, C. J.; KAWCAK, C. E.; GOODRICH, L. R. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. **Veterinary Surgery**, v. 43, p. 255-265, 2014.

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

FORTIER, L. A; POTTER, H. G.; RICKEY, E. J.; SCHNABEL, L. V; FOO, L. F.; CHONG, L. R.; STOKOL, T.; CHEETHAM, J.; NIXON, A. J. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. **The Journal of Bone and Joint Surgery American**, v. 92, p. 1927–1937, 2010.

FORTIER, L. A.; TRAVIS, A. J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 2, p. 9, 2011.

FORTIER, L. A.; SMITH, R. K. W. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 24, p. 191–201, 2008.

FRISBIE, D. D. Synovial joint biology and pathology. In: AUER, J. A. **Equine Surgery**. Philadelphia: Saunders, 2006, p. 1037-1055.

FRISBIE, D. D.; KISIDAY, J. D.; KAWCAK, C. E.; WERP, N. M.; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, p. 1675–1680, 2009.

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

FRISBIE, D. D.; STEWART, M. C. Cell-based therapies for equine joint disease. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, p. 335–349, 2011.

GAO, S.; ZHAO, P.; LIN, C.; SUN, Y.; WANG, Y.; ZHOU, Z. Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron-like cells which are compatible. **Tissue Engineering. Part A**, v. 20, p. 1271–1284, 2014.

GIOVANNINI, S.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P.; NESIC, D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. **Differentiation**, v. 76, n. 2, p. 118–129, 2008.

GODWIN, E. E.; YOUNG, N. J.; DUDHIA, J.; BEAMISH, I. C.; SMITH, R. K. W. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 25–32, 2012.

GOLDRING, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 9, p. 1916–1926, 2000.

GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, p. 230–237, 2010.

GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse: a review. **Veterinary Journal**, v. 171, p. 51–69, 2006.

GUERCIO, A.; DI MARCO, P.; CASELLA, S.; RUSSOTTO, L.; PUGLISI, F.; MAJOLINO, C.; GIUDICE, E.; DI BELLA, S.; PURPARI, G.; CANNELLA, V.; PICCIONE, G. Mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat and platelet-rich plasma used in athletic horses with lameness of the superficial digital flexor tendon. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 1, p. 19–26, 2015.

GUEST, D. J.; OUSEY, J. C.; SMITH, M. R. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. **Stem cells and cloning: advances and applications**, v. 1, p. 1–9, 2008.

GUTIERREZ-NIBEYRO, S. D. Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, n. 2, p. 363–371, 2011.

HAN, S. A.; LEE, S.; SEONG, S. C.; LEE, M. C. Effects of CD14 macrophages and proinflammatory cytokines on chondrogenesis in osteoarthritic synovium-derived stem cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 20, p. 2680–2691, 2014.

HARNOVÁ, J.; THÓTOVÁ, T.; SARISKY, M.; AMRICHOVÁ, J.; ROSOCHA, J. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem. **Folia Biologica (Praha)**, v. 124, p. 119–124, 2011.

HASEEB, A.; HAQQI, T. M. Immunopathogenesis of osteoarthritis. **Clinical Immunology**, v. 146, n. 3, p. 185–196, 2013.

HERMIDA-GÓMEZ, T.; FUENTES-BOQUETE, I.; GIMENO-LONGAS, M. J.; MUIÑOS-LÓPEZ, E.; DÍAZ-PRADO, S.; DE TORO, F. J.; BLANCO, F. J. Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. **Journal of Rheumatology**, v. 38, p. 339–349, 2011.

HO, A. D.; PUNZEL, M. Hematopoietic stem cells: can old cells learn new tricks? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. May, p. 547–555, 2003.

HONGBAO, MA.; MA, M. Totipotent of stem cell. **Stem Cell**, v. 5, n. 2, p. 1–5, 2014.

HOYNOWSKI, S. M.; FRY, M. M.; GARDNER, B. M.; 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.

HUI, A. Y.; MCCARTY, W. J.; MASUDA, K.; FIRESTEIN, G. S.; SAH, R. L. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury and disease. **Wiley Interdisciplinary Review. Systems Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 15–37, 2013.

HUSS, R.; LANGE, C.; WEISSINGER, E. M.; KOLB, H. J.; THALMEIER, K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34 (-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. **Stem cells**, v. 18, p. 252–260, 2000.

ICHINOSE, S.; MUNETA, T.; KOGA, H.; SEGAWA, Y.; TAGAMI, M.; TSUJI, K.; SEKIYA, I. Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 90, n. 2, p. 210–221, 2010.

IWASAKI, K.; KOMAKI, M.; YOKOYAMA, N.; TANAKA, Y.; TAKI, A.; KIMURA, Y.; TAKEDA, M.; ODA, S.; IZUMI, Y.; MORITA, I. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. **Journal of Periodontology**, v. 84, p. 1425–33, 2013.

JEFFCOTT, L. B. Osteochondrosis: an international problem for the horse industry. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 16, p. 32–37, 1996.

JONES, E. Synovial mesenchymal stem cells in vivo: potential key players for joint regeneration. **World Journal of Rheumatology**, v. 1, n. 1, p. 4, 2011.

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 and Rheumatism**, v. 58, n. 6, p. 1731–1740, 2008.

JONES, E. A.; 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 and Rheumatism**, v. 50, n. 3, p. 817–827, 2004.

JORGENSEN, C. Mesenchymal stem cells: uses in osteoarthritis. **Joint Bone Spine**, v. 80, p. 565–567, 2013.

KEEN, H. I.; CONAGHAN, P. G. Ultrasonography in osteoarthritis. **Radiologic Clinics of North America**, v. 47, n. 4, p. 581–594, 2009.

KIM, M.-J.; SON, M. J.; SON, M.-Y.; SEOL, B.; KIM, J.; PARK, J.; KIM, J. H.; KIM, Y.-H.; PARK, S. a; LEE, C.-H.; LEE, K.-S.; HAN, Y.-M.; CHANG, J.-S.; CHO, Y. S. Generation of human induced pluripotent stem cells from osteoarthritis patient-derived synovial cells. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 10, p. 3010–21, 2011.

KITAMURA, H.; OKUMURA, M.; SATO, F.; KIMOTO, K. Increased concentrations of protein gene product 9.5 in the synovial fluid from horses with osteoarthritis. **The Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 2, p. 115–123, 2001.

KITAMURA, H. P.; YANASE, H.; KITAMURA, H.; IWANAGA, T. Unique localization of protein gene product 9.5 in type B synoviocytes in the joints of the horse. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**: official Journal of the Histochemistry Society, v. 47, n. 3, p. 343–352, 1999.

KOCH, T. G.; BERG, L. C.; BETTS, D. H. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 49, p. 1000–1017, 2008.

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, p. 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.

KOGA, H.; MUNETA, T.; NAGASE, T.; NIMURA, A.; JU, Y. J.; MOCHIZUKI, T.; SEKIYA, I. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: Suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. **Cell and Tissue Research**, v. 333, p. 207–215, 2008.

KOYAMA, N.; OKUBO, Y.; NAKAO, K.; OSAWA, K.; FUJIMURA, K.; BESSHO, K. Pluripotency of mesenchymal cells derived from synovial fluid in patients with temporomandibular joint disorder. **Life Sciences**, v. 89, n. 19-20, p. 741–747, 2011.

KRASNOKUTSKY, S.; ATTUR, M.; PALMER, G.; SAMUELS, J.; ABRAMSON, S. B. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**, v. 16, p. S1–S3, 2008. Supplement, 3.

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, n. 8, p. 1–10, 2012.

KURTH, T.; HEDBOM, E.; SHINTANI, N.; SUGIMOTO, M.; CHEN, F. H.; HASPL, M.; MARTINOVIC, S.; HUNZIKER, E. B. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 1178–1189, 2007.

LACITIGNOLA, L.; CROVACE, A.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. **Veterinary Research Communications**, v. 32, p. 33–38, 2008.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; PEREGO, R.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: in vitro proliferative and multilineage potential assessment. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 9, p. 737–744, 2013.

LEE, C. M.; KISIDAY, J. D.; MCILWRAITH, C. W.; GRODZINSKY, A. J.; FRISBIE, D. D. Synoviocytes protect cartilage from the effects of injury *in vitro*. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 14, n. 1, p. 54, 2013.

LEE, D. H.; SONN, C. H.; HAN, S. B.; OH, Y.; LEE, K. M.; LEE, S. H. Synovial fluid CD34 - CD44 + CD90 + mesenchymal stem cell levels are associated with the severity of primary knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, p. 106–109, 2012a.

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. 2173–2186, 2012b.

LEPEULE, J.; BAREILLE, N.; ROBERT, C.; EZANNO, P.; VALETTE, J. P.; JACQUET, S.; BLANCHARD, G.; DENOIX, J. M.; SEEGER, H. Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the prevalence of developmental orthopaedic disease in limbs of French foals at weaning. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 89, p. 167–177, 2009.

LI, J.; HANSEN, K. C.; ZHANG, Y.; DONG, C.; DINU, C. Z.; DZIECIATKOWSKA, M.; PEI, M. Rejuvenation of chondrogenic potential in a young stem cell microenvironment. **Biomaterials**, v. 35, n. 2, p. 642–653, 2014.

LIZ, A.; ALVES, G.; ELISA, M.; VIEIRA, M.; PAULA, A.; BARREIRA, B.; HUSSNI, C. A.; WATANABE, M. J. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 650–655, 2009.

LOPEZ, M. J.; JARAZO, J. State of the art: stem cells in equine regenerative medicine. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 145–154, 2015.

LOVATI, A. B.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A.; RECORDATI, C.; BONACINA, E.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. **Veterinary Research Communications**, v. 35, p. 103–121, 2011.

MAIA, L.; VITA, B. de; MORAES, C. N.; DESTRO, F. C.; ALVARENGA, F. C. L.; AMORIM, R. M. Considerações Sobre a Obtenção, Processamento, Caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco mesenquimais em medicina equina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 359–373, 2013.

MAPP, P. I.; REVELL, P. A. Ultrastructural localisation of muramidase in the human synovial membrane. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 46, p. 30–37, 1987.

MARFE, G.; ROTTA, G.; DE MARTINO, L.; TAFANI, M.; FIORITO, F.; DI STEFANO, C.; POLETTINI, M.; RANALLI, M.; RUSSO, M. A.; GAMBACURTA, A. A new clinical approach: Use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses. **Life Sciences**, v. 90, n. 21-22, p. 825–830, 2012.

MATSUKURA, Y.; MUNETA, T.; TSUJI, K.; KOGA, H.; SEKIYA, I. Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 472, p. 1357–1364, 2014.

MAUMUS, M.; MANFERDINI, C.; TOUPET, K.; PEYRAFITTE, J. A.; FERREIRA, R.; FACCHINI, A.; GABUSI, E.; BOURIN, P.; JORGENSEN, C.; LISIGNOLI, G.; NOËL, D. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. **Stem Cell Research**, v. 11, n. 2, p. 834–844, 2013.

MCCARTHY, H. E.; BARA, J. J.; BRAKSPEAR, K.; SINGHRAO, S. K.; ARCHER, C. W. The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived

stromal cells as potential cell sources for cartilage repair in the horse. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 3, p. 345–351, 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.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996.

MCILWRAITH, C. Review Article Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease : a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, p. 473–482, 2005.

MCILWRAITH, C. W. Management of Joint disease in the sport horse. In: EQUINE RESEARCH NUTRITION CONFERENCE, 2010, Kentucky, USA. **Proceedings...** 2010. p. 61-81.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; RODKEY, W. G.; KISIDAY, J. D.; WERP, N. M.; KAWCAK, C. E.; STEADMAN, J. R. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. **Arthroscopy Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 27, n. 11, p. 1552–1561, 2011.

MOCHIZUKI, T.; MUNETA, T.; SAKAGUCHI, Y.; NIMURA, A.; YOKOYAMA, A.; KOGA, H.; SEKIYA, I. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 3, p. 843–853, 2006.

MOHANTY, N.; GULATI, B. R.; KUMAR, R.; GERA, S.; KUMAR, S.; KUMAR, P.; YADAV, P. S. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from equine umbilical cord blood. **Cytotechnology**, 2014.

MORITO, T.; MUNETA, T.; HARA, K.; JU, Y. J.; MOCHIZUKI, T.; MAKINO, H.; UMEZAWA, A.; SEKIYA, I. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. **Rheumatology**, v. 47, n. April, p. 1137–1143, 2008.

MORIYAMA, H.; KASASHIMA, Y.; KUWANO, A.; WADA, S. Anatomical location and culture of equine corneal epithelial stem cells. **Veterinary Ophthalmology**, v. 17, p. 106–112, 2014.

MORTELLARO, C. M. Pathophysiology of osteoarthritis. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 75–78, 2003. Supplement, 1.

MURATA, D.; MIYAKOSHI, D.; HATAZOE, T.; MIURA, N.; TOKUNAGA, S.; FUJIKI, M.; NAKAYAMA, K.; MISUMI, K. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 1, p. 53–61, 2014.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Review in translational hematology immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Library**, v. 110, n. 10, p. 3499–3506, 2008.

NIMURA, A.; MUNETA, T.; KOGA, H.; MOCHIZUKI, T.; SUZUKI, K.; MAKINO, H.; UMEZAWA, A.; SEKIYA, I. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 2, p. 501–510, 2008.

NÖTH, U.; RACKWITZ, L.; STEINERT, A. F.; TUAN, R. S. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 7-8, p. 765–783, 2010.

ORTH, P.; REY-RICO, A.; VENKATESAN, J. K.; MADRY, H.; CUCCHIARINI, M. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 7, p. 1–17, 2014.

PASCUCCI, L.; CURINA, G.; MERCATI, F.; MARINI, C.; DALL'AGLIO, C.; PATERNESI, B.; CECCARELLI, P. Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: towards the definition of minimal stemness criteria. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 3-4, p. 499–506, 2011.

PERONI, J. F.; BORJESSON, D. L. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, n. 2, p. 351–362, 2011.

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** (New York, N.Y.), v. 284, p. 143–147, 1999.

PRATHEESH, M. D.; GADE, N. E.; KATIYAR, A. N.; DUBEY, P. K.; SHARMA, B.; SAIKUMAR, G.; AMARPAL; SHARMA, G. T. Isolation, culture and characterization of

caprine mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 2, p. 313–319, 2013.

PRIETO, J. G.; PULIDO, M. M.; ZAPICO, J.; MOLINA, A. J.; GIMENO, M.; CORONEL, P.; ALVAREZ, A. I. Comparative study of hyaluronic derivatives: rheological behaviour, mechanical and chemical degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 63–69, 2005.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science** (New York, N.Y.), v. 276, p. 71–74, 1997.

RANERA, B.; LYAHYAI, J.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, F. J.; REMACHA, A. R.; BERNAL, M. L.; ZARAGOZA, P.; RODELLAR, C.; MARTÍN-BURRIEL, I. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 1-2, p. 147–154, 2011.

REED, S. A.; JOHNSON, S. E. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. **Journal of Cellular Physiology**, v. 215, p. 329–336, 2008.

REEF, V. B.; LAIM, D. A.; WHITTIER, M.; ALLAM, L. G. Joint ultrasonography. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 3, p. 256–267, 2004.

RENZI, S.; RICCÒ, S.; DOTTI, S.; SESSO, L.; GROLLI, S.; CORNALI, M.; CARLIN, S.; PATRUNO, M.; CINOTTI, S.; FERRARI, M. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: A clinical report. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 272–277, 2013.

REZZA, A.; SENNETT, R.; RENDL, M. Adult stem cell niches. **Cellular and Molecular Components**, v. 107, p. 333–372, 2014.

RIGGS, C. M. Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse. **Equine Veterinary Education**, v. 18, p. 100–112, 2010.

ROELOFS, A. J.; ROCKE, J. P. J.; DE BARI, C. Cell-based approaches to joint surface repair: A research perspective. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 7, p. 892–900, 2013.

ROZEMULLER, H.; PRINS, H.-J.; NAAIJKENS, B.; STAAL, J.; BÜHRING, H.-J.; MARTENS, A. C. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple

mammalian species using cross-reacting anti-human monoclonal antibodies. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 12, p. 1911–1921, 2010.

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

SALAMON, A.; JONITZ-HEINCKE, A.; ADAM, S.; RYCHLY, J.; MÜLLER-HILKE, B.; BADER, R.; LOCHNER, K.; PETERS, K. Articular cartilage-derived cells hold a strong osteogenic differentiation potential in comparison to mesenchymal stem cells in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 18, p. 2856–2865, 2013.

SANTHAGUNAM, A.; SANTOS, F. Dos; MADEIRA, C.; SALGUEIRO, J. B.; CABRAL, J. M. S. Isolation and ex vivo expansion of synovial mesenchymal stromal cells for cartilage repair. **Cytotherapy**, v. 16, n. 4, p. 440–453, 2014.

SCHNABEL, L. V.; FORTIER, L. A.; WAYNE MCILWRAITH, C.; NOBERT, K. M. Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? **Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 570–577, 2013.

SCHWINDT, BARNABÉ, M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, p. 13–19, 2005.

SEKIYA, I.; OJIMA, M.; SUZUKI, S.; YAMAGA, M.; HORIE, M.; KOGA, H.; TSUJI, K.; MIYAGUCHI, K.; OGISHIMA, S.; TANAKA, H.; MUNETA, T. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, p. 943–949, 2012.

SEO, J. P.; TANABE, T.; TSUZUKI, N.; HANEDA, S.; YAMADA, K.; FURUOKA, H.; TABATA, Y.; SASAKI, N. Effects of bilayer gelatin/ β -tricalcium phosphate sponges loaded with mesenchymal stem cells, chondrocytes, bone morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on osteochondral defects of the talus in horses. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 3, p. 1210–1216, 2013.

SETHE, S.; SCUTT, A.; STOLZING, A. Aging of mesenchymal stem cells. **Ageing Research Reviews**, v. 5, p. 91–116, 2006.

SHI, Z.; ZHAO, L.; QIU, G.; HE, R.; DETAMORE, M. S. The effect of extended passaging on the phenotype and osteogenic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 401, p. 155–164, 2015.

SHINTANI, N.; HUNZIKER, E. B. Chondrogenic differentiation of bovine synovium: bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor beta1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 6, p. 1869–1879, 2007.

SHIRASAWA, S.; SEKIYA, I.; SAKAGUCHI, Y.; YAGISHITA, K.; ICHINOSE, S.; MUNETA, T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: Optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, p. 84–97, 2006.

SMITH, M. D. The normal synovium. **The Open Rheumatology Journal**, v. 5, p. 100–106, 2011. Supplement, 1: M2.

SMITH, R. K. W.; KORDA, M.; BLUNN, G. W.; GOODSHIP, A. E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 99–102, 2003.

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

SOUSA, E. B. de; CASADO, P. L.; NETO, V. M.; EUGENIA, M.; DUARTE, L.; AGUIAR, D. P. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells : latest discoveries and therapeutic perspectives. **Stem cell Research & Therapy**, v. 5, n. 112, p. 1–6, 2014.

SPAAS, J. H.; BROECKX, S.; VAN DE WALLE, G. R.; POLETTINI, M. The effects of equine peripheral blood stem cells on cutaneous wound healing: a clinical evaluation in four horses. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 38, p. 280–284, 2013.

STEEL, C. M. Equine Synovial Fluid Analysis. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 24, p. 437–454, 2008.

STENDERUP, K.; JUSTESEN, J.; CLAUSEN, C.; KASSEM, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v. 33, p. 919–926, 2003.

STEWART, M. C. Cell-based therapies: current issues and future directions. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, n. 2, p. 393–399, 2011.

STEWART, M. C.; STEWART, A. A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, n. 2, p. 243–261, 2011.

STOCK, K. F.; HAMANN, H.; DISTL, O. Factors associated with the prevalence of osseous fragments in the limb joints of Hanoverian Warmblood horses. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 147–156, 2006.

SUN, Y.; ZHENG, Y.; LIU, W.; ZHENG, Y.; ZHANG, Z. Synovium fragment-derived cells exhibit characteristics similar to those of dissociated multipotent cells in synovial fluid of the temporomandibular joint. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–10, 2014.

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M.; KAWANO, S. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell and Tissue Research**, v. 312, p. 31–40, 2003.

TAYLOR, S. E.; CLEGG, P. D. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. **Veterinary Clinics of North America: equine practice**, v. 27, p. 263–274, 2011.

TAYLOR, S. E.; SMITH, R. K. W.; CLEGG, P. D. Review Article mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 2, p. 172–180, 2007.

TOUPADAKIS, C. A.; WONG, A.; GENETOS, D. C.; CHEUNG, W. K.; BORJESSON, D. L.; FERRARO, G. L.; GALUPPO, L. D.; LEACH, J. K.; OWENS, S. D.; YELLOWLEY, C. E. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 10, p. 1237–1245, 2010.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, A.; CATACCIO, C. R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, p. 361–373, 2011.

VAN LENT, P. L.; VAN DEN BERG, W. B. Mesenchymal stem cell therapy in osteoarthritis: advanced tissue repair or intervention with smouldering synovial activation? **Arthritis Research & Therapy**, v. 15, p. 112, 2013.

VAN WEEREN, P. R. Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 5, p. 248–258, 2006.

VAN WEEREN, P. R.; BARNEVELD, a. The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, p. 16–25, 1999.

VANDERPERREN, K.; SAUNDERS, J. H. Diagnostic imaging of the equine fetlock region using radiography and ultrasonography. Part 1: soft tissues. **The Veterinary Journal**, v. 181, n. 2, p. 111–122, 2009.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **TRENDS in Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 502–508, 2002.

VERFAILLIE, C. M.; PERA, M. F.; LANSDORP, P. M. Stem cells: hype and reality. **American Society of Hematology**, p. 369–391, 2002.

VIDAL, M. A.; ROBINSON, S. O.; LOPEZ, M. J.; PAULSEN, D. B.; BORKHSENIUS, O.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 8, p. 713–724, 2008.

WHITWORTH, D. J.; BANKS, T. A. Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 416–424, 2014.

WILKE, M. M.; VYDAM, D. .; NIXON, A. J. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, p. 913–925, 2007.

WRIGLEY, R. H. Ultrassonografia dos tendões, ligamentos e articulações. In: STASHAK, T. S. **Claudicações em equinos segundo Adams**. São Paulo: Roca, 2006. 100 p.

YANG, H.; PIDGORNA, A.; LOUTFY, M. R.; SHUEN, P. Effects of interruptions of controlled-rate freezing on the viability of umbilical cord blood stem cells. **Transfusion**, v. 55, p. 70–78, 2014.

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 and Tissue Research**, v. 327, p. 449–462, 2007.

YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R. A.; HUDSON, J.; FLOYD, J. A.; HAWKINS, K.; THOMAS, K.; AUSTIN, T.; EDWARDS, C.; CUZZOURT, J.; DUENZL, M.; LUCAS, P. A.; BLACK, A. C. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anatomical Record**, v. 264, p. 51–62, 2001.

ZHANG, S.; MUNETA, T.; MORITO, T.; MOCHIZUKI, T.; SEKIYA, I. Autologous synovial fluid enhances migration of mesenchymal stem cells from synovium of osteoarthritis patients in tissue culture system. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, p. 1413–1418, 2008.

ZHU, Y.; YUAN, M.; MENG, H. Y.; WANG, A. Y.; GUO, Q. Y.; WANG, Y.; PENG, J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 11, p. 1627–1637, 2013.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, a J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Apêndice A - Figura 1 - Fotomicrografias representativas do cultivo celular proveniente dos grupos LS e MS, durante a 3ª passagem

Análise da morfologia fibroblastóide e capacidade de aderência celular. Confluência de 80%. **A.** LS-H, **B.** LS-OCD, **C.** LS-OA, **D.** MS-H, **E.** MS-OCD e **F.** MS-OA. Análise em microscopia invertida com objetiva de 10x

APÊNDICE B

Apêndice B - Tabela 3 - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos LS pela técnica de citometria de fluxo para os marcadores CD90 e CD44

Animal	CD90+CD44-			CD90-CD44+			CD90-CD44-			CD90+CD44+		
	LS H	LS OCD	LS OA	LS H	LS OCD	LS OA	LS H	LS OCD	LS OA	LS H	LS OCD	LS OA
1	90,9	37,5	49,7	0,09	2,98	1,78	8,54	21,7	6,04	0,45	37,9	42,5
2	63,5	85	70,6	1,3	0,02	1	19,2	13,6	14,8	15,9	1,41	13,6
3	46	72,5	40,4	2,73	0,14	5,24	18,1	3,58	36,3	33,2	23,7	18
4	40,7	82,6	24,8	2,22	0,04	4,43	47,8	15	65	9,31	2,38	5,79
5	85,9	73,6	60,4	0,18	0,58	1,48	12,7	19,5	26,9	1,3	6,31	11,2
6	94,4	64	20,8	0,16	0,45	13,8	4,07	18	45,6	1,39	17,5	19,8
7	79,1	27,2	67,6	0,06	13,3	0,39	20,3	21,7	26,4	0,47	37,8	5,58
8	87,4	50,7	54,2	0,04	1,18	0,3	6,49	13,3	45,1	6,04	34,8	0,38
9	54,8	20,6	90	4,62	11,6	0,04	31,6	13,1	7,55	9,02	54,7	2,46
10	61,1	88,9	38,8	0,41	0,02	0,16	37,6	10,4	60,6	0,83	0,69	0,51
11	65,3	66,4	69,5	1,32	0,06	0,74	27,6	33,2	16,4	5,81	0,34	13,3
12	24,9	42,6	49,2	0,8	1,98	1,79	73,5	9,93	27,1	0,76	45,5	22
13	26,4	29,1	75	2,55	5,91	0,5	68	43	20,4	3,01	22,1	4,04
14	87,7	56,8	20,2	0,04	2,36	58,1	6,69	21,6	10,6	5,54	19,3	11
15		80,4	23,1		0,02	71,9		16,3	2,85		3,27	2,11
16		46,4	15,5		0,51	66,1		51,7	11,8		1,47	6,59
17		25,8			13,8			44,1			16,3	
18		17,7			21,8			47,7			12,8	
19		23,6			4,22			66,6			5,52	
20		0,2			0,46			99,4			0	
21		22,4			2,32			72			3,28	
Média	64,9 a	48,3 b	48,1 b	1,18 a	3,98 b	14,2 c	27,3	31,2	26,5	6,65 a	16,5 b	11,2 b
EP	6,4	5,7	5,7	0,37 A	1,31	6,43	5,98	5,4	4,8	2,37	3,67	2,7

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença estatística dentro do grupo LS (P<0,05)

APÊNDICE C

Apêndice C - Tabela 4 - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos MS pela técnica de citometria de fluxo para os marcadores CD90 e CD44

Animal	CD90+CD44-			CD90-CD44+			CD90-CD44-			CD90+CD44+		
	MS H	MS OCD	MS OA	MS H	MS OCD	MS OA	MS H	MS OCD	MS OA	MS H	MS OCD	MS OA
1	97,2	28,2	37,9	0,26	3,33	7,53	1,37	7,82	38,1	1,18	60,7	16,4
2	88,5	39,6	17,4	0,18	1,19	29,4	9,97	8,44	28,3	1,39	50,7	24,9
3	68,8	19,7	28,2	0,4	1,12	10,1	29	77,6	29,8	1,8	1,58	31,9
4	89,5	12,4	79	0	9,24	0,3	10,4	71,4	15,7	0,18	6,94	5
5	85,1	81,3	40,4	0,25	0,67	0,1	11,8	16,9	59,3	2,83	1,18	0,15
6	78,5	72,9	67,8	0,12	1,5	0,14	18,1	24,5	29	3,27	1,18	3
7	86,8	71,4	68,6	0	0	0,88	12,5	28,6	28,6	0,7	0	1,99
8	92,6	20	16,6	0	1,64	15,7	6,7	75	57,9	0,7	3,34	9,75
9	45,4	5,63	41,7	3,41	3,94	4,56	39,3	88,6	38,9	11,9	1,82	14,8
10	92,8	50,7	20,8	0	0,04	16,7	6,78	49,3	53,4	0,47	0,09	9,13
11	84,7	30,5	25,3	0,03	0,53	8,75	15,1	68	60	0,12	0,95	6,03
12	62,7	93,5		0	0,03		36,6	5,58		0,69	0,87	
13	40,3	15,2		0,96	0,66		57,3	83,6		1,51	0,56	
14	13,6	26,3		11,7	6,91		72,2	63,7		2,48	3,06	
15	0,56	54,6		0,14	3,11		99	33		0,27	9,23	
16	39,1	22,2		6,4	0,79		48,8	76,5		5,7	0,54	
Média	66,6 a	40,2 b	40,3 b	1,49 a	2,17 a	8,56 b	29,7	48,7	39,9	2,2 a	8,9 ab	11,2 b
EP	7,52	6,79	6,67	0,8	0,66	2,76	6,91	7,53	4,63	0,74	4,63	3,02

Letras minúsculas distintas na mesma linha denotam diferença estatística dentro do grupo MS (P<0,05)

APÊNDICE D

Apêndice D - Tabela 5 - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos LS pela técnica de citometria de fluxo para os marcadores CD105 e CD34

Animal	CD105+CD34-			CD105-CD34+			CD105-CD34-			CD105+CD34+		
	LS H	LS OCD	LS OA	LS H	LS OCD	LS OA	LS H	LS OCD	LS OA	LS H	LS OCD	LS OA
1	0	0	0	0,02	1,33	1,51	100	87	95,8	0	11,7	2,66
2	0	0,1	0	0	0	0	100	99,9	100	0	0	0
3	0	0	0	0	0,26	0	100	99,4	100	0	0,35	0
4	0	0	0	0,14	0	0,02	99,8	100	100	0,09	0	0,02
5	0	0	0	0	0	0,02	99,8	100	100	0,06	0	0
6	0	0	0	0	0	0,08	100	100	99,7	0,05	0	0,21
7	0	0	0	0	0,23	0	100	99,4	100	0	0,4	0
8	1,38	0	0	0	0	0	99,6	100	100	0	0	0
9	0,02	0	0	0	0	0	99,9	100	99,8	0	0	0,17
10	0,04	0,02	0,07	0	0	0	99,9	100	99,9	0	0	0
11	0,51	0	0,45	0,02	0	0	99,4	100	99,1	0,06	0	0,47
12	1,1	0,02	1,72	0	0	0	98,8	100	96,1	0,13	0	2,21
13		0	0		0	0		93,3	100		6,67	0
14		0	0,6		0,14	0,02		99,8	99,4		0,02	0
15		0,02	0,07		0	0,09		99,9	99,8		0	0,04
16		0,52	1,11		0,02	0		99,1	98,7		0,31	0,16
17		1,85			0			98,1			0,07	
18		0,67			0			99,3			0,02	
19		1,17			0			98,5			0,32	
20		0,15			0			99,7			0,13	
21		0,17			0			99,8			0,08	
Média	0,25	0,22	0,25	0,02	0,09	0,11	99,7	98,7	99,3	0,03	0,96	0,37
EP	0,14	0,10	0,13	0,01	0,06	0,09	0,14	0,77	0,34	0,01	0,62	0,2

Dados não diferem estatisticamente (P>0,05)

APÊNDICE E

Apêndice E - Tabela 6 - Valores percentuais individuais dos animais dos grupos MS pela técnica de citometria de fluxo para os marcadores CD105 e CD34

Animal	CD105+CD34-			CD105-CD34+			CD105-CD34-			CD105+CD34+		
	MS H	MS OCD	MS OA	MS H	MS OCD	MS OA	MS H	MS OCD	MS OA	MS H	MS OCD	MS OA
1	0	0,12	0	0	0	0,4	100	99,8	99,3	0	0,12	0,27
2	0	0	0,15	0	0	0	100	99,6	99,8	0	0,43	0,07
3	0	0	0,12	0	0,02	0,06	100	100	99,8	0	0,02	0
4	0	0	0	0	0,33	0	99,9	99,6	99,9	0,06	0,12	0,03
5	0	0	0	0,08	1,09	0	99,9	97,8	100	0,04	1,09	0
6	0	0	0,06	0	0	0	100	100	99,8	0	0	0,12
7	0,06	3,24	1,62	0	0	0	99,9	96,3	98,4	0	0,46	0,02
8	0	0,02	0,45	0,06	0,14	0	99,9	99,8	99,1	0,02	0,08	0,45
9	0,02	0	0,18	0	0	0	99,9	100	99,7	0	0	0,11
10	0	0	1,27	0	0,01	0	99,9	99,9	98,6	0,02	0	0,1
11	0,02	0	0,09	0	0	0	99,9	100	99,9	0	0	0
12	0	0		0	0		99,9	100		0,02	0	
13	3,41	0,51		0,08	0		96,4	99,5		0,08	0	
14	0,41	1,45		0	0,03		99,5	98,2		0,06	0,3	
15	0,3	0,29		0,04	0		99,7	99,7		0	0,05	
16	0,19	0,15		0,05	0		99,7	99,9		0,05	0	
Média	0,28	0,36	0,36	0,02	0,10	0,04	99,7	99,4	99,4	0,02	0,17	0,11
EP	0,21	0,21	0,17	0,01	0,07	0,04	0,22	0,26	0,17	0,01	0,07	0,04

Dados não diferem estatisticamente (P>0,05)

APÊNDICE F

Apêndice F - Figura 2 - Fotomicrografias representativas da caracterização celular dos grupos LS e MS pela técnica de imunocitoquímica

Análise das populações imunocoradas positivamente para anticorpos anti-lisozima, anti-PGP 9.5 e PCNA, demonstrando a presença de sinoviócitos A, B e proliferação celular, respectivamente. Fotomicrografias à direita demonstrando controle negativo das populações respectivas. Análise em microscopia óptica, com aumento de 20x. **A.** LS-H (anti-lisozima), **B.** MS-H (anti-lisozima), **C.** LS-H (anti-PGP 9.5), **D.** MS-H (anti-PGP 9.5), **E.** LS-H (anti-PCNA) e **F.** MS-H (anti-PCNA)

APÊNDICE G

Apêndice G - Figura 3 - Fotomicrografias representativas da análise por imunocitoquímica dos grupos LS e MS

Imunocitoquímica positiva para anti-vimentina (A-E) e negativa para citoqueratina (G-L), nanog (M, N, O) e oct 4 (P, Q, R). Objetiva de 20x.

A. LS-H, B. LS-OCD, C. LS-OA, D. MS-H, E. MS-OCD, F. MS-OA. G. LS-H, H. LS-OCD, I. LS-OA, J. MS-H, K. MS-OCD, L. MS-OA M. LS-H, N. LS-OCD, O. LS-OA, P. LS-H, Q. LS-OCD, R. LS-OA

APÊNDICE H

Apêndice H - Figura 4 - Fotomicrografias representativas do grupo LS após diferenciação osteogênica

Indução do grupo LS demonstrando coloração positiva para Alizarin Red, confirmando o potencial de diferenciação, através da matriz de cálcio coradas em vermelho. **A.** LS-H, **B.** LS-H controle, **C.** LS-OCD, **D.** LS-OCD controle, **E.** LS-OA, **F.** LS-OA controle. Análise em microscopia invertida, objetivas de 10x

APÊNDICE I

Apêndice I - Figura 5 - Fotomicrografias representativas do grupo MS após a diferenciação osteogênica

Indução do grupo MS demonstrando coloração positiva para Alizarin Red, confirmando o potencial de diferenciação, através da matriz de cálcio coradas em vermelho. **A.** MS-H, **B.** MS-H controle. **C.** MS-OCD, **D.** MS-controle, **E.** MS-OA, **F.** MS-OA controle. Análise em microscopia invertida, objetiva de 10x

APÊNDICE J

Apêndice J - Figura 6 - Fotomicrografias representativas da diferenciação adipogênica dos grupos LS e MS

Indução para linhagem adipogênica demonstrando coloração positiva para Oil Red O, confirmando gotículas lipídicas. Diferenciadas – **A.** LS-H; **B.** LS-OCD; **C.** LS-OA; **G.** MS-H; **H.** MS-OCD; **I.** MS-OA. Grupo controle – **D.** LS-H; **E.** LS-OCD; **F.** LS-OA; **J.** MS-H; **K.** MS-OCD; **L.** MS-OA

APÊNDICE K

Apêndice K - Figura 7 - Fotomicrografias representativas da diferenciação condrogênica do grupo LS

Confirmação da capacidade de diferenciação através da observação de matriz de proteoglicanos corados em Azul de Toluidina (**A-C**), Alcian Blue (**D-F**) e HE (**G-I**). (**LS-H** - A, D, G); (**LS-OCD** - B, E, H); (**LS-OA** - C, F, I). Análise em microscopia óptica em aumento de 20x.

APÊNDICE L

Apêndice L - Figura 8 - Fotomicrografias representativas da diferenciação condrogênica no grupo MS

Confirmação da capacidade de diferenciação condrogênica demonstrada através da matriz de proteoglicanos corados em Azul de Toluidina (**A-C**), Alcian Blue (**D-F**) e HE (**G-I**) (MS-H - A, D, G); (MS-OCD - B, E, H); (MS-OA - C, F, I). Análise em microscopia óptica em aumento de 20x

APÊNDICE M

Apêndice M - Figura 9 - Fotomicrografias representativas do teste de potencial tumorigênico após aplicação por via subcutânea nos camundongos Balb-C^{nu/nu}

A, B. Camundongos que receberam implante de células das fontes de LS e MS (A, B). **A.** Inoculação de células de LS-H, **B.** Inoculação de células de MS-H. **C-D.** tecido subcutâneo. **E.** tecido renal. **F.** baço. **G.** pulmão. **H.** fígado. Lâminas coradas em HE, com objetiva de 1000 x

APÊNDICE N

Apêndice N – Figura 10 - Fotos radiográficas representativas das articulações radiocárpicas antes e após tratamento intra-articular com cultura de células do LS-H

Radiografia dorsopalmar (A e C) e dorsolatero-palmaromedial (B e D), demonstrando área lesionada (círculo) após duas biópsias de 5 mm em cada articulação radiocarpiana. **A-B.** Radiografia momento (D0) anterior a aplicação de células de LS-H. **C-D.** Radiografias momento (D90) após a aplicação de células de LS-H

APÊNDICE O

Apêndice O - Figura 11 - Fotos representativas do exame ultrassonográfico das articulações radiocárpicas antes e após tratamento por via intra-articular da cultura de células do LS

Área lesionada (círculo) após biópsias. **A.** D0. **B e C.** D90. Mensurações em diâmetro e profundidade