

JOICE FÜLBER

Comparação do potencial condrogênico de células-tronco
mesenquimais de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de
equinos

São Paulo

2019

JOICE FÜLBER

**Comparação do potencial condrogênico de células-tronco
mesenquimais de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de
equinos**

São Paulo

2019

JOICE FÜLBER

**Comparação do potencial condrogênico de células-tronco
mesenquimais de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de
equinos**

Tese 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 Doutor em
Ciências.

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

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

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3790
FMVZ

Fülber, Joice

Comparação do potencial condrogênico de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de equinos / Joice Fülber. – 2019.
147 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Terapia celular. 2. Condrócitos. 3. Agrecam. 4. Queratam sulfato. I. Título.

BIOÉTICA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comparação do potencial condrogênico de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de equinos", protocolada sob o CEUA nº 1143080617 (ID 005387), sob a responsabilidade de **Raquel Yvone Arantes Baccarin e equipe; Joice Fülber** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2018.

We certify that the proposal "Comparison of the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells of synovial fluid, bone marrow and adipose tissue of horses", utilizing 10 Equines (males and females), protocol number CEUA 1143080617 (ID 005387), under the responsibility of **Raquel Yvone Arantes Baccarin and team; Joice Fülber** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [07/2017](#) a [03/2019](#)

Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [0 a 15 anos](#)

N: [10](#)

Linhagem: [Sem raça definida](#)

Peso: [250 a 500 kg](#)

Local do experimento: Laboratório de Cultivo celular - departamento de clínica veterinária

São Paulo, 17 de agosto de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FÜLBER, Joice

Título: Comparação do potencial condrogênico de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de equinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Johnys, meu amor.

Obrigada por toda a compreensão nos dias difíceis.

Obrigada por me apoiar e levantar meu astral quando eu pensava que estava tudo perdido.

Essa vitória também é sua, pois sem o seu incentivo e paciência, não sei se eu conseguiria.

As palavras escritas não conseguem expressar o quanto você é importante para mim.

Obrigada, amor meu.

Aos meus pais, Irlene e Jorge,

Em primeiro lugar por me ensinarem a não ter medo das adversidades da vida e lutar para conquistar meus objetivos.

Por me ensinar o que é respeito e dignidade.

Obrigada pela confiança e todo amor.

Ao meu eterno amigo, Lion.

DEDICATÓRIA

Uma página para o cavalo que conquistou meu coração ao longo desse estudo.
Me senti mais Médica Veterinária, embora com um toque de nervosismo por ter muito
carinho por ele
Balu...essa página toda sua.

AGRADECIMENTOS

Nesse tópico serei menos formal, afinal de contas, aqui será mencionado o nome de pessoas que convivi ao longo de alguns anos e que tenho muito carinho.

A partir dessa conquista, considero que tenho um forte sentimento de alívio, felicidade, amadurecimento pessoal e profissional, por isso, peço licença para tentar expressar em palavras o tamanho do significado que têm a palavra AGRADECER.

Em primeiro lugar, agradeço à DEUS.

Aos animais que passaram por esse Projeto de Pesquisa, alguns com muita paciência e cooperativos, outros nem tanto, mas todos foram muito importantes para o desenvolvimento desse estudo. Eles foram os atores principais nesse cenário pela busca de possibilidades terapêuticas.

Aos Professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por proporcionar excelência em ensino para nós Pós-graduandos.

Às Professoras Maria Cláudia, mais conhecida como Macau e a Professora Raquel, pela excelente atuação na coordenação da Pós-graduação da Clínica Veterinária.

Às Professoras Alice Della Libera e Marcia Gomes, pela inovação nos processos que concernem as atividades obrigatórias dos pós-graduandos durante atuação na coordenação da Pós-graduação da Clínica Veterinária.

Aos meus colegas de Pós-graduação, pelo ótimo convívio, conversas e por toda ajuda, vinda durante a realização dos ensaios nos laboratórios ou Hospital Veterinário, ou até mesmo aquelas pequenas ou longas (no meu caso) conversas nos arredores da Faculdade, nos corredores do Departamento de Clínica Médica, ou, seja também no Hospital Veterinário.

À Núbia que me ensinou como realizava às coletas de medula óssea e tecido adiposo e depois de alguns anos, enfim, ela foi incorporada à equipe “Raquelzetes”, equipe que tenho maior orgulho de pertencer e que mencionarei a seguir:

Em especial, aos meus colegas que representam o bordão “Raquelzetes”: Fernanda, Eric, Sarah, Cynthia e “menina” Ângela (que agora é residente, mas vestiu a camisa “Raquelzetes” como aluna de Iniciação Científica). Cada um de vocês contribuiu do seu jeito e no seu tempo na realização desse trabalho.

Ainda na seção “Raquelzetes”, quero demonstrar minha eterna gratidão por ter convivido com essas pessoas. A ênfase agora é para discorrer um pouquinho das minhas coletas. Lembro que

foram dias mais sérios por ter tanto trabalho pela frente, mas que embora houvesse a necessidade de seriedade, não fomos impedidos de realizar as coletas em um clima muito agradável e por muitas vezes engraçados com direito à música, que, de vezes em quando o Eric colocava dizendo que representava as minhas coletas – Dig-Dig-Joy – (Sandy & Junior), apenas por me apelidarem de “Djoi”. Isso tudo parece bem bobo, mas confesso que foi engraçado e no fundo, podemos levar as coisas sérias de maneira mais serena.

À Sofia Cicolo. Não posso deixar de agradecer você por tudo que fez para me ajudar ao longo do meu Doutorado. Quantas histórias temos para contar, hein? Pois é, eu poderia dizer que nossa amizade me surpreendeu positivamente. Sabe quando não esperamos a ajuda e ela vem de uma pessoa inesperada? Isso ocorreu e saiba que não foi em apenas um importante caso isolado, que ficou conhecido como equipe “azul de metileno” ou equipe “Balu”, mas em alguns outros momentos da vida. Levarei nossa amizade para todo o sempre.

A todos os Professores que convivo quase que diariamente, pelos ensinamentos e atenção.

Em especial ao Professor Luis Claudio Lopes Correia da Silva, por acreditar nas propriedades do tratamento com células-tronco mesenquimais e indicar a terapêutica, permitindo assim, que isso seja concretizado.

À professora Carla Belli. Uma pessoa iluminada, cheia de paciência e humildade. Obrigada pelas suas explicações e boas conversas, com pitadas de conselhos.

À Professora Cristina Massoco, pela enorme ajuda com nosso grupo de Pesquisa.

À Professora Denise Saretta Schwartz, pelo enorme apoio nos momentos mais difíceis da minha vida.

A todos os residentes do HOVET:

Carolzinha, Neto, Anderson, Alessandra, Yumi, Paula, Tati, Kauê e Manu. Obrigada pela convivência harmônica que tivemos durante esse período.

À Professora Ana Liz Garcia Alves, que cedeu o protocolo de isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (inclusive, já com exemplos dos cálculos da collagenase para digestão do tecido).

À Ana Lúcia por me ensinar como realizar o isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo, depois de tanto sofrimento e dificuldade com o cultivo dessa fonte.

Ao enfermeiro do Serviço de Clínica, Marcos Alves, também conhecido por Marquinhos. Obrigada pelo ótimo convívio, ajuda e paciência.

Ao enfermeiro Cícero, que não mede esforços para ajudar em tudo que precisamos no HOVET/FMVZ-USP.

Aos funcionários Gervásio, Rosendo e Felipera, por todo o esforço nos cuidados com os animais.

Ao Geraldo e agora, ao Elias por ajudar na preservação das células-tronco mesenquimais ao buscar nitrogênio líquido de tempos em tempos.

Às técnicas do laboratório do departamento de clínica da FMVZ/USP, Maria Helena, Claudia e Clara por me aguentarem praticamente todos os dias “tagarelando” por ali, como eu dizia... por vezes sentada no divã do laboratório.

A todos os funcionários da FMVZ/USP.

Agradeço ao André Luiz da Cunha, pelos ensinamentos de algumas técnicas realizadas nesse estudo, em especial na fase do estudo piloto.

Agradeço ao Renan Pelluzi Cavalheiro, por me ensinar a técnica de imunofluorescência nos meus “pequenos” microesferoides.

Às técnicas do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, Aline, Elza e todas as outras que sempre responderam as minhas dúvidas com muito apreço.

À minha amiga Francene, pelo apoio e incentivo de sempre.

Espero ter lembrado de todas as pessoas que me ajudaram nessa etapa da minha vida.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

E por fim, agradeço ao GATO...nomeado de Feliz, que apareceu na minha vida e de certa forma, trouxe felicidade para a minha casa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Em especial, a Professora Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

Primeiramente pela confiança e paciência.

Sua orientação, explicações e ensinamentos me permitiram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Tenho muita admiração pela profissional que é e tenho muito orgulho de ter sido sua orientada ao longo desses anos.

À Dr^a. Yara Michelacci,

Serei eternamente grata pela confiança e por todas as suas explicações e ensinamentos. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório e permitir a concretização desse trabalho.

EPÍGRAFE

Se a vida não ficar mais fácil, fique mais forte
(autor desconhecido)

RESUMO

FÜLBER, J. **Comparação do potencial condrogênico de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de equinos.** [Chondrogenic potential comparison of mesenchymal stem cells from synovial fluid, bone marrow and adipose tissue from equines]. 2019. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) representam uma terapia promissora no tratamento das enfermidades articulares dos equinos. As características de imunomodulação e possível efeito regenerativo as qualificam para essa finalidade. Entretanto, ainda não foi estabelecida qual fonte de CTMs é a mais indicada para originar estrutura cartilagínea hialina em processos de regeneração. Este estudo comparou o potencial condrogênico das CTMs derivadas de líquido sinovial (CTMs-LS), medula óssea (CTMs-MO) e tecido adiposo (CTMs-AD) de equinos, por meio da avaliação da síntese de agregam. Para tanto, 10 cavalos foram doadores de líquido sinovial (LS), medula óssea (MO) e de tecido adiposo (AD). As CTMs foram extraídas dessas três fontes, cultivadas e diferenciadas em condrócitos a partir de duas metodologias. No primeiro método utilizou-se cultura em *pellets* dentro de tubos cônicos, resultando em esferoides. O segundo método foi feito a partir da exposição das células à nanopartículas formando cultura tridimensional, originando microesferoides. A diferenciação condrogênica foi induzida com meio comercial em ambos os métodos. A extração de proteoglicano foi realizada e a concentração de agregam foi quantificada por ELISA e como fator de correção as proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de biureto modificado. *Immunoblotting* foi realizado para identificar agregam e queratam sulfato nos esferoides e para os microesferoides foi realizado imunofluorescência. As células em cultura, oriundas das diferentes fontes, demonstraram capacidade de aderência ao plástico e aparência fibroblastoide, confirmando característica e morfologia de CTMs. Ambas as metodologias proporcionaram diferenciação condrogênica. As concentrações das proteínas solúveis, agregam e o peso úmido foram maiores nos esferoides oriundos das CTMs-MO em comparação aos de CTMs-AD ($P < 0.05$) e as CTMs-LS não denotaram diferença estatística entre as duas fontes ($P > 0.05$). No entanto, as concentrações das razões agregam/proteínas solúveis, a razão entre proteína solúvel por peso úmido e agregam por peso úmido não apresentaram diferença estatística entre as fontes ($P > 0.05$). Agregam e queratam sulfato foram identificados nos esferoides oriundos das três fontes, demonstrados pela técnica de *Immunoblotting*. Nos microesferoides, as concentrações de

proteínas solúveis foram maiores naqueles derivados de CTMs-AD em comparação às de CTMs-LS e CTMs-MO ($P < 0.05$). Já as concentrações de agregam foram superiores nos microesferoides derivados de CTMs-LS em relação às CTMs-MO e não diferiram estatisticamente das CTMs-AD. A razão do agregam por proteínas solúveis diferiu estatisticamente, demonstrando superioridade das CTM-LS e CTMs-AD ao comparar com as CTMs-MO. Os microesferoides de todas as fontes expressaram agregam e queratam sulfato por imunofluorescência confocal. Conclui-se que as CTMs derivadas das três fontes produzem agregam. Os esferoides de CTMs-AD produzem menor rendimento, mas desempenham eficiência igual às de CTMs-LS e CTMs-MO, confirmados pelas razões de agregam por proteínas solúveis. Já em ambiente tridimensional por meio de nanopartículas biocompatíveis, as CTMs-LS e CTMs-AD demonstraram superioridade condrogênica. Por fim, as três fontes podem ser utilizadas em tratamentos intra-articulares, já em conjunto com biomateriais ou *scaffolds* deve-se recomendar a utilização de CTMs-LS ou CTMs-AD.

Palavras chave: Terapia celular. Condrócitos. Agregam. Queratam sulfato.

ABSTRACT

FÜLBER, J. **Chondrogenic potential comparison of mesenchymal stem cells from synovial fluid, bone marrow and adipose tissue from equines.** [Comparação do potencial condrogênico de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de equinos]. 2019. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Mesenchymal stem cells (MSCs) represent a promising therapy for treatment of joint disorders in horses. They are qualified for this purpose because of the immunomodulation characteristics and possible regenerative effect. However, it has not yet been established which source of MSCs is the most indicated to create hyaline cartilage structure in regeneration processes. This study compared the chondrogenic quality of the MSCs derived from synovial fluid (MSCs-SF), bone marrow (MSCs-BM) and adipose tissue (MSCs-AT) of horses, through the evaluation of the aggrecan synthesis. For this purpose, 10 horses were donors of synovial fluid (SF), bone marrow (BM) and adipose tissue (AT). The MSCs were extracted from these three sources, cultured and differentiated into chondrocytes from two methodologies. In the first method, pellets were cultured inside conical tubes, resulting in spheroids. The second method was made by exposing of the cells to nanoparticles forming a three-dimensional culture, originating microspheres. Chondrogenic differentiation was commercially induced in both methods. Proteoglycan extraction was performed and aggrecan concentration in the spheroids and microspheres was quantified by ELISA and the soluble proteins were quantified by modified biuret method as a correction factor. Immunoblotting was performed to identify aggrecan and keratan sulfate on spheroids and in the microspheres by high resolution confocal microscopy immunofluorescence. Cells in culture from different sources showed ability to adhere to plastic and a fibroblastic appearance, confirming the characteristic and morphology of MSCs. Both methodologies provided chondrogenic differentiation. Concentrations of the soluble proteins, aggrecan and wet weight were higher in the spheroids derived from the MSCs-BM compared to the MSCs-AT ($P < 0.05$) and the MSCs-SF showed no statistical difference between the two sources ($P > 0.05$). Although, the ratio between aggrecan/soluble proteins concentration, wet weight soluble protein and wet weight aggrecan showed no significant difference ($P > 0.05$). Aggrecan and keratan sulfate were identified in the spheroids from the three sources, demonstrated by the Immunoblotting technique. In the microspheres, soluble proteins

concentrations were higher in those derived from MSCs-AT compared to MSCs-SF and MSCs-BM ($P < 0.05$). However, the concentrations of aggrecan were higher in the microspheres derived from MSCs-SF in relation to the MSCs-BM and did not differ statistically from the MSCs-AT. Soluble protein and aggrecan ratio differed statistically, demonstrating superiority of MSCs-SF and MSCs-AT when compared to the MSCs-BM. Microspheres from all sources expressed aggrecan and keratan sulfate by confocal immunofluorescence. It is concluded that the MSCs derived from the three sources produce aggrecan. The spheroids of MSCs-AT had lower productivity but perform efficiency equal to those of MSCs-SF and MSCs-BM, that being confirmed by the aggrecan and soluble proteins ratio. The MSCs-SF and the MSCs-AT demonstrate chondrogenic superiority in three-dimensional environment using biocompatible nanoparticles. Finally, all three sources can be used in intra-articular treatments. In conjunction with biomaterials or scaffolds, the use of MSCs-SF or MSCs-AT should be recommended.

Keywords: Cellular therapy. Chondrocytes. Aggrecan. Keratan sulfate.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Tabela 5 - Valores da concentração individual das variáveis estudadas nos esferoides	141
Apêndice B - Tabela 6 - Efeito da fonte de CTMs induzidas em microesferoides	143
Apêndice C - Tabela 7 - Efeito do tempo das CTMs induzidas em microesferoides.....	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da articulação sinovial e esquema da organização da cartilagem articular de equino	43
Figura 2 - Organização molecular da matriz extracelular da cartilagem articular	45
Figura 3 - Representação esquemática da família de proteoglicanos ricos em leucina.....	50
Figura 4 - Apresentação esquemática de uma molécula de agrecam	53
Figura 5 - Representação dos sítios de clivagem nos domínios do agrecam de equino	56
Figura 6 - Esquema da estrutura do Queratam sulfato.	58
Figura 7 - Estrutura complexa do Queratam sulfato I e II (KS I e KS II)	59
Figura 8 - Coleta de medula óssea e agulha tipo Jamshidi para coleta de medula óssea	68
Figura 9 - Imagem representativa das coletas de tecido adiposo nos equinos.	69
Figura 10 - Imagem representativa das células-tronco mesenquimais em cultura.	81
Figura 11 - Representação das lâminas de eletroforese em gel de agarose para as amostras de agrecam 1 e 2 de equino.....	84
Figura 12 - Foto representativa da detecção de agrecam por Immunoblotting.	88
Figura 13 - Foto representativa da identificação do agrecam por immunoblotting.....	89
Figura 14 - Foto representativa da detecção de queratam sulfato por Immunoblotting.	89
Figura 15 - Representação dos microesferoides e seus dias de diferenciação condrogênica.....	90
Figura 16 - Imagem representativa da imunofluorescência dos microesferoides obtidos de CTMs derivadas do líquido sinovial	95
Figura 17 – Imagem representativa da imunofluorescência dos microesferoides obtidos de CTMs derivadas da medula óssea.....	96
Figura 18 – Imagem representativa da imunofluorescência dos microesferoides obtidos de CTMs derivadas do tecido adiposo.....	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Média e mediana dos pesos úmidos dos esferoides das fontes de CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo	82
Gráfico 2 -	Média e mediana do total de proteínas solúveis das fontes de CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo	83
Gráfico 3 -	Média e mediana da concentração de agregam produzido pelas CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo	85
Gráfico 4 -	Média e mediana da relação de agregam por proteínas solúveis das CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo	86
Gráfico 5 -	Média e mediana da razão das proteínas solúveis por peso úmido do esferoide das CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo.....	86
Gráfico 6 -	Média e mediana da razão das proteínas solúveis por peso úmido dos esferoides das CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo.	87
Gráfico 7 -	Média e mediana da concentração total das proteínas solúveis das diferentes fontes de CTMs.....	92
Gráfico 8 -	Média e mediana da concentração de agregam das diferentes fontes de CTMs	92
Gráfico 9 -	Média e mediana da relação do agregam por proteínas solúveis dos microesferoides	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das médias e erro padrão das variáveis analisadas nos esferoides.....	87
Tabela 2 - Efeito de interação entre a fonte de células e o tempo de diferenciação.....	91
Tabela 3 - Média e erro padrão relacionada à comparação do agregam, total de proteínas solúveis e a razão entre ambas das diferentes fontes de CTMs.....	93
Tabela 4 - Média e erro padrão da comparação do efeito do tempo de diferenciação condrogênica.....	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Citocinas secretadas por células-tronco mesenquimais e as células-alvo correspondentes.....	35
Quadro 2 - Identificação dos animais doadores de CTMs.....	66

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

3D	Tridimensional
AAEP	Associação Americana de Veterinários de Equinos
AD	Tecido adiposo
ADAMTS	Agrecanases
AH	Ácido hialurônico
AGC	Agrecam
AGC-1	Gene que codifica o agrecam
Asn-Phe	L-fenilalanina e L-asparagina
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BMP-2	Proteína morfogênica 2
BSA	Albumina sérica bovina
CCL	Quimiocinas da família CC
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
CD44	Glicoproteína receptor de ácido hialurônico
CD90	Thy-1: expressa em células multipotentes
CD105	Endogлина: 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
CLIP	Proteína da camada intermédia da cartilagem
CO ₂	Dióxido de carbono
COMP	proteína oligomérica da matriz da cartilagem (<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>)
Col	Colágeno

CS	Condroitim sulfato
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTMs	Células-tronco mesenquimais
DMEM/F12	<i>Dulbecco Modified Essential Medium</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i> (matriz extracelular)
GAG	Glicosaminoglicano
GuHCl	Hidrocloreto de guanidina
HtrA-1	Serino proteases
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
INF- γ	interferon gama
LS	Líquido sinovial
MO	Medula óssea
CTM-LS	Célula-tronco mesenquimal de líquido sinovial
CMT-MO	Célula-tronco mesenquimal de medula óssea
CTM-AD	Célula-tronco mesenquimal de tecido adiposo
G1	Domínio globular 1
G2	Domínio globular 2
G3	Domínio globular 3
GalNAc	N- acetilgalactosamina
GDF-5	Fator de diferenciação de crescimento 5
GlcNAc	N-acetilglicosamina
Glu-Ala	Ácido glutâmico e L-alalanina
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HGF	Fator de crescimento hepatóide
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IGD	Domínio interglobular
IL-1 α	Interleucina 1 alpha
ITS	Insulina transferrina sódica
KS	Queratam sulfato
KS-1	Queratam sulfato 1

KS-2	Queratam sulfato 2
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MHC-I	Complexo de histocompatibilidade classe I
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade classe II
MMPs	Metaloproteinases
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDA	1,3 diaminopropano-acetato
pH	Potencial de hidrogênio
P1	Primeira passagem das células-tronco mesenquimais
P3	Terceira passagem das células-tronco mesenquimais
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Proteoglicanos
PPAR γ	Receptores ativadores de proliferação de peroxissomos gama
PRELP	Proteína de repetição rica em leucina
PRP	Plasma rico em plaquetas
PTGER-2	Receptor da PGE ₂
RANTES	Quimiocinas expressas e secretadas por células T normais e reguladas por ativação
RLAH	Região de ligação do ácido hialurônico
Runx2	Fator de transcrição 2
SFB	Soro fetal bovino
SLRPs	Proteoglicanos ricos em leucina
SOX 9	Fator de transcrição 9
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th	Linfócito T auxiliar
Th 1	Células T regulatórias 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treggs	Células T regulatórias
TTD	Articulação tibiotársica direita
TTE	Articulação tibiotársica esquerda
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1 Células-tronco mesenquimais	29
2.1.1 Terapia de reparação articular e o uso de células-tronco mesenquimais.....	36
2.2 Estrutura da cartilagem articular	41
2.2.1 Os condrócitos	43
2.2.2 Componentes da matriz extracelular cartilágnea.....	46
2.2.2.1 Colágeno.....	47
2.2.2.2 Proteoglicanos	49
2.2.2.3 Agrecam	52
2.2.2.4 Glicosaminoglicanos	56
2.3 A membrana sinovial	60
2.4 O líquido sinovial.....	61
3 JUSTIFICATIVA	63
4 OBJETIVOS	64
5 MATERIAL E MÉTODOS	65
5.1 Animais	65
5.2 Preparo dos animais para coleta das amostras	66
5.3 Coleta de líquido sinovial	66
5.4 Coleta de medula óssea.....	67
5.5 Coleta de tecido adiposo	68
5.6 Cultivo de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial	69
5.7 Cultivo de células-tronco mesenquimais oriundas de medula óssea	70
5.8 Cultivo de células-tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo	70
5.9 Diferenciação condrogênica.....	71
5.9.1 Diferenciação condrogênica em tubos cônicos (esferoides).....	71

5.9.2 Diferenciação condrogênica em microplaca (microesferoides).....	72
5.10 Extração de proteoglicanos	73
5.11 Dosagem da concentração total de proteínas solúveis.....	74
5.12 Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA.....	74
5.13 Quantificação do agrecam pelo método ELISA	75
5.14 Identificação de agrecam e queratam sulfato dos esferoides por <i>Immunoblotting</i>	76
5.15 Técnica de imunofluorescência confocal nos microesferoides.....	77
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
7 RESULTADOS.....	80
7.1 Animais e coletas	80
7.2 Cultivo de células-tronco mesenquimais	80
7.3 Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais em tubos cônicos (formação dos esferoides).....	81
7.4 Dosagem da concentração total de proteínas solúveis dos esferoides	82
7.5 Eletroforese em gel de agarose para determinação de padrão de agrecam de cavalo.....	83
7.6 Dosagem da concentração de Agrecam (ELISA) dos esferoides	84
7.7 Razão do agrecam por total de proteínas solúveis, proteínas solúveis por peso úmido e agrecam por peso úmido	85
7.8 <i>Immunoblotting</i> : Identificação de agrecam e queratam sulfato nos esferoides	88
7.10 Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais em microplaca (microesferoides).....	90
7.11 Análise da concentração total de proteínas solúveis e agrecam dos microesferoides	91
7.12 Imunofluorescência por microscopia confocal dos microesferoides	94
8 DISCUSSÃO	98
9 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICES.....	139

1 INTRODUÇÃO

O cavalo foi domesticado por volta de 3000 anos antes de Cristo, e a espécie é considerada importante desde o início da sua domesticação por servir à humanidade com seu sistema locomotor excepcionalmente desenvolvido, com ênfase no seu trabalho no campo, como meio de transporte, e inclusive durante as guerras. Sendo assim, os cavalos foram selecionados de acordo com seu desenvolvimento e suas características a depender do uso pretendido, resultando em diversas raças e diferentes aptidões para diversas modalidades esportivas (HINCHCLIFF, 2014).

Por ser um animal atleta, sofre lesões frequentes relacionadas ao sistema musculoesquelético, as quais podem ocorrer por diversos fatores como condição física, vulnerabilidade individual pré-existente, má conformação ou genética, ferrageamento inadequado, fatores nutricionais e erros em programas de treinamento (EGENVALL et al., 2013; BARREY, 2014).

De todas as lesões que abrangem o sistema musculoesquelético, os problemas relacionados às articulações são frequentes causas de perda de desempenho, ocorrem conseqüentemente ao estresse mecânico, provocado após cargas excessivas, que ultrapassam os limites fisiológicos articulares (RIGGS, 2010). Essas lesões raramente acontecem de forma aguda ou catastrófica como nos casos de fraturas, mas como seu início é muitas vezes silencioso e associado a baixa capacidade regenerativa da cartilagem articular, as tornam um problema ligado diretamente ao bem-estar desses animais e conseqüentemente levam ao prejuízo econômico. Em paralelo, a doença articular em humanos, a exemplo da osteoartrite, é causa de incapacidade de locomoção e perda de qualidade de vida, cuja situação não difere da demonstrada pelos equinos que perdem sua capacidade esportiva (VAN WEEREN, 2014).

Nesse contexto, há interesse científico direto relacionado a pesquisas sobre a influência e efeitos do exercício, treinamento e seu impacto na saúde articular, assim como na busca por suporte terapêutico que objetive a reparação tecidual a partir da recuperação da integridade da cartilagem hialina, a qual é de difícil regeneração. A Medicina Regenerativa surge nessa circunstância em razão da dificuldade ou falhas parciais das atuais abordagens terapêuticas para as artropatias, iniciando com o emprego da terapia celular e aplicação de células-tronco mesenquimais (CTMs), as quais possuem propriedades promissoras (BOEUF; RICHTER, 2010; ORTH et al., 2014).

Assim, as CTMs são comumente estudadas na Medicina Veterinária, principalmente na Medicina Equina, para uso em aplicações terapêuticas nas doenças de origem musculoesqueléticas (CLEGG; PINCHBECK, 2011; FORTIER; TRAVIS, 2011; CARRADE HOLT et al., 2012). Dentre suas propriedades a promessa de regeneração tecidual as tornam promissoras com a finalidade de restaurar novamente a arquitetura estrutural e a função biomecânica do tecido lesionado (FORTIER; SMITH, 2008; LOPEZ; JARAZO, 2015), fornecendo melhor condição de reparação tecidual e controle ou modulação do processo inflamatório no qual é um denominador comum em todas as lesões atléticas ligadas ao sistema musculoesquelético (LACITIGNOLA et al., 2008). Isto resulta na reabilitação funcional dos tecidos, especialmente nos que possuem capacidade limitada de reparação, tais como tendões, ligamentos, meniscos e cartilagem (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011).

Entretanto, alguns fatores devem ser considerados, uma vez que existem diversos nichos para obtenção das CTMs, como por exemplo: facilidade no procedimento da coleta; possibilidade de morbidade relacionada ao momento da coleta; quantidade de células obtidas das diferentes fontes de coletas; bem como capacidade proliferativa e de diferenciação celular (FRISBIE; SMITH, 2010; TOUPADAKIS et al., 2010). Essas imprecisões devem ser mais estudadas e compreendidas para estabelecer a fonte benéfica do tecido de origem das CTMs, principalmente quando são voltadas para tratamento de tecidos específicos, como a cartilagem articular.

Os condrócitos e as CTMs provenientes da medula óssea e do tecido adiposo são as principais fontes utilizadas para reparação da cartilagem, todavia presume-se que as células isoladas a partir de tecidos oriundos das articulações, como membrana sinovial ou líquido sinovial possam ser uma fonte mais favorável para o tratamento das enfermidades de origem articular. Tal suposição baseia-se no fato das CTMs derivadas de tecido sinovial apresentarem, segundo alguns autores, maior potencial condrogênico *in vitro* do que as CTMs obtidas 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). Porém, essa afirmação foi fundamentada apenas por aumento no tamanho dos *pellets* formados após diferenciação condrogênica e na expressão do colágeno tipo II por meio de RT-PCR em humanos e ratos. Logo, ainda faltam estudos *in vitro* e *in vivo*, nas espécies alvo para comprovar essa hipótese.

Além disso, foi demonstrado que as células obtidas da medula óssea, em situações de diferenciação condrogênica *in vitro*, podem resultar em cartilagem hipertrófica, formada durante os estágios finais da ossificação. Este fenótipo celular é representado pela síntese de colágeno X, que resulta em fibrocartilagem, com propriedade funcional inferior, capaz de originar mineralização e, conseqüentemente, indesejável e nociva a qualquer processo de regeneração cartilaginosa (MCCARTHY et al., 2012).

O uso de CTMs em enfermidades articulares é uma terapia em evolução e aparentemente pode proporcionar benefícios aos pacientes (FORTIER et al., 2010; STEWART, 2011). Ainda não está claro qual é o número ideal de CTMs necessário para o tratamento, assim como qual fonte seria mais benéfica para o paciente visando o tratamento de enfermidades articulares, essencialmente a osteoartrite (FORTIER; TRAVIS, 2011; SCHNABEL et al., 2013).

Esse estudo investigou se CTMs isoladas de medula óssea, tecido adiposo e líquido sinovial apresentam atividades biológicas distintas, principalmente relacionadas a síntese de matriz extracelular após diferenciação condrogênica. Além disso, procurou estabelecer se tais diferenças justificariam uso preferencial nas aplicações clínicas e, conseqüentemente, no tratamento específico de enfermidades articulares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão, serão abordadas as propriedades das células-tronco mesenquimais e sua terapêutica para enfermidades de origem locomotora nos equinos, assim como os aspectos estruturais, morfológicos e funcionais do complexo que envolve a cartilagem articular. As informações obtidas foram pesquisadas por meio das plataformas Pubmed, Scopus, ScienceDirect e livros.

2.1 Células-tronco mesenquimais

A descoberta das células-tronco mesenquimais (CTMs) ocorreu na década de 1970, quando Friedenstein e colaboradores relataram pela primeira vez uma subpopulação de células originárias da medula óssea com capacidade de formar colônias a partir da sua capacidade de aderência à superfície plástica, nomeando-as como unidades formadoras de colônias. Tais células também demonstraram habilidades no processo de diferenciação em osteoblastos (PROCKOP, 1997; BROOKE et al., 2007).

Em 1991 o termo CTMs foi então introduzido na literatura por Arnold Caplan, que as definiu como células estromais, capazes de diferenciação celular, com habilidades de autorrenovação e características de migração para tecidos (MAO et al., 2015).

As CTMs correspondem a uma população heterogênea de células estromais, com potencial multipotente, ou seja, atuação no processo de diferenciação nos tecidos do mesoderma (CHEN et al., 2008), como exemplo na diferenciação da cartilagem, osso e tecido adiposo. Além disso, oferecem suporte na hematopoese e na formação de adipócitos na medula (IM, 2017).

Com base nas propriedades das CTMs, existe enorme interesse de pesquisadores nessa área, com foco no tratamento de doenças cardíacas (HARE et al., 2013), respiratórias (LALU et al., 2014), digestivas (DUIJVESTIEN et al., 2010) locomotoras (RICHARDSON et al., 2016), assim como algumas doenças de origem neurológica (RUFF; FAULKNER; FEHLINGS, 2013; MAIA et al., 2015).

As CTMs podem ser extraídas de diversas fontes, sendo que nos cavalos já foram obtidas a partir da medula óssea, (GODWIN et al., 2012), tecido adiposo (DE MATTOS

CARVALHO et al., 2009), cordão umbilical (TOUPADAKIS et al., 2010; RANERA et al., 2011; BARBERINI et al., 2014), sangue do cordão umbilical (KOCH et al., 2007; MOHANTY et al., 2014), membrana amniótica (DE VITA et al., 2013; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013), sangue periférico (KOERNER et al., 2006) e também do líquido e da membrana sinovial (FÜLBER et al., 2016).

As CTMs derivadas de tecido sinovial foram caracterizadas primeiramente por De Bari em 2001, a partir da membrana sinovial de pacientes humanos com doença articular degenerativa (DE BARI et al., 2001). A partir disso, outros estudos iniciaram suas buscas, em que o potencial condrogênico das CTMs da membrana sinovial de humanos foi comparada com CTMs extraídas da medula óssea (SHIRASAWA et al., 2006). A caracterização e comprovação das suas habilidades de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e em especial na demonstração de seu fenótipo condrogênico as classificaram como linhagens superiores nos estudos em células de humanos (SAKAGUCHI et al., 2005) assim como nos casos de osteoartrite (NAGASE et al., 2008). As CTMs extraídas do líquido sinovial foram demonstradas também nos coelhos (KOGA et al., 2008) e ratos (YOSHIMURA et al., 2007) e anos depois, o equino foi a espécie alvo de estudo, usando a fonte derivada do líquido e da membrana sinovial em estudos que as caracterizaram (FÜLBER et al., 2016; BURK et al., 2017).

Com o objetivo de diminuir as discrepâncias na caracterização das CTMs, a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu alguns critérios para sua identificação, destacando suas características, dentre as quais: a aderência ao plástico, a avaliação por citometria de fluxo quanto a expressão de marcadores de superfície CD90 (Thy-1), CD73 (ecto 5 nucleotidase) e CD105 (endogлина), associada a inexistência da expressão de CD45 (marcador e leucócitos), CD34 (células hematopoiéticas), CD14 e CD11 β (expressos em monócitos e macrófagos), CD79 α ou CD19 (marcadores de células B) e, ainda, a diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica (DOMINICI et al., 2006).

Os critérios mencionados são exigidos para células de origem humana. A caracterização para outras espécies é ainda algo desafiador, devido à falta de marcadores específicos para a espécie estudada (STEWART; STEWART, 2011). Nessas circunstâncias, caracterizar as CTMs obtidas de equinos é algo laborioso, pois a disponibilidade dos anticorpos espécie específicos é ainda limitada (ARNHOLD et al., 2007; BORJESSON; PERONI, 2011; PASCUCCHI et al., 2011). Sendo assim, a identificação para outras espécies se torna restrita à adesão das células ao plástico, somado à diferenciação celular *in vitro* nas três linhagens mesodermiais (condrogênica, osteogênica e adipogênica) (DOMINICI et al., 2006; ROZEMULLER et al.,

2010). Portanto, a definição de um conjunto de marcadores para garantir a homogeneidade e convicção na identificação das CTMs da espécie equina é ainda relevante (BORJESSON; PERONI, 2011).

Apenas os marcadores CD13, CD44 e MHC-II estão disponíveis comercialmente para a espécie equina. Entretanto, alguns estudos demonstraram caracterização dessas células a partir da aderência ao plástico, diferenciação celular e expressão de CD29, CD44 e CD90 (ARNHOLD et al., 2007), associado à ausência da expressão de CD14, CD79 e MHC-II (GUEST; OUSEY; SMITH, 2008; BORJESSON; PERONI, 2011; CARVALHO et al., 2014).

As CTMs podem ser cultivadas por diferentes protocolos, porém algumas diferenças nas condições de cultura podem interferir diretamente com a sua qualidade (LIU et al., 2017). A cultura prolongada resulta em alterações funcionais, como redução na proliferação, na capacidade de formar colônias secundárias e no seu potencial de diferenciação, tornando-se células senescentes. Ressalta-se também que as células se modificam a cada passagem realizada, diminuindo ainda mais suas propriedades (LIU et al., 2017).

Em resposta as modificações na expressão genética durante o processo de diferenciação celular, ocorrem transformações nas células, como no seu tamanho, morfologia, potencial de membrana e na sua atividade metabólica (TAYLOR; CLEGG, 2011).

Para que as CTMs se diferenciem, são necessários meios de cultura específicos suplementados com diversos fatores de crescimento (TAYLOR; CLEGG, 2011).

Para a linhagem osteogênica os agentes indutores estabelecidos são betaglicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino (DOMINICI et al., 2006; STEWART; STEWART, 2011), resultando na diferenciação em osteoblastos após três semanas a partir da identificação de depósitos de cálcio, matriz mineralizada e atividade de fosfatase alcalina após coloração com Von Kossa (DOMINICI et al., 2006), Alizarin Red ou cloreto de tetrazólio nitroazul, respectivamente. Outras técnicas para a confirmação da diferenciação osteogênica são obtidas 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).

O meio de cultivo indutor para diferenciação adipogênica deve ser enriquecido com isobutilxantina, fosfodiesterase, pantotenato, biotina, insulina, dexametasona, soro fetal bovino, indometacina e rosiglitazona (GUEST; OUSEY; SMITH, 2008). Os agentes indutores são ligeiramente diferentes ao comparar à diferenciação de CTMs humano, pois, em células de equinos se faz necessário adicionar soro de coelho ao meio de cultura. O cultivo em monocamada celular 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 β 1 integrina (TAYLOR; CLEGG, 2011).

A indução das CTMs em condrócitos pode ser realizada *in vitro*, entretanto, demanda protocolo de cultura tridimensional possível de ser realizado dentro de tubos cônicos, resultando em micromassas ou esferoides. Os fatores de crescimentos necessários para essa diferenciação são: fator transformador beta (TGF- β 1), proteína morfogênica óssea-2 (BMP-2), fator de diferenciação de crescimento-5 (GDF-5) (MURPHY et al., 2015), ácido ascórbico, insulina transferrina sódico (ITS) e dexametasona. A detecção de proteoglicanos é identificada histologicamente pela coloração positiva de azul de toluidina e alcian blue. A expressão gênica inclui análise de fator de transcrição SOX9, colágeno tipo II e agregam (STEWART; STEWART, 2011).

Embora as células possam ser encontradas em diversos tecidos, as células oriundas de medula óssea e tecido adiposo são as mais estudadas (IM, 2017). Há certa desvantagem quanto à obtenção de células da medula óssea em relação ao tecido adiposo, isto se deve tanto ao procedimento teoricamente mais invasivo durante a aspiração da medula, quanto ao número de CTMs obtidas. O tecido adiposo produz maior número de células, somado ao procedimento menos invasivo, atraindo cada vez mais os pesquisadores (FRASER et al., 2006).

Porém, após alguns ensaios *in vitro* com células de humanos, foi possível demonstrar que existem diferenças nas características destas células com relação à diferenciação celular para a linhagem osteogênica. Um estudo demonstrou maior atividade da fosfatase alcalina nas células de tecido adiposo quando comparada com células da medula óssea (ZUK et al., 2001). Entretanto, outro estudo não observou diferença quanto à atividade de fosfatase alcalina e o conteúdo de cálcio após diferenciação osteogênica de ambas as fontes (DE UGARTE et al., 2003). Em caráter contraditório, foi demonstrado que as células do tecido adiposo são inferiores às células extraídas da medula óssea, durante o processo de diferenciação osteogênica, por apresentarem baixa atividade de fosfatase alcalina, menor mineralização e menor expressão de osteocalcina e osteopontina (IM; SHIN; LEE, 2005; VISHNUBALAJI et al., 2012).

Ainda no contexto dos diferentes tecidos em que as células-tronco possam ser extraídas e as diferenças relacionadas ao potencial de diferenciação (DIGIROLAMO et al., 1999; DIMOCK et al., 2000; KIM et al., 2012; SCHELLENBERG et al., 2012), foi demonstrado que as células oriundas de tecido adiposo foram incapazes de se diferenciar espontaneamente em osso após transplante *in vivo* (SACCHETTI et al., 2016).

Nos últimos anos foi sugerido que a regulação da dinâmica e da função da mitocôndria é essencial para a diferenciação de CTMs. As mitocôndrias são organelas das células eucarióticas, e possuem papel essencial na longevidade dos organismos devido sua função no metabolismo energético e na morte celular. O equilíbrio entre a dinâmica e a morfologia mitocondrial é crucial para a manutenção da homeostase dos tecidos: a dinâmica mitocondrial regula o destino das CTMs (LI et al., 2017).

As condições da atividade metabólica são diferentes nas CTMs quando comparadas às células diferenciadas. As CTMs são mais dependentes da glicólise, enquanto que as células diferenciadas dependem mais do metabolismo oxidativo (HOFMANN et al., 2012; HSU et al., 2016).

Em situações *in vitro* em longo prazo, a cultura exibe menor proporção significativa de células com uma distribuição mitocondrial perinuclear, demonstrando maior teor de adenosina trifosfato (ATP) e tendem a se diferenciar quando comparadas com as células de uma passagem anterior. Após o início do processo de diferenciação, as mitocôndrias presentes nas CTMs são ativadas por meio de mecanismo ainda desconhecido e a fosforilação oxidativa torna-se a principal fonte de ATP (LI et al., 2017).

Há aumento de geração de espécies reativas de oxigênio durante o processo de indução da diferenciação condrogênica (*in vitro*) (JALLALI et al., 2007; MORITA et al., 2007; HEYWOOD; LEE, 2016). Além disso, interessante, a diferenciação em condrócitos parece ser regulada pela adição de peróxido de hidrogênio, e inibida pela administração do antioxidante N-acetilcisteína, sugerindo que espécies reativas de oxigênio geradas por NADPH desempenham papel importante na condrogênese, essencial para a sobrevivência e diferenciação apenas durante o estágio inicial da condrogênese (KIM et al., 2010).

As CTMs exercem seus efeitos terapêuticos por vários mecanismos, como a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células (mencionado anteriormente), enfatizando a possibilidade de regeneração do tecido alvo; a capacidade de tropismo para locais inflamados após lesão tecidual; a capacidade de segregar múltiplas moléculas bioativas, capazes de estimular a recuperação de células lesionadas, e assim, inibir a inflamação; a falta de imunogenicidade e a capacidade de realizar funções imunomoduladoras (SHARMA et al., 2014).

A capacidade de modular o ambiente inflamatório é demonstrada por propriedades que as CTMs possuem em suprimir a ativação ou proliferação dos linfócitos, que ocorre por meio do contato direto com o tecido ou por interação parácrina com interferon gama (INF- γ) produzidos por células do sistema imunológico. Após essa interação, as CTMs desencadeiam a

liberação de fatores solúveis, dentre eles, indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), IL-6 (HUAMAN et al., 2019), IL-10, PGE₂ (BOUFFI et al., 2010; HSU et al., 2013), IL-4, IL-10, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (BARRACHINA et al., 2016) e o fator de crescimento hepatoide (HGF) (AGGARWAL; PITTENGER, 2004), resultando na inibição da atividade de linfócitos T, B e citotóxicos, células *Natural Killer* (NK) (CHEN et al., 2008; NAUTA; FIBBE, 2008)) e de células dendríticas apresentadoras de antígenos (BOUFFI et al., 2010; VAN LENT; VAN DEN BERG, 2013).

Nesse contexto, após exposição das CTMs ao ambiente inflamado quando são expostas ao IFN γ , destaca-se eventos em cascata ou simultâneos a partir da secreção de PGE₂, mediado principalmente por PTGER-2 (receptor da PGE₂) (LEE et al., 2016), atuando principalmente na inibição dos mediadores inflamatórios TNF- α , INF- γ e metaloproteinases (MMPs) (JORGENSEN, 2013) e estimulando a produção de IL-10 (PERONI; BORJESSON, 2011; CARRADE HOLT et al., 2012), que juntamente com IL-6 e IDO, promovem a conversão de células T CD4⁺ em células Treg CD4 + Foxp3 + (células T reguladoras), suprimindo a resposta aloantígenica (KYURKCHIEV, 2014). Ao secretar citocinas, as CTMs são envolvidas em mecanismos de interações complexas com o sistema imune. As principais citocinas secretadas pelas CTMs são demonstradas no quadro 1.

Quadro 1 - Citocinas secretadas por células-tronco mesenquimais e as células-alvo correspondentes.

Citocinas secretadas por CTMs	Células alvo
IL-10	Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, Th1, Tregs e Tr1,
IL-6	Neutrófilos, monócitos, células dendríticas, células B, Th2, Tregs, Th17 e CD8 ⁺ FoxP3 ⁺
TGF- β	Macrófagos, <i>Natural killer</i> , células dendríticas, células B, células T e Tregs
Quimiocinas	Neutrófilos, monócitos, <i>Natural killer</i> , eosinófilos, basófilos, células dendríticas e linfócitos
CCL-2/MCP-1	Macrófagos, células endoteliais, células plasmáticas, Th2 e Th17
CCL-5/RANTES	Neutrófilos, monócitos, células dendríticas, Th1, Tregs e CD8 ⁺ FoxP3 ⁺
IDO	Monócitos, células dendríticas, células B, células T e Tregs
VEGF	Células dendríticas, células endoteliais, Th1, Th17 e Tregs
ICAM	Células T
PGE ₂	Macrófagos, monócitos, <i>Natural killer</i> , células dendríticas, células T e Tr1

CTMs: Células-tronco mesenquimais; TGF β : fator de crescimento transformante β ; CCL: quimiocinas da família CC; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1; RANTES: Quimiocinas expressas e secretadas por células T normais e regulada por ativação; IDO: Indoleamina-2,3-dioxigenase; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; ICAM: molécula de adesão intercelular; PGE₂: Prostaglandina E2; Th: linfócito T auxiliar; Tregs: células T regulatórias; Tr1: células T regulatórias 1. Fonte: (KYURKCHIEV, 2014), adaptado.

Vantagens nas aplicações terapêuticas das CTMs apontam mecanismos envolvidos com baixa expressão dos principais complexos de histocompatibilidade I e II (MHC I e MHC II) e ausência de expressão de moléculas capazes de estimular células T (CD40, CD80 e CD86) (ZHANG et al., 2015).

A imunogenicidade reduzida juntamente com a capacidade de regular o sistema imune, permite às CTMs evitar o reconhecimento direto por células *Natural Killer* e previne a ativação de linfócitos T em receptores, além de diminuir a ativação da via indireta por meio da apresentação de MHC-I por células apresentadoras de antígenos para células B, seguido de produção de aloanticorpos. Essa característica é vantajosa, uma vez que resulta em maior eficácia e menor risco de inflamação no local após a aplicação das CTMs, reduzindo assim efeitos adversos (CONSENTIUS; REINKE; VOLK, 2015).

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, que 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.

2.1.1 Terapia de reparação articular e o uso de células-tronco mesenquimais

As CTMs são cada vez mais estudadas com o objetivo de tratar enfermidades articulares nos equinos, ao demonstrar características voltadas ao seu potencial regenerativo. Além disso, o foco atual parece estar direcionado para a investigação da sua habilidade imunomoduladora. A inflamação desempenha papel fundamental nas doenças de origem articular, visto que a liberação de mediadores pró-inflamatórios presentes no líquido sinovial, levam a ativação da degradação enzimática da cartilagem. As CTMs podem modular o ambiente local por meio da interação direta ou parácrina com células do sistema imunológico, suprimindo sua proliferação (como já descrito na seção anterior) e estabelecendo a retomada das funções do tecido alvo (BARRACHINA et al., 2016).

O tratamento dos defeitos da cartilagem representa muitos desafios clínicos, dada sua natureza avascular, aneural e alinfática. A microfratura, que é uma técnica voltada para estimulação da medula óssea, é um procedimento muito utilizado na prática cirúrgica, entretanto o tecido resultante nesse processo é predominantemente formado por fibrocartilagem, que é inferior à cartilagem hialina. Existe crescente interesse de pesquisadores na medicina regenerativa e engenharia de tecidos visando melhorar os resultados nos pacientes que necessitam de reparação da cartilagem (GOLDBERG et al., 2017), pois o tecido substituído por fibrocartilagem não possui a mesma propriedade mecânica, tornando-se vulnerável às

forças de cisalhamento da articulação (TAYLOR; SMITH; CLEGG, 2007; WILKE; VYDAM; NIXON, 2007).

Dentre as opções de reparação ou regeneração da cartilagem são incluídos o uso de enxertos osteocondrais, aplicações intra-articular de plasma rico em plaquetas (PRP) (ZHU et al., 2013; CHIANG et al., 2014; YAMADA et al., 2016; SHI et al., 2017; MEHRANFAR et al., 2019), implante de condrócitos autólogos (MALLICK et al., 2017) e aplicação de CTMs (ORTVED; NIXON, 2016). Atualmente, a microfratura óssea subcondral associada à injeção intra-articular de CTMs parece estar à frente para tratar defeitos articulares nos equinos (JOHNSON; FRISBIE, 2016). Após a artroscopia, associado ou não a terapia celular, o tratamento continua com metas de reabilitação ao fornecer suporte ao membro afetado, restaurar flexibilidade articular, estabilidade e diminuir a dor perioperatória (JOHNSON; FRISBIE, 2016).

Originalmente, o principal foco da atividade terapêutica das CTMs estava voltada para sua habilidade de diferenciação celular, considerando essa característica fundamental no seu envolvimento de regeneração tecidual (TAYLOR; SMITH; CLEGG, 2007), no entanto, outros mecanismos de ação destas células são considerados relevantes, como a secreção parácrina e a interação células-célula, estimulando assim os mecanismos de cura inata do paciente (SMITH; GARVICAN; FORTIER, 2014).

Há indícios que as CTMs oriundas da medula óssea demonstrem maior potencial condrogênico quando comparadas com as células provenientes do tecido adiposo (VIDAL et al., 2008), assim como maior potencial osteogênico em comparação com as células de tecido adiposo (TOUPADAKIS et al., 2010).

Por outro lado, quando o tratamento tem por objetivo a regeneração por tecido fibrocartilaginoso, como nos casos de lesão de menisco, tanto as CTMs obtidas de tecido adiposo ou medula óssea semeadas em *scaffolds* de colágeno demonstram capacidade de regeneração nos meniscos. Neste caso, as células-tronco de fonte adiposa são mais atrativas para o tratamento ao ponderar o método de extração e o maior número de células que são expandidas no laboratório (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016).

O tratamento com CTMs derivadas da medula óssea, infundindo cerca de 20×10^6 células por via intra-articular em defeitos condrais na tróclea femoral de equinos, levou a melhor cicatrização precocemente ao comparar animais tratados com fibrina. Contudo, este efeito não foi mantido após oito meses, demonstrando pouca diferença em comparação com o outro grupo do estudo (WILKE; VYDAM; NIXON, 2007).

A avaliação do tratamento intra-articular com CTMs oriundas de medula óssea foi investigado em equinos após indução de microfraturas nos côndilos mediais do fêmur. Após um mês da indução, um grupo de animais recebeu tratamento com CTMs, associadas com ácido hialurônico e outro grupo recebeu apenas ácido hialurônico. A avaliação por artroscopia revelou maior qualidade tecidual e resistência da cartilagem, além de aumento na concentração de agregam obtida por meio da avaliação imuno-histoquímica nas articulações tratadas com as CTMs (McILWRAITH et al., 2011).

Outro estudo descreveu um caso de um cavalo de 4 anos de idade da raça Puro sangue inglês com defeitos bilaterais nos côndilos femorais mediais associado à lesão no ligamento cruzado cranial, que foi tratado por artroscopia e após noventa dias recebeu 2×10^6 CTMs oriundas da medula óssea suspensas em cola de fibrina. Após cinco e 13 meses do exame inicial esse cavalo recebeu nova aplicação de células suspensas em ringer com lactato, nos respectivos períodos mencionados. Quatro meses após a realização do tratamento foi demonstrado redução na profundidade dos defeitos da cartilagem e melhora moderada no ligamento cruzado cranial e após 15 meses o cavalo voltou às corridas demonstrando desempenho semelhante quando comparado ao que ele tinha anterior à lesão, incluindo momentos em que ele venceu os páreos durante as corridas (RAHEJA et al., 2011).

Ainda em estudos com equinos, Fortier et al. (2010) induziram defeitos condrais e trataram um grupo com CTMs de medula óssea associado a microfraturas e outro grupo foi tratado apenas com microfratura e demonstraram tanto macroscopicamente quanto por histologia e por ressonância magnética, melhor cicatrização condral nos animais tratados com microfraturas e CTMs.

O tratamento intra-articular em cavalos é uma escolha segura e tem colaborado para a volta dos animais ao esporte. Trinta e três casos de equinos com lesão na articulação femorotibial tratados com artroscopia seguida por aplicação de CTMs derivadas de medula óssea demonstraram que 43% dos cavalos tratados voltaram ao esporte com o mesmo desempenho que tinham anterior à lesão, outros 33% dos cavalos voltaram ao esporte, porém com nível de performance inferior a ocorrência da lesão e 24% dos cavalos não voltaram ao esporte. Por apresentar perspectiva e porcentagem significativa de retorno atlético desses animais, pode-se supor que as CTMs apresentam características promissoras (FERRIS et al., 2014).

Em defeitos condrais induzidos experimentalmente a aplicação intralesional de CTMs derivadas de tecido adiposo demonstrou melhora nas condições inflamatórias articulares, ou seja, apresentaram menor número de linfócitos e neutrófilos no líquido sinovial avaliado após

o tratamento. Além disso, as articulações tratadas demonstraram formação de fibrocartilagem e resultaram em melhor tecido de reparação quando observados macroscopicamente, enquanto os animais com defeitos condrais não tratados demonstraram maior intensidade de fibrose por apresentarem concentração de células fibroblásticas e maior área de transição entre o tecido neoformado e a cartilagem normal, observando a presença de condrócitos mortos e lacunas vazias (YAMADA et al., 2013).

A aplicação de PRP ativado com trombina como arcabouço para as aplicações de 10^7 CTMs oriundas do tecido adiposo demonstra ser outra possibilidade de tratamento por via intra-articular nos defeitos condrais induzidos em cavalos. Animais tratados apresentaram melhor aspecto macroscópico do tecido de reparação condral, resistentes à palpação com probe, observados durante o procedimento de avaliação cirúrgica por artroscopia em que o tecido demonstrou maior similaridade cartilaginosa, com aderência às bordas das lesões e preenchimento das áreas totais dos defeitos condrais induzidos, enquanto cavalos não tratados demonstraram falhas de preenchimento, com aspecto friável e pouco aderido na lesão (YAMADA et al., 2016).

Um estudo randomizado, multicêntrico, controlado e duplo cego verificou a eficácia do tratamento de osteoartrite em setenta equinos com grau de claudicação entre 2 a 4 avaliados de acordo com os critérios da Associação Americana de Veterinários de Equinos (AAEP) com duas aplicações de CTMs alogênicas derivadas de tecido adiposo com intervalo de 45 dias. Os cavalos foram acompanhados por 90 dias e os animais tratados demonstraram redução significativa (considerando $P < 0.05$) na claudicação, associado à diminuição do processo inflamatório local, observados por meio da diminuição da temperatura local e efusão articular (MARIÑAS-PARDO et al., 2018).

As CTMs derivadas da sinóvia ainda não foram estudadas extensivamente nos trabalhos *in vivo* na espécie equina, entretanto, tais células parecem possuir maior capacidade para diferenciação condrogênica, com menores chances de ossificação endocondral hipertrófica, que é indesejável e observada nos estudos com CTMs derivadas da medula óssea (ORTVED; NIXON, 2016), sendo que essa característica baseia-se em experimentos *in vitro*, em que as células provenientes da medula óssea resultam em cartilagem hipertrófica após serem diferenciadas (MCCARTHY et al., 2012).

A avaliação da cicatrização da cartilagem após utilização das células de sinóvia, em coelhos como modelos experimentais, demonstrou maior produção de matriz cartilaginosa, proliferação celular e capacidade de cicatrização superior às CTMs extraídas de tecido adiposo e muscular, concluindo assim possível vantagem relacionada ao seu maior potencial

condrogênico (KOGA et al., 2008).

Em engenharia de tecidos, as CTMs oriundas de líquido sinovial de coelhos associadas a hidrogel de quitosana como *scaffold*, demonstraram reparação tecidual macroscópica e na avaliação histológica. A diferenciação condrogênica foi avaliada por expressão de colágeno II, agregam por PCR e marcadores de superfície CD34, CD45, CD44, CD90, CD166 por citometria de fluxo, demonstrando resultado promissor para tratar defeitos cartilagíneos nas aplicações clínicas (JIA et al., 2019).

As células derivadas de membrana sinovial também oferecem regeneração dos meniscos. As células extraídas da membrana sinovial desempenham papel fundamental durante o curso natural da cicatrização de meniscos, dado seu potencial condrogênico. A investigação desta característica foi elucidada em ratos transgênicos após meniscectomia. Neste caso, houve regeneração do menisco após 12 semanas, comprovada por meio de microscopia eletrônica ao observar as características meniscais e também expressão de colágeno tipo II (HORIE et al., 2009).

CTMs obtidas do líquido sinovial de pacientes humanos com osteoartrite severa submetidos a substituições totais da articulação do joelho foram aplicadas (1×10^6) por via intra-articular em camundongos imunossuprimidos Balb-C^{nu/nu} após transecção do ligamento cruzado e indução de osteoartrite e a avaliação macroscópica e histológica do tecido cartilagíneo, foi realizada após 28 dias (primeiro grupo sacrificado) e 56 dias (segundo grupo sacrificado), contudo, as CTMs xenogênicas não demonstraram influência benéfica ou prejudicial nas articulações dos camundongos (NEYBECKER et al., 2018).

A realização de artroscopia somado à aplicação intra-articular de CTMs derivadas de tecido adiposo (4×10^6) foi avaliado em trinta pacientes humanos com idade acima de 65 anos diagnosticados com osteoartrite severa na articulação do joelho. Quase todos os pacientes demonstraram melhora significativa durante a avaliação clínica ao longo de dois anos de acompanhamento, seguido de avaliação por meio de artroscopia que resultou em melhora macroscópica da cartilagem ou não demonstraram piora na degradação, considerando o tratamento efetivo e seguro com redução da dor e melhora da função (KOH et al., 2015).

Outro estudo clínico em humanos diagnosticados com osteoartrite crônica e tratados com CTMs derivadas da medula óssea ($40,9 \times 10^6$), demonstrou ser viável, seguro e eficaz, resultando em diminuição da intensidade da dor relatada pelos pacientes e redução na incapacidade funcional musculoesquelética, com sinais de reparo da cartilagem após doze meses em que o tratamento foi realizado, quando as articulações foram visualizados por ressonância magnética (SOLER et al., 2016).

Embora a utilização de CTMs em enfermidades articulares mostrem resultados promissores com aparente diferenciação condrogênica, CTMs com características hipertróficas após diferenciação e expansão limitada ainda permanecem (GOLDBERG et al., 2017).

A elaboração de *scaffolds* de quitosana incorporados a nanopartículas de óxido de grafeno parece demonstrar uma composição atrativa para os condrócitos (SHAMEKHI et al., 2019). Esses estudos vêm crescendo e parecem significativos para abordagem terapêutica envolvendo as articulações.

Na busca do tratamento regenerativo da cartilagem, várias fontes de células são investigadas, incluindo medula óssea (FORTIER et al., 2010; CHU, 2015; BARTOLOTTI et al., 2018; VERONESI et al., 2019), sangue periférico (SPAAS et al., 2012; SAW et al., 2013), tecido adiposo (KOHLI et al., 2019), membrana sinovial e líquido sinovial (MURATA et al., 2014, FÜLBER et al., 2016; MURATA et al., 2018), entretanto, ainda, sem qualquer evidência clara de superioridade de uma fonte em relação à outra (ORTVED; NIXON, 2016). Embora os estudos estejam avançando, ainda não está claro qual é a quantidade de células que deve ser utilizada ou, como já mencionado, se existe, e qual seria a fonte mais indicada para o tratamento das enfermidades articulares, em especial nos casos de osteoartrite (FORTIER; TRAVIS, 2011; SCHNABEL et al., 2013).

2.2 Estrutura da cartilagem articular

Em condições fisiológicas, as superfícies ósseas de todas as articulações sinoviais são protegidas por uma fina camada translúcida de tecido conjuntivo, conhecida como cartilagem articular hialina (MARKS, 2014). Os principais componentes da cartilagem articular são: água que compreende 65-80% do seu peso úmido, colágeno que compreende 10-30% do seu peso úmido, moléculas de proteoglicano que compreendem 5 a 10% do seu peso úmido, células conhecidas como condrócitos, compreendendo aproximadamente 1-2% (CARON, 2003) ou 1-5% (MOBASHERI et al., 2014), e pequena quantidade de outras proteínas não colágenas, glicoproteínas e lipídios (MARKS, 2014).

As articulações sinoviais (Figura 1) são encontradas em locais de grande mobilidade, delimitadas pela cápsula articular e revestidas por membrana sinovial, que por sua vez, secretam líquido sinovial que nutre e lubrifica a articulação (HUI et al., 2013; ORTH et al., 2014; SALVA; MERRILL, 2016). A cartilagem hialina é avascular, aneural e alinfática (ORTH et

al., 2014), portanto, todos os nutrientes e oxigênio são proporcionados por um processo de difusão por meio do osso subcondral e do líquido sinovial (BEEKUIZEN, 2014; DEMOOR et al., 2014).

O primeiro sinal morfológico do desenvolvimento da cartilagem foi a partir de um processo denominado de condensação, onde as CTMs indiferenciadas, derivadas do mesoderma migram para a região regidas por interações célula-célula e célula-matriz, formando uma interzona. Este processo é importante para a diferenciação dos condrócitos que produzem abundante matriz extracelular, constituída de proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina e colágeno tipo II, IX e XI, formando assim o anel cartilaginoso (MACKIE et al., 2008; KWON et al., 2016). A interzona por sua vez, é constituída por três camadas: duas camadas externas que contribuem para o crescimento de epífises de ossos longos, e uma camada interna que forma a cavidade condral ou superfície articular (SALVA; MERRILL, 2016). Subsequentemente, as células na borda do anel cartilaginoso, formam a cartilagem articular (KWON et al., 2016).

As zonas de cartilagem, também conhecidas como camadas, (demonstradas na figura 1) baseiam-se na forma dos condrócitos, na composição da matriz extracelular e na orientação do colágeno tipo II em relação à superfície articular e ao osso subcondral. A zona superficial ou zona tangencial protege camadas mais profundas das forças compressivas e compõe de 10% a 20% da espessura da cartilagem articular. As fibras de colágeno desta zona são alinhadas paralelamente à superfície articular. A camada superficial contém número relativamente elevado de condrócitos achatados. Essa zona está em contato com o líquido sinovial, sendo responsável pela maioria das propriedades de tração da cartilagem, o que lhe permite resistir às forças de compressão e tensão impostas pela articulação (ALFORD, 2005).

A zona intermédia ou transitória proporciona ponte anatômica e funcional entre as zonas superficial e profunda. A zona intermediária representa 40% a 60% do volume total da cartilagem, e contém proteoglicanos e fibrilas de colágeno mais espessas. Nesta camada, o colágeno é organizado obliquamente, e os condrócitos são esféricos, de baixa densidade e orientados em colunas perpendiculares paralelas às fibras colágenas. Funcionalmente, a zona intermediária é a primeira linha de resistência às forças compressivas (SOPHIA FOX; BEDI; RODEO, 2009; MOBASHERI et al., 2014).

A zona profunda é responsável por fornecer a maior resistência às forças compressivas, pois as fibrilas de colágeno estão dispostas perpendicularmente à superfície articular e se estendem em direção a *tidemark*, conhecido como fronteira entre as camadas calcificadas e não calcificadas da cartilagem, na qual é originada pela atividade dos condrócitos (SURI; WALSH, 2012). A zona profunda contém as fibrilas de colágeno de maior diâmetro, com teor de

proteoglicano mais alto e menor concentração de água. Os condrócitos são tipicamente dispostos em orientação colunar, esféricos, paralelos às fibras colágenas e perpendiculares à linha articular. A zona profunda representa aproximadamente 30% do volume da cartilagem articular. Graças à elevada concentração de proteoglicanos, a zona profunda garante maior resistência às forças de compressão (MOBASHERI et al., 2014).

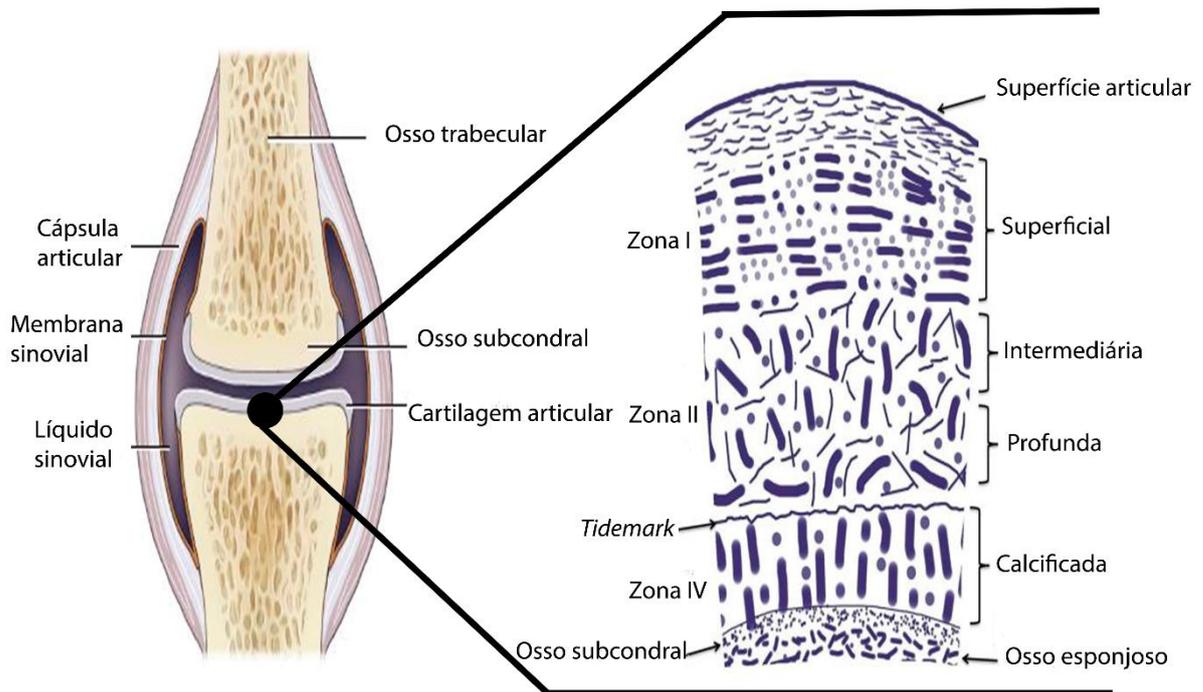


Figura 1 – Estrutura da articulação sinovial e esquema da organização da cartilagem articular de equino.

Fonte: (McILWRAITH et al., 2016), adaptado.

2.2.1 Os condrócitos

O principal tipo de célula presente na cartilagem são os condrócitos, os quais são derivados de CTMs e ocupam aproximadamente 1-5% do volume da cartilagem articular. Além disso, os condrócitos são responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular,

descritos como “arquitetos” da cartilagem (MOBASHERI et al., 2014) e são consideravelmente protagonistas na tentativa de regeneração cartilaginosa por sintetizar matriz extracelular (MACIULAITIS et al., 2016).

Histologicamente, os condrócitos são células isoladas umas das outras, envolvidos por quantidade considerável de matriz extracelular (MOBASHERI et al., 2014), ou seja, uma combinação formada por alta concentração de proteoglicanos especialmente agregam, dispostos a rede de fibras de colágeno tipo II (VENN, 1979), colágeno tipo IX, VI e XI e proteínas não colágenas, como a fibronectina (figura 2).

Dentro da cartilagem, os condrócitos são submetidos a numerosos fatores mecânicos e ambientais que regulam sua atividade metabólica e seu fenótipo. Eles são altamente especializados e metabolicamente ativos, desempenham considerável papel no desenvolvimento, manutenção e reparação da matriz extracelular de acordo com os diferentes sinais que percebem (BHOSALE; RICHARDSON, 2008; DEMOOR et al., 2014; VLADAR et al., 2015).

Os condrócitos são responsáveis pelo *turnover*, a partir da detecção de alterações na composição macromolecular e na organização da matriz, com importante capacidade para manter o equilíbrio entre sua atividade anabólica e catabólica (AIGNER; STÖVE, 2003).

Sabe-se que a carga mecânica exercida sobre a cartilagem cria sinais mecânicos e elétricos que ajudam a direcionar a atividade dos condrócitos entre a síntese ou a degradação da matriz (MOBASHERI et al., 2014). Dentro deste contexto, a homeostase da cartilagem articular é obtida por meio da síntese dos componentes da matriz ou pela regulação de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, hialuronidases e agreganases (DEMOOR et al., 2014), e pela sinalização, por meio da relativa quantidade de citocinas e fatores de crescimento presente na cartilagem ou no líquido sinovial (GOLDRING; GOLDRING, 2010; DEMOOR et al., 2014).

Além disso, em condições fisiológicas, os condrócitos secretam fatores anti-angiogênicos, como os peptídeos reguladores troponina I e trombospondina-1, e inibidores de enzimas de degradação da matriz, incluindo inibidores teciduais de metaloproteinases, inibidor secretor de proteinase de leucócitos e inibidor do ativador do plasminogênio (SURI; WALSH, 2012).

Entre os receptores envolvidos na sinalização hialurônica, o CD44 é o mais comum nas membranas celulares (ISHIDA et al., 1997). Os condrócitos que expressam maior quantidade de CD44, parecem exibir maior potencial condrogênico (GROGAN et al., 2007).

Os condrócitos têm um potencial limitado para a replicação, um fator que contribui para

a limitada capacidade intrínseca de cicatrização da cartilagem em resposta à lesão. A sobrevivência dos condrócitos depende de um ótimo ambiente químico e mecânico (SOPHIA FOX; BEDI; RODEO, 2009). Sendo assim, parte da patogenia da degeneração condral pode ser explicada pela atividade metabólica dos condrócitos, pois como já mencionado, sua função é manter equilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz extracelular, através da secreção de seus componentes macromoleculares (colágeno, proteoglicanos e glicosaminoglicanos) e a modulação do *turnover* fisiológico da matriz (GOLDRING, 2000).

Do ponto de vista molecular, os mediadores líticos, como as citocinas, radicais livres, proteases e prostaglandinas secretados pelos condrócitos e liberados na matriz extracelular são controlados por produção equilibrada de substâncias anabólicas e reparadoras, como fatores de crescimento, inibidores de citocinas catabólicas e inibidores de enzimas degradativas (MORTELLARO, 2003).

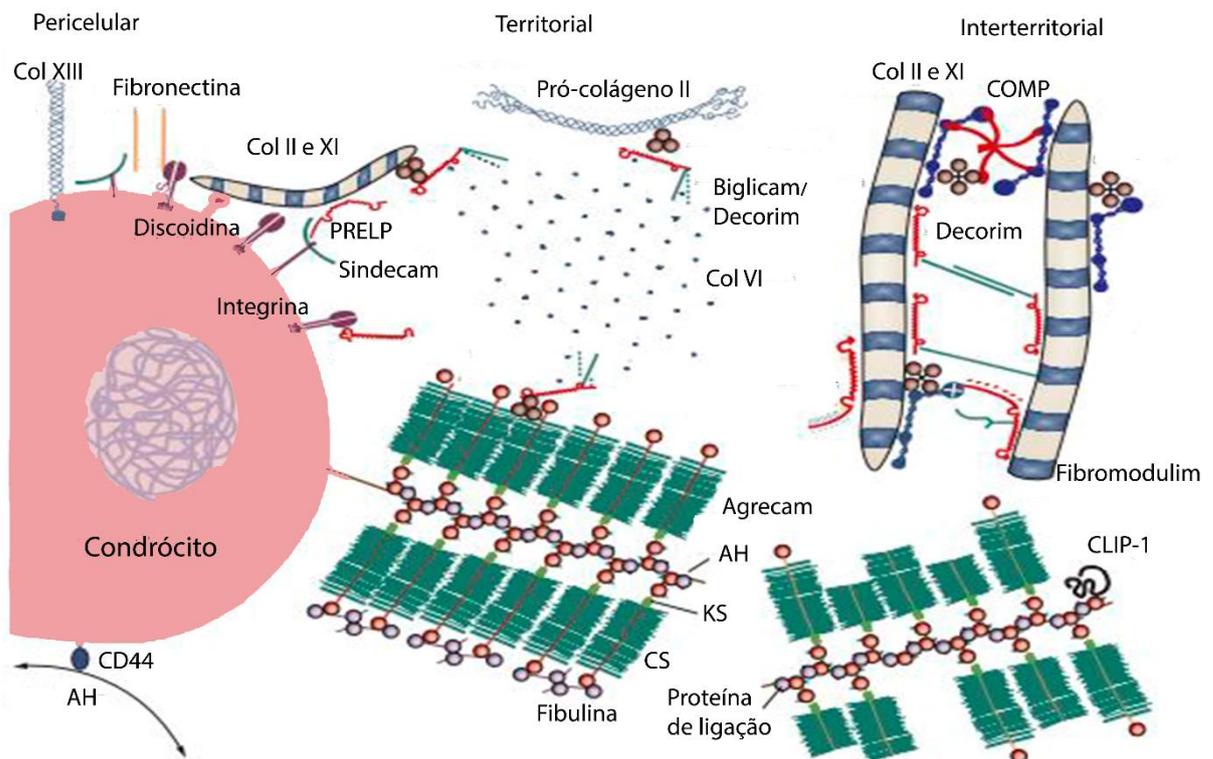


Figura 2 - Organização molecular da matriz extracelular da cartilagem articular.

Legenda: Matriz cartilaginosa em zonas definidas pela distância do condrócito. Matriz pericelular ao redor da célula, ácido hialurônico (AH) ou hialuronam e sua ligação com o receptor CD44. Matriz territorial e interterritorial com pró-colágeno, forma precursora transitoriamente na matriz, quebrada rapidamente pelas pró-colágeno peptidases, removendo os pró-peptídeos e formando as moléculas de colágeno, que espontaneamente se dispõem numa

formação escalonada, formando as fibrilas de colágeno, CLIP – proteína 1 da camada intermédia da cartilagem; COMP – proteína de matriz oligomérica da cartilagem; CS - condroitim sulfato; KS – queratam; PRELP - proteína de repetição rica em leucina, em prolina e arginina. Fonte: (HEINEGÅRD; SAXNE, 2011), adaptado.

2.2.2 Componentes da matriz extracelular cartilágnea

As células constituem tecidos durante o desenvolvimento dos organismos vertebrados, originando tecido epitelial, nervoso, muscular e conjuntivo. No tecido conjuntivo, o espaço entre as células é preenchido por substâncias semelhante a gel, sintetizadas e secretadas por elas, determinando a matriz extracelular. Os componentes do tecido conjuntivo são células especializadas, fibras e substâncias fundamentais que constitui um complexo viscoso e altamente hidrofílico de macromoléculas aniônicas formadas por polissacarídeos (NELSON, COX, 2014).

A respeito da matriz extracelular cartilágnea, as macromoléculas consistem em colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas adesivas, que proporcionam arcabouço físico para sustentar a estrutura do tecido, determinando hidratação, com importante papel no controle das trocas de nutrientes e resíduos, nas interações célula-matriz e na sinalização da difusão molecular. Desta forma, a matriz extracelular é importante durante o processo de regulação do comportamento celular e desempenha um papel relevante nos processos de caráter fisiológico e patológico (VIGETTI et al., 2014).

As interações célula-matriz mediadas por receptores celulares específicos e epítomos de ligação celular em muitas moléculas da matriz desempenham a função na fixação e migração das células, assim como promovem diferenciação celular e níveis de expressão gênica. Dessa forma, a matriz fornece microambiente fisiológico especial para as células, protegendo-as de influências mecânicas, na morfogênese e metabolismo celular atribuída ao armazenamento e liberação de fatores de crescimento.

2.2.2.1 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante nos vertebrados e representa um componente importante na matriz extracelular. Podem ser classificados em formadores de fibrilas (colágeno tipo I, II, III V e XI), FACIT (*fibril-associated collagen with interrupted triple Helix*) (colágeno tipo IX, XII, XIV, XVI e XIX), e não fibrilares de cadeia curta (colágeno tipo VIII, X), de membrana basal (colágeno tipo IV), de fibrilas de ancoragem (colágeno tipo VII) e microfibrilares (colágeno tipo VI). Apesar das diferenças entre os colágenos, todos compartilham uma estrutura de tripla hélice composta de três polipeptídeos, conhecidos como cadeias α , consistindo em repetições de Gly-X-Y, onde X é qualquer aminoácido, e Y é frequentemente prolina ou hidroxiprolina (MICHELACCI, 2003).

O colágeno é a macromolécula estrutural mais abundante na matriz extracelular, constituindo cerca de 60% do peso seco da cartilagem. O colágeno tipo II representa de 90% a 95% e forma fibrilas e fibras entrelaçadas com agregados de proteoglicanos, o que confere a propriedade biomecânica articular de resistência às forças compressivas (LAVERTY; GIRARD, 2013). Este tipo de colágeno consiste em três proteínas idênticas, com cerca de 1000 aminoácidos em cada, chamadas de cadeias $\alpha 1$. Elas são enroladas umas às outras formando uma tripla hélice. A molécula é formada intracelularmente a partir de pro-peptídeos nos terminais *N* (amino) e *C* (carboxi), que são clivados no espaço extracelular por proteinases, liberando a molécula de colágeno final ainda agregadas em fibrilas (MCILWRAITH et al., 2016).

Os tipos de colágeno I, IV, V, VI, IX e XI também estão presentes, porém em proporção menor. Os colágenos secundários ajudam a formar e estabilizar a rede de fibrilas do colágeno tipo II (SOPHIA FOX; BEDI; RODEO, 2009).

Estudos ultra estruturais demonstram sobreposição entre o colágeno tipo IV com a matriz do colágeno tipo II, representando componente molecular central que forma uma interface mecânica entre a matriz rígida e as células. Foi demonstrado que o colágeno tipo IV é capaz de se ligar a diferentes moléculas, entre elas, o decorim, fibromodulim e fibronectina (TILLET et al., 1994). Adicionalmente, o colágeno tipo IV possui alta afinidade com a molécula de ácido hialurônico e possivelmente essa ligação possui papel significativo nos processos de crescimento e remodelamento do tecido conjuntivo (KIELTY et al., 1992). Portanto, presumivelmente, o colágeno tipo IV possui envolvimento na ancoragem e sinalização celular da matriz (AIGNER; STÖVE, 2003).

O colágeno tipo IX é membro da família dos FACIT (*fibril-associated collagen with interrupted triple Helix*), ou seja, colágeno associado com fibrilas com tripla hélice interrompida, portanto, não se organiza em fibrilas, mas está presente na superfície de fibrilas formadas por colágenos tipo I e XI (GELSE, PÖSCHL, AIGNER, 2003). O colágeno tipo IX é formado por três diferentes cadeias α : $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$ e $\alpha 3(\text{IX})$ e se constitui em três domínios tripla hélice (COL1-3) intercalados por domínios que não formam hélices (NC1-4). Essa molécula se associa às superfícies das fibrilas de colágeno por meio de ligações cruzadas antiparalelas com moléculas de colágeno tipo II (WU et al., 1992). Os domínios COL3 e NC4 projetam-se da superfície da molécula e acredita-se que sejam importantes sítios de ligação para outros componentes da matriz extracelular. O colágeno tipo IX pode ser considerado um proteoglicano, pois pode ser glicosilado com condroitim sulfato no domínio NC3 de suas cadeias $\alpha 2$ (MARTEL-PELLETIER et al., 2008). O colágeno XI está localizado no núcleo das fibrilas do colágeno II e parece estar envolvido na iniciação da formação dessas fibrilas e também na limitação do seu diâmetro (AIGNER; STÖVE, 2003). A função do colágeno XVI, que também está presente na cartilagem articular, é até agora desconhecida (LAI; CHU, 1996), mas provavelmente atua como proteína que conecta e organiza as redes fibrilares, modulando a integridade e estabilidade da matriz extracelular (GRÄSSEL; BAUER, 2013).

O colágeno X desempenha atividade durante a ossificação endocondral, sendo sintetizado por condrócitos hipertróficos durante o processo de crescimento epifisário nos animais em crescimento, com importante papel na mineralização da matriz. Este mesmo colágeno é expresso nos animais e pacientes humanos com enfermidades articulares, como exemplo no desenvolvimento da osteoartrite, principalmente por estar associado ao processo de maior mineralização da cartilagem articular (MCILWRAITH et al., 2016) .

O colágeno secretado pelos condrócitos, em especial o tipo II, forma uma rede tridimensional onde estão os agregados de proteoglicanos e ácido hialurônico em forma de arco, que proporciona a natureza rígida da cartilagem. O predomínio de proteoglicanos na cartilagem madura é em monômero de agregam, agregados com ácido hialurônico por meio de proteínas de ligação, formando macromoléculas.

2.2.2.2 Proteoglicanos

Os proteoglicanos formam um grupo de moléculas proteicas e consistem em esqueleto proteico, no qual uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos são ligadas covalentemente (COUCHMAN; PATAKI, 2012). A cartilagem possui proteoglicanos com cadeias laterais de condroitim sulfato, que fazem parte da família da lectina, ou seja, o agrecom, componente essencial presente na matriz extracelular cartilaginosa; e versicam presente na matriz extracelular de diversos tecidos, inclusive na cartilagem (KNUDSON; KNUDSON, 2016; MCILWRAITH et al., 2016b).

Esses proteoglicanos compõem a estrutura do tecido conjuntivo, assim como possuem funções como mediar a adesão das células à matriz extracelular e ligar-se a fatores que estimulam a proliferação celular. Suas propriedades são determinadas principalmente pelo glicosaminoglicano específico ligado ao seu esqueleto proteico (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2014).

A cartilagem possui um grupo de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs), dentre eles: decorin, biglicam, fibromodulim e luminam (Figura 5) que regulam a fibrilogênese de colágeno, tamanho das suas fibrilas e sua disposição no tecido, com importante papel na manutenção da integridade cartilaginosa (ROUGHLEY, 2006).

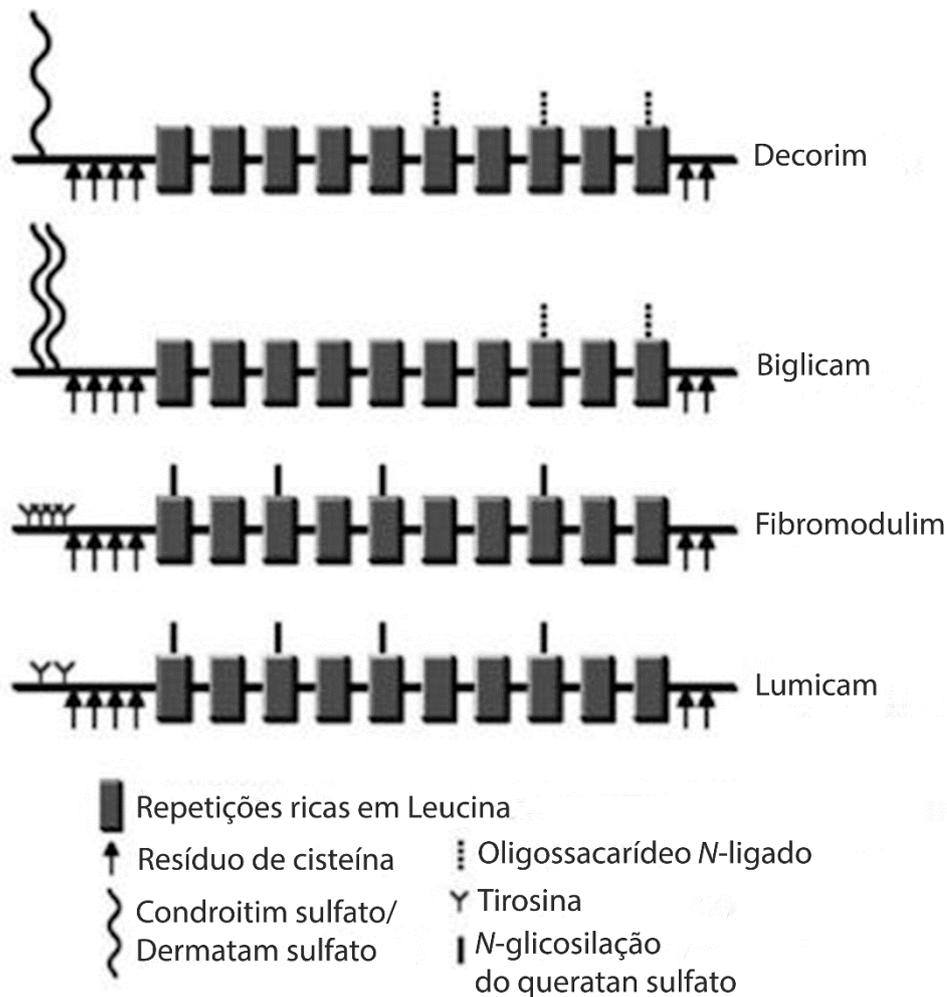


Figura 3 - Representação esquemática da família de proteoglicanos ricos em leucina.

Fonte: (NI; LI; ZHOU, 2014), adaptado.

Os proteoglicanos variam tanto na forma, como em função. O decorim é abundante em tecido conjuntivo onde pode participar da regulação e formação de fibras colágenas intersticiais. Ele possui apenas uma cadeia de dermatan sulfato ou condroitim sulfato ligados à extremidade *N*-terminal da proteína (COUCHMAN; PATAKI, 2012).

Os membros da família ricos em leucina participam da regulação da fibrilogênese do colágeno, pois possuem a capacidade de se ligar em diferentes regiões do colágeno e desta forma no envolvimento da organização dessas fibras. Camundongos nocautes em decorim possuem fibras intersticiais anormais na pele (DANIELSON et al., 1997).

O fibromodulim apresenta 4 cadeias de queratan sulfato, um domínio central e resíduos

de tirosina sulfatados ligados em *N*-terminal (OLDBERG et al., 1989; HEATHFIELD et al., 2004) encontrado na cartilagem (ROUGHLEY; WHITE; MORT, 1996; LAUDER et al., 1998). De forma semelhante, o lumican é glicosilado com queratam sulfato (YING et al., 1997; GROVER et al., 2002) e está presente na matriz extracelular da cartilagem articular humana em todas as idades, embora sua abundância seja muito maior no adulto. Na cartilagem adulta o lumican existe predominantemente em uma forma de glicoproteína sem queratam sulfato, enquanto na cartilagem jovem aparece como um proteoglicano (GROVER et al., 2002).

O biglicam é composto por duas cadeias de condroitim sulfato ou dermatam sulfato. Esse proteoglicano foi identificado como uma molécula que se acumula na superfície das células e em ambientes pericelulares, e parece demonstrar envolvimento na morfogênese e na diferenciação celular (HARDINGHAM; FOSANG, 1992).

Decorim e biglicam isolados da cartilagem articular (ROUGHLEY; WHITE; MORT, 1996; PIETRASZEK-GREMPLEWICZ et al., 2018) em especial, o decorim demonstram envolvimento com diferentes fibras de colágeno, como as do tipo I (WEBER; HARRISON; IOZZO, 1996), tipo II (HARDINGHAM; FOSANG, 1992), e alta afinidade por fibras do tipo VI (BIDANSET et al., 1992). As interações de proteoglicanos ricos em leucina e o colágeno parecem importantes para o processo de organização das fibras colágenas. O decorim ainda pode ser observado em áreas da matriz interterritorial em regiões mais profundas da cartilagem, todavia, pode ser encontrado na superfície cartilágnea, associado ao colágeno IX (HAGG; BRUCKNER; HEDBOM, 1998).

O fibromodulim, decorim e biglicam parecem modular a atividade do TGF- β (HILDEBRAND et al., 1994), um fator de crescimento transformador, mediador central da fibrilogênese (BIERNACKA; DOBACZEWSKI; FRANGOIANNIS, 2011), secretados por vários tipos celulares e comprometidos com a homeostase e reparo dos tecidos, respostas imunológicas e inflamatórias, deposição de matriz extracelular, controle da proliferação, diferenciação e adesão celular (HILDEBRAND et al., 1994; BURTON-WURSTER et al., 2003). Entretanto, camundongos nocautes do gene *GROB*, demonstram ativação elevada de TGF- β no tecido ósseo, o que consequentemente parece afetar a síntese dos proteoglicanos biglicam e decorim com notória diminuição na glicosilação ao dermatam sulfato desses proteoglicanos e consequentemente menor concentração na cartilagem (CHAN et al., 2018).

Fragmentos de decorim e fibromodulim são evidentes nos processos degenerativos da cartilagem e em lesões de menisco, assim como na osteoartrite, com o decorrer da idade, ocorre ainda leve aumento na fragmentação do decorim e fibromodulim (MELROSE et al., 2008).

Biglicam, decorim e fibromodulim afetam a fibrilogênese do colágeno *in vitro* e o seu metabolismo descoordenado pode contribuir para a formação e deposição anormal de colágeno observado na osteoartrite, contribuindo no decurso dos processos catabólicos (DOURADO et al., 1996).

Por fim, o perlecam é outro proteoglicano de heparam sulfato, típico de lâminas basais, entretanto é também encontrado na matriz extracelular cartilaginosa e possibilita a adesão dos condrocitos ao tecido (SUNDARRAJ et al., 1995).

2.2.2.3 Agrecam

O proteoglicano mais abundante da cartilagem articular é o agrecam (figura 4), que é formado por um esqueleto proteico de peso molecular aproximado de 230 kDa, composto por três domínios globulares G1, G2 e G3 (SANDY et al., 1990) e um domínio interglobular, entre G1 e G2 (WATANABE et al., 1997). A grande região entre os domínios G2 e G3 é subdividido em mais três regiões: Um domínio de ligação de queratam sulfato adjacente a G2, seguido de dois domínios de ligação de condroitim sulfato (CS1 e CS2) glicosilado com cerca de 100 cadeias de condroitim sulfato e 30 a 50 cadeias de queratam sulfato (DOEGE et al., 2001). Equinos e ruminantes são as únicas espécies estudadas até o presente momento que possuem três domínios de ligação de condroitim sulfato (CS1, CS2 e CS3) (CAPORALI; KUYKENDALL; STEWART, 2015). Sendo assim, o agrecam é um grande esqueleto proteico à qual várias cadeias de glicosaminoglicanos estão ligados.

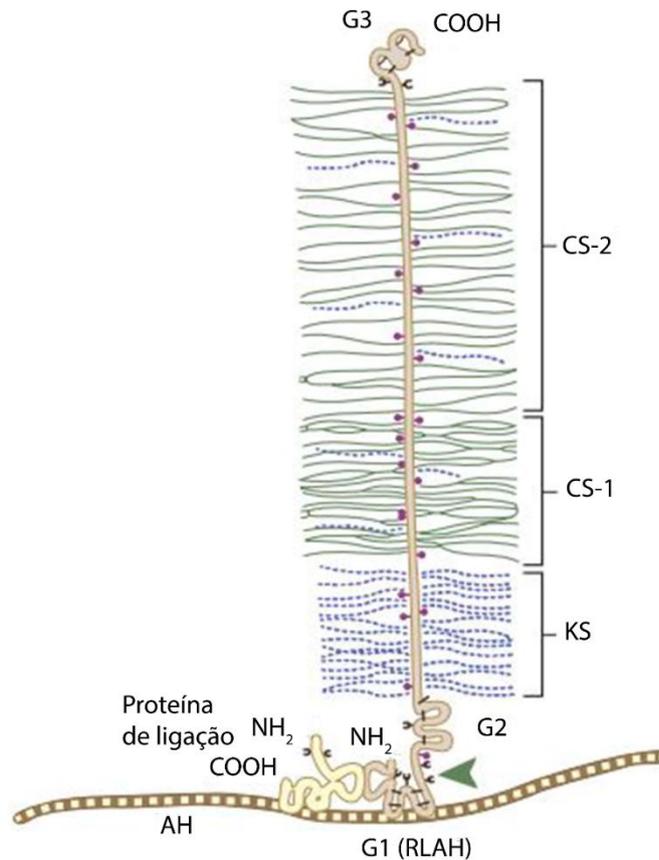


Figura 4 - Apresentação esquemática de uma molécula de agregam.

Legenda: Molécula de agregam com uma proteína central ligada ao ácido hialurônico (AH) por uma proteína de ligação. Cadeias laterais com glicosaminoglicanos sulfatados ligados: queratam sulfato (KS), condroitim sulfato (CS). Domínios globulares 1 (G1) (região de ligação do ácido hialurônico [RLAH]), G2 e G3. Fonte: (MCILWRAITH et al., 2016), adaptado.

Essa molécula possui uma extremidade *N*-terminal normalmente ligada por uma proteína de ligação (*link protein*) a outro componente da matriz, principalmente no ácido hialurônico, e outra extremidade carboxi-terminal. O domínio G1, localizado na extremidade *N*-terminal, desempenha um papel de estabilidade ao formar um enorme agregado, fornecendo propriedades biomecânicas à cartilagem (IOZZO et al., 2016).

O domínio G2 é exclusivo da molécula de agregam (KIANI et al., 2001) e não há interação com ácido hialurônico ou proteína de ligação (FOSANG; HARDINGHAM, 1989; WATANABE et al., 1997), assim como nenhuma função foi descrita para esse domínio,

entretanto, é conservado e está presente no agregam, sugerindo que pode ter uma função importante na cartilagem (KIANI et al., 2001).

Entre os domínios G2 e G3 (domínio interglobular), os glicosaminoglicanos podem ligar cadeias laterais ao esqueleto proteico. As cadeias laterais de queratam sulfato estão próximas ao domínio G2 e as cadeias de condroitim sulfato estão mais próximas do domínio G3 (FOSANG; HARDINGHAM, 1989; ASPBERG, 2012; HORKAY et al., 2017). Este domínio é suscetível a clivagem por proteinases (LARK, MICHAEL W. et al., 1995; KNUDSON; KNUDSON, 2016), como metaloproteinase, serinoproteinase e catépsina B. Consequentemente, após clivagem nesse ponto, ocorre perda da inserção dos glicosaminoglicanos. O domínio interglobular pode estar associado ao turnover do agregam (KIANI et al., 2002).

O domínio G3 localizado na extremidade carboxi-terminal conecta o agregado a matriz extracelular (FOSANG; HARDINGHAM, 1989) e parece ter importância em alguns distúrbios hereditários no homem, como exemplo na osteocondrite dissecante familiar com padrão autossômico dominante, através de mutações nas repetições de lectina (MCILWRAITH et al., 2016), assim como nas doenças condrodisplásicas (SCHWARTZ; DOMOWICZ, 2002) e em alterações genéticas como a displasia do esqueleto em humanos (TOMPSON et al., 2009). O gene que codifica o agregam (Agc1) é expresso durante o desenvolvimento fetal e em adultos e sua diminuição é capaz de ocasionar em malformações esqueléticas. Em camundongos homocigotos, a perda parcial de agregam ocasiona nanismo que persiste durante a vida adulta além de enrijecimento da matriz extracelular com severa erosão de cartilagem, acarretando osteoartrite sem aumento prévio de enzimas catabólicas. Isso demonstra a importância dessa molécula, uma vez que sua diminuição causa comprometimento das propriedades mecânicas da cartilagem (ALBERTON et al., 2019).

O agregam presente na matriz extracelular é encontrado apenas na forma agregada, sendo assim não existe a molécula livre (ROUGHLEY, 2006), e cada agregado é composto de um filamento central de ácido hialurônico com até 100 moléculas de agregam estabilizados por uma proteína de ligação (MORGELIN et al., 1988). Essa estrutura é influenciada pelo tamanho do ácido hialurônico, seu grau de processamento e pela proteína de ligação (ROUGHLEY, 2006). Seu aprisionamento na matriz extracelular ocorre por meio do colágeno.

Em um ambiente aquoso, o agregam se expande em virtude das cadeias de glicosaminoglicanos que possuem carga negativa e atraem água, tornando-se hidratados. Essa compressão é resistida pelas fibras de colágeno dentro da matriz extracelular. Para função adequada da cartilagem é necessário que a concentração do agregam seja alta o suficiente para

manter o equilíbrio entre a pressão e as forças de tensão a partir do alongamento das fibras de colágeno que formam uma rede rígida. Caso isso não ocorra, a cartilagem poderá ser comprometida com a compressão. Quando a cartilagem é sujeita a maior pressão, a água se desloca, entretanto quando a pressão diminui a água é atraída de volta pelo agregam, por apresentar propriedade osmótica (ROUGHLEY; MORT, 2014).

O movimento da água dentro da cartilagem durante as forças compressivas é considerado importante para a nutrição dos condrócitos. Como a cartilagem é um tecido avascular, seus nutrientes surgem por difusão do líquido sinovial e o deslocamento da água sobre compressão auxilia na remoção de produtos residuais. Entretanto, altas compressões podem predispor à sobrecarga e desta forma influenciar de forma negativa diretamente nas células, resultando em morte celular e destruição da matriz extracelular. Inclusive, especula-se que a sobrecarga pode estar ligada ao início do processo de osteoartrite (ROUGHLEY; MORT, 2014).

A proteólise da matriz extracelular da cartilagem ocorre por enzimas também conhecidas por proteases, como as serino proteases (HtrA1), cisteíno proteases (catepsinas e calpaína), metaloproteases (MMPs) e agrecanases (ADAMTS), sendo esta última, alvo de muita investigação, pois é seletiva no processo de fragmentação da molécula de agregam (ROUGHLEY, 2006).

Sendo assim, a agrecanase pode clivar a região interglobular (LARK, MICHAEL W. et al., 1995) na ligação do ácido glutâmico e L-alanina (Glu-Ala) através da sua ação no sítio de clivagem L-fenilalanina e L-asparagina (Asn-Phe) em conjunto com metaloproteinases, das quais liberam todos os domínios glicosilados da proteína, comprometendo as funções da manutenção do turgor da cartilagem promovida pela ligação das moléculas de água (CAPORALI; KUYKENDALL; STEWART, 2015). Entretanto, esse sítio não é o local preferencial de clivagem. A eficiência da agrecanase é observada em mais quatro regiões dentro do domínio G2-G3, locais ricos em condroitim sulfato, na ligação Glu-Gly, liberando assim a extremidade COOH da molécula (TORTORELLA et al., 2000).

Na espécie equina, existem dois sítios de clivagem do agregam através de metaloproteinases (VDIPEN360/361-FFAVSG e AFTSED463 / 464LVVQVT) e um sítio de clivagem por meio de agrecanase (NITEGE-392/393-ARGSVI), ambos no domínio interglobular entre G1 e G2 (CAPORALI; KUYKENDALL; STEWART, 2015), descritos anteriormente em ratos (DOEGE et al., 1987).

Ainda na espécie equina, a metaloproteinase é capaz de clivar o sítio que envolvem os domínios G2 e KS e a agrecanase cliva mais quatro locais nesse domínio, além dos sítios nos

domínios CS2 e CS3. Esses sítios (Figura 5) foram demonstrados por sequenciamento genético e são semelhantes aos sítios de clivagem descritos anteriormente em bovinos (DURIGOVA et al., 2008). (Sequenciamento - Domínio G2 e KS: AFCFRG-682/683-VSVAPS pela metaloproteinase; domínio G2 e KS: TAGQLE-1896/1897-GRGTIG, PFKEEE-2082/2083-GLGSVE, APTAQE-2187/2188-AGEGPS e PTVSQE-2287/2288-LGQRPP pela agrecanase e domínio CS2 e CS3: MQRPAE-2473/2474-ALLEIE) (CAPORALI; KUYKENDALL; STEWART, 2015).

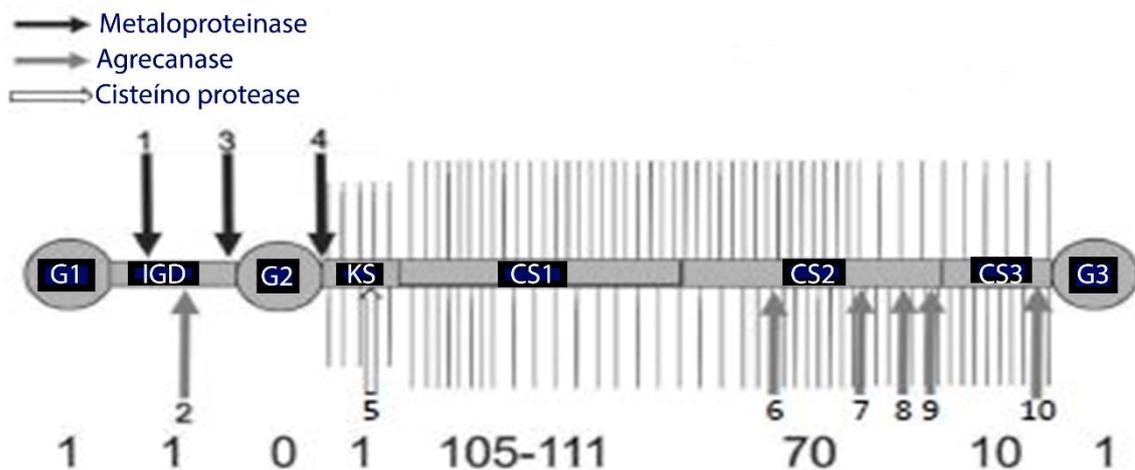


Figura 5 - Representação dos sítios de clivagem nos domínios do agregam de equino.

Legenda: Domínios: G1, interglobular (IGD), G2, Queratam sulfato (KS), Condroitim sulfato (CS1, CS2 e CS3) e G2. Fonte: (CAPORALI; KUYKENDALL; STEWART, 2015), adaptado

2.2.2.4 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos consistem de uma cadeia linear longa e unidades dissacarídicas repetidas de hexosamina (N-acetilglicosamina ou N-galactosamina), que se alternam com outro monossacarídeo, o ácido D-glicurônico, ácido L-idurônico ou galactose (JACKSON et al., 1991; KJELLÉN E LINDAHL, 1991). No seu papel estrutural, os glicosaminoglicanos são fundamentais em complexos de conglomerados e interações proteína-proteína tanto na superfície celular, quanto na matriz extracelular, por conseguinte, estão envolvidos na sinalização ou inibição de eventos celulares (SALVA; MERRILL, 2016).

A combinação dos grupos sulfatos com os grupos carboxila dos resíduos de ácido

urônico gera uma grande densidade de cargas negativas. Para minimizar as forças de repulsão, tais moléculas em solução demonstram conformação estendida, no qual formam uma hélice em que os grupos carboxila localizam-se alternadamente (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2014).

Os glicosaminoglicanos são carregados negativamente, devido à presença de grupos sulfato ou carboxila na maioria dos seus resíduos de açúcar. Os principais glicosaminoglicanos encontrados em tecidos animais são: ácido hialurônico, condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato, heparina e queratam sulfato (CHIRALDI; CIMINI; DE ROSA, 2010; CUNHA, 2017). Sendo que na cartilagem, os principais glicosaminoglicanos são ácido hialurônico, condroitim sulfato e queratam sulfato (POMIN; MULLOY, 2018).

Os diferentes glicosaminoglicanos se diferenciam entre si pelo tipo de hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina), tipo de açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose), ligações entre eles, grau de sulfatação e posição a que se ligam os grupamentos sulfato. Esses grupos se ligam aos açúcares por ligações éster (AGUIAR, 1999; CUNHA, 2017).

Em contraste com os glicosaminoglicanos sulfatados, o ácido hialurônico é sintetizado pela proteína ácido hialurônico sintase a partir de sua extremidade redutora, sendo então, liberado para o espaço extracelular. O ácido hialurônico representa o único glicosaminoglicano não sulfatado e não ligado a um núcleo proteico. A enzima hialuronidase é responsável pela sua clivagem (KÖWITSCH; ZHOU; GROTH, 2017).

O ácido hialurônico possui estrutura mais simples do que outros glicosaminoglicanos, descrito como um polímero linear de dissacarídeos, composto por unidades repetidas de N-acetilglucosamina e ácido glucurônico, ligadas entre si por meio de ligações glicosídicas β 1,4 e β 1,3 (DU SOUICH, 2014). É encontrado em alguns tecidos, como na crista de galo, humor vítreo e cartilagem e exerce funções de preenchimento de matriz e lubrificação das articulações sinoviais (SILVA, 2012).

Suas propriedades físico-químicas são determinadas por sua massa molecular e conformação espacial. As unidades dissacarídicas de ácido hialurônico podem atingir um peso molecular entre 10^5 a 10^7 Daltons (Da). As moléculas de alto peso molecular se entrelaçam, formando uma solução de alta viscosidade, com propriedades importantes para o líquido sinovial, atuando essencialmente na lubrificação das articulações, além de oferecer amortecimento nos casos de alto impacto (PRIETO et al., 2005). Entre os receptores envolvidos na sinalização do ácido hialurônico, o CD44 é o mais comum nas membranas celulares e está presente em quase todas as células humanas. O CD44 é uma glicoproteína e pode interagir com diferentes fatores de crescimento, bem como com citocinas e proteínas de matriz extracelular

como a fibronectina (SHERMAN et al., 1994). Nesse contexto, uma importante função dessa glicoproteína é a capacidade de ligar e internalizar o ácido hialurônico (VIGETTI et al., 2014).

O queratam sulfato (KS) é um outro glicosaminoglicano estudado há décadas, sendo primeiramente encontrado na córnea por Suzuki e colaboradores em 1939 (CATERSON; MELROSE, 2018).

É composto de unidades dissacarídicas de N-acetilglucosamina e galactose, e em exceção aos outros glicosaminoglicanos não contém ácido urônico. Sua sulfatação é variável como ésteres sulfatados ao carbono 6 da galactose e da hexosamina (Figura 6) (NELSON; COX, 2006).

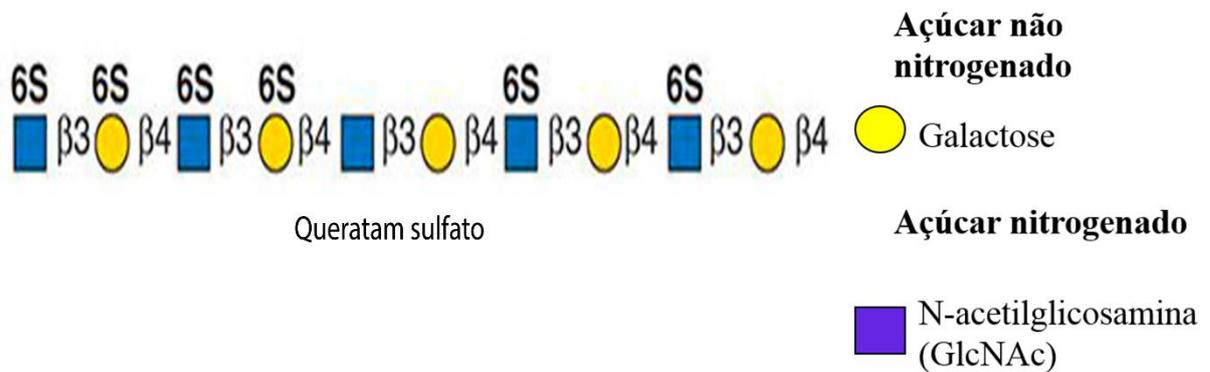


Figura 6 - Esquema da estrutura do Queratam sulfato.

Legenda: Classificação do KS, em relação ao tipo de hexosamina glicosaminoglicano, a hexosamina é N-acetilada, em relação ao tipo de açúcar é o único glicosaminoglicano que possui um açúcar neutro, a D-galactose. O tipo de ligação glicosídica intradissacarídica e interdissacarídica: ligação do açúcar não nitrogenado à hexosamina é do tipo 1→4 em KS, sendo a conformação β da ligação dependente do açúcar não nitrogenado (β-D-galactose). KS a hexosamina se liga à D-galactose por uma ligação β (1→3). Fonte: Esko et al. (2009).

Pode ser encontrado nos tecidos esqueléticos e na matriz extracelular, sendo classificado de acordo com sua estrutura, com base nos oligossacarídeos que ligam a molécula ao esqueleto proteico. Sendo assim, o queratam sulfato I (KS-I) (Figura 4), encontrado em abundância na córnea (MICHELACCI, 2003), é ligado à proteína através de resíduos de asparagina através de resíduos de N-acetilglucosamina e manose (STEIN et al., 1982). O queratam sulfato II (KS-II) (Figura 4) é encontrado na cartilagem (CAMPO; TOURTELLOTTE, 1967; CIFONELLI et al.,

1967; MICHELACCI et al., 1979) e consiste de cadeias de KS ligados em O-glicosídica por meio de N-acetilgalactosamina com serina ou treonina (POMIN, 2015).

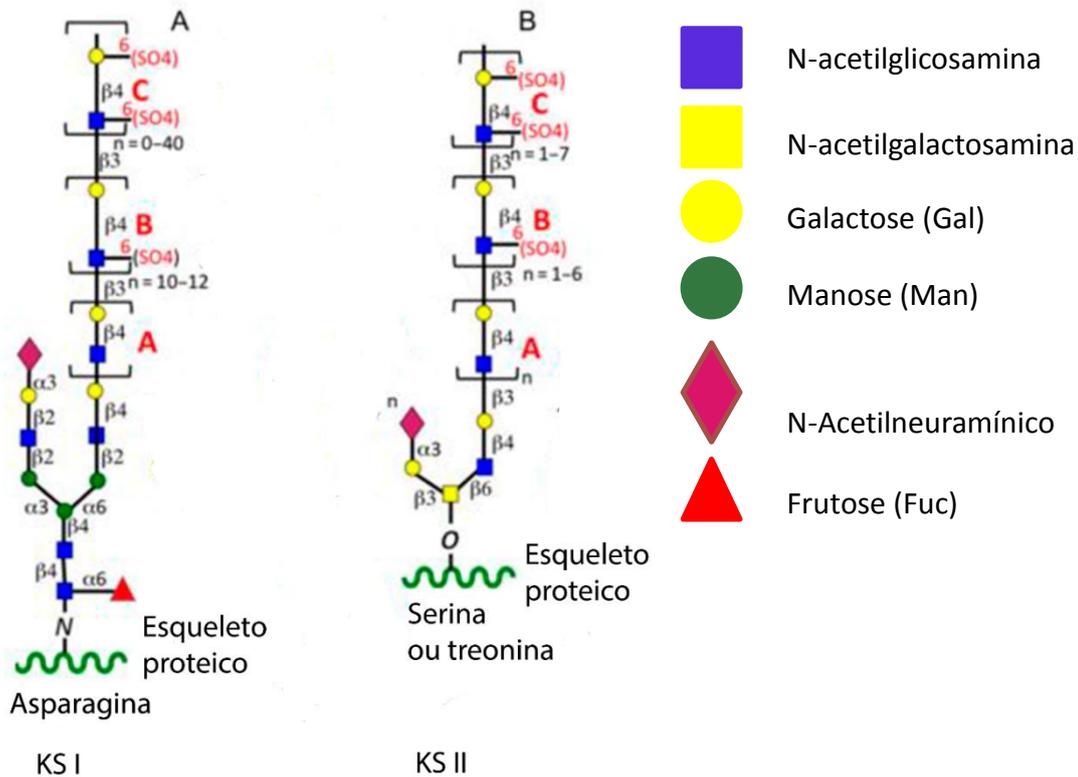


Figura 7 - Estrutura complexa do Queratam sulfato I e II (KS I e KS II).

Legenda: Queratam sulfato encontrado na córnea (KS I) e Queratam sulfato encontrado na cartilagem (KS II). **A** – Não sulfatado; **B** – Monossulfatado; **C** – Regiões dissulfatadas. Fonte: (CATERSON; MELROSE, 2018), adaptado.

O queratam sulfato pode ser limitado em seus terminais não redutores com vários tipos de monossacarídeos, incluindo o ácido siálico α (2,3) ou a α (2-6), ligados na galactose e β (1-3) N-acetilgalactosamina sulfatado. Enzimas localizadas no complexo de Golgi catalisam a transferência de sulfatos e alongamento de suas cadeias. É estendido pelas ações alternativas de β 1,4-galactosiltransferase (beta4GalT) e β 1,3 N-acetilglucosaminiltransferase (beta3GnT). Modificações de sulfatação C-6 nos resíduos de N-acetilglucosamina e uma proporção de resíduos de galactose adjacentes são observadas (UCHIMURA, 2015). Portanto, ambos (KS I e KS II) possuem manose, fucose, ácido siálico e N-acetilgalactosamina em sua composição (DEVLIN, 2007).

O queratam sulfato fornece proteção à cartilagem, pois é capaz de inibir respostas imunológicas mediadas por células T, demonstrados em estudo *in vitro* e *in vivo*. Essa resposta é evidente nas cadeias de queratam sulfato dos domínios G1 de agregam. Neste caso, as cadeias de queratam podem limitar o acesso de proteases a proteínas ou a incorporação de sítios de reconhecimento de células T (GUERASSIMOV et al., 1998).

Em uma tentativa de compreender e estabelecer marcadores específicos envolvidos em diversas lesões articulares, a quantificação da concentração de queratam sulfato em fluidos biológicos, como urina de equinos submetidos ao exercício (BACCARIN et al., 2012); no sangue de equinos (CALATRONI et al., 2008) e em cultura de condrócitos extraídos da cartilagem desafiados com interleucina 1 ($IL-1\alpha$) *in vitro*, demonstraram que este glicosaminoglicano pode desempenhar importante papel no metabolismo da cartilagem, principalmente durante os processos catabólicos, encontrados como biomarcadores em enfermidades a exemplo da osteoartrite (LEGRAND et al., 2017). Ainda nesse contexto, a quantidade de KS na cartilagem de indivíduos jovens é menor quando comparada com indivíduos adultos. Assim como na cartilagem de indivíduos com osteoartrite que demonstram quantidade de KS mais baixa (MICHELACCI et al., 1979) e foi também observado menor porcentagem de KS em tumores benignos (encondromatose) e malignos (condrossarcoma) de cartilagens (MOURÃO et al., 1979; MICHELACCI et al., 1981), sendo assim, possivelmente durante os processos de crescimento e ossificação, o agregam presente na cartilagem possui menos cadeias de KS.

2.3 A membrana sinovial

A membrana sinovial é formada por duas camadas, denominadas íntima e subíntima, com pequena quantidade de ácido hialurônico entre elas. A camada íntima é composta por dois tipos de células, chamados sinoviócitos do tipo A, que são semelhantes aos macrófagos, com lisossomas e um grande complexo de Golgi e sinoviócitos do tipo B, que são os fibroblastos sinoviais e produzem colágeno, fibronectina e ácido hialurônico para compor o líquido sinovial (GOODRICH; NIXON, 2006; SMITH, 2011; HUI et al., 2013). A camada subíntima é composta de vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo que se fundem à camada externa da cápsula articular (KLEINE; BUDSBERG, 2017).

O diâmetro e a permeabilidade da microvascularização sinovial podem ser alterados por

mediadores, incluindo mediadores lipídicos como prostaglandinas e leucotrienos e neuropeptídeos como a substância P e bradicinina, liberados no decurso da sinovite, resultando em extravasamento plasmático e distensão articular. Além disso, a sinovite prolongada está associada à angiogênese, espessamento e fibrose da cápsula sinovial, contribuindo para os sintomas clínicos e propagação de doenças articulares (DE GRAUW, 2011).

A membrana sinovial secreta o líquido sinovial, para lubrificar e nutrir a articulação, atuando também na remoção de substâncias indesejáveis (SUTTON et al., 2009). Adicionalmente, a membrana sinovial regula o ambiente articular de forma passiva e ativa: por meio da difusão de substâncias dos capilares e por secreção de substâncias derivadas dos sinoviócitos, respectivamente. Outras funções conhecidas da membrana sinovial envolvem a regulação da concentração proteica, de ácido hialurônico e fagocitose promovida por sinoviócitos do tipo A, consistindo na principal barreira no transporte de moléculas (MCILWRAITH, TROTTER, 1996).

2.4 O líquido sinovial

O líquido sinovial é um fluido viscoso, translúcido, claro, de coloração amarelo palha. A celularidade do líquido sinovial do equino é geralmente menor que 500 células nucleadas/mL, principalmente as mononucleares (DE GRAUW, 2011). É produzido pela camada interna da cápsula articular, conhecida como membrana sinovial (STEEL, 2008). Sua função na manutenção da homeostase articular é fornecida por meio dos seus constituintes moleculares e celulares, como: células, ácido hialurônico e lubricina (HUI et al., 2013).

As proteínas presentes no líquido sinovial dos equinos participam da homeostase, embora também estejam envolvidas nos processos de artropatias (CHIARADIA et al., 2012).

A presença do ácido hialurônico no líquido sinovial lhe garante viscosidade. Outra importante função é a atuação como barreira para a troca de moléculas pequenas no líquido sinovial (McILWRAITH; TROTTER, 1996).

A capacidade de lubrificação das superfícies da cartilagem desempenhada pelo líquido sinovial é também dependente da presença de glicoproteína, especialmente a lubricina, também chamada de proteína da zona superficial pela sua localização na membrana sinovial e na cartilagem (SMITH, 2011). Sua função é voltada para redução da tensão superficial, ao tracionar as superfícies articulares em direções opostas, impedindo assim a fusão articular

(McILWRAITH; TROTTER, 1996).

O ácido hialurônico é provavelmente o responsável por reter volume constante de água no líquido sinovial durante o exercício (LEVICK; MCDONALD, 1995). Este volume constante atua como almofada para o tecido sinovial e como um reservatório de lubrificante para a cartilagem. É provável que a taxa de síntese de ácido hialurônico e sua presença no líquido sinovial dependam da estimulação mecânica dos fibroblastos presentes na camada íntima. Assim, quando o volume do líquido sinovial é elevado, as tensões mecânicas nos fibroblastos da íntima são reduzidas resultando na diminuição da produção de ácido hialurônico. Em contrapartida, uma situação de diminuição no volume do líquido sinovial, provocará aumento na taxa de produção desse componente (SMITH, 2011).

Frente a lesão articular, a composição e função do líquido sinovial é alterada, devido às modificações nos tecidos adjacentes. O líquido sinovial interage e medeia interações entre estes tecidos e, por este motivo, os quadros em que há alterações no metabolismo celular influenciam diretamente na sua composição, resultando em ambiente catabólico, assim como na incapacidade de lubrificar a articulação (HUI et al., 2013).

Em um processo de inflamação aguda das articulações, o número de células pode aumentar no líquido sinovial, pelo rápido influxo de neutrófilos, que então se tornam o tipo celular predominante (DE GRAUW, 2011).

Comumente, o líquido sinovial pode ser obtido de forma simples, sem acarretar destruição do tecido. Sendo assim, os biomarcadores moleculares presentes no líquido sinovial têm sido estudados extensivamente. O reconhecimento precoce do desequilíbrio homeostático pode ter alto valor diagnóstico e prognóstico (TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017).

Marcadores diretos incluem fragmentos de clivagem e produtos de síntese; componentes de tecido articular que refletem diretamente nos processos anabólicos e catabólicos, como marcadores relacionados ao colágeno ou ao metabolismo do agregam, moléculas de ação lubrificante ou proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP). Os biomarcadores indiretos são moléculas que afetam o metabolismo dos tecidos, mas não são gerados durante a síntese ou degradação do tecido. Os mediadores inflamatórios, as enzimas, citocinas e fatores de crescimento são os mais estudados (TE MOLLER; VAN WEEREN, 2017).

Evidências sugerem que o processo inflamatório, mesmo quando em baixo grau e a reação imunológica podem contribuir para a patogênese da osteoartrite, sugerindo que esses dois mecanismos podem favorecer no desenvolvimento de efusão e possam não ser tão distintos como se pensava originalmente (SMITH, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

CTMs representam uma importante ferramenta no desenvolvimento de abordagens terapêuticas para diversas enfermidades. A compreensão de seu potencial regenerativo e imunomodulador fornece esclarecimento necessário para seu uso na Medicina e Medicina Veterinária, em especial para tratar distúrbios do sistema musculoesquelético, dos quais os problemas articulares ganham destaque por ser um tecido altamente especializado, que exibe ineficiência regenerativa. Sendo assim, os problemas articulares são capazes de debilitar equinos e comprometer sua vida atlética, visto a diminuição de seu desempenho e aposentadoria precoce, conseqüentemente.

Embora as CTMs necessitem expressar características semelhantes para fins de caracterizá-las, há indícios de que exista diferenças entre as diversas fontes das quais são extraídas, principalmente no que se refere ao processo de diferenciação celular, com maior interesse voltado para o conhecimento das propriedades que essas células possuem em sintetizar moléculas relacionadas ao tecido específico, e conseqüentemente, promover o processo de regeneração tecidual. A partir disso, pesquisas se aprofundam cada vez mais em descobrir suas distintas capacidades de diferenciação (IM, 2017), razão que motivou o presente estudo.

4 OBJETIVOS

1. Coletar, isolar e expandir CTMs derivadas do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo de equinos.
2. Realizar a diferenciação condrogênica de todas as CTMs obtidas das fontes mencionadas.
3. Realizar a extração e quantificação de proteoglicano após diferenciação celular, para avaliar e comparar as propriedades de síntese dessa molécula produzida pelos condrócitos diferenciados e conhecer sua capacidade em formar matriz extracelular de qualidade, típica de cartilagem hialina.
4. Estabelecer qual fonte de CTMs é mais indicada para originar estrutura cartilágnea hialina para posterior terapêutica para enfermidades articulares.
5. Avaliar o comportamento das células-tronco mesenquimais após diferenciação condrogênica por meio da formação de microesferoides a partir de nanopartículas.

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 (FMVZ/USP), conforme o protocolo de número 1143080617 (ID 005387).

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Cultivo Celular no Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP e no Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP.

5.1 Animais

Dez cavalos clinicamente saudáveis com idade entre três e cinco anos, (Quadro 2) participaram deste experimento como doadores de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo. Os animais foram incluídos no experimento após avaliação clínica, a partir de exame físico completo e permaneceram no Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP em baias com camas de serragem, sob condições naturais de luz, umidade e temperatura, e receberam alimentação de feno de gramínea *coast cross* (*Cynodum dactylum*), ração comercial e água *ad libitum*.

Quadro 2 - Identificação dos animais doadores de CTMs

Cavalos	Fonte de células			Idade	Sexo	Peso
				(anos)		(kg)
1	LS - TTE	MO	AD	5	Macho	300
2	LS - RCD	MO	AD	5	Macho	410
3	LS - TTD	MO	AD	4	Macho	300
4	LS - TTE	MO	AD	3,5	Macho	310
5	LS -TTE	MO	AD	4	Macho	310
6	LS - TTD	MO	AD	5	Macho	290
7	LS - TTE	MO	AD	3,5	Macho	290
8	LS - TTD	MO	AD	4	Macho	300
9	LS - TTD	MO	AD	4	Macho	295
10	LS - TTE	MO	AD	5	Macho	330

Legenda: LS – líquido sinovial; TTE – articulação tibiotársica esquerda; TTD – articulação tibiotársica direita; MO – medula óssea; AD – tecido adiposo.

5.2 Preparo dos animais para coleta das amostras

Anteriormente ao procedimento de coletas das amostras de líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo, os animais iniciaram o preparo para sedação. Sendo assim, os animais ficaram em jejum alimentar por aproximadamente 12 horas. No dia da coleta, os cavalos passaram por exame físico para avaliação das funções vitais e em seguida, foi realizada aplicação de cloridrato de detomidina na dose de 0,02 mg/kg pela via intravenosa.

5.3 Coleta de líquido sinovial

Anteriormente a punção, a região da articulação tibiotársica foi preparada com tricotomia, seguido de antissepsia com clorexidine degermante a 2% e solução de clorexidine alcóolico. O acesso para punção foi medialmente a veia safena, abaixo do maléolo da tibia na

face dorsomedial da articulação do tarso. O líquido sinovial foi obtido por artrocentese com agulhas hipodérmicas 30 x 08 acopladas em seringas de 10 mL e foi obtido um volume entre 2 e 6 mL. Após a coleta, foi aplicado rifamicina sódica tópica, seguido de curativo no local da punção. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de cultivo celular onde foram processadas imediatamente.

5.4 Coleta de medula óssea

Para a coleta de medula óssea foi realizado tricotomia na área do osso esterno. Após palpação da 5^a estérnebra, foi realizada antisepsia no local com clorexidine degermante a 2% e clorexidine alcoólico, seguido de bloqueio anestésico com 20 mL de cloridrato de lidocaína sem vasoconstritor no tecido subcutâneo. Para o bloqueio, a agulha foi inserida no sentido ventrodorsal perpendicular à pele e a aplicação foi realizada concomitantemente à retirada da agulha, até formar um botão anestésico na pele. Em seguida, a punção foi realizada com agulha própria para coleta de medula óssea do tipo *Jamshidi* 8G, 10 cm (figura 8), no sentido ventrodorsal perpendicular à pele. Após introdução da agulha, uma seringa de 20 mL contendo 1 mL de heparina foi acoplada para aspiração do conteúdo medular (figura 8). Após a coleta, foi aplicado rifamicina sódica tópica no local da punção e os animais receberam flunixin meglumine 2,2 mg/kg por via intravenosa em dose única, como anti-inflamatório e analgésico. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de cultivo celular onde foram processadas imediatamente.

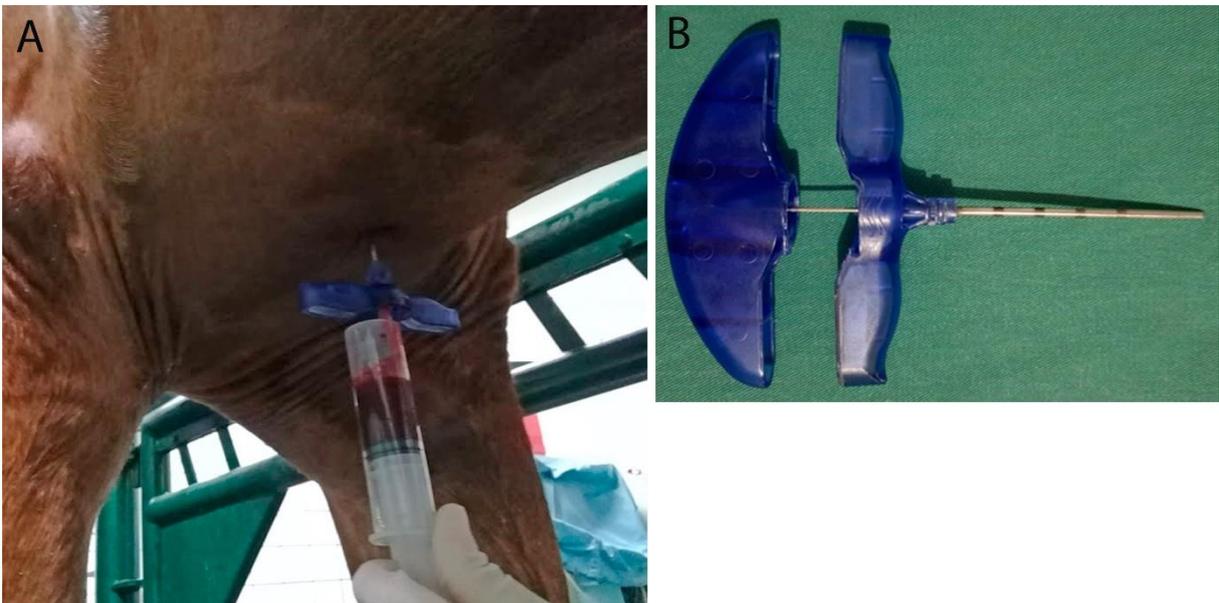


Figura 8 - Coleta de medula óssea e agulha tipo *Jamshidi* para coleta de medula óssea.

Legenda: **A:** Procedimento de coleta de medula óssea de equino demonstrando o local anatômico da 5^a estérnebra do osso esterno para aspiração de conteúdo medular (interior da seringa). **B:** Agulha para punção de medula óssea modelo Jamshidi, de calibre 8 G e 10 cm de comprimento. Fonte: Fülber, 2019.

5.5 Coleta de tecido adiposo

A coleta de tecido adiposo foi realizada na região lateral à base da cauda, acima do músculo glúteo dorsal. Para este procedimento foi realizada antissepsia no local com clorexidina degermante a 2% e clorexidina alcoólico seguido de bloqueio anestésico com cloridrato de lidocaína sem vasoconstritor.

Uma incisão na pele com lâmina de bisturi foi realizada e, em seguida a pele foi divulsionada para exposição de tecido adiposo e posterior coleta (figura 9). O tecido adiposo foi removido com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e a amostra foi armazenada em tubos cônicos de 50 mL contendo meio de cultivo Dmem/F12 suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de gentamicina e 0,25% de anfotericina B. A pele foi suturada em pontos simples separado com fio de *nylon 0* e os curativos foram realizados diariamente até perfeita cicatrização. Em seguida, a amostra foi encaminhada para o laboratório de cultivo celular onde foi iniciado o processamento imediato.



Figura 9 - Imagem representativa das coletas de tecido adiposo nos equinos.

Legenda: Imagem demonstrando a coleta de tecido adiposo acima do músculo glúteo dorsal (base da cauda). Foi realizada incisão de aproximadamente 5 cm de comprimento paralela e aproximadamente 15 cm abaxial à coluna vertebral, viabilizando a visualização de tecido adiposo entre a pele e a musculatura. Fonte: Fülber, 2019.

5.6 Cultivo de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial

O líquido sinovial foi processado no laboratório de cultivo celular, em fluxo laminar vertical, iniciando a cultura primária, o isolamento e a expansão das células. O líquido sinovial foi transferido para frascos de cultivo de 25 cm², num volume máximo de 3 mL de amostra por frasco, e foram preenchidos com 4 ml de meio de cultivo DMEM/F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina (200 Mmol) 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. Após aderência das células, o meio de cultivo foi trocado, utilizando 5 mL de meio a cada troca, realizadas a cada 48 horas, até atingirem 70 a 80% de confluência celular.

5.7 Cultivo de células-tronco mesenquimais oriundas de medula óssea

A amostra proveniente da medula óssea foi diluída em tampão fosfato-salino (PBS) na proporção de 1:1 e delicadamente depositada sobre solução de Ficoll 1077 g/mL (proporção 1:1). Em seguida, foi centrifugada a 400 x g durante 30 minutos à temperatura ambiente, com o objetivo de separar as células por gradiente de densidade. Após centrifugação, a camada contendo CTMs (fração de células mononucleares) foi ressuspensa em PBS, e novamente centrifugada a 720 x g durante 10 minutos, seguido por mais uma etapa de lavagem, nas mesmas condições já descritas. O *pellet* formado foi transferido para frascos de cultivo de 25 cm², e preenchidos com 5 mL de meio de cultivo DMEM/F12, suplementado (10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina e 0,25% de anfotericina B), incubados a uma temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. Após aderência das células, o meio de cultura foi removido e as trocas desse meio foram realizadas a cada 48 horas, até obter confluência celular de 70 a 80% de células expandidas no frasco.

5.8 Cultivo de células-tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo

O tecido adiposo foi submetido a três lavagens com PBS com penicilina/estreptomicina e anfotericina B. Após as lavagens, o tecido adiposo foi removido, seco com gaze estéril e pesado em balança de precisão. Em seguida, o tecido foi colocado em placa de Petri e fragmentado com auxílio de pinça anatômica e lâmina de bisturi, com o objetivo de aumentar a superfície de contato e facilitar a digestão enzimática. Para este fim, foi usado solução 2 mg/mL de colagenase tipo I diluída em meio DMEM/F12 com penicilina/estreptomicina e anfotericina B filtrada com filtros de 22 µm. A cada 1 g de tecido adiposo, foi utilizado 2 mL de meio de cultura com solução de colagenase. Esta solução foi homogeneizada junto ao tecido em placa de Petri e incubado *overnight* por 12 a 16 horas em estufa a 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. Após este período, o conteúdo foi transferido para tubos cônicos tipo falcon de 15 mL, e acrescido meio de cultura suplementado (10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina e 0,25% de anfotericina B) e centrifugado por 10 minutos a 650 x g. A fração adiposa (sobrenadante) foi

descartada e o *pellet* foi ressuspendido em um novo tubo cônico tipo falcon de 15 mL, e homogeneizado novamente em meio de cultura como descrito acima e centrifugado novamente. Este último procedimento foi repetido mais uma vez. Posterior a centrifugação, o *pellet* formado foi homogeneizado em meio de cultura e o conteúdo foi transferido para frascos de cultura de 25 cm², incubados a uma temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. Após aderência das células, o meio de cultura foi removido e iniciaram-se as trocas deste meio a cada 48 horas, até obter confluência celular de 70 a 80% de células expandidas no frasco.

5.9 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi realizada a partir de duas metodologias, sendo a primeira já descrita, estabelecida e publicada por diversos autores (SAKAGUCHI et al., 2005; BARBERINI et al., 2014; FÜLBER et al., 2016), a partir da formação de esferoides em tubos cônicos com meio indutor comercial. Outra metodologia foi proposta neste estudo, com início do processo de indução condrogênica com a utilização nanopartículas e plaqueamento de células em microplacas de 96 poços. Este método ainda não foi descrito em estudos com indução na linhagem de condrócitos.

Ambas as metodologias foram realizadas a partir de cultivo com o mesmo meio de cultura indutor de condrócitos (meio comercial StemPro chondrogenesis differentiation kit – Thermo Fisher Scientific).

5.9.1 Diferenciação condrogênica em tubos cônicos (esferoides)

A diferenciação condrogênica foi realizada nas amostras de CTMs, isoladas a partir de líquido sinovial (11 amostras, sendo a décima primeira obtida do nosso banco de células anteriormente), medula óssea (10 amostras) e tecido adiposo (10 amostras), somando 31 amostras. Neste ensaio, as células foram inicialmente cultivadas (como já descrito acima) em frascos de 75 cm² e assim que atingiram 70% de confluência, foram removidas a partir de tratamento enzimático com tripsina (tripsinização), que consiste na remoção do meio de cultivo,

seguido de duas lavagens com 2 mL de PBS em cada e posteriormente adicionado 1 mL de tripsina 0,25%. As amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2 mL de meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino para inativação da tripsina. A suspensão celular foi aspirada e transferida para um tubo cônico de 15 mL, centrifugada durante 10 minutos a 400 x g. O botão celular foi ressuspenso em meio de cultivo DMEM/F12 e as células foram contadas em câmara de Neubauer, com início do processo de indução condrogênica em aproximadamente 2×10^6 células viáveis por amostra. As células foram então cultivadas nos tubos cônicos com capacidade para 15 mL, onde foi adicionado 2 mL do mesmo meio de cultivo que permaneceu por 48 horas. Após este período, o meio foi removido e iniciou-se o processo de diferenciação condrogênica com meio indutor comercial (StemPro chondrogenesis differentiation kit – Thermo Fisher Scientific). As células foram mantidas no fundo do tubo cônico, para originar esferoides e a troca de meio foi realizada a cada 48 horas, no decorso de 21 dias.

Após este processo, os esferoides obtidos foram pesados e congelados no ultrafreezer -80°C para posterior extração de proteoglicanos com hidrocloreto de guanidina (GuHCl).

5.9.2 Diferenciação condrogênica em microplaca (microesferoides)

A metodologia de diferenciação condrogênica em microplaca (marca Greiner Bio-One) foi realizada para conhecer o comportamento das células em um sistema indutor de cultura tridimensional (3D) e explorar a capacidade de diferenciação em condrócitos em um menor tempo do que já preconizado na literatura em torno de 21 dias. Para tanto, as células viáveis foram plaqueadas em triplicatas em um total de 1×10^4 em cada poço e adicionado 100 µL de meio de cultivo DMEM/ F12 com 0,3 µL de nanopartículas (nanoshuttleTM marca Greiner Bio-One). A placa foi incubada em temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. Após 24 horas, as nanopartículas foram incorporadas às membranas das células, e então a placa foi incubada em cima de um ímã, que submete as células ao início da cultura tridimensional. Nessa técnica as células recebem nanopartículas biocompatíveis constituídas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina que magnetiza as células e permite modelamento celular com configuração em microesferoide, onde elas se agregam e iniciam a síntese de matriz extracelular. As microplacas de 96 poços possuem sistemas diferenciados com propriedade repelente que não permite a aderência celular à superfície

plástica. Iniciou-se o processo de diferenciação condrogênica com meio indutor comercial (StemPro chondrogenesis differentiation kit – Thermo Fisher Scientific), que foi trocado a cada 48 horas. Para as trocas de meio de cultivo indutor, a microplaca de 96 poços era mantida em cima do imã, para que os microesferoides não fossem perdidos nesse momento. Os microesferoides formados foram removidos da cultura aos 4, 7, 14 e 21 dias após o início da diferenciação condrogênica. Dois microesferoides de cada amostra foram fixados em paraformaldeído a 2% para realizar o ensaio de imunofluorescência confocal com o anticorpo anti-agrecam e anti-queratam sulfato; e a extração de proteoglicanos com GuHCl foi feita em um microesferoide de cada grupo e tempo para quantificação de agrecam pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e proteínas solúveis pelo método de biureto modificado (BCA = ácido bicinconínico, *Pierce Assay Kit*).

5.10 Extração de proteoglicanos

Após o processo de diferenciação condrogênica, os esferoides obtidos foram pesados e fragmentados em pequenas frações. Os microesferoides não foram pesados nem fragmentados, pois o seu tamanho não permitiu. Em seguida, os esferoides foram colocados em criotubos de 2 mL e incubados com 1 mL de solução de GuHCl 4 M em tampão acetato de sódio 0.05 M, pH 4.5 com 10 µL de inibidor de proteases, sob agitação a 4°C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 260 x g, e o sobrenadante reservado em tubos cônicos de 15 mL e congelados a -20°C. Em seguida, foi acrescido mais 0,5 mL de solução 4 M de GuHCl em tampão acetato de sódio 0.05 M, pH 4.5, acrescidos de 5 µL de inibidor de protease no *pellet* formado após a centrifugação e incubado novamente nas mesmas condições descritas. Após incubação, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 260 x g, o sobrenadante novamente reservado em tubos cônicos e o *pellet* formado foi descartado. As macromoléculas presentes no sobrenadante foram precipitadas através da lenta adição de 3 volumes de metanol (4,5 mL) e então foram incubadas a -20°C, *overnight*. Seguindo a incubação, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 1500 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi coletado e seco a vácuo. As amostras foram ressuspensas em 50 µL de água destilada para quantificação de agrecam pelo método de ELISA e de proteínas solúveis pelo método de biureto modificado (BCA), bem como para detecção e análise do agrecam e queratam sulfato por meio de *Immunoblotting*. Os microesferoides passaram por esse processo

supracitado, entretanto o volume adicionado das soluções inicialmente foi menor (500 μL de GuHCl e 5 μL de inibidor de protease) e as análises de quantificação de proteína e agregam foram realizadas como descrita para os esferoides.

A mesma metodologia de extração de proteoglicanos foi empregada à dois fragmentos de cartilagem colhidos após o óbito de um cavalo, obtendo como produto agregam equino, para ser usado como padrão das amostras no método de quantificação da concentração do agregam por ELISA.

5.11 Dosagem da concentração total de proteínas solúveis

Sabe-se que a cartilagem hialina possui uma quantidade considerável de proteína, entre elas, proteoglicanos, formados por esqueleto proteico, colágeno e proteínas não colágenas, portanto, a dosagem da concentração total de proteínas solúveis foi realizada no presente estudo para estabelecer a razão de agregam por proteína, ou seja, um fator de correção para diferenças de peso ou tamanho dos esferoides e microesferoides. Para tanto, o teste foi feito por meio da metodologia de biureto modificado com o Kit *Pierce BCA Protein Assay Thermo Cientific*TM, através de reação colorimétrica. Em uma placa de 96 poços, foram aplicadas 5 μL de amostra diluído em 45 μL de água destilada, em duplicatas. A curva padrão foi realizada nas duas primeiras colunas da placa, deixando os primeiros dois poços para o branco. A curva padrão realizada com BSA (soro albumina bovina) 2 mg/mL, iniciou em 50 μg , seguido de diluição sequencial em PBS (25 μg , 12.5 μg , 6.25 μg , 3.13 μg , 1.56 μg , 0.78 μg). Os reagentes foram diluídos conforme as instruções do *Datashet* na proporção de 1:50 (reagente A e reagente B), e aplicados à placa em um volume de 200 μL por poço. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura de 37°C e em seguida a leitura foi realizada em absorbância de 560 nm, em leitor de microplaca (*Versa max microplate reader*), utilizando o programa *SoftMax Pro*.

5.12 Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA

As amostras de agregam de equino foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,55%, em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05 M e pH 9 (PDA), em cuba refrigerada,

submetida a uma diferença de potencial de 100 V, por aproximadamente uma hora, como descrito por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976) para conhecer a concentração total do agregam e realizar a curva padrão posteriormente no ensaio de ELISA. Duas lâminas foram obtidas: na primeira lâmina foram utilizados 5 μ L de amostras sem diluição, e na segunda, as amostras de agregam foram diluídas em água destilada: 1:10 e 1:20, em duplicatas. O padrão de condroitim sulfato (5 μ L), foi utilizado na concentração de 1 mg/mL, também em duplicata. O corante vermelho de cresol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a eletroforese o proteoglicano e glicosaminoglicano foram fixados no gel por brometo de cetiltrimetilamônio (cetavlon) 0,1% pelo tempo mínimo de duas horas. Em seguida o gel foi coberto com papel filtro e seco sob corrente de ar aquecida. A lâmina foi corada com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% em etanol 50% por 15 minutos. O excesso de corante foi removido pela solução de ácido acético 1% em etanol 50%. A lâmina foi escaneada (Epson Expression 1680) para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas (Lauch VisonWorksLS). Os valores das unidades densitométricas foram obtidos e dessa forma, foi estabelecido a concentração inicial da curva padrão realizada no método de ELISA e quantificação do agregam das amostras originadas a partir dos esferoides e microesferoides.

5.13 Quantificação do agregam pelo método ELISA

A curva padrão realizada com BSA 2 mg/mL, iniciou em 50 μ g, seguido de diluição sequencial em PBS (25 μ g, 12,5 μ g, 6,25 μ g, 3,13 μ g, 1,56 μ g, 0,78 μ g).

A quantificação da concentração do agregam foi realizada pelo método de ELISA. Em uma placa de 96 poços foram aplicadas amostras em duplicata (foram utilizadas 5 μ L ou 2 μ L de amostra em PBS, que foi estabelecido conforme o resultado da dosagem de proteínas solúveis). A curva padrão foi feita nas duas primeiras colunas, a partir de agregam de equino extraído da cartilagem (descrito no tópico extração de proteoglicanos e eletroforese em gel de agarose tampão PDA). Optou-se então por utilizar o padrão agregam 1, diluído 1:10 (0,8 mg/mL), com aplicação na placa de 5 μ L em uma concentração inicial sabida de 4 μ g, seguido de diluição sequencial em PBS (2 μ g, 1 μ g, 0,5 μ g, 0,25 μ g, 0,125 μ g e 0,0625 μ g). Os dois primeiros poços foram reservados para o branco. O volume total de cada poço foi de 50 μ L. A placa foi mantida sob agitação constante durante 60 minutos em temperatura ambiente, seguido

de 3 lavagens com PBS. Em seguida, foi adicionado 200 µL de BSA 1% em PBS, para bloquear os sítios de ligação inespecíficas e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 60 minutos sob agitação constante. Após o tempo de incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS e então foi adicionado anticorpo primário (monoclonal) anti-agrecam de cavalo (produzido em camundongo, marca *Imuny*), diluído 1:1000 em solução BSA 1% em PBS (volume total de 50 µL por poço), e a placa foi novamente incubada por 60 minutos, sob agitação constante. Após incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e em seguida foi adicionado anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase (HRP), diluído 1:50000 em BSA 1% em PBS (volume total de 50 µL por poço), que foi incubado por mais 60 minutos, sob agitação constante em temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e foi adicionado 50 µL de substrato preparado anteriormente (reagente A: solução cromógeno estabilizado com reagente B: solução de peróxido na proporção 1:1). A reação foi realizada protegida da luz e ficou incubada por 15 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M (reagente *stop solution*), e a absorbância das amostras foi lida à 492 nm em leitor de microplaca *Versa max microplate reader*, utilizando o programa *SoftMax Pro*.

5.14 Identificação de agrecam e queratam sulfato dos esferoides por *Immunoblotting*

Após extração do proteoglicano com GuHCL, as amostras foram fracionadas para início das técnicas. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, como já descrito acima (tópico Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA). Após a corrida, as amostras foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e Zeta-Probe por capilaridade durante 1 hora e 30 minutos. Passado o tempo de transferência, a membrana foi mergulhada em solução de BSA a 1% para o bloqueio dos sítios inespecíficos por 1 hora sob agitação. Transcorrido esse tempo, a membrana foi lavada com PBS e adicionado anticorpo primário monoclonal anti- agrecam de cavalo (1 mg/mL, produzido em camundongo, marca *Imuny*) e anti-queratam (por se tratar de anticorpos não conjugados duas lâminas foram realizadas separadamente) associado à BSA 1% (diluição 1:1000), ou seja, 10 µL de anticorpo primário em 10 mL de BSA 1%, durante 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Após incubação, foram feitas 3 lavagens rápidas e 3 lavagens lentas de 5 minutos, quando então foi adicionado anticorpo secundário anti camundongo IgG conjugado com peroxidase (HRP -

Abcam), na diluição 1:50000, incubado por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Após este período, foram realizadas 3 lavagens rápidas, seguido de 3 lavagens lentas de 5 minutos cada. Por fim, a membrana foi revelada com substrato quimioluminescente (Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Pico) e fotografada (GelDoc-It Imaging System, UVP).

Outra análise foi realizada ainda como um método para identificação de agregam. Para isso, foram utilizadas amostras provenientes dos esferoides após extração de proteoglicanos com GuHCl. O volume de 5 µL das amostras foram incubados com 10 µL de condroitinase AC *overnight*. A enzima é capaz de degradar condroitim sulfato A e C ou condroitim 4- e 6- sulfato). Como controle, 5 µL de amostras iguais foram apenas incubadas com 10 µL de água destilada. Após incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, tampão PDA (descrito no tópico Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA). A lâmina foi feita a partir de 5 µL de amostra e padrão de condroitim sulfato em duplicata, sendo um padrão também incubado com condroitinase AC e outro incubado com água destilada. Após correr a lâmina por eletroforese, o protocolo realizado nesse processo foi idêntico ao descrito anteriormente.

5.15 Técnica de imunofluorescência confocal nos microesferoides

Os microesferoides foram incubados com solução de glicina 0,1 M em PBS por 10 minutos, pois as amostras foram anteriormente fixadas em paraformaldeído que faz ligações cruzadas com proteínas de superfície. Transcorridos os 10 minutos, a solução foi removida e foi adicionado solução de bloqueio composta de 5% de soro fetal bovino e 0,1% de saponina diluído em PBS, seguido de incubação durante 60 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, a solução de bloqueio foi removida e os microesferoides foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida, foi adicionado solução com anticorpo primário anti-agregam (produzido em camundongo, marca *Imuny*), diluído 1:200 em solução de saponina 0,1% em BSA 1% em PBS e foram incubados por 60 minutos, em temperatura ambiente. Após incubação, a solução contendo anticorpo primário foi removida e os esferoides foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida, o PBS foi removido e acrescido anticorpo secundário anti IgG de camundongo produzido em cabra (2 mg/mL) (alexa flúor 633 - invitrogen), diluído 1:200, em solução de saponina 0,1% em BSA 1% em PBS e então as amostras foram incubadas por 60 minutos, protegidos de luz, em temperatura ambiente. A solução foi removida após o tempo de incubação e os esferoides foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida, foi realizada a incubação com

Dapi (diluído 1:10000), na mesma solução de diluição dos anticorpos, durante 40 minutos, protegidos de luz, em temperatura ambiente. Após incubação, os microesferoides foram lavados mais 3 vezes com PBS, em seguida as lâminas foram confeccionadas e as imagens foram realizadas em microscopia confocal Leica TCS SP8. Como controle, uma amostra foi preparada como branco (sem o anticorpo primário), para configuração do laser e faixa de excitação do anticorpo primário.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo programa SAS System for Windows 9.3 (SAS, 2000). Os dados foram testados para normalidade dos resíduos (Distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias utilizando o aplicativo *Guided Data Analysis*. Transformações foram feitas quando necessárias. Os efeitos da origem (líquido sinovial – LS, medula óssea – MO e tecido adiposo – AD), dos tempos (4, 7, 14 e 21 dias) e da interação Origem*Tempo foram determinadas pelo PROC MIXED de Medidas repetidas no tempo, seguido do teste de Duncan em que um valor de probabilidade de $p < 0.05$ foi considerado significativo. Os resultados foram descritos pelas médias não transformadas e \pm erro padrão.

7 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram demonstrados mediante gráficos, tabelas e figuras. Os valores da média e \pm erro padrão foram descritos em tabelas e gráficos no decorrer do texto. Os valores individuais referentes a todas as variáveis estudadas foram descritos em tabelas e encontram-se nos apêndices (A, B e C).

7.1 Animais e coletas

Os animais doadores de células-tronco não apresentaram alterações sistêmicas. Os locais de punção ou de incisão (articulações, região do esterno e do músculo glúteo dorsal), não apresentaram indícios de processo inflamatório local, mantendo tamanho, temperatura e sensibilidade dentro dos padrões de normalidade quando examinados por meio de inspeção e palpação. A região do músculo glúteo dorsal, onde o tecido adiposo foi coletado cicatrizou perfeitamente aos 10 dias posteriores à coleta, quando os pontos de sutura foram retirados. Nenhum animal apresentou processo infeccioso ou inflamatório. Todas as coletas foram razoavelmente fáceis de serem realizadas e satisfatórias, entretanto a coleta de líquido sinovial foi mais fácil e exigiu menos materiais de coleta.

7.2 Cultivo de células-tronco mesenquimais

As CTMs das três fontes estudadas demonstraram morfologia fibroblastoide e aderência ao plástico, quando observadas ao microscópio invertido. Essa é uma característica importante encontrada nas CTMs (Figura 10).

As CTMs provenientes do líquido sinovial iniciaram a aderência ao plástico com aproximadamente quatro dias de cultivo, visualizadas por microscopia invertida. Entretanto, ainda havia muitas células não aderentes. Sendo assim, apenas metade do meio de cultura foi removido e acrescido mais 3 mL de meio, para dar oportunidade às células não aderentes e sua aderência posterior. A confluência de aproximadamente 70% ocorreu em média de 25.5 ± 3.8

dias, quando foi realizada a remoção destas células por meio de dissolução enzimática com tripsina, originando a primeira passagem das células (P1), das quais foram congeladas ou mantidas em cultivo em frasco de 75 cm² para dar sequência no experimento.

A primeira troca de meio das CTMs oriundas da medula óssea ocorreu após cinco dias de cultivo. A confluência de aproximadamente 70% foi alcançada em média de 18.5 ± 1.89 dias, quando as células foram tripsinizadas em P1, das quais foram congeladas ou mantidas em cultivo em frasco de 75 cm², para dar sequência no experimento.

Já as CTMs extraídas do tecido adiposo demonstraram aderência ao plástico um dia após início da cultura, demonstrando alta capacidade de proliferação. As células alcançaram confluência de 70% em média de 3.8 ± 0.89 dias. Como descrito anteriormente, as células desta fonte também foram mantidas em cultura ou congeladas.

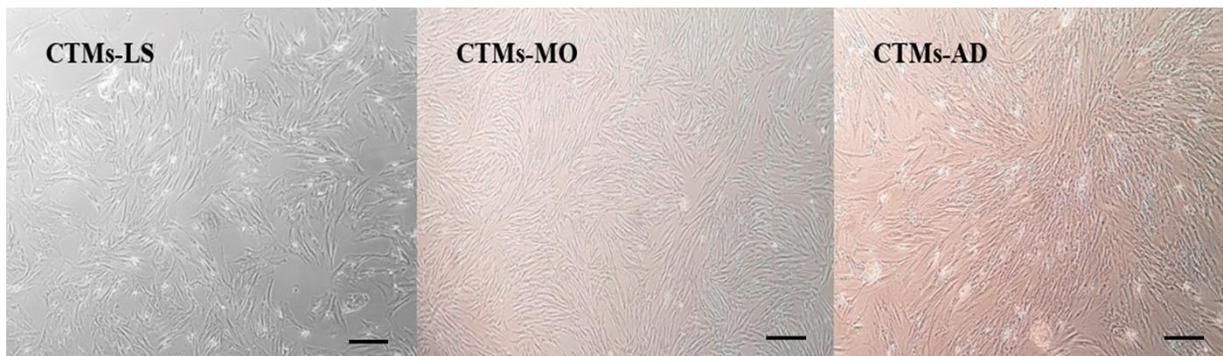


Figura 10 - Imagem representativa das células-tronco mesenquimais em cultura.

Legenda: CTMs-LS: Células-tronco mesenquimais derivadas de líquido sinovial; CTMs-MO: Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea; CTMs-AD: Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Células-tronco mesenquimais confluentes demonstrando morfologia fibroblastóide durante a expansão em terceira passagem, representando 70% de confluência. Barra = 50 µm. Microscopia invertida, aumento de 400x. Fonte: Fülber, 2019.

7.3 Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais em tubos cônicos (formação dos esferoides)

Os *pellets* demonstraram consistência mais firme em aproximadamente 15 dias após o início da indução. A diferenciação condrogênica ocorreu a partir da formação de esferoides cartilagueos, cultivados por um período estabelecido de 21 dias. Após esse tempo, os esferoides

foram removidos e demonstraram consistência firme.

A média do peso úmido em miligrama (mg) foi apresentada na tabela 1 e no gráfico 1. O peso úmido diferiu entre as fontes, sendo notório que os esferoides obtidos a partir das CTMs da medula óssea foram mais pesados quando comparados com as CTMs do tecido adiposo ($P < 0.05$) e não diferiram das CTMs do líquido sinovial ($P > 0.05$). A variável peso úmido não diferiu entre as fontes de CTMs do líquido sinovial e CTMs de tecido adiposo ($P > 0.05$), embora tenha sido evidente que as CTMs de tecido adiposo demonstraram menor tamanho. Os valores individuais estão demonstrados no apêndice A. (Média do peso úmido dos esferoides: CTMs-LS $8,57 \pm 2,7$ mg; CTMs-MO $9,79 \text{ mg} \pm 2,4$; CTMs-AD $5,17 \pm 3,5$ mg).

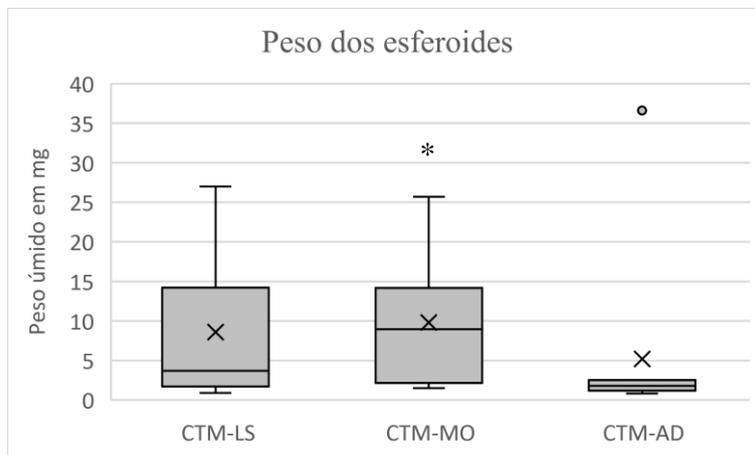


Gráfico 1 - Média e mediana dos pesos úmidos dos esferoides das fontes de CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo.

Legenda: Média (X), mediana (traço -) e desvio padrão do peso úmido dos esferoides, das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD).

° = outlier.

* demonstraram diferença estatística em relação às CTMs-AD ($p < 0.05$)

7.4 Dosagem da concentração total de proteínas solúveis dos esferoides

Foi possível dosar a concentração total de proteínas solúveis nos *pellets* de todas as fontes. A concentração total das proteínas solúveis dos condrócitos produzidos a partir das CTMs da medula óssea foi maior ao comparar com a origem do tecido adiposo ($P < 0.05$) e não

diferiu da origem líquido sinovial (gráfico 2). O tecido adiposo demonstrou similaridade estatística com o líquido sinovial nessa comparação (tabela 1). Os valores individuais dessa análise foram demonstrados no apêndice A. (concentração total de proteínas solúveis: CTM-LS $4,14 \pm 1,03 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; CTM-MO $4,99 \pm 0,86 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; CTM-AD $2,17 \pm 0,52 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

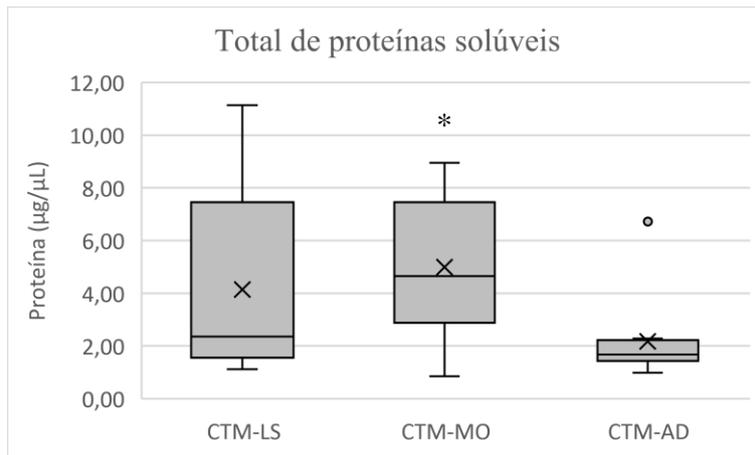


Gráfico 2 - Média e mediana do total de proteínas solúveis das fontes de CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo.

Legenda: Concentração média (X), mediana (traço -) e desvio padrão de proteínas solúveis extraídas das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD).

° = outlier.

* demonstraram diferença estatística em relação às CTMs-AD ($p < 0,05$)

7.5 Eletroforese em gel de agarose para determinação de padrão de agregam de cavalo

Ambas as amostras de agregam extraídas da cartilagem do equino foram detectadas no gel de agarose em tampão PDA (figura 11). A concentração do agregam 1 foi em média de 8 mg/mL e a amostra de agregam 2 obteve resultado em torno de 2 mg/mL. Portanto, optou-se por utilizar as amostras do agregam 1, diluídas 1:10 para realização da curva padrão no ensaio de ELISA.

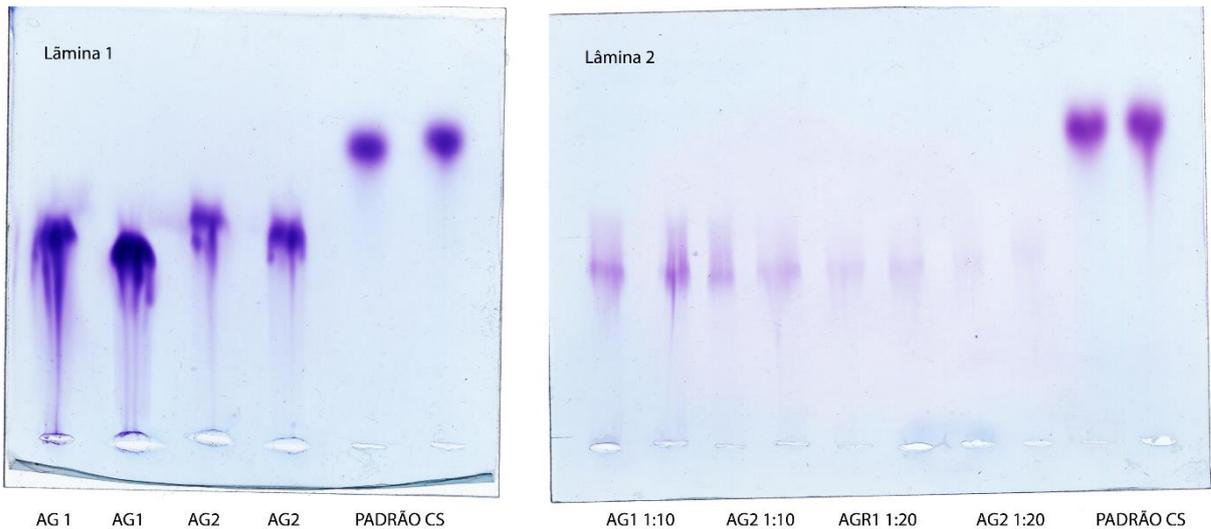


Figura 11 - Representação das lâminas de eletroforese em gel de agarose para as amostras de agrecam 1 e 2 de equino.

Legenda: Lâmina 1 - AG 1, AG 2 – agrecam 1 e agrecam 2 sem diluição; padrão CS – condroitim sulfato. Lâmina 2 – 1:10 e 1:20 – diluição das amostras de agrecam. De acordo com o resultado da concentração de agrecam nas lâminas de eletroforese, foi escolhida a amostra AG1 1:10 referente à primeira amostra da lâmina 2 em que o agrecam apresentou 2 mg/mL.

7.6 Dosagem da concentração de Agrecam (ELISA) dos esferoides

Todos os esferoides apresentaram concentração de agrecam independente da fonte. CTMs obtidas da medula óssea demonstraram maior concentração de agrecam quando comparadas com as células do tecido adiposo ($p < 0.05$). As CTMs do líquido sinovial foram estatisticamente iguais aos valores obtidos da medula óssea. Também não foi observado diferença estatística em relação aos valores da origem do tecido adiposo comparadas com as CTMs do líquido sinovial (gráfico 3). Os valores das médias são apresentados na tabela 1 e os dados individuais estão demonstrados no apêndice A. (CTM-LS $63,8 \pm 25,11$ ng/mL; CTM-MO $78,13 \pm 16,3$ ng/mL; CTM AD $26,63 \pm 9,85$ ng/mL)

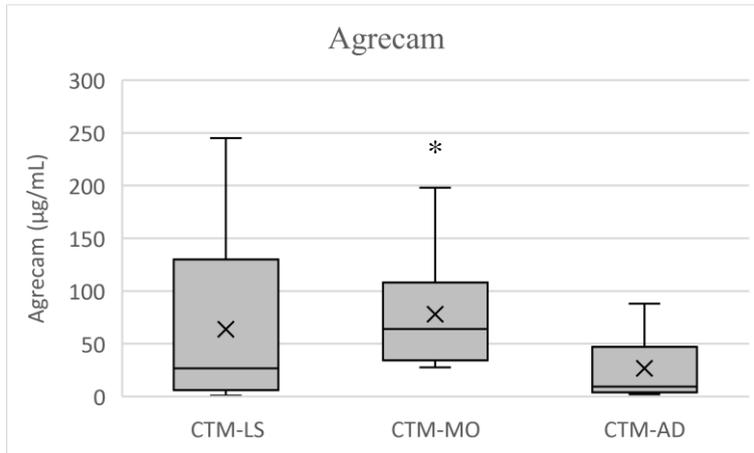


Gráfico 3 - Média e mediana da concentração de agregam produzido pelas CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo.

Legenda: Concentração média (X), mediana (traço -) e desvio padrão da concentração de agregam dos esferoides extraídos das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD).

° = outlier.

* demonstraram diferença estatística em relação às CTMs-AD ($p < 0.05$).

7.7 Razão do agregam por total de proteínas solúveis, proteínas solúveis por peso úmido e agregam por peso úmido

A razão de agregam por proteínas solúveis, das proteínas solúveis por peso úmido e do agregam por peso úmido (gráficos 4, 5 e 6, respectivamente) não demonstrou diferença entre as fontes, entretanto as médias encontradas apresentaram-se maiores nas CTMs da medula óssea. Esses dados são apresentados na tabela 1. Como nas demais análises, os valores individuais são apresentados no Apêndice A

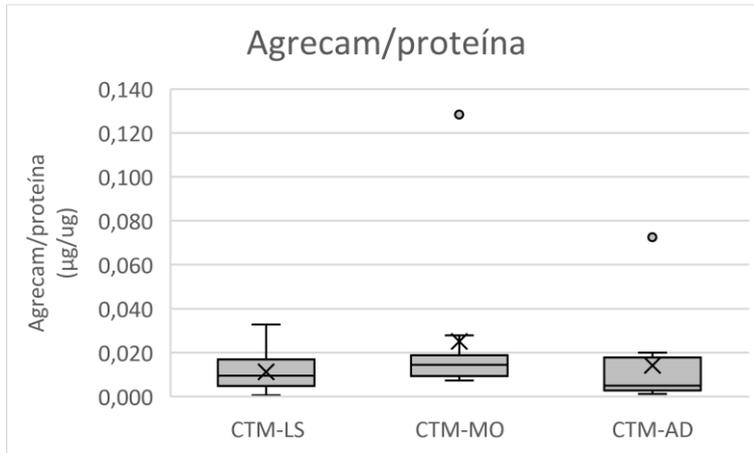


Gráfico 4 - Média e mediana da relação de agregam por proteínas solúveis das CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo.

Legenda: Médias (X), mediana (traço -) e desvio padrão da razão da concentração de agregam por proteínas solúveis extraídos dos esferoides das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD). Não houve diferença estatística significativa ($P > 0.05$).

° = outlier.

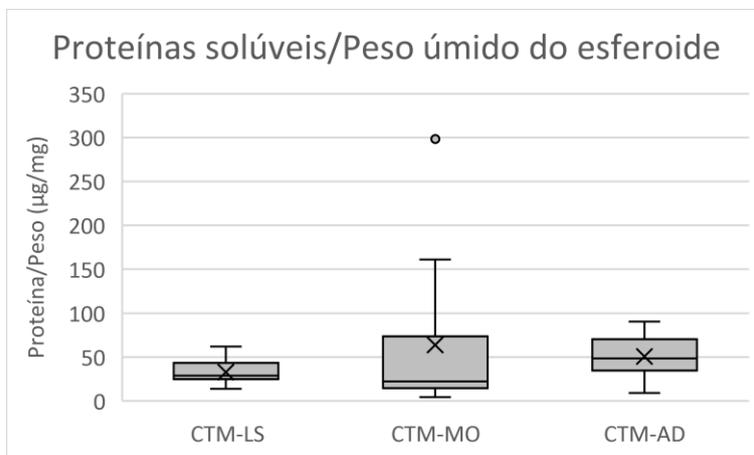


Gráfico 5 - Média e mediana da razão das proteínas solúveis por peso úmido do esferoide das CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo.

Legenda: Médias (X), mediana (traço -) e desvio padrão da razão da concentração de proteínas solúveis por peso úmido do esferoide extraídos das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD). Não houve diferença estatística significativa ($P > 0.05$).

° = outlier.

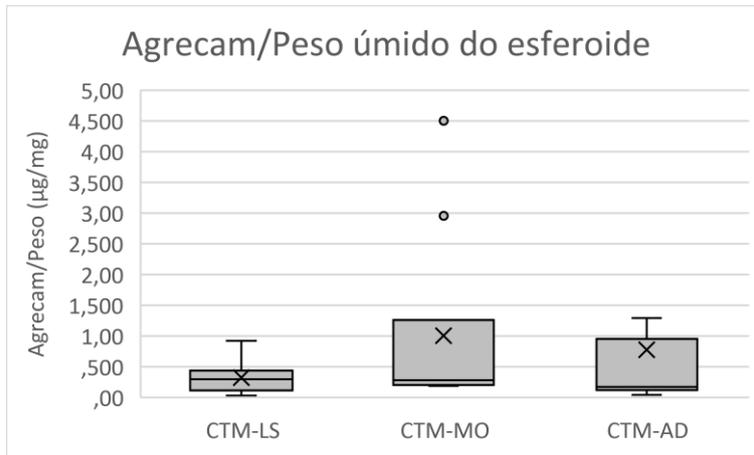


Gráfico 6 - Média e mediana da razão das proteínas solúveis por peso úmido dos esferoides das CTMs do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo.

Legenda: Médias (X), mediana (traço -) e desvio padrão da razão concentração de agrecam por peso úmido dos esferoides extraídos das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD).

Não houve diferença estatística significativa ($P > 0.05$).

° = outlier.

Tabela 1 - Valores das médias e erro padrão das variáveis analisadas nos esferoides.

	CTMs-LS	CTMs-MO	CTMs-AD
Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$4,14 \pm 1,03$ ^{ab}	$4,99 \pm 0,86$ ^a	$2,17 \pm 0,52$ ^b
Agrecam ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	$63,8 \pm 25,11$ ^{ab}	$78,13 \pm 16,3$ ^a	$26,63 \pm 9,85$ ^b
Ag/Pt ($\text{ng}/\mu\text{g}$)	$11,3 \pm 2,9$ ^a	$25,14 \pm 11,62$ ^a	$14,2 \pm 6,81$ ^a
Peso (mg)	$8,57 \pm 2,7$ ^{ab}	$9,79 \pm 2,4$ ^a	$5,17 \pm 3,5$ ^b
Pt/Peso ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso úmido)	$32,66 \pm 4,07$ ^a	$63,84 \pm 29,74$ ^a	$50,82 \pm 7,61$ ^a
Ag/Peso ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso úmido)	$0,32 \pm 0,07$ ^a	$1,01 \pm 0,47$ ^a	$0,78 \pm 0,43$ ^a

Legenda: CTMs-LS – Células-tronco mesenquimais de líquido sinovial; CTMs-MO – células-tronco mesenquimais de medula óssea, CTMs-AD – células-tronco mesenquimais de tecido adiposo. Ag/Pt – Agrecam por proteínas solúveis, Pt/Peso – Proteínas solúveis por peso úmido, Ag/Peso – Agrecam por peso úmido.

Letras minúsculas diferentes entre as colunas denotam diferença estatística ($p < 0.05$).

7.8 Immunoblotting: Identificação de agrecam e queratam sulfato nos esferoides

A identificação do agrecam e queratam sulfato foi obtida pela técnica de *immunoblotting*. Embora esse ensaio não tenha característica quantitativa, as CTMs derivadas do líquido sinovial demonstraram marcação mais forte para agrecam, seguido da medula óssea e por fim, do tecido adiposo (Figura 12). Foi utilizado anticorpo padrão de agrecam da espécie bovina nesse ensaio, que não foi identificado após revelação do *immunoblotting*, caracterizando o anticorpo monoclonal (equino) como específico para a espécie.

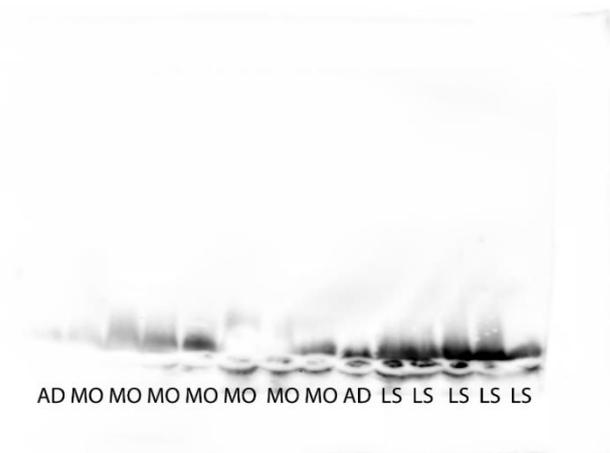


Figura 12 - Foto representativa da detecção de agrecam por Immunoblotting.

Legenda: CTMs obtidas de tecido adiposo (AD); medula óssea (MO) e líquido sinovial (LS).

Ainda para identificar e confirmar que os condrócitos induzidos a partir das CTMs das três fontes sintetizaram agrecam, outro *immunoblotting* foi realizado a partir de amostras das três fontes incubadas com enzima condroitinase AC de *Flavobacterium heparinum*. O agrecam foi identificado nas amostras incubadas e não incubadas com a enzima, demonstrando padrão diferente de migração entre eles (Figura 13). A condroitinase AC é uma enzima capaz de degradar os condroitim sulfatos A e C (ou condroitim 4- e 6- sulfato); sendo assim, a enzima quebra ligações β -glicosídicas entre N-acetilgalactosamina e ácido glucurônico, degradando condroitim sulfato a dissacarídeos insaturados (MICHELACCI E DIETRICH, 1975; 1976b; MICHELACCI E DIETRICH, 1986). Portanto, as amostras incubadas com condroitinase AC migraram na lâmina de forma diferente, uma vez que as cadeias de condroitim sulfato presentes no agrecam foram degradadas a dissacarídeos insaturados, demonstrando halos mais claros.

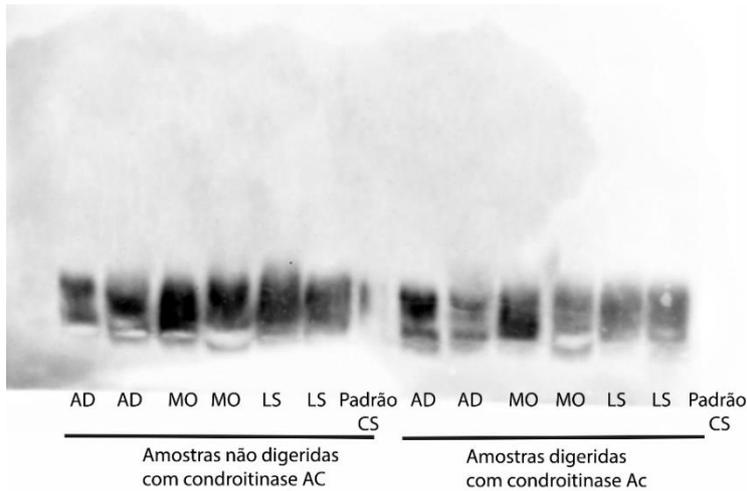


Figura 13 - Foto representativa da identificação do agrecam por immunoblotting.

Legenda: *Immunoblotting* das amostras de tecido adiposo (AD), medula óssea (MO) e líquido sinovial (LS). Padrão condroitim sulfato (CS). As amostras foram submetidas a incubação com condroitinase AC e como controle foram incubadas apenas com água destilada (amostras não digeridas). Nota-se que o padrão de condroitim sulfato foi totalmente digerido e não é encontrado na revelação do immunoblotting, já as amostras com agrecam demonstraram padrão diferente de migração entre as amostras digeridas e não digeridas com a enzima. A condroitinase AC faz a clivagem de ligações β -glicosídicas entre *N*-acetilgalactosamina e ácido glucorônico, degradando condroitim sulfato (glicosaminoglicano presente na molécula de agrecam) a dissacarídeos insaturados que não são precipitados e nem corados no gel de agarose em tampão PDA.

Foi possível identificar queratam sulfato (Figura 14), entretanto as amostras marcadas com o anticorpo não migraram como o padrão, permanecendo na origem da lâmina.

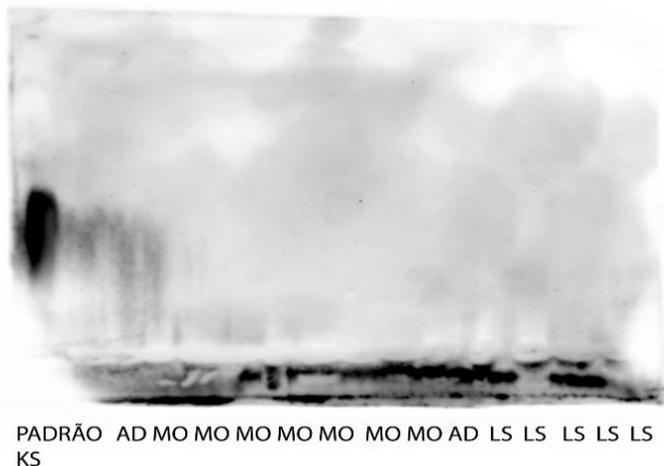


Figura 14 - Foto representativa da detecção de queratam sulfato por Immunoblotting.

Legenda: CTMs obtidas de tecido adiposo (AD); medula óssea (MO) e líquido sinovial (LS). Possível perceber que existe queratam sulfato nas amostras, mas todas ficaram na origem da lâmina e não migraram.

7.10 Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais em microplaca (microesferoides)

As CTMs de todas as fontes foram capazes de formar microesferoides, que demonstraram forma tridimensional após dois dias de indução condrogênica, observados em microscopia invertida. A partir do segundo dia de diferenciação condrogênica não houve necessidade de manter o imã incubado embaixo da microplaca de cultura, sendo, portanto, removido. Após 4, 7, 14 e 21 dias (Figura 15), os microesferoides foram retirados dos poços com cuidado e mantidos em PBS para análises da quantificação de proteína, agregam e imunofluorescência por microscopia confocal.

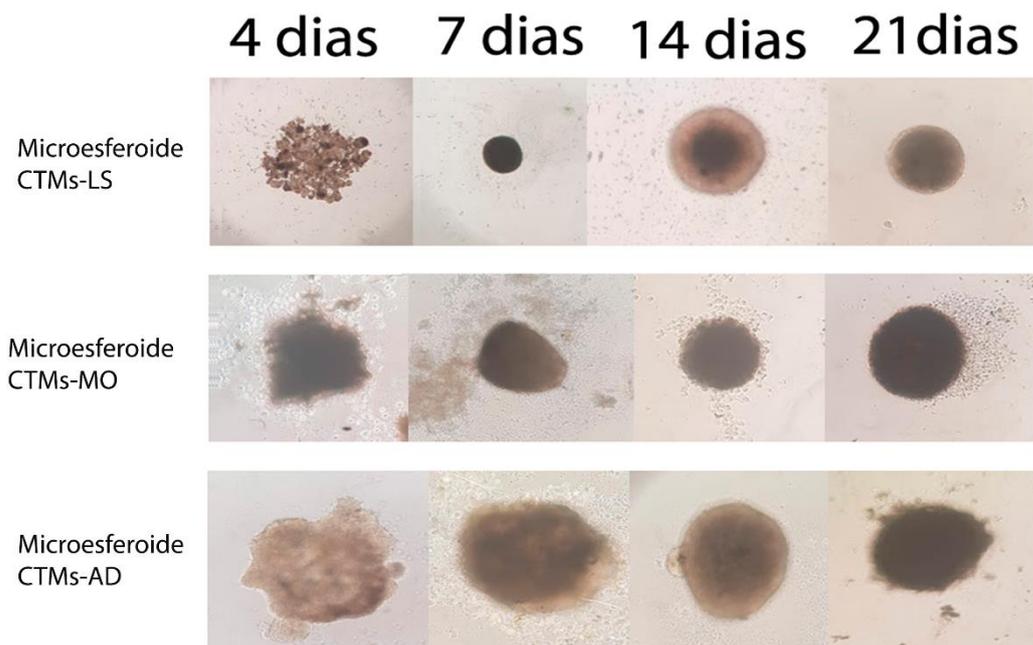


Figura 15 - Representação dos microesferoides e seus dias de diferenciação condrogênica.

Legenda: Fotomicrografias representativas dos microesferoides. Microscopia invertida, aumento de 40x.

7.11 Análise da concentração total de proteínas solúveis e agrecam dos microesferoides

As amostras provenientes de todas as fontes expressaram concentração de proteínas solúveis. Não foram observadas interações significativas entre origem e tempo para as variáveis avaliadas: total de proteína solúvel, agrecam e razão entre ambas (tabela 2). Sendo assim, o efeito da fonte foi avaliado independente do tempo de indução condrogênica e o efeito do tempo foi avaliado independente da fonte. Os valores individuais do efeito da fonte encontram-se no apêndice B e os valores individuais do efeito do tempo são demonstrados no apêndice C.

Tabela 2 - Efeito de interação entre a fonte de células e o tempo de diferenciação.

	Fonte (valor de p)	Tempo (valor de p)	Fonte/Tempo (valor de p)
Agrecam	0,1256	0,9713	0,6361
Proteína	0,054	0,0291	0,2202
Agrecam/Proteína solúvel	0,2851	0,5591	0,9307

Não houve interação entre as variáveis ($P > 0.05$) na avaliação estatística entre as fontes de células-tronco mesenquimais e o tempo realizado para diferenciá-las.

Em relação à comparação das fontes das CTMs, foi possível observar que as concentrações das proteínas solúveis das amostras provenientes do tecido adiposo foram maiores ao comparar com as CTMs de medula óssea e do líquido sinovial ($p > 0.05$). As CTMs oriundas do líquido sinovial são iguais estatisticamente ao compará-las com a medula óssea ($P > 0.05$). (Gráfico 7, tabela 3).

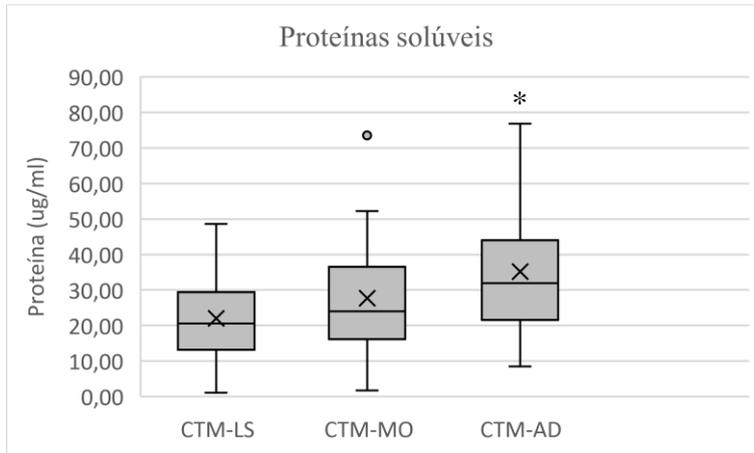


Gráfico 7 - Média e mediana da concentração total das proteínas solúveis das diferentes fontes de CTMs.

Legenda: Concentração média (X), mediana (traço -) e desvio padrão da concentração de proteínas solúveis presentes nos microesferoides extraídos das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD). ° = *outlier*.

* demonstraram diferença estatística em relação à CTMs-MO e CTMs-LS ($p < 0.05$).

Já a concentração média de agrecam foi maior nas amostras originadas de líquido sinovial ao comparar com as CTMs de medula óssea ($P < 0.05$), entretanto foram estatisticamente iguais com as amostras de tecido adiposo ($P > 0.05$). (Gráfico 8; Tabela 3).

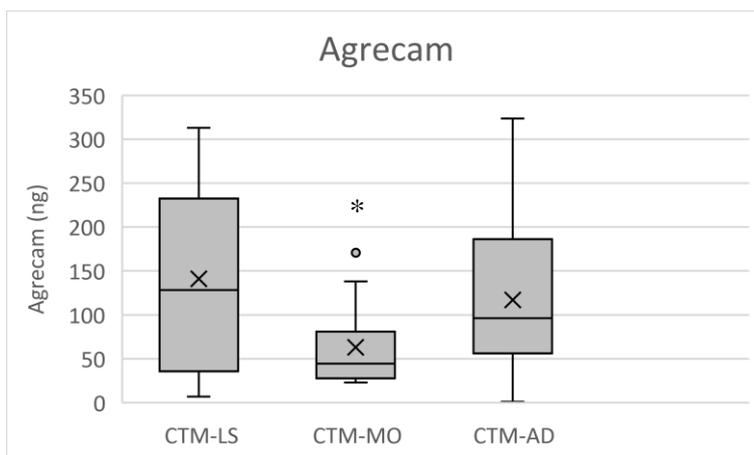


Gráfico 8 - Média e mediana da concentração de agrecam das diferentes fontes de CTMs.

Legenda: Concentração média (X), mediana (traço -) e desvio padrão da concentração de agrecam dos microesferoides extraídos das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD). ° = *outlier*.

* demonstraram diferença estatística em relação à CTMs-MO e CTMs-LS ($p < 0.05$).

A razão do agrecam por proteínas solúveis demonstrou diferença significativa entre as CTMs derivadas de líquido sinovial em relação às CTMs da medula óssea. Entretanto não houve diferença na comparação estatística entre as CTMs do líquido sinovial e do tecido adiposo. As CTMs da medula óssea não denotaram diferença estatística com as CTMs do tecido adiposo (Gráfico 9, Tabela 3).

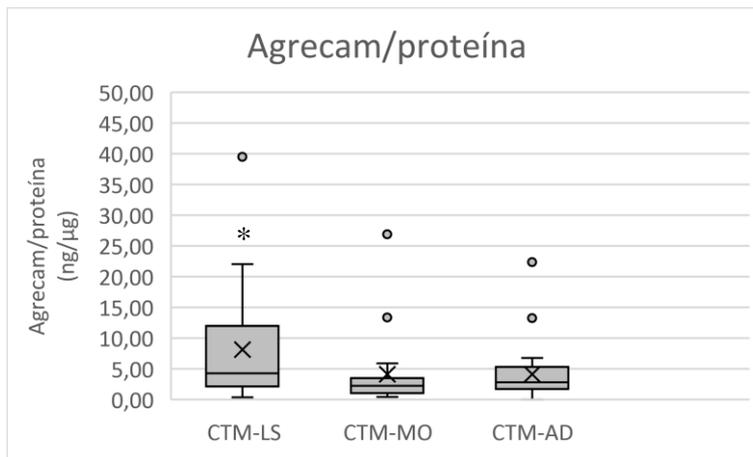


Gráfico 9 - Média e mediana da relação do agrecam por proteínas solúveis dos microesferoides

Legenda: Médias (X), mediana (-) e desvio padrão da razão da concentração de agrecam por proteínas solúveis dos microesferoides extraídos das amostras de células-tronco mesenquimais de líquido sinovial (CTMs-LS), células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMs-AD).

° = outlier.

* demonstraram diferença estatística em relação às CTMs-MO ($p < 0.05$)

Tabela 3 - Média e erro padrão relacionada à comparação do agrecam, total de proteínas solúveis e a razão entre ambas das diferentes fontes de CTMs.

	CTM-LS	CTM-MO	CTM-AD
Proteína	22,02 ± 1,84 ^a	27,7 ± 2,57 ^a	35,22 ± 2,82 ^b
Agrecam	141,21 ± 25,49 ^a	63,06 ± 12,07 ^b	117,3 ± 14,32 ^a
Agrecam/Proteína	8,15 ± 1,62 ^a	4,11 ± 1,51 ^b	4,23 ± 0,7 ^{ab}

Legenda: CTM-LS – CTMs de líquido sinovial; CTM-MO – CTMs de medula óssea, CTM-AD – CTMs de tecido adiposo. Letras minúsculas diferentes entre as colunas denotam diferença ($p < 0.05$)

Não houve diferença significativa na análise do efeito do tempo de diferenciação condrogênica entre as três fontes ($P > 0,05$) (tabela 4).

Tabela 4 - Média e erro padrão da comparação do efeito do tempo de diferenciação condrogênica.

	4 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Proteínas solúveis	33,63 ± 3,24	27,59 ± 2,7	25,35 ± 2,82	26,74 ± 3,02
Agrecam	96,85 ± 15,13	118,09 ± 18,69	131,29 ± 33,15	93,79 ± 17,23
Agc/Pt solúveis	3,41 ± 0,62	6,22 ± 1,73	7,36 ± 2,86	19,11 ± 15,51

Legenda: Agc/Pt solúveis: Razão agrecam por total de proteínas solúveis.

7.12 Imunofluorescência por microscopia confocal dos microesferoides

Foi possível identificar agrecam e queratam sulfato, nos microesferoides obtidos a partir das CTMs do líquido sinovial, medula óssea e do tecido adiposo por meio do ensaio de imunofluorescência confocal. Agrecam e queratam sulfato foram identificados na matriz dos microesferoides e o DAPI demonstrou o núcleo das células. As figuras 16, 17 e 18 são representativas de um microesferoide de cada fonte e tempo de diferenciação, marcadas com os anticorpos mencionados.

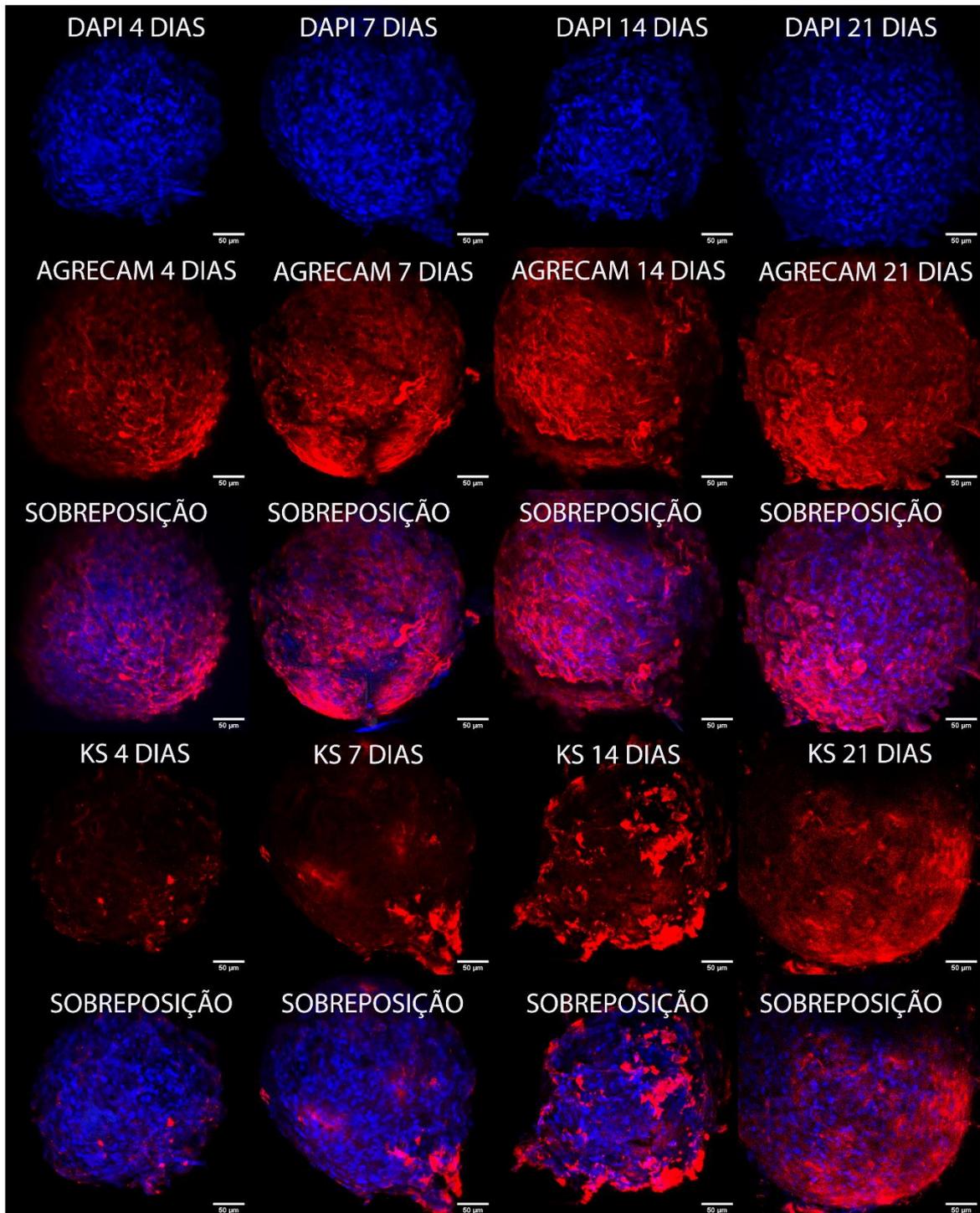


Figura 16 - Imagem representativa da imunofluorescência dos microsferoides obtidos de CTMs derivadas do líquido sinovial.

Legenda: AGC – Agrecam; KS – queratam sulfato.

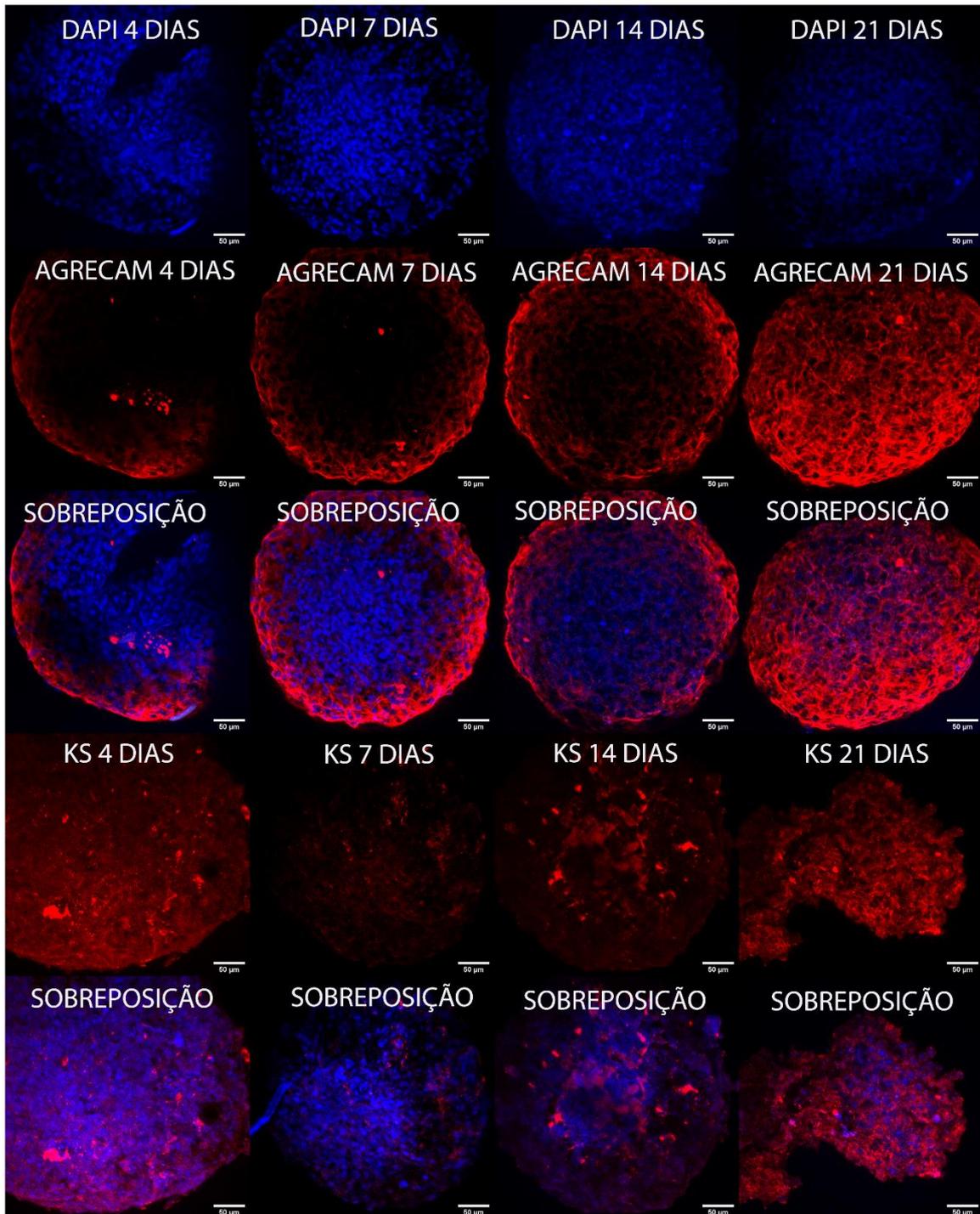


Figura 17 – Imagem representativa da imunofluorescência dos microsferoides obtidos de CTMs derivadas da medula óssea.

Legenda: AGC – Agrecam; KS – queratam sulfato.

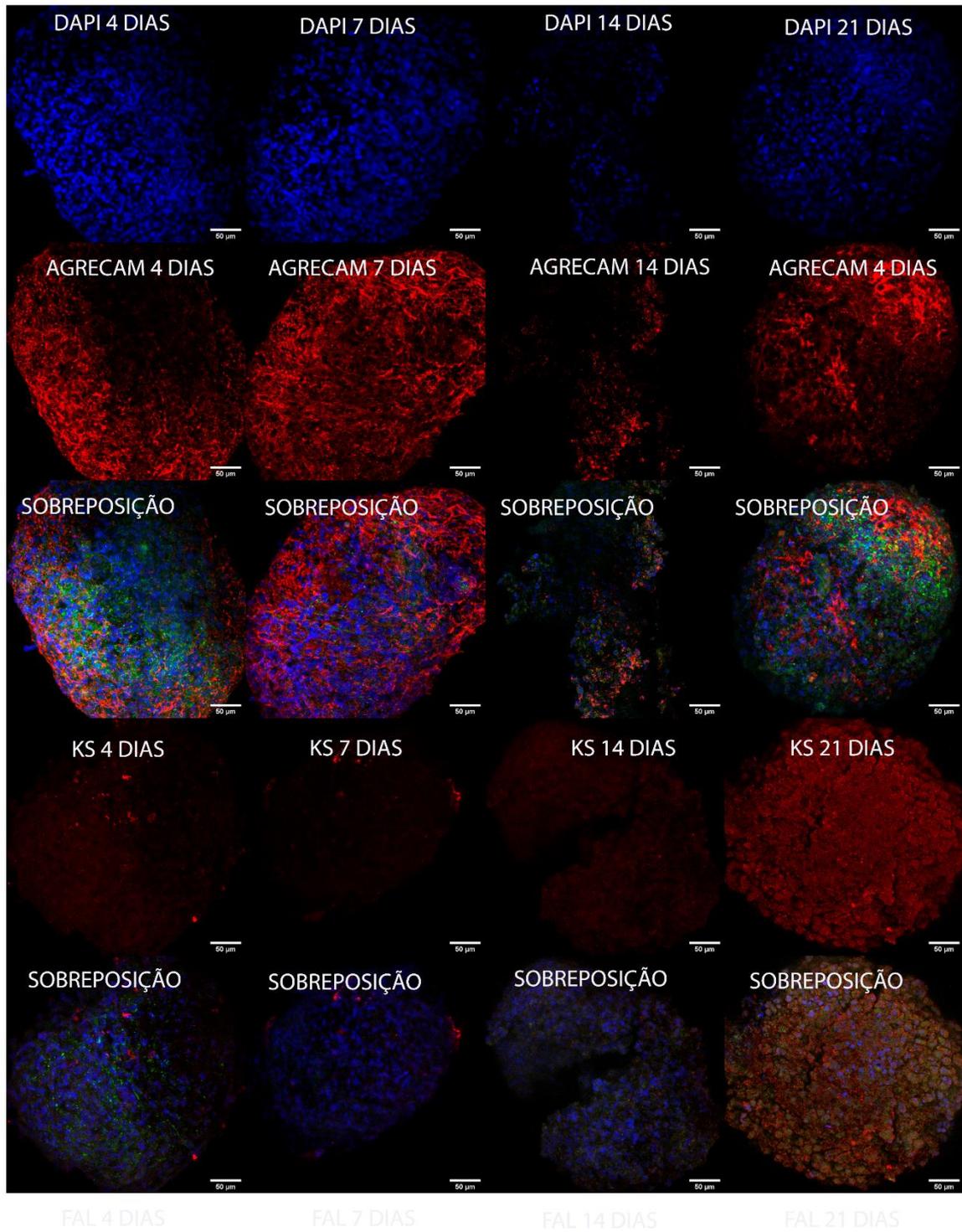


Figura 18 – Imagem representativa da imunofluorescência dos microsferoides obtidos de CTMs derivadas do tecido adiposo.

Legenda: AGC – Agrecam; KS – queratam sulfato.

8 DISCUSSÃO

As CTMs foram isoladas a partir do líquido sinovial, medula óssea e do tecido adiposo e demonstraram eficiência em aderir ao plástico e crescimento em monocamada com formação de colônias de aparência fibroblastoide, resultado que confirma a morfologia e característica das CTMs, como já demonstrado em publicações anteriores (KOERNER et al., 2006; BROOKE et al., 2007; STOLZING et al., 2008; DE MATTOS CARVALHO et al., 2009; J., 2011; MOKBEL et al., 2011; SEKIYA et al., 2012; MAIA et al., 2013a; BARBERINI et al., 2014; FÜLBER et al., 2016; FERRO et al., 2019).

A três fontes das células-tronco aqui isoladas são alvo de muitas pesquisas, entretanto, a medula óssea e o tecido adiposo são exploradas há mais tempo quando comparadas com tecido de origem sinovial.

No presente estudo, as CTMs da medula óssea foram obtidas da 5ª estérnebra do osso esterno. De certa forma, esse tipo de coleta é invasivo, entretanto não traz prejuízos e danos aos animais, desde que sejam tomados cuidados rigorosos de antisepsia. Além da coleta, a metodologia utilizada para o cultivo foi semelhante aos estudos publicados (ALVES et al., 2009; MAIA et al., 2013b), o que demonstra repetibilidade ao usá-los como base. A medula óssea é responsável pela hematopoese, com produção de eritrócitos, plaquetas, granulócitos, monócitos e linfócitos. CTMs representam cerca de 0,001 a 0,01% na medula (TAYLOR; CLEGG, 2011), sendo evidente a necessidade de expansão das células se o objetivo for experimental ou terapêutico. Como as CTMs não estão em grande número na medula, assim que coletadas demoram no mínimo duas semanas para obter confluência celular. Neste estudo, as células demoraram em média 18,5 dias até atingirem confluência (70%) e alcançarem a primeira passagem, o que corrobora com outros estudos em que a expansão *in vitro* dessas células foi alcançada em torno de vinte e cinco dias (BARBERINI et al., 2014) e quinze dias (ABO-AZIZA; ZAKI, 2016).

Já as células obtidas do tecido adiposo são facilmente coletadas por um método minimamente invasivo. No presente estudo pode-se afirmar que as células possuem rápido crescimento em monocamada e demonstraram confluência em média de 3,8 dias. Esse resultado converge com os achados de Barberini et al. (2014), no qual foi observado confluência das células obtidas de tecido adiposo de equino apenas após 15 dias de cultura, assim como em um estudo com CTMs oriundas de humanos, em que foi constatado confluência de 70 a 80% em 21 dias (ALIPOUR et al., 2015).

A confluência de 70% de expansão celular obtida do líquido sinovial foi alcançada em aproximadamente 26 dias. Esse dado se refere apenas à primeira passagem das células. Durante esse cultivo, nota-se que CTMs de líquido sinovial demandam tempo até conseguirem chegar em terceira passagem (P3) e apresentarem boa concentração. Murata et al. (2014) utilizou o mesmo meio de cultivo suplementado e conseguiu expansão das células em apenas nove dias. Entretanto a metodologia por ele utilizada e a raça dos cavalos diferiram da descrita nesse estudo, logo, pode-se especular que possa haver alguma influência, principalmente nas condições imunológicas e individuais dos equinos.

Ainda que seja evidente que as CTMs extraídas do líquido sinovial demoraram mais dias para expansão celular quando comparadas com as outras fontes, a coleta desse material biológico é razoavelmente mais fácil em relação à coleta da medula óssea e do tecido adiposo. Porém, as medidas profiláticas de antisepsia devem ser muito bem conduzidas para não ocasionar artrite séptica iatrogênica. Nota-se aqui a importância do ambiente e higienização. Portanto, como a coleta de líquido sinovial é de certa forma mais fácil, o fato da proliferação se apresentar mais demorada não deverá ser considerada individualmente.

O potencial condrogênico das três fontes foram comparados *in vitro* em nosso estudo. Para que as células consigam se diferenciar em condrócitos é necessário removê-las do ambiente de cultura em monocamada para um ambiente que facilite esse processo. Nesse caso duas metodologias foram realizadas para obter a mesma finalidade: cultura em tubos cônicos para manter as células em formato de micromassas, gerando como produto final esferoides e uma cultura em placa a partir de uma tecnologia com exposição das células a nanopartículas que aderem na superfície celular permitindo formar um agregado de células, facilitando o ambiente de cultura tridimensional já no primeiro instante em que as células são submetidas à essa condição a partir da imposição aplicada por meio de um ímã, produzindo como produto final os microesferoides.

A utilização da maior número de células-tronco mesenquimais para diferenciação condrogênica durante a indução em tubos cônicos foi necessária, pois sabe-se que os condrócitos demonstram instabilidade em monocultura com possibilidades de desdiferenciação e que a proporção de células que expressam queratam sulfato diminui quando são cultivados em baixa densidade. Quando os condrócitos são cultivados em alta densidade, a desdiferenciação é suprimida e essas células demonstram expressar colágeno tipo I e II, diferente do que ocorre em condições de baixa densidade, quando as células expressam o colágeno tipo I. Condrócitos cultivados em alta densidade também demonstram maior quantidade de matriz extracelular com proteoglicanos e queratam sulfato quando comparadas

às culturas de baixa densidade celular, ou seja, a cultura em alta densidade estabiliza o fenótipo dos condrócitos possibilitando síntese de matriz (SOLURSH, MEIER, 1974; WATT, 1988).

A cultura de células em baixa densidade necessita de proliferação, diferentemente do que ocorre em ambiente de alta densidade. Logo, no ambiente de baixa densidade aparentemente o número de células instáveis é expandida, demonstrando morfologia menos arredondada e fenótipo instável relacionados à produção de matriz extracelular (ZANETTI; SOLURSH, 1984). Portanto, a importância da alta densidade celular para diferenciação em condrócitos é respondida pelo efeito na morfologia celular e na comunicação intercelular, por contato célula-célula ou por meio de fatores secretados por elas.

Portanto, técnicas para cultura de células-tronco mesenquimais em formato tridimensional são requeridas para o processo de diferenciação em condrócitos, originando esferoides, *pellets* ou micromassas. Entretanto, essa metodologia exige grande número de células iniciais, dada a importância da densidade celular no processo condrogênico. No cenário de comparação entre as duas metodologias realizadas, na tecnologia de cultura tridimensional em placas, as células recebem nanopartículas biocompatíveis constituídas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina, o que leva ao modelamento celular com formação do microesferoide. Isto permite agregação celular e início de síntese de matriz extracelular, com alta densidade celular, mas com menor número de células. A técnica é vantajosa pois usa menor número de células, permite que os condrócitos expressem seu fenótipo, e fornece ambiente necessário para adequada diferenciação celular.

Ainda, a metodologia com microesferoides recebem papel de destaque, pois demonstramos que a partir de 4 dias, os condrócitos já demonstram síntese de matriz extracelular independente da fonte. Especula-se aqui que esse método *in vitro*, garante condições mais próximas do ambiente cartilágneo *in vivo*, uma vez que os microesferoides demonstram característica firme e síntese de matriz precocemente quando comparados a outra metodologia. Este resultado não é observado durante a indução de condrócitos em tubos cônicos, pois, as células são colocadas nos tubos e as trocas de meio de cultura são realizadas delicadamente para não interferir na manutenção das células no fundo do tubo, pois em particular, necessitam umas das outras para fornecimento de ancoragem. Esse processo parece demandar maior energia e desafio às células, pois ficam soltas em meio de cultura e iniciam o processo de síntese de matriz a partir do momento que demonstram maior união célula-célula ou desde o início da produção de matriz, que conseqüentemente pode ser notado por volta do décimo quarto dia, quando apresentam característica um pouco mais firme, sendo observado durante a troca de meio. Em 21 dias, o produto final é um esferoide cartilágneo, com

condrócitos e matriz, corroborando com os achados na literatura (BURK et al., 2012; FÜLBER et al., 2016; ADAM et al., 2019). Há relatos de sucesso na diferenciação condrogênica de CTMs derivadas de líquido sinovial saudável, em pacientes com doença degenerativa e osteoartrite após 14 dias de indução condrogênica (SEKIYA et al., 2012). Mesmo assim, para garantir a diferenciação das células desse estudo, foi preconizado 21 dias, mesmo que algumas amostras tivessem assumido característica pouco mais firme por volta de 14 dias.

A indução condrogênica foi realizada a partir de meio comercial (indução dos esferoides e microesferoides), assim como em outros estudos (DE VITA et al., 2013; SANTHAGUNAM et al., 2014; KORNICKA et al., 2015; SHI et al., 2015; BURK et al., 2017; FERRO et al., 2019). Entretanto os suplementos fundamentais para este fim são conhecidos, no qual são usualmente confeccionados em meio de cultura, suplementado com ácido ascórbico, insulina, transferrina, TGF- β ou BMPs (STEWART; STEWART, 2011) e dexametasona (SEKIYA et al., 2012).

O fenótipo condrogênico é observado normalmente pela deposição de colágeno tipo II, detecção de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e análise do fator de transcrição SOX9 (STEWART; STEWART, 2011).

Os esferoides e microesferoides foram digeridos com GuHCl pela metodologia proposta por Hassel et al. (1979) para extração de proteoglicanos e consequentemente avaliação da síntese de matriz extracelular produzida pelos condrócitos. Portanto, os esferoides e microesferoides resultaram em um precipitado que foi seco a vácuo e ressuspendido em água destilada.

As amostras de todas as fontes estudadas demonstraram que as CTMs foram capazes de diferenciação em condrócitos uma vez que sintetizaram matriz cartilaginosa.

Ao comparar as fontes após digestão dos esferoides, foi identificado que a concentração de agregam e de proteínas solúveis presentes nas amostras da medula óssea foram maiores quando comparadas com o tecido adiposo e não demonstraram diferença estatística com as CTMs do líquido sinovial. No entanto, ao avaliar a relação do agregam por proteínas solúveis as três fontes apresentaram semelhança. Quando o peso dos esferoides foi avaliado, a partir das amostras da medula e do líquido sinovial observou-se que ambos são maiores do que os esferoides produzidos a partir do tecido adiposo, sendo estatisticamente diferente somente da medula óssea. Levando em consideração que todas as diferenciações condrogênicas partiram do mesmo número de CTMs viáveis, ou seja, 2×10^6 , observamos que o tecido adiposo foi o que produziu menor rendimento, isto é, menor número de condrócitos capazes de produzir agregam. Contudo, essas CTMs são tão quão eficientes às de medula óssea e líquido sinovial,

dados confirmados pelas razões agregam por total de proteínas solúveis e agregam por peso. Giovanini et al. (2008) e Vidal et al. (2008) comparam a medula óssea e o tecido adiposo de equinos e demonstraram resultados semelhantes, entretanto, CTMs derivadas do líquido sinovial não foram comparadas. Resultados diferentes foram descritos para outras fontes, em que a medula óssea apresentou fraca capacidade condrogênica ao ser comparada com líquido amniótico e tecido do cordão umbilical de equinos (LOVATI et al., 2011).

As fontes de tecido sinovial, medula óssea e tecido adiposo foram comparadas em células humanas e demonstraram que o tecido sinovial e medula óssea foram superiores ao compará-los com o tecido adiposo. Essa comparação foi realizada apenas em relação ao tamanho e peso úmido formado pelos esferoides e por histologia, em que as colorações foram mais intensas nas provenientes de líquido sinovial e medula óssea (SAKAGUCHI et al., 2005). Mesmo que o peso úmido e o tamanho dos esferoides não sejam específicos para qualifica-los como superiores, as lâminas mostraram coloração de matriz extracelular, inferindo que o tamanho aumentou por apresentar mais matriz e não pelo aumento no número de condrócitos (SEKIYA et al., 2002a; SHIRASAWA et al., 2006), possibilitando concluir que esse seja um indicador inquestionável em trazer uma resposta real da capacidade condrogênica (SEKIYA; COLTER; PROCKOP, 2001; SEKIYA et al., 2002b; SAKAGUCHI et al., 2005). Sendo assim, os resultados obtidos em nosso estudo acrescentam a literatura encontrada nos estudos conduzidos em humanos e em ratos, ou seja, além de termos observado aumento no tamanho e peso úmido dos esferoides nas amostras de células obtidas do líquido sinovial e da medula óssea de equinos, pudemos comprovar que na matriz gerada houve aumento da concentração de agregam; proteoglicano específico de matriz cartilaginosa.

Koga et al. (2008), demonstraram que as CTMs de origem sinovial, assim como da medula óssea possuem melhor potencial de qualidade condrogênica em defeitos cartilaginosa induzidos em coelhos. Os autores quantificaram maior produção de matriz extracelular, por meio de score histológico nos animais tratados com as células derivadas da sinóvia e da medula óssea quando comparadas com os animais que receberam tratamento com CTMs provenientes do tecido adiposo. Embora existam semelhanças entre as CTMs do líquido sinovial e da medula óssea, as células sinoviais mostraram vantagens, principalmente em relação às coletas. Os resultados obtidos em nosso estudo, demonstram que a expansão das CTMs demora em média de 25,5 dias para o líquido sinovial e 18,5 dias para as células da medula óssea. Esses resultados denotam semelhança e ao pensar clinicamente, ambas poderiam ser utilizadas para tratamento de enfermidades de origem articular, porém a coleta do líquido sinovial é mais facilmente

realizada quando comparada com a coleta da medula óssea e de certa forma menos invasiva para o paciente equino.

Além da comparação entre o tamanho, peso úmido e a matriz extracelular das lâminas coradas com azul de toluidina, Yoshimura et al. (2007) identificaram inferioridade condrogênica das CTMs provenientes do tecido adiposo, medula óssea, músculo e periósteo de ratos, quando comparadas às CTMs de membrana sinovial, por meio da baixa expressão gênica de colágeno tipo II por RT-PCR e da síntese de condroitim sulfato e ácido hialurônico. Ainda nesse raciocínio, Mochizuki et al. (2006) comprovaram a superioridade condrogênica de CTMs humanas, extraídas da membrana sinovial (fração fibrosa e fração adiposa) em relação as células oriundas de tecido adiposo subcutâneo por meio da expressão gênica de colágeno tipo II, agregam, decorim, biglicam, proteínas de ligação, SOX5, SOX6, SOX9, condroitim 4-sulfotransferase e a análise por cromatografia líquida dos glicosaminoglicanos condroitim 4-6-sulfatados e ácido hialurônico.

Ainda em termos comparativos, quando o tecido adiposo é comparado com a medula óssea e com células extraídas da cartilagem da orelha de coelhos, nota-se a sua característica de rápida proliferação, mas a superioridade das células é observada na fonte extraída da cartilagem, por apresentarem maior expressão de colágeno tipo II, agregam e a via de sinalização condrogênica SOX9 por PCR em ensaios *in vitro*. Defeitos articulares induzidos em coelhos também denotam melhora significativa quando tratados com células obtidas da cartilagem e medula óssea em relação às do tecido adiposo (KHALILIFAR et al., 2018). Semelhante aos nossos achados, o tecido adiposo possui a vantagem de proliferação mais rápida em cultura, entretanto, é inferior quando submetidos à comparação de rendimento celular e consequentemente produção de agregam. Essas considerações são apenas para ensaio *in vitro*, pois testes com equinos como modelos experimentais ainda não foram realizados.

As CTMs da medula óssea e tecido adiposo foram comparadas em ensaio *in vivo* em cavalos com defeitos de menisco e após 12 meses do tratamento, ambas repararam o menisco com tecido fibrocartilaginoso (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2016).

A outra metodologia proposta a partir de nanopartículas aderidas às membranas das CTMs resultaram na diferenciação dessas células em condrócitos, formando microesferoides. Esses condrócitos também demonstraram habilidades ao sintetizar matriz extracelular. Como as células são arbitrariamente induzidas a se manterem em cultura tridimensional, esse fenômeno pode ser visto a partir de quatro dias de indução condrogênica. Nesse estudo, os microesferoides foram removidos aos 4 dias como mencionado anteriormente, e aos 7, 14 e 21 dias. Os microesferoides de todas as fontes de CTMs e em todos os tempos estudados

mostraram capacidade de diferenciação em condrócitos. Reed; Johnson (2008) também demonstraram capacidade condrogênica em período menor do que 21 dias: 7, 15 e 21 dias, mas outras análises foram realizadas após essa diferenciação, como exemplo a via de sinalização condrogênica SOX9 das CTMs oriundas de sangue do cordão umbilical de potros recém-nascidos, em uma metodologia simples por meio da formação de micromassas após centrifugação, semelhante à descrita para formação dos esferoides.

A análise da quantificação da concentração total de proteínas solúveis foi obtida por teste colorimétrico e concentração de agrecam por ELISA (já discutido nos esferoides). Nesse caso, as amostras foram comparadas em relação ao tempo de indução e entre as três diferentes fontes. Não houve diferença entre os tempos de diferenciação, ou seja, não houve aumento da concentração de agrecam no decorrer do tempo. No entanto, não foi detectado agrecam em algumas amostras dos microesferoides obtidos a partir das três fontes, provavelmente por estarem abaixo do nível de detecção e isso pode ter influenciado nos resultados estatísticos para a comparação tempo, ainda que observado oscilações individuais na concentração das variáveis estudadas nos diferentes tempos.

Na comparação da concentração de agrecam presente nos microesferoides obtidos a partir das três fontes, as CTMs derivadas do líquido sinovial demonstraram superioridade na produção de agrecam quando comparadas com as CTMs derivadas da medula óssea e não foram diferentes estatisticamente das CTMs do tecido adiposo. Ainda, as CTMs de tecido adiposo também mostraram diferença em comparação com as CTMs da medula óssea. Ao relacionar a concentração do agrecam por proteínas solúveis e obter a correção dos valores das concentrações, as CTMs do líquido sinovial continuaram superiores na produção de agrecam em relação às CTMs da medula óssea. Porém, após esse fator de correção, as CTMs do tecido adiposo se igualaram com as CTMs da medula óssea.

Como os resultados entre as duas metodologias foram diferentes é possível interpretar que as CTMs do tecido adiposo melhoram seu desempenho quando colocados em um ambiente tridimensional, pois se igualam às CTMs derivadas do líquido sinovial e da medula óssea. Na metodologia tridimensional com nanopartículas biocompatíveis, as CTMs da medula óssea conseguem se diferenciar em condrócitos, mas não produzem agrecam como as outras duas fontes. Fica evidente que as fontes de CTMs derivadas da medula óssea e do tecido adiposo oscilam entre as duas metodologias realizadas no presente estudo, enquanto as CTMs do líquido sinovial, permanecem entre as melhores fontes e nesse caso, quando em ambiente tridimensional com nanopartículas biocompatíveis conseguem melhorar ainda mais o seu desempenho.

Não existem estudos com diferenciação em condrócitos *in vitro* a partir dessa tecnologia tridimensional com nanopartículas, entretanto a pesquisa com engenharia de tecidos e *scaffolds* envolve particularmente a produção de um tecido tridimensional que funciona como suporte mecânico ou um arcabouço onde células são cultivadas. *Scaffolds* formados por quitosana, ácido polilático e ácido hialurônico mostram excelente biocompatibilidade, maior estabilidade e diferenciação condrogênica *in vitro* e ainda confirmam que os condrócitos se unem de forma uniforme ao *scaffold* e podem ser usados como estratégia terapêutica a fim de melhorar a regeneração do tecido cartilágneo (MALLICK et al., 2017) .

Estudos de bioengenharia de tecidos demonstraram a importância do ambiente em que as CTMs são aplicadas para que possam expressar seu fenótipo de forma significativa. A aplicação de CTMs diretamente no local desejado, parece não ser o melhor método terapêutico para promover regeneração tecidual, pois as CTMs podem migrar para outros locais que não os da lesão, embora assumam papéis imunomoduladores e parácrinos que são propriedades benéficas e já conhecidas (SANTOS et al., 2019). No modelo animal, quando as CTMs derivadas do tecido sinovial são encapsuladas a *scaffolds* produzidos a partir de géis, compostos por ácido hialurônico, colágeno e fibrinogênio mostraram reparação com tecido muito semelhante a cartilagem hialina nos defeitos osteocondrais induzidos em coelhos (LEE et al., 2012).

Estratégias de cultura tridimensional a partir de *scaffolds* têm demonstrado resultados interessantes, pois facilitam o transporte de nutrientes para as células encapsuladas em géis compostos por ácido hialurônico, colágeno e fibrinogênio e parecem garantir maior possibilidade de regeneração da cartilagem (LEE et al., 2012).

Ainda nesse contexto, foi publicado recentemente um estudo que demonstrou a produção de *scaffolds* a partir da impressão 3D, feitos com três camadas na tentativa de mimetizar a estrutura da cartilagem (camada mais superficial da cartilagem, interface e camada subcondral) a base de gelatina metacrilada e nanohidroxiapatita, com concentrações diferentes de acordo com a sua camada específica. Além de caracterizá-lo *in vitro* de acordo com as propriedades físicas, químicas e biológicas, seu uso *in vivo* em conjunto com CTMs derivadas da medula óssea permitiu avaliações macroscópicas e microscópicas do novo tecido formado, concluindo que esse tratamento demonstrou melhor reparação condrogênica em defeitos cartilágneos de coelhos quando comparados com outro grupo em que os animais foram tratados com *scaffolds* monofásicos ou não tratados. O reparo *in vivo* resultou na formação de um novo tecido de superfície lisa preenchido por matriz extracelular (LIU et al., 2019).

Outras moléculas demonstraram ser promissoras e estudos ainda avaliados no laboratório apostam na kartogenina que é uma molécula não proteica condroindutora ligada à superfície de óxido de ferro, seguido da incorporação de nanocristais de colágeno e celulose. Esses compostos parecem estimular o microambiente auxiliando no crescimento e diferenciação de CTMs oriundas da medula óssea (YANG et al., 2019).

Na maioria dos estudos citados, quando apenas a medula óssea e o tecido adiposo livres de *scaffolds* são comparados, nota-se superioridade da medula óssea. Especula-se aqui que isso contribuiu para que a medula óssea fosse cada vez mais estudada para novas estratégias terapêuticas, essencialmente as baseadas em bioengenharia de tecidos e produção de *scaffolds*, pois essa fonte já havia mostrado bons resultados. As conclusões dos autores são unânimes em que ao usar tecnologia tridimensional e não formar pellets tridimensionais (manuais) em tubos cônicos, favorece às células a se transformarem em condrócitos e quando estudados *in vivo*, garantem um tecido novo semelhante à cartilagem. Porém, nossos resultados *in vitro*, mostram que especificamente para combater afecções articulares, as CTMs, principalmente derivadas do líquido sinovial ou até mesmo do tecido adiposo se desenvolvem melhor no ambiente 3D a partir de tecnologia com nanopartículas, sugerindo a viabilização da futura aplicação *in vivo*.

Pode-se concluir que as CTMs revelam diferenciação condrogênica precocemente quando expostas a ambiente *in vitro* mais próximo de uma cartilagem, mimetizando condições de seu ambiente natural. Os resultados do presente estudo demonstraram superioridade condrogênica das CTMs oriundas do líquido sinovial, seguido de células do tecido adiposo e por último, das células provenientes da medula óssea. Isto corrobora com hipóteses levantadas de que a capacidade metabólica das células derivadas do líquido sinovial são melhores, por diferenças no número de células ancestrais e a condrogênese é uma consequência da propensão que essas células já possuem em seguir uma via condrogênica, sugerindo que o microambiente tecidual local pode estar direcionando o “destino” das CTMs para essa linhagem de forma pré-determinada (MOCHIZUKI et al., 2006).

A imunofluorescência confocal foi feita como um teste qualitativo nos microesferoides e, todas as fontes nos quatro tempos avaliados (4, 7, 14 e 21 dias), expressaram agregam e queratam sulfato. Sakaguchi et al. (2005) e Shirasawa et al. (2006), apenas demonstraram a histologia das CTMs de humanos como um ensaio fidedigno para avaliação da matriz extracelular. Já Zayed et al., (2016) realizaram a imunofluorescência em CTMs derivadas do líquido sinovial e medula óssea de equinos, após desafiar a cultura condrogênica com IFN- γ e TNF- α , resultando na diminuição da expressão de agregam, SOX9, colágeno tipo II e TGF β 1 nas células desafiadas, pressupondo que as CTMs dessas duas fontes sintetizaram matriz, mas

o processo inflamatório pode influenciar na degradação e/ou na diminuição da síntese de matriz extracelular realizada pelos condrócitos.

Outras fontes de CTMs aparecem na literatura com finalidade comparativa. O potencial condrogênico de sangue do cordão umbilical, tecido umbilical, medula óssea e tecido adiposo foram comparados nas células de equinos e o sangue do cordão umbilical demonstrou superioridade aos demais, seguido de medula óssea, tecido umbilical e tecido adiposo. Entretanto, a avaliação foi realizada apenas por meio de histologia e coloração alcian blue, safranina e tricômico de Masson, sugerindo que amostras de coloração mais intensa denotam maior matriz extracelular por produção acentuada de glicosaminoglicanos ou colágeno (BURK et al., 2012).

9 CONCLUSÃO

As CTMs derivadas do líquido sinovial, medula óssea e tecido adiposo são capazes de diferenciação condrogênica, visto que os condrócitos produzidos realizaram a síntese de agregam.

As CTMs derivadas de tecido adiposo quando não cultivadas em condições de tecnologia de sistema tridimensional (nanopartículas) demonstraram menor produção de agregam, proteoglicano fundamental presente na cartilagem hialina. Porém, ao relacionar agregam por proteínas solúveis e agregam por peso úmido, a produção de agregam se igualou às outras duas fontes.

Quando as células são cultivadas em condições de tecnologia de sistema tridimensional a partir do uso de nanopartículas biocompatíveis, as CTMs derivadas do líquido sinovial e tecido adiposo apresentam melhor adaptação e superioridade na síntese de agregam. Ao relacionar a razão agregam por proteínas solúveis, as CTMs do líquido sinovial demonstram superioridade. Por isso, sugerimos que essas fontes são melhores para aplicação no tratamento intra-articular em conjunto com biomateriais e *scaffolds*.

As CTMs derivadas do líquido sinovial demonstram maior estabilidade ao produzir agregam independente da metodologia utilizada.

REFERÊNCIAS

- ABO-AZIZA, F. A. M.; ZAKI, A. A. The Impact of Confluence on bone marrow mesenchymal stem (BMMS) Proliferation and Osteogenic Differentiation. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 0, n. 0, 2016.
- ADAM, E. N.; JANES, J.; LOWNY, R.; LAMBERT, J.; THAMPI, P.; STROMBERG, A.; MACLEOD, J. N. Chondrogenic differentiation potential of adult and fetal equine cell types. **Veterinary Surgery**, 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/vsu.13183>>.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Transplantation**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2004.
- AGUIAR, J. A. K. **Estudos de indução e purificação de condroitinases de Flavobacterium heparinum**. Brasil, 1999. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, Brasil, 1999.
- AIGNER, T.; STÖVE, J. Collagens - Major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1569–1593, 2003.
- ALBERTON, P.; DUGONITSCH, H.; HARTMANN, B.; LI, P.; FARKAS, Z.; SALLER, M.; CLAUSEN-SCHAUMANN, H.; ASZODI, A. Aggrecan Hypomorphism Compromises Articular Cartilage Biomechanical Properties and Is Associated with Increased Incidence of Spontaneous Osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1008, 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1008>>.
- ALFORD, J. W. Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. **American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 295–306, 2005. Disponível em: <<http://ajs.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0363546504273510>>.
- ALIPOUR, F.; PARHAM, A.; PH, D.; MEHRJERDI, H. K. Equine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells : Phenotype and Growth Characteristics , Gene Expression Profile and Differentiation Potentials. **Cell Journal**, v. 16, n. 4, p. 456–465, 2015.
- ALVES, A. L. G.; VIEIRA, M. E. M.; BARREIRA, A. P. B.; MOTA, L. S. L. S.; SAITO, M. E.; KOHAYAGAWA, A.; HUSSNI, C. A.; WATANABE, M. J.; OLIVEIRA, P. G. G. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 650–655, 2009.

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.

ASPBERG, A. The Different Roles of Aggrecan Interaction Domains. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 60, p. 987–996, 2012.

BACCARIN, R. Y. a; MACHADO, T. S. L.; LOPES-MORAES, A. P.; VIEIRA, F. a C.; MICHELACCI, Y. M. Urinary glycosaminoglycans in horse osteoarthritis. Effects of chondroitin sulfate and glucosamine. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 88–96, 2012.

BANFI, A.; MURAGLIA, A.; BOZIN, B.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v. 28, p. 707–715, 2000.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24559797>>.

BARRACHINA, L.; REMACHA, a. R.; ROMERO, a.; VÁZQUEZ, F. J.; ALBAREDA, J.; PRADES, M.; RANERA, B.; ZARAGOZA, P.; MARTÍN-BURRIEL, I.; RODELLAR, C. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 57–65, 2016.

BARREY, E. Biomechanics of locomotion in the athletic horse. In: HINCHCLIFF, K. W; KANEPS, A. J. GEOR, R. J. **Equine Sports Medicine and Surgery Basic and clinical of the equine athlete**. ed 2. Ed Saunders Elsevier, Philadelphia. p. 189, 2014.

BARTOLOTTI, I.; FINI, M.; MARTINI, L.; LOLLI, R.; PARRILLI, A.; DESANDO, G.; VERONESI, F.; GIAVARESI, G.; GRIGOLO, B.; SARTORI, M.; MAGLIO, M. Bone marrow concentrate and expanded mesenchymal stromal cell surnatants as cell-free approaches for the treatment of osteochondral defects in a preclinical animal model. **International Orthopaedics**, v. 43, n. 1, p. 25–34, 2018.

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

BERG, J. M. .; TYMOCZKO, J. L. .; STRYER, L. In: **Bioquímica.** 7 ed, 2014

BHOSALE, A. M.; RICHARDSON, J. B. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. **British Medical Bulletin**, v. 87, p. 77–95, 2008.

BIDANSET, D. J.; GUIDRY, C.; ROSENBERG, L. C.; CHOI, H. U.; TIMPL, R.; HOOK, M. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 8, p. 5250–5256, 1992.

BIERNACKA, A. .; DOBACZEWSKI, M. .; FRANGOIANNIS, N. G. TFG-b signaling in fibrosis. **Growth Factors**, v. 29, n. 5, p. 196–202, 2011.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2010.12.001>>.

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, 2010.

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.

BURK, J.; GLAUCHE, S. M.; BREHM, W.; CROVACE, A.; FRANCIOSO, E.; HILLMANN, A.; SCHUBERT, S.; LACITIGNOLA, L. Characterisation and intracellular labelling of mesenchymal stromal cells derived from synovial fluid of horses and sheep. **The Veterinary Journal**, v. 222, p. 1–8, 2017.

BURK, J.; RIBITSCH, I.; GITTEL, C.; JUELKE, H.; KASPER, C.; STASZYK, C.; BREHM, W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 98–106, 2012. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.004>>.

BURTON-WURSTER; LIU, W. .; MATTHEWS, G. L. .; SURGEON, E. .; LUST, G. .; ROUGHLEY, P. J. .; GLANT, T. T. .; SZABÓ, G. C. . TGF beta 1 and biglycan, decorin, and fibromodulin metabolism in canine cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 3, p. 167–176, 2003.

CALATRONI, A.; AVENOSO, A.; FERLAZZO, A. M.; LINDNER, A.; CAMPO, G. M. Transient increase with strenuous exercise of plasma levels of glycosaminoglycans in humans and horses. **Connective Tissue Research**, v. 49, p. 416–425, 2008.

CAMPO, R. D.; TOURTELLOTTE, A. I. C. D. The composite of bovine cartilage and bone. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 41, n. 3, p. 614–624, 1967.

CAPORALI, E. H.; KUYKENDALL, T.; STEWART, M. C. Complete sequencing and characterization of equine aggrecan. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 28, p. 79–87, 2015.

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 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.

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.

CATERSON, B.; MELROSE, J. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. **Glycobiology**, v. 28, n. 4, p. 182–206, 2018.

CHAN, W. L. .; STEINER, M. .; WITKOS, T. .; EGERER, J. .; BUSSE, B. .; MIZUMOTO, S. .; PESTKA, J. M. .; ZHANG, H. .; HAUSSER, I. .; ABO., K. L.; OTT, C.-E. .; KOLANCZYK, M. .; WILLIE, B. .; SCHINKE, T. .; PAGANINI, C. .; ROSSI, A. .; SUGAHARA, K. .; AMLING, M. .; KNAUS, P. .; CHAN, D. .; LOWE, M. .; MUNDLOS, S. .; KORNAK, U. . Impaired proteoglycan glycosylation, elevated TGF- β signaling, and abnormal osteoblast differentiation as the basis for bone fragility in a mouse model for gerodermia osteodysplastica. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 3, p. 1–24, 2018.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jecm.2014.06.007>>.

CHIARADIA, E.; PEPE, M.; TARTAGLIA, M.; SCOPPETTA, F.; D'AMBROSIO, C.; RENZONE, G.; AVELLINI, L.; MORICONI, F.; GAITI, A.; BERTUGLIA, A.; BECCATI, F.; SCALONI, A. Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4478–4493, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.02.008>>.

CHU, C. R. The Challenge and the Promise of Bone Marrow Cells for Human Cartilage Repair. **Cartilage**, v. 6, p. 36S–45S, 2015. Disponível em: <http://car.sagepub.com/content/6/2_suppl/36S.short>.

CIFONELLI, J. A.; SAUNDERS, A.; GROSS, J. I.; DISEASES, M. Keratan sulfate fractions from bovine and human tissues. **Carbohydrate Research**, v. 3, 1967.

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.

CONSENTIUS, C.; REINKE, P.; VOLK, H. D. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: What has been seen in vitro and in vivo? **Regenerative Medicine**, v. 10, n. 3, p. 305–315, 2015.

COUCHMAN, J. R.; PATAKI, C. a. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 60, p. 885–897, 2012.

CUNHA, A. L. **Desvendando a relação estrutura-função de condroitim sulfatos: Estudo dos efeitos anti-inflamatórios sobre condrócitos e macrófagos**. Brasil, 2017. 235 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, Brasil, 2017.

DANIELSON, K. G.; BARIBAULT, H.; HOLMES, D. F.; GRAHAM, H.; KADLER, K. E.; IOZZO, R. V. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. **Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 3, p. 729–743, 1997.

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 GRAUW, J. C. Molecular monitoring of equine joint homeostasis. **Veterinary Quarterly**, v. 31, n. April, p. 77–86, 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01652176.2011.565546>>.

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 UGARTE, D. a.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P. a.; ZHU, M.; DRAGOO, J. L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M. H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**, v. 174, p. 101–109, 2003.

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 Veterinaria 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.030>>.

DEVLIN, T. M. In: **Manual de Bioquímica com Correlações clínicas**. editora Blücher 6 ed., 2007.

DIGIROLAMO, C. M.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY, D. G.; CLASS, R.; PROCKOP, D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **British Journal of Haematology**, v. 107, n. 1987, p. 275–281, 1999.

DIMOCK, A. N., SICILIANO, P. D., McWRAITH, C. W. Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the disease equine joint. **Equine Veterinary Journal**. v. 32, n. 5, p. 439 - 443, 2000.

DOEGE, K. J.; SASAKI, M.; KIMURA, T.; YAMADA YOSHIHIKO. Complete Coding Sequence and Deduced Primary Structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 2, p. 894-902, 1991.

DOEGE, K.; SASAKI, M.; HORIZAN, E.; HASSELL, J. R.; YAMADA, Y. Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycans core protein deduced from cDNA clones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 36, p. 17757–17767, 1987.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>>.

DOURADO, B. Y. G. S.; ADAMS, M. E.; MATYAS, J. R.; HUANG, D. Expression of biglycan, decorin and fibromodulin in the hypertrophic phase of experimental osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 4, p. 187–196, 1996.

DU SOUICH, P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 142, p. 362–374, 2014.

DUIJVESTEN, M.; VOS, A. C. W.; ROELOFS, H.; WILDENBERG, M. E.; WENDRICH, B. B.; VERSPAGET, H. W.; KOOY-WINKELAAR, E. M. C.; KONING, F.; ZWAGINGA, J. J.; FIDDER, H. H.; VERHAAR, A. P.; FIBBE, W. E.; VAN DEN BRINK, G. R.; HOMMES, D. W. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. **British Journal of Sports Medicine**, v. 59, p. 1662–1669, 2010.

DURIGOVA, M.; SOUCY, P.; FUSHIMI, K.; NAGASE, H.; MORT, J. S.; ROUGHLEY, P. J. Characterization of an ADAMTS-5-mediated cleavage site in aggrecan in OSM-stimulated bovine cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, p. 1245–1252, 2008.

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 Sti fle Injury. **Veterinary Surgery : VS**, v. 9999, p. 1–11, 2014.

FERRO, T.; SANTHAGUNAM, A.; MADEIRA, C.; SALGUEIRO, J. B.; DA SILVA, C. L.; CABRAL, J. M. S. Successful isolation and ex vivo expansion of human mesenchymal stem/stromal cells obtained from different synovial tissue-derived (biopsy) samples. **Journal**

of **Cellular Physiology**, v. 234, n. 4, p. 3973–3984, 2019.

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.

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 volume**, 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.

FOSANG, a J.; HARDINGHAM, T. E. Isolation of the N -terminal globular protein domains from cartilage proteoglycans. Identification of G2 domain and its lack of interaction with hyaluronate and link protein. **Biochemical Journal**, v. 261, p. 801–809, 1989.

FRASER, J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 150–154, 2006.

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.

FÜLBER, J.; MARIA, D. A.; DA SILVA, L. C. L. C.; MASSOCO, C. O.; AGRESTE, F.; BACCARIN, R. Y. A. Comparative study of equine mesenchymal stem cells from healthy and injured synovial tissues: An in vitro assessment. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0294-3>>.

GELSE, K., PÖSCHL, E., AIGNER T. Collagens – Structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1531-1546, 2003.

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.

GOLDBERG, A.; MITCHELL, K.; SOANS, J.; KIM, L.; ZAIDI, R. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. **Journal of Orthopaedic**

Surgery and Research, v. 12, p. 39, 2017. Disponível em: <<http://josr-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13018-017-0534-y>>.

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.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M. L.; PÉREZ-CASTRILLO, S.; SÁNCHEZ-LÁZARO, J. A.; PRIETO-FERNÁNDEZ, J. G.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, M. E.; LOBATO-PÉREZ, S.; COLAÇO, B. J.; OLIVERA, E. R.; VILLAR-SUÁREZ, V. Assessment of regeneration in meniscal lesions by use of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. **American Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 7, p. 779–788, 2016. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/10.2460/ajvr.77.7.779>>.

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

GRÄSSEL, S.; BAUER, R. J. Collagen XVI in health and disease. **Matrix Biology**, v. 32, p. 64–73, 2013.

GROGAN, S. P.; BARBERO, A.; DIAZ-ROMERO, J.; CLETON-JANSEN, A. M.; SOEDER, S.; WHITESIDE, R.; HOGENDOORN, P. C. W.; FARHADI, J.; AIGNER, T.; MARTIN, I.; MAINIL-VARLET, P. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 2, p. 586–595, 2007.

GROVER, J.; CHEN, X.-N.; KORENBERG, J. R.; ROUGHLEY, P. J. The Human Lumican Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21942–21949, 2002.

GUERASSIMOV, A.; ZHANG, Y.; BANERJEE, S.; CARTMAN, A.; LEROUX, J. Y.; ROSENBERG, L. C.; ESDAILE, J.; FITZCHARLES, M. A.; POOLE, a. R. Cellular immunity to the G1 domain of cartilage proteoglycan aggrecan is enhanced in patients with rheumatoid arthritis but only after removal of keratan sulfate. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 6, p. 1019–1025, 1998.

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. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3781685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2011.04.001>>.

HAGG, R.; BRUCKNER, P.; HEDBOM, E. Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: Differential distribution of decorin and collagen IX. **Journal of Cell Biology**, v. 142, n. 1, p. 285–294, 1998.

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

HARDINGHAM, T. E. ; FOSANG, A. J. Proteoglycans: many forms and many functions. **The FASEB Journal**, p. 861–870, 1992.

HARE, J. M.; TRAVERSE, J. H.; HENRY, T. D.; DIB, N.; STRUMPF, R. K.; SCHULMAN, S. P.; GERSTENBLITH, G.; DEMARIA, A. N.; DENKTAS, A. E.; GAMMON, R. S.; HERMILLER, J. B. J.; REISMAN, M. a; SCHAER, G. L.; SHERMAN, W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) after acute myocardial infarction. **Journal**, v. 54, n. 24, p. 2277–2286, 2013.

HASSEL, J. R.; NEWSOME, D. A.; HASCALL, V. C. Characterization and Biosynthesis of Proteoglycans of Corneal Stroma from Rhesus Monkey. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 24, p. 12346-12354, 1979.

HEATHFIELD, T. F.; ÖNNERFJORD, P.; DAHLBERG, L.; HEINEGÅRD, D. Cleavage of Fibromodulin in Cartilage Explants Involves Removal of the N-terminal Tyrosine Sulfate-rich Region by Proteolysis at a Site That Is Sensitive to Matrix Metalloproteinase-13. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 8, p. 6286–6295, 2004.

HEINEGÅRD, D.; SAXNE, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 50–56, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.198>>.

HEYWOOD, H.; LEE, D. Bioenergetic reprogramming of articular chondrocytes by exposure to exogenous and endogenous reactive oxygen species and its role in the anabolic response to low oxygen. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 10, p. 1–9, 2016.

HILDEBRAND, A. .; ROMARÍS, M. .; RASMUSSEN, L. M. .; HEINEGÅRD, D. .; TWARDZIK, D. R. .; BORDER, W. A. .; RUOSLAHTI, E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor β . **Biochemical Journal**, v. 302, n. 2, p. 527–534, 1994.

HINCHCLIFF, K. W. The horse an as athlete. In: HINCHCLIFF, K. W; KANEPS, A. J. GEOR, R. J. **Equine Sports Medicine and Surgery Basic and clinical of the equine athlete**. ed 2. Ed Saunders Elsevier, Philadelphia. p. 03, 2014.

HOFMANN, A. D.; BEYER, M.; KRAUSE-BUCHHOLZ, U.; WOBUS, M.; BORNHÄUSER, M.; RÖDEL, G. Oxphos supercomplexes as a hallmark of the mitochondrial phenotype of adipogenic differentiated human MSCS. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

HORIE, M.; SEKIYA, I.; MUNETA, T.; ICHINOSE, S.; MATSUMOTO, K.; SAITO, H.; MURAKAMI, T.; KOBAYASHI, E. Intra-articular Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. **Stem cells**, v. 27, p. 878–887, 2009.

HORKAY, F.; BASSER, P. J.; HECHT, A. M.; GEISLER, E. Structure and Properties of Cartilage Proteoglycans. **Macromolecular Symposia**, v. 372, n. 1, p. 43–50, 2017.

HSU, W.-T.; LIN, C.-H.; CHIANG, B.-L.; JUI, H.-Y.; WU, K. K.-Y.; LEE, C.-M. Prostaglandin E2 Potentiates Mesenchymal Stem Cell-Induced IL-10+IFN- +CD4+ Regulatory T Cells To Control Transplant Arteriosclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 5, p. 2372–2380, 2013.

HSU, Y.-C.; WU, Y.-T.; YU, T.-H.; WEI, Y.-H. Mitochondria in mesenchymal stem cell biology and cell therapy: From cellular differentiation to mitochondrial transfer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 52, p. 119–131, 2016.

HUAMAN, O. .; BAHAMONDE, J. .; CAHUASCANCO, B. .; JERVIS, M. .; PALOMINO, J. .; TORRES, C. G. .; PERALTA, O. A. Immunomodulatory and immunogenic properties of mesenchymal stem cells derived from bovine fetal bone marrow and adipose tissue. **Research in Veterinary Science**, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.048>>.

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.

IM, GI. Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal

cells: Their comparative efficacies and synergistic effects. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.36089>>.

IM, G. II; SHIN, Y. W.; LEE, K. B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, p. 845–853, 2005.

IOZZO, R. V; SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix Biology**, v. 42, p. 11-55, 2015.

ISHIDA, O.; TAKANA, Y.; MORITO, I.; TAKIGAWA, M.; ETO, S. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 1657 - 1663, 1997.

JALLALI, N.; RIDHA, H.; THRASIVOULOU, C.; BUTLER, P.; COWEN, T. Modulation of intracellular reactive oxygen species level in chondrocytes by IGF-1, FGF, and TGF-beta1. **Connective tissue research**, v. 48, n. May, p. 149–58, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522998>>.

JACKSON, R. L., BUSCH, S. J., & CARDIN, A. D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiol Rev**, v.71, n. 2, p. 481-539, 1991.

JIA, Z.; ZHU, F.; LI, X.; LIANG, Q.; ZHUO, Z.; HUANG, J.; DUAN, L.; XIONG, J.; WANG, D. Repair of osteochondral defects using injectable chitosan-based hydrogel encapsulated synovial fluid-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, p. 541–551, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.115>>.

JOHNSON, S. a.; FRISBIE, D. D. Cartilage Therapy and Repair in Equine Athletes. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 26, p. 155–165, 2016.
JORGENSEN, C. Mesenchymal stem cells: Uses in osteoarthritis. **Joint Bone Spine**, v. 80, p. 565–567, 2013.

KHALILIFAR, M. A.; SC, M.; ESLAMINEJAD, M. B.; PH, D.; GHASEMZADEH, M. In Vitro and In Vivo Comparison of Different Types of Rabbit Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. **Cell Journal**, n. 6, 2018.

KIANI, C.; CHEN, L.; WU, Y. J.; YEE, A. J.; YANG, B. B. Structure and function of aggrecan. **Cell Research**, v. 12, p. 19–32, 2002.

KIANI, C.; LEE, V.; CAO, L.; CHEN, L.; WU, Y.; ZHANG, Y.; ADAMS, M. E.; YANG, B. B. Roles of aggrecan domains in biosynthesis, modification by glycosaminoglycans and product secretion. **The Biochemical journal**, v. 354, p. 199–207, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171095>>.

KIELTY, C. M.; WHITTAKER, S. P.; GRANT, M. E.; SHUTTLEWORTH, C. A. Type VI collagen microfibrils: Evidence for a structural association with hyaluronan. **Journal of Cell Biology**, v. 118, n. 4, p. 979–992, 1992.

KIM, M.; KIM, C.; CHOI, Y. S.; KIM, M.; PARK, C.; SUH, Y. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 133, p. 215–225, 2012.

KIM, S. K.; HAE, W. C.; HEE, E. Y.; ICK, Y. K. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 40294–40302, 2010.

KJELLÉN, L., & LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annu Ver Biochem**, v. 60, p. 443–75, 1991.

KLEINE, S. a; BUDSBERG, S. C. Synovial membrane receptors as therapeutic targets: A review of receptor localization, structure, and function. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, n. November 2016, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jor.23568>>.

KNUDSON, C. B.; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. **Cartilage: Volume 1: Physiology and Development**, v. 12, p. 1–22, 2016.

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.; 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.

KOH, Y. G.; CHOI, Y. J.; KWON, S. K.; KIM, Y. S.; YEO, J. E. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, n. 5, p. 1308–1316, 2015.

KOHLI, N.; AL-DELFI, I. R. T.; SNOW, M.; SAKAMOTO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; JOHNSON, W. E. B. CD271-selected mesenchymal stem cells from adipose tissue enhance cartilage repair and are less angiogenic than plastic adherent mesenchymal stem cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3194, 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-39715-z>>.

KORNICKA, K.; MARYCZ, K.; TOMASZEWSKI, K. A.; MAR, M.; AGNIESZKA, U. The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. v. 2015, 2015.

KÖWITSCH, A.; ZHOU, G.; GROTH, T. Medical Application of Glycosaminoglycans - A Review. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/term.2398>>.

KWON, H.; PASCHOS, N. K.; HU, J. C.; ATHANASIOU, K. Articular cartilage tissue engineering: The role of signaling molecules. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p. 1173–1194, 2016.

KYURKCHIEV, D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 552, 2014.

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.

LAI, C. H.; CHU, M. L. Tissue distribution and developmental expression of type XVI collagen in the mouse. **Tissue and Cell**, v. 28, n. 2, p. 155–164, 1996.

LALU, M. M.; MOHER, D.; MARSHALL, J.; FERGUSSON, D.; MEI, S. H. J.; MACLEOD, M.; GRIFFIN, G.; TURGEON, A. F.; RUDNICKI, M.; FISHMAN, J.; AVEY, M. T.; SKIDMORE, B.; GRIMSHAW, J. M.; STEWART, D. J.; SINGH, K.; MCINTYRE, L. Efficacy and safety of mesenchymal stromal cells in preclinical models of acute lung injury: a systematic review protocol. **Systematic Reviews**, v. 3, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://www.systematicreviewsjournal.com/content/pdf/2046-4053-3-48.pdf%5Cnpapers2://publication/doi/10.1186/2046-4053-3-48>>.

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.

LARK, MICHAEL W.; GORDY, J. T.; WEIDER, J. R.; AYALA, J.; KIMURA, J. H.; WILLIAMS, H. R.; MUMFORD, R. A.; FLANNERY, C. R.; CARLSON, S. S.; IWATA, M.; SANDY, J. D. Cell-mediated catabolism of aggrecan. **The journal of biological chemistry**, v. 270, n. 6, p. 2550–2556, 1995.

LARSON, B.; SOUZA, G.; SELDIN, J. Application note: An automated walk-away system to perform differentiation of 3D mesenchymal stem cells spheroids. In: <http://www.n3dbio.com/wp-content/uploads/2017/11/Mesenchymal-Stem-Cells-Differentiation.pdf>

LAUDER, R. M.; HUCKERBY, T. N.; NIEDUSZYNSKI, I. A.; PLAAS, A. H. K. Attached To Fibromodulin Isolated From Articular Cartilage. **October**, v. 757, p. 753–757, 1998.

LAVERTY, S.; GIRARD, C. Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 1, p. 3–12, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.035>>.

LEE, B. C.; KIM, H. S.; SHIN, T. H.; KANG, I.; LEE, J. Y.; KIM, J. J.; KANG, H. K.; SEO, Y.; LEE, S.; YU, K. R.; CHOI, S. W.; KANG, K. S. PGE 2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–12, 2016.

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, 2012.

LEGRAND, C. B.; LAMBERT, C. J.; COMBLAIN, F. V.; SANCHEZ, C.; HENROTIN, Y. E. Review of Soluble Biomarkers of Osteoarthritis: Lessons From Animal Models. **Cartilage**, v. 8, p. 211–233, 2017.

LEVICK, J. R.; MCDONALD, J. N. Fluid movement across synovium in healthy joints: role of synovial fluid macromolecules. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 54, p. 417–423, 1995.

LI, Q.; GAO, Z.; CHEN, Y.; GUAN, M.-X. The role of mitochondria in osteogenic,

adipogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Protein & Cell**, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13238-017-0385-7>>.

LIU, J.; LI, L.; SUO, H.; YAN, M.; YIN, J.; FU, J. 3D printing of biomimetic multi-layered GelMA/nHA scaffold for osteochondral defect repair. **Materials & Design**, v. 171, p. 107708, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264127519301455>>.

LIU, S.; DE CASTRO, L. F.; JIN, P.; CIVINI, S.; REN, J.; REEMS, J.-A.; CANCELAS, J.; NAYAK, R.; SHAW, G.; O'BRIEN, T.; MCKENNA, D. H.; ARMANT, M.; SILBERSTEIN, L.; GEE, A. P.; HEI, D. J.; HEMATTI, P.; KUZNETSOV, S. a.; ROBEY, P. G.; STRONCEK, D. F. Manufacturing Differences Affect Human Bone Marrow Stromal Cell Characteristics and Function: Comparison of Production Methods and Products from Multiple Centers. **Scientific Reports**, v. 7, n. April, p. 46731, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep46731>>.

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. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/evj.12311>>.

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.

MACIULAITIS, J.; REKSTYTE, S.; USAS, A.; JANKAUSKAITE, V.; GUDAS, R.; MALINAUSKAS, M.; MACIULAITIS, R. Characterization of tissue engineered cartilage products: Recent developments in advanced therapy. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 823–832, 2016.

MACKIE, E. J.; AHMED, Y. a.; TATARCZUCH, L.; CHEN, K. S.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, p. 46–62, 2008.

MAIA, L.; DA CRUZ LANDIM- ALVARENGA, F.; TAFFAREL, M. O.; DE MORAES, C. N.; MACHADO, G. F.; MELO, G. D.; AMORIM, R. M. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/63>>.

MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; DA MOTA, L. S. L. S.; DE ASSIS GOLIM, M.; LAUFER-AMORIM, R.; DE VITA, B.; BARBERINI, D. J.; LISTONI, A. J.; DE MORAES,

C. N.; HECKLER, M. C. T.; AMORIM, R. M. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. January, p. 618–624, 2013a.

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, 2013b.

MALLICK, S. P.; RASTOGI, A.; TRIPATHI, S.; SRIVASTAVA, P. Strategies on process engineering of chondrocyte culture for cartilage tissue regeneration. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 4, p. 601–610, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00449-016-1724-4>>.

MAO, F.; TU, Q.; WANG, L.; CHU, F.; LI, X.; LI, H. S.; XU, W.; MAO, F.; TU, Q.; WANG, L.; CHU, F.; LI, X.; LI, H. S.; XU, W. Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. **Oncotarget**, v. 5, 2015. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/abstract/16682>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.004>>.

MARIÑAS-PARDO, L.; GARCÍA-CASTRO, J.; RODRÍGUEZ-HURTADO, I.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I.; NÚÑEZ-NAVEIRA, L.; HERMIDA-PRIETO, M. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (Horse Allo 20) for the Treatment of Osteoarthritis-Associated Lameness in Horses: Characterization, Safety, and Efficacy of Intra-Articular Treatment. **Stem Cells and Development**, v. 27, n. 17, p. 1–67, 2018.

MARKS, R. Osteoarthritis and Articular Cartilage : Biomechanics and Novel Treatment Paradigms. **Advances in ageing research**, n. September, p. 297–309, 2014.

MARTEL-PELLETIER, J., BOILEAU, C., PELLETIER, J. P., & ROUGHLEY, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, v. 22, n. 2, p. 351-384, 2008.

MARTINS, E. A. N.; MICHELACCI, Y. M.; BACCARIN, R. Y. A; COGLIATI, B.; SILVA, L. C. L. C. Evaluation of chitosan-GP hydrogel biocompatibility in osteochondral defects: an experimental approach. **BMC veterinary research**, v. 10, p. 197, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4236820&tool=pmcentrez&rend>>

ertype=abstract>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.036>>.

MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; VAN WEEREN, P. R. **Joint disease in the horse**. 2ª edição ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; RODKEY, W. G.; KISIDAY, J. D.; WERPY, 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2011.06.002>>.

MEHRANFAR, S.; ABDI RAD, I.; MOSTAFAV, E.; AKBARZADEH, A. The use of stromal vascular fraction (SVF), platelet-rich plasma (PRP) and stem cells in the treatment of osteoarthritis: an overview of clinical trials. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 882–890, 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2019.1576710>>.

MELROSE, J.; FULLER, E. S.; ROUGHLEY, P. J.; SMITH, M. M.; KERR, B.; HUGHES, C. E.; CATERSON, B.; LITTLE, C. B. Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues. **Arthritis Research and Therapy**, v. 10, n. 4, p. 1–10, 2008.

MICHELACCI, Y. M., & DIETRICH, C. P. A comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*: Isolation of a chondroitinase AC-susceptible dodecasaccharide from chondroitin sulphate B. **Biochem J**, v. 151, n. 1, p. 121-9, 1975.

MICHELACCI, Y. M., & DIETRICH, C. P. Structure of chondroitin sulfates. Analyses of the products formed from chondroitin sulfates A and C by the action of the chondroitinases C and AC from *Flavobacterium heparinum*. **Biochim Biophys Acta**, v. 451, n. 2, p. 436-43, Dec 1976b.

MICHELACCI, Y. M.; MOURÃO, P. A. S.; LAREDO-FILHO, J.; DIETRICH, C. P. Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilages. **Connective Tissue Research**, v.7, p.29 - 36, 1979.

MICHELACCI, Y. M.; LAREDO-FILHO, J.; DIETRICH, C. P. Proteoglycans and chondroitin sulfates from human multiple chondroma (enchondromatosis). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.14, p.161 - 172, 1981.

MICHELACCI, Y. M., & DIETRICH, C. P. Structure of chondroitin sulphate from whale cartilage: distribution of 6- and 4-sulphated oligosaccharides in the polymer chains. *J Biol Macromol*, v. 8, p. 108-113, 1986.

MICHELACCI, Y. M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1037–1046, 2003.

Disponível em:

<<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L37080914>>.

MOBASHERI, A.; KALAMEGAM, G.; MUSUMECI, G.; BATT, M. E. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. **Maturitas**, v. 78, n. 3, p. 188–198, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.04.017>>.

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. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10616-014-9831-z>>.

MOKBEL, A. N.; EL TOOKHY, O. S.; SHAMAA, A. a; RASHED, L. a; SABRY, D.; EL SAYED, A. M. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 12, p. 259, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/12/259>>.

MORGELIN, M.; PAULSSON, M.; HARDINGHAM, T. E.; HEINEGARD, D.; ENGEL, J. Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. **Biochem. J.**, v. 253, p. 175–185, 1988. Disponível em:

<<http://www.biochemj.org/bj/253/bj2530175.htm>>.

MORITA, K.; MIYAMOTO, T.; FUJITA, N.; KUBOTA, Y.; ITO, K.; TAKUBO, K.; MIYAMOTO, K.; NINOMIYA, K.; SUZUKI, T.; IWASAKI, R.; YAGI, M.; TAKAISHI, H.; TOYAMA, Y.; SUDA, T. Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 7, p. 1613–1623, 2007.

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

MOURÃO, P. A. S.; MICHELACCI, Y. M.; TOLEDO, O. M. S. Glycosaminoglycans and proteoglycans of normal and tumoral cartilages of humans and rats. **Cancer Research (Chicago, Ill.)**, v.39, p. 2802 - 2806, 1979.

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. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023314003219>>.

MURATA, Y.; UCHIDA, S.; UTSUNOMIYA, H.; HATAKEYAMA, A.; NAKASHIMA, H.; CHANG, A.; SEKIYA, I.; SAKAI, A. Synovial Mesenchymal Stem Cells Derived From the Cotyloid Fossa Synovium Have Higher Self-renewal and Differentiation Potential Than Those From the Paralabral Synovium in the Hip Joint. **American Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 12, p. 2942–2953, 2018.

MURPHY, M. .; HUET, D. J. .; HU, J. C. .; ATHANASIOU, K. A. TGF-B1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces Chondrogenesis in Expanded Human Articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. **Stem Cells**, v. 33, p. 762–773, 2015.

NAGASE, T.; MUNETA, T.; JU, Y. J.; HARA, K.; MORITO, T.; KOGA, H.; NIMURA, A.; MOCHIZUKI, T.; SEKIYA, I. Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 5, p. 1389–1398, 2008.

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.
NELSON, D. L. .; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. 17.

NELSON, D. L., COX, M. M.. Carbohydrates and glycobiology. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**. ed. 4. Ed Sarvier. p. 239 - 267, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carbohidratos e glicobiologia. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. ed. 6. Ed Artmed. p. 264, 2014.

NEYBECKER, P.; HENRIONNET, C.; PAPE, E.; MAINARD, D.; GALOIS, L.; LOEUILLÉ, D.; GILLET, P.; PINZANO, A. In vitro and in vivo potentialities for cartilage repair from human advanced knee osteoarthritis synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2018.

NI, G. X.; LI, Z.; ZHOU, Y. Z. The role of small leucine-rich proteoglycans in osteoarthritis pathogenesis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, n. 7, p. 896–903, 2014.

OLDBERG, A.; ANTONSSON, P.; LINDBLOM, K.; HEINEGÅRD, D. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). **The EMBO Journal**, v. 8, n. 9, p. 2601–2604, 1989.

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.

ORTVED, K. F.; NIXON, A. J. Cell-based cartilage repair strategies in the horse. **Veterinary Journal**, v. 208, p. 1–12, 2016.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.07.017>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2011.06.003>>.

PIAI, J. F.; MARTINS, A. M.; DA SILVA, M. L. A.; REIS, R. L.; MUNIZ, E. C.; NEVES, N. M. Chondroitin sulfate immobilization at the surface of electrospun nanofiber meshes for cartilage regeneration. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 403, p. 112–125, 2012.

PIETRASZEK-GREMPLEWICZ, K. .; KARAMANOU, K.; NIANG, A.; DAUCHEZ, M.; BELLOY, N.; MAQUART, F.-X.; BAUD, S.; BRÉZILLON, S. Small leucine-rich proteoglycans and matrix metalloproteinase-14: Key partners? **Matrix Biology**, v. 75–76, p.

271–285, 2018.

POMIN, V. H. Keratan sulfate: An up-to-date review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 282–289, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.029>>.

POMIN, V. H.; MULLOY, B. Glycosaminoglycans and proteoglycans. **Pharmaceuticals**, v. 11, p. 1–9, 2018.

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, n. April, p. 71–74, 1997.

RAHEJA, L. F.; GALUPPO, L. D.; BOWERS-LEPORE, J.; DOWD, J. P.; TABLIN, F.; YELLOWLEY, C. E. Treatment of Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage Fissures in a Horse Using Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 3, p. 147–154, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2010.12.009>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.033>>.

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, n. August, p. 329–336, 2008.

RICHARDSON, S. M.; KALAMEGAM, G.; PUSHPARAJ, P. N.; MATTA, C.; MEMIC, a; KHADEMOSSEINI, a; MOBASHERI, R.; POLETTI, F. L.; HOYLAND, J. A; MOBASHERI, A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. **Methods**, v. 99, p. 69–80, 2016. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84952026554&partnerID=40&md5=ab98aa42998aa049340c7c90e09bbfb5>>.

ROUGHLEY, P. J.; WHITE, R. J.; MORT, J. S. Presence of pro-forms of decorin and biglycan in human articular cartilage. **Biochemical Journal**, v. 318, n. 3, p. 779–784, 1996.

ROUGHLEY, P. J. The structure and function of cartilage proteoglycans. **European Cells and Materials**, v. 12, p. 92–101, 2006.

ROUGHLEY, P. J.; MORT, J. S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 1, p. 1–11, 2014.

ROZEMULLER, H.; PRINS, H.-J.; NAAJKENS, 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.

RUFF, C. a.; FAULKNER, S. D.; FEHLINGS, M. G. The potential for stem cell therapies to have an impact on cerebral palsy: Opportunities and limitations. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 55, p. 689–697, 2013.

SACCHETTI, B.; FUNARI, A.; REMOLI, C.; GIANNICOLA, G.; KOGLER, G.; LIEDTKE, S.; COSSU, G.; SERAFINI, M.; SAMPAOLESI, M.; TAGLIAFICO, E.; TENEDINI, E.; SAGGIO, I.; ROBEY, P. G.; RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Np identical “Mesenchymal stem cells” ate different times and sites: Human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. **Stem Cell Reports**, v. 7, p. 664–677, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.012>>.

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.

SALVA, J. E.; MERRILL, A. E. Signaling networks in joint development. **Developmental Dynamics**, p. 262–274, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.24472>>.

SANDY, J. D.; FLANNERY, C. R.; BOYNTON, R. E.; NEAME, P. J. Isolation and characterization of disulfide-bonded peptides from the three globular domains of aggregating cartilage proteoglycan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. May, p. 21108–21113, 1990.

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. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.10.010>>.

SANTOS, V. H. Dos; PFEIFER, J. P. H.; SOUZA, J. B. De; STIEVANI, F. D. C.; HUSSNI, C. A.; GOLIM, M. D. A.; DEFFUNE, E.; ALVES, A. L. G. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses. **Research in Veterinary Science**, v. 124, n. February, p. 38–45, 2019.

SAW, K.-Y.; ORTH, M. C. .; EDIN, F. R. C. S. .; ADAM, A. .; JEE, C. S. Y. .; MERICAN, S. .; M.B.B.CH.; F.R.C.R.; KHAY-YONG SAW, M.CH.ORTH., F.R.C.S.(EDIN), ADAM ANZ, M. D.; CAROLINE SIEW-YOKE JEE, PH.D.(LOND), SHAHRIN MERICAN, M.B.B.CH., F.R.C.R., R. C.-S. N. . Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: A randomized controlled trial. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 29, n. 6 SUPPL. 1, p. e27–e28, 2013. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed14&NEWS=N&AN=71255315>>.

SCHELLENBERG, A.; STIEHL, T.; HORN, P.; JOUSSEN, S.; PALLUA, N.; HO, A. D.; WAGNER, W. Population dynamics of mesenchymal stromal cells during culture expansion. **Cytherapy**, v. 14, n. November 2011, p. 401–11, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324912706527>>.

SCHIRALDI, C.; CIMINI, D.; DE ROSA, M. Production of chondroitin sulfate and chondroitin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1209–1220, 2010.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.018>>.

SCHWARTZ, N. B.; DOMOWICZ, M. Chondrodysplasias due to proteoglycan defects. **Glycobiology**, v. 12, n. May 2002, 2002.

SEKIYA, I.; COLTER, D. C.; PROCKOP, D. J. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 2, p. 411–418, 2001.

SEKIYA, I.; LARSON, B. L.; SMITH, J. R.; POCHAMPALLY, R.; CUI, J.-G.; PROCKOP, D. J. Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. **Stem cells**, v. 20, p. 530–541, 2002a.

SEKIYA, I.; VUORISTO, J. T.; LARSON, B. L.; PROCKOP, D. J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 7, p. 4397–4402, 2002b.

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, n. June, p. 943–949, 2012.

SHAMEKHI, M. A.; MIRZADEH, H.; MAHDAVI, H.; RABIEE, A.; MOHEBBI-KALHORI, D.; BAGHABAN ESLAMINEJAD, M. Graphene oxide containing chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, n. 2018, p. 396–405, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.020>>.

SHARMA, R. R.; POLLOCK, K.; HUBEL, A.; MCKENNA, D. Mesenchymal stem or stromal cells: A review of clinical applications and manufacturing practices. **Transfusion**, v. 54, p. 1418–1437, 2014.

SHERMAN, L.; SLEEMAN, J.; HERRLICH, P.; PONTA, H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 726–733, 1994.

SHI, W. J.; TJOUMAKARIS, F. P.; LENDNER, M.; FREEDMAN, K. B. Biologic injections for osteoarthritis and articular cartilage damage: can we modify disease? **The Physician and Sportsmedicine**, v. 45, 2017.

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. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-014-2303-0>>.

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.

SILVA, R. B. B. **Estudo experimental em coelhos do efeito do ácido hialurônico na apoptose pós-traumática de condrócitos**. Brasil, 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ortopedia e Traumatologia, Brasil, 2012.

SMITH, M. D. The normal synovium. **The open rheumatology journal**, v. 5, n. Suppl 1:M2, p. 100–106, 2011.

SMITH, R. K.; GARVICAN, E. R.; FORTIER, L. a. The current “state of play” of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human. **Regenerative medicine**, v. 9, p. 673–85, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25372081>>.

SOLER, R. .; OROZCO, L. .; MUNAR, A. .; HUGUET, M. .; LOPEZ, R. .; VIVES, J. .; COLL, R. .; CODINACH, M. .; LOPEZ, J. G. Final results of a phase I-II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for the treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration. **Knee**, v. 23, n. 4, p. 647–654, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968016015001829>0A<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26783191>0A<http://www.elsevier.com/locate/knee>0A<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emexa&NEWS=N&AN=607644455>>.

SOLURSH, M.; MEIER, S. Effects of cell density on the expression of differentiation by chick embryo chondrocytes. **Journal of Experimental Zoology**. v. 187, n. 3, p. 311-322, 1974.

SOPHIA FOX, A. J.; BEDI, A.; RODEO, S. a. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. **Sports health**, v. 1, n. 6, p. 461–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015907>5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015907>>.

SPAAS, J. H.; OOSTERLINCK, M.; BROECKX, S.; DUMOULIN, M.; SAUNDERS, J.; SOOM, a Van; PILLE, F.; VAN DE WALLE, G. R. Treatment of equine degenerative joint disease with autologous peripheral blood-derived mesenchymal stem cells : a case report. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 81 p. 11–16, 2012.

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

STEIN, T.; KELLER, R.; STUHLSATZ, H. W.; GREILING, H.; OHST, E.; MÜLLER, E.; SCHARF, H.-D. Structure of the Linkage-Region between Polysaccharide Chain and Core Protein in Bovine Corneal Proteokeratan Sulfate. **Hoppe-Seyler’s Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 363, n. August, p. 825–834, 1982.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2011.07.001>>.

STEWART, M. C.; STEWART, 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2011.06.004>>.

STOLZING, a.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; SCUTT, a. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 163–173, 2008.

SUNDARRAJ, N.; FITE, D.; LEDBETTER, S.; CHAKRAVARTI, S.; HASSELL, J. R. Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. **J Cell Sci**, v. 108, n. Pt 7, p. 2663–2672, 1995.

SURI, S.; WALSH, D. A. Osteochondral alterations in osteoarthritis. **Bone**, v. 51, p. 204–211, 2012.

SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P.; GENT, T.; FREEMAN, S.; FOSTER, N.; BARRETT-JOLLEY, R.; MOBASHERI, A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 10–24, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.013>>.

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.

TE MOLLER, N. C. R.; VAN WEEREN, P. R. How exercise influences equine joint homeostasis. **The Veterinary Journal**, v. 222, p. 60–67, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023317300631>>.

TILLET, E.; WIEDEMANN, H.; GOLBIK, R.; PAN, T. -C; ZHANG, R. -Z; MANN, K.; CHU, M. -L; TIMPL, R. Recombinant expression and structural and binding properties of $\alpha 1(VI)$ and $\alpha 2(VI)$ chains of human collagen type VI. **European Journal of Biochemistry**, v. 221, n. 1, p. 177–187, 1994.

TOMPSON, S. W.; MERRIMAN, B.; FUNARI, V. a.; FRESQUET, M.; LACHMAN, R. S.; RIMOIN, D. L.; NELSON, S. F.; BRIGGS, M. D.; COHN, D. H.; KRAKOW, D. A Recessive Skeletal Dysplasia, SEMD Aggrecan Type, Results from a Missense Mutation

Affecting the C-Type Lectin Domain of Aggrecan. **American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 1, p. 72–79, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.12.001>>.

TORTORELLA, M. D.; PRATTA, M.; LIU, R. Q.; AUSTIN, J.; ROSS, O. H.; ABBASZADE, I.; BURN, T.; ARNER, E. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18566–18573, 2000.

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.

UCHIMURA, K. Keratan sulfate: Biosynthesis, structures, and biological functions. In: *Glycosaminoglycan*, vol. 1229. p. 389 - 399, 2015.

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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3672811&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

VAN WEEREN. Joint physiology: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K. W.; KANEPS, A. J. GEOR, R. J. **Equine Sports Medicine and Surgery Basic and clinical of the equine athlete**. ed 2. Ed Saunders Elsevier, Philadelphia. p. 213, 2014.

VENN, M. F. Chemical composition of human femoral head cartilage: influence of topographical position and fibrillation. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 38, p. 57–62, 1979.

VERONESI, F.; DESANDO, G.; FINI, M.; PARRILLI, A.; LOLLI, R.; MAGLIO, M.; MARTINI, L.; GIAVARESI, G.; BARTOLOTTI, I.; GRIGOLO, B.; SARTORI, M. Bone marrow concentrate and expanded mesenchymal stromal cell supernatants as cell-free approaches for the treatment of osteochondral defects in a preclinical animal model. **International Orthopaedics**, v. 43, n. 1, p. 25–34, 2019.

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. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1532-950X.2008.00462.x/full>>.

VIGETTI, D.; KAROUSOU, E.; VIOLA, M.; DELEONIBUS, S.; DE LUCA, G.; PASSI, A. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2452–2459, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.001>>.

VISHNUBALAJI, R.; AL-NBAHEEN, M.; KADALMANI, B.; ALDAHMAH, A.; RAMESH, T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. **Cell and Tissue Research**, v. 347, p. 419–427, 2012.

VLADAR, E. K.; LEE, Y. L.; STEARNS, T.; AXELROD, J. D. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. **Journal of developmental Biology**, v. 3, p. 37–54, 2015.

WATANABE, H.; CHEUNG, S. C.; KIMATA, K.; YAMADA, Y. PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE : Identification of Hyaluronan-binding Domains of Aggrecan Identification of Hyaluronan-binding Domains of Aggrecan *. v. 272, n. 44, p. 28057–28065, 1997.

WATT, F. M. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. **Journal of Cell Science**. v. 89, p. 373-378, 1988.

WEBER, I. T.; HARRISON, R. W.; IOZZO, R. V. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 50, p. 31767–31770, 1996.

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, n. July, p. 913–925, 2007.

WU, J. J., WOODS, P. E., & EYRE, D. R. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem*, v. 267, n. 32, p. 23007-14, 1992.

YAMADA, A. L. M.; ALVARENGA, M. L.; BRANDÃO, J. S.; WATANABE, M. J.; RODRIGUES, C. A.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: Uso em lesões condrais em modelo experimental equino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 461–467, 2016.

YAMADA, A. L. M.; CARVALHO, A. de M.; MOROZ, A.; DEFFUNE, E.; WATANABE, M. J.; HUSSNI, C. A.; RODRIGUES, C. A.; ALVES, A. L. G. Mesenchymal stem cell

enhances chondral defects healing in horses. **Stem Cell Discovery**, v. 03, n. 04, p. 218–225, 2013.

YANG, W.; ZHENG, Y.; CHEN, J.; ZHU, Q.; FENG, L.; LAN, Y.; ZHU, P.; TANG, S.; GUO, R. Preparation and characterization of the collagen/cellulose nanocrystals/USPIO scaffolds loaded kartogenin for cartilage regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 18, 2019.

YING, S.; SHIRAIISHI, A.; KAO, C. W.; CONVERSE, R. L.; FUNDERBURGH, J. L.; SWIERGIEL, J.; ROTH, M. R.; CONRAD, G. W.; KAO, W. W. Characterization and Expression of the Mouse Lumican Gene *. v. 272, n. 48, p. 30306–30313, 1997.

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.

ZAYED, M. N.; SCHUMACHER, J.; MISK, N.; DHAR, M. S. Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid. **The Veterinary Journal**, v. 217, p. 26–32, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023316300685>>.

ZANETTI, N. C.; SOLURSH, M. Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*. v. 99, p. 115-123, 1984.

ZHANG, J.; HUANG, X.; WANG, H.; LIU, X.; ZHANG, T.; WANG, Y.; HU, D. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2015.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2013.07.017>>.

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 - Tabela 5 - Valores das concentrações individuais das variáveis estudadas nos esferoides

Amostras	Fonte	Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Agregam ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	Agregam/ Proteína ($\text{ng}/\mu\text{g}$)	Peso úmido do esferoide (mg)	Proteína/Peso ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso úmido)	Agregam/Peso ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso úmido)
1	LS	8,46	151,21	17,87	17,1	24,74	0,4
2	LS	11,13	130,09	11,69	27	20,61	0,2
3	LS	7,46	245,09	32,86	13,3	28,04	0,9
4	LS	4,42	74,81	16,92	8,9	24,84	0,4
5	LS	3,91	26,71	6,83	14,2	13,76	0,1
6	LS	2,34	22,26	9,52	3,3	35,44	0,3
7	LS	1,13	6,21	5,49	1,3	43,56	0,2
8	LS	1,67	6,56	3,94	2,9	28,71	0,1
9	LS	1,55	1,01	0,65	1,7	45,63	0,03
10	LS	1,12	5,36	4,81	0,9	62,01	0,3
11	LS	2,36	32,41	13,72	3,7	31,92	0,4
Média		4,14ab	63,8ab	11,3a	8,57ab	32,66a	0,32a
EPM		1,03	25,11	2,9	2,7	4,07	0,07
12	MO	7,70	107,465	13,96	25,7	14,98	0,2
13	MO	3,25	32,865	10,11	8,1	20,07	0,2
14	MO	0,85	109,465	128,32	9,8	4,35	0,6
15	MO	1,79	27,665	15,49	2	44,64	0,7
16	MO	4,76	34,84	7,32	5,8	41,04	0,3
17	MO	7,38	56,965	7,72	15,3	24,12	0,2
18	MO	3,61	53,815	14,93	13,7	13,16	0,2
19	MO	7,09	198,09	27,93	2,2	161,21	4,5
20	MO	4,55	71,415	15,70	13,8	16,48	0,3
21	MO	8,95	88,715	9,91	1,5	298,36	3,0
Média		4,99a	78,13a	25,14a	9,79a	63,84a	1,01a
EPM		0,86	16,3	11,62	2,4	29,74	0,47
22	AD	1,55	6,065	3,91	2,1	36,89	0,1
23	AD	6,73	88,215	13,11	36,6	9,19	0,1
24	AD	1,76	2,115	1,20	2,5	35,13	0,04
25	AD	1,44	2,715	1,88	0,8	90,24	0,2
26	AD	1,67	5,515	3,31	2,5	33,32	0,1
27	AD	1,68	33,665	20,02	2	42,05	0,8
28	AD	2,28	38,765	16,97	1,5	76,17	1,3
29	AD	0,99	71,715	72,48	0,8	61,84	4,5
30	AD	1,42	4,515	3,17	1,3	54,79	0,2
31	AD	2,20	13,015	5,93	1,6	68,61	0,4
Média		2,17b	26,63b	14,20a	5,17b	50,82a	0,78a
EPM		0,52	9,85	6,81	3,5	7,61	0,43

Fonte de células-tronco mesenquimais - LS: Líquido sinovial; MO: Medula óssea; AD: Tecido adiposo.

Letras diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística significativa ($P < 0.05$).

APÊNDICE B

Apêndice B - Tabela 6 - Efeito da fonte de células-tronco mesenquimais induzidas em microesferoides

Cavalo	Amostra	LS			MO			AD		
		Proteína (µg)	Agrecam total (ng)	Agrecam/Proteína ng/µg	Proteína (µg)	Agrecam total (ng)	Agrecam/Proteína ng/µg	Proteína (µg)	Agrecam total (ng)	Agrecam/Proteína ng/µg
1	1	37,57	ND	ND	45,00	23,13	0,51	17,92	109,38	6,10
	2	35,00	ND	ND	18,88	ND	ND	31,19	209,38	6,71
	3	21,00	ND	ND	52,21	ND	ND	14,33	ND	ND
	4	15,21	85,63	5,63	27,40	28,13	1,03	37,36	ND	ND
2	5	43,60	128,13	2,94	23,39	138,13	5,90	73,72	233,75	3,17
	6	30,52	49,38	1,62	21,75	ND	ND	76,85	183,75	2,39
	7	26,87	ND	ND	10,29	ND	ND	68,68	303,75	4,42
	8	4,59	ND	ND	15,28	ND	ND	71,50	211,25	2,95
3	9	29,41	ND	ND	49,43	170,63	3,45	58,37	56,25	0,96
	10	13,65	ND	ND	33,41	ND	ND	37,15	131,25	3,53
	11	26,41	161,88	6,13	39,02	30,63	0,78	40,48	1,25	0,03*
	12	30,53	23,13	0,76	29,83	ND	ND	62,38	71,25	1,14
4	13	12,86	35,63	2,77	16,01	23,13	1,44	50,60	53,75	1,06
	14	15,91	ND	ND	28,92	ND	ND	36,32	96,25	2,65
	15	19,80	6,88	0,35	16,65	ND	ND	10,11	226,25	22,37
	16	7,62	ND	ND	17,00	ND	ND	44,23	151,25	3,42
5	17	14,41	30,63	2,13	46,90	171,88	3,66	37,97	223,75	5,89
	18	17,78	233,13	13,12	36,36	45,63	1,25	35,03	158,75	4,53
	19	7,93	313,13	39,51	50,30	126,88	2,52	19,23	16,25	0,85
	20	1,05	231,88	220,50*	36,53	ND	ND	49,67	ND	ND
6	21	16,40	ND	ND	24,03	55,63	2,31	26,79	66,25	2,47
	22	15,20	35,63	2,34	1,70	45,63	26,90	30,36	83,75	2,76
	23	20,41	ND	ND	12,86	ND	ND	43,31	58,75	1,36
	24	21,74	ND	ND	3,97	53,13	13,37	29,78	ND	ND
7	25	20,19	ND	ND	73,55	30,63	0,42	8,47	116,25	13,72
	26	11,24	ND	ND	47,15	ND	ND	12,43	26,25	2,11
	27	13,04	ND	ND	9,94	ND	ND	32,73	56,25	1,72
	28	25,93	ND	ND	32,43	ND	ND	15,62	28,75	1,84
8	29	38,09	211,88	5,56	16,89	43,13	2,55	26,14	86,25	3,30
	30	24,07	206,88	8,60	14,92	31,88	2,14	45,51	83,75	1,84
	31	6,98	ND	ND	15,87	26,88	1,69	40,88	ND	ND
	32	28,91	ND	ND	22,37	65,63	2,93	22,58	63,75	2,82
9	33	46,34	ND	ND	23,96	24,38	1,02	21,18	8,75	0,41
	34	29,33	ND	ND	26,73	ND	ND	25,73	48,75	1,90
	35	20,85	ND	ND	32,69	ND	ND	17,09	13,75	0,80
	36	10,89	ND	ND	23,16	ND	ND	20,90	111,25	5,32
10	37	48,65	ND	ND	ND	ND	ND	27,57	186,25	6,76
	38	11,67	256,88	22,02	ND	ND	ND	35,38	198,75	5,62
	39	20,65	303,13	14,68	ND	ND	ND	24,45	323,75	13,24
	40	38,53	86,88	2,25	ND	ND	ND	28,67	101,25	3,53

Cavalo	Amostra	LS			MO			AD		
		Proteína (µg)	Agregam total (ng)	Agregam/ Proteína ng/µg	Proteína (µg)	Agregam total (ng)	Agregam/ Proteína ng/µg	Proteína (µg)	Agregam total (ng)	Agregam/ Proteína ng/µg
	Média	22,02 a	141,21 a	8,15 a	27,7 a	63,06 b	4,11 b	35,22b	117,3 a	4,23 ab
	EPM	1,84	25,49	1,62	2,57	12,07	1,51	2,82	14,32	0,7

Fonte de células-tronco mesenquimais - LS: Líquido sinovial; MO: Medula óssea; AD: Tecido adiposo.

Letras minúsculas distintas em colunas diferentes denotam diferença estatística entre as fontes (P<0,05).

* Não utilizado para efeito estatístico.

ND – Não detectado.

APÊNDICE C

Apêndice C – Tabela 7 - Efeito do tempo das células-tronco mesenquimais induzidas em microesferoides.

Fonte	Animais	4 dias			7 dias			14 dias			21 dias						
		#	Agregam/		#	Agregam/		#	Agregam/		#	Agregam/					
			Proteína (µg)	Agregam total (ng)	Proteína ng/µg		Proteína (µg)	Agregam total (ng)	Proteína ng/µg		Proteína (µg)	Agregam total (ng)	Proteína ng/µg		Proteína (µg)	Agregam total (ng)	Proteína ng/µg
LS	1	1	37,57	ND	ND	2	35,00	ND	ND	3	21,00	ND	ND	4	15,21	85,63	5,63
LS	2	5	43,60	128,13	2,94	6	30,52	49,38	1,62	7	26,87	ND	ND	8	4,59	ND	ND
LS	3	9	29,41	ND	ND	10	13,65	ND	ND	11	26,41	161,88	6,13	12	30,53	23,13	0,76
LS	4	13	12,86	35,63	2,77	14	15,91	ND	ND	15	19,80	6,88	0,35	16	7,62	ND	ND
LS	5	17	14,41	30,63	2,13	18	17,78	233,13	13,12	19	7,93	313,13	39,51	20	1,05	231,88	220,50
LS	6	21	16,40	ND	ND	22	15,20	35,63	2,34	23	20,41	ND	ND	24	21,74	ND	ND
LS	7	25	20,19	ND	ND	26	11,24	ND	ND	27	13,04	ND	ND	28	25,93	ND	ND
LS	8	29	38,09	211,88	5,56	30	24,07	206,88	8,60	31	6,98	ND	ND	32	28,91	ND	ND
LS	9	33	46,34	ND	ND	34	29,33	ND	ND	35	20,85	ND	ND	36	10,89	ND	ND
LS	10	37	48,65	ND	ND	38	11,67	256,88	22,02	39	20,65	303,13	14,68	40	38,53	86,88	2,25
MO	1	41	45,00	23,13	0,51	42	18,88	ND	ND	43	52,21	ND	ND	44	27,40	28,13	1,03
MO	2	45	23,39	138,13	5,90	46	21,75	ND	ND	47	10,29	ND	ND	48	15,28	ND	ND
MO	3	49	49,43	170,63	3,45	50	33,41	ND	ND	51	39,02	30,63	0,78	52	29,83	ND	ND
MO	4	53	16,01	23,13	1,44	54	28,92	ND	ND	55	16,65	ND	ND	56	17,00	ND	ND
MO	5	57	46,90	171,88	3,66	58	36,36	45,63	1,25	59	50,30	126,88	2,52	60	36,53	ND	ND
MO	6	61	24,03	55,63	2,31	62	1,70	45,63	26,90	63	12,86	ND	ND	64	3,97	53,13	13,37
MO	7	65	73,55	30,63	0,42	66	47,15	ND	ND	67	9,94	ND	ND	68	32,43	ND	ND
MO	8	69	16,89	43,13	2,55	70	14,92	31,88	2,14	71	15,87	26,88	1,69	72	22,37	65,63	2,93
MO	9	73	23,96	24,38	1,02	74	26,73	ND	ND	75	32,69	ND	ND	76	23,16	ND	ND

Fonte	Animais	4 dias			7 dias			14 dias			21 dias						
		#	Agregam/ Proteína		#	Agregam/ Proteína		#	Agregam/ Proteína		#	Agregam/ Proteína					
			(µg)	total (ng)	ng/µg		(µg)	total (ng)	ng/µg		(µg)	total (ng)	ng/µg		(µg)	total (ng)	ng/µg
AD	1	77	17,92	109,38	6,10	78	31,19	209,38	6,71	79	14,33	ND	ND	80	37,36	ND	ND
AD	2	81	73,72	233,75	3,17	82	76,85	183,75	2,39	83	68,68	303,75	4,42	84	71,50	211,25	2,95
AD	3	85	58,37	56,25	0,96	86	37,15	131,25	3,53	87	40,48	1,25	0,03	88	62,38	71,25	1,14
AD	4	89	50,60	53,75	1,06	90	36,32	96,25	2,65	91	10,11	226,25	22,37	92	44,23	151,25	3,42
AD	5	93	37,97	223,75	5,89	94	35,03	158,75	4,53	95	19,23	16,25	0,85	96	49,67	ND	ND
AD	6	97	26,79	66,25	2,47	98	30,36	83,75	2,76	99	43,31	58,75	1,36	100	29,78	ND	ND
AD	7	101	8,47	116,25	13,72	102	12,43	26,25	2,11	103	32,73	56,25	1,72	104	15,62	28,75	1,84
AD	8	105	26,14	86,25	3,30	106	45,51	83,75	1,84	107	40,88	ND	ND	108	22,58	63,75	2,82
AD	9	109	21,18	8,75	0,41	110	25,73	48,75	1,90	111	17,09	13,75	0,80	112	20,90	111,25	5,32
AD	10	113	27,57	186,25	6,76	114	35,38	198,75	5,62	115	24,45	323,75	13,24	116	28,67	101,25	3,53
	Média		33,63	96,85	3,41		27,59	118,09	6,22		25,35	131,29	7,36		26,75	93,79	19,11
	EPM		3,24	15,13	0,62		2,70	18,69	1,73		2,82	33,15	2,86		3,02	17,23	15,51

Fonte de células-tronco mesenquimais - LS: Líquido sinovial; MO: Medula óssea; AD: Tecido adiposo.

Dados não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

#: Amostras.

ND: Não detectado.