

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**COLETA, PROCESSAMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
FENOTÍPICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E  
SUA VIABILIDADE DE APLICAÇÃO POR VIA INTRATECAL  
EM EQUINOS**

**LEANDRO MAIA**

Botucatu, São Paulo

Agosto, 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**COLETA, PROCESSAMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
FENOTÍPICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E  
SUA VIABILIDADE DE APLICAÇÃO POR VIA INTRATECAL  
EM EQUINOS**

**LEANDRO MAIA**

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (Unesp) para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof Dr. Rogério Martins Amorim  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Fernanda da Cruz Landim Alvarenga  
Prof<sup>a</sup> René Laufer-Amorim

Botucatu, São Paulo

Agosto, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSÂNGELA LOBO**

Maia, Leandro.

Coleta, processamento, caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais e sua viabilidade de aplicação por via intratecal em equinos / Leandro Maia. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: Rogério Martins Amorim

Co-Orientadores: Fernanda da Cruz Landim Alvarenga

Reneé Laufer-Amorim

Capes: 50501003

1. Equino – Doenças - Tratamento. 2. Células-tronco – Transplante. 3. Líquido cefalorraquidiano. 4. Tratamento veterinário. 5. Medula óssea. 6. Transplante de órgãos, tecidos, etc.

Palavras-chave: Cavalos; CTMs; Diferenciação; Implante; Líquor.

**Nome do Autor:** Leandro Maia

**Título:** COLETA, PROCESSAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E SUA VIABILIDADE DE APLICAÇÃO POR VIA INTRATECAL EM EQUINOS.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Ass. Rogério Martins Amorim  
Presidente e Orientador  
Depto. de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP- Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Adj. Ana Liz Garcia Alves  
Membro  
Depto. de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP- Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Adj. Maria Verônica de Souza  
Membro  
Depto. de Veterinária  
Universidade Federal de Viçosa- UFV – Viçosa

Prof<sup>a</sup>. Adj. Brunna Patrícia A. da Fonseca  
Membro  
Depto. de Veterinária  
Universidade Federal de Viçosa- UFV – Viçosa

Dr<sup>a</sup>. Márjorie de Assis Golim  
Membro  
Depto. Programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica  
Hemocentro (FM) – UNESP- Botucatu

Data da defesa: 13 de agosto de 2012.

## DEDICATÓRIA

*À Deus por guiar os meus passos e tornar possível mais este sonho.*

*Ao meu pai in memoriam e familiares.*

*À minha namorada.*

*Aos meus supervisores.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre comigo, me dando força, proteção e amparo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai (*in memoriam*) pela amizade, pelo aprendizado, pela educação, pelo amor e pela sabedoria que contribuíram de forma significativa para a minha formação pessoal e acadêmica.

À minha mãe pelo carinho, amor e apoio, sobretudo nesses últimos anos.

Às minhas queridas avós Ninita (*in memoriam*) e Glorinha pelo exemplo de vida, carinho e amor.

À Ge pelo carinho, amor, pela educação e pelo incentivo constante.

Aos meus queridos irmãos Léo e André pelo estímulo constante, pela amizade e pelo afeto. Também aos demais familiares, pelo incentivo e carinho.

À minha linda namorada Carol que fez tudo se tornar mais fácil em Botucatu. Obrigado pelo seu companheirismo, cuidado, amor, amizade, sermões e diversão. Te amo linda. Seguramente você foi o meu grande presente em Botucatu.

Ao meu orientador Rogério pelo exemplo de profissionalismo, amizade, ensinamento e confiança ao longo do programa de doutorado.

Às co-orientadoras Fernanda da Cruz Landim e Renné Laufer Amorim pela contribuição no desenvolvimento do trabalho e pelo conhecimento compartilhado. Especialmente agradeço à professora Fernanda pela amizade, carinho, aprendizado, força e credibilidade no meu trabalho.

Aos professores do departamento de Clínica Veterinária: Alexandre, Calderon, Simony, Michiko, Regina, Aguemi, Elizabeth, Raimundo e Noeme pela amizade e aprendizado.

Aos professores Maria Verônica (UFV), Ana Liz (FMVZ - Unesp Botucatu), Brunna (UFV), Dantas (UFV), Pacifico (UFV), Geraldo Eleno (UFMG), Márjorie (Hemocentro- Botucatu), Cláudia (FMVZ - USP), Elenice (Hemocentro - Botucatu), Sheila (FMVZ - Unesp Botucatu), Ligia (IB- Unesp Botucatu), Gisele (FO - Unesp Araçatuba), Papa (FMVZ - Unesp Botucatu), Sony (FMVZ - Unesp Botucatu), Nereu (FMVZ - Unesp Botucatu), Eunice (FMVZ - Unesp Botucatu), Denise (FMVZ - Unesp Botucatu), Marco (FMVZ - Unesp Botucatu), João (FMVZ - Unesp Botucatu) Meira (FMVZ - Unesp Botucatu), Carlos Hussni (FMVZ - Unesp Botucatu), Zitinho (FMVZ -

Unesp Botucatu), Celso (FMVZ - Unesp Botucatu), Stélio (FMVZ – Unesp Botucatu) Daniela (IB- Botucatu), Jurandi (FMVZ - Unesp Jaboticabal), Jean (Bioethicus) pela amizade, incentivo profissional e pela contribuição de alguma forma na minha carreira acadêmica ou realização deste trabalho. Adicionalmente, agradeço aos demais professores da FMVZ- Unesp Botucatu e UFV.

Aos funcionários, ou melhor, amigos Marquinho, César (Clínica), Zé, Edivaldo, Cris, Valter, Edilson, Dona Raquel (Mãezona) (Reprodução), Val (Patologia), Clô (Cirurgia), Zé (Patologia), Zé e Maria (Pós-Graduação). Adicionalmente à todos os funcionários que contribuíram para realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, pela sua excelente estrutura física e corpo docente que proporcionou um ótimo Curso de Doutorado.

A todos os amigos de Pós-Graduação, especialmente a Carlinha, a Destro, a Midyan, o Felipe, a Marta, a Amanda, a Isa, a Bianca, a Bruna, a Natália, a Loreta, o Armando, o Dietrich, o Leandro, o Guilherme, o Matheus, a Priscila, a Patrícia, a Daniele, a Marilda, a Giovana, a Tati, a Camila, a Rosiara, a Mayra, a Letícia, a Fernanda, a Andreza, a Sthephane, a Aline, ao Márcio e ao Ian. Desculpa se esqueci de alguém em especial.

Aos amigos do laboratório de Reprodução e Terapia Celular Avançada pela amizade e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de República Daniel, Jair e Gabriel pela amizade.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Proc.2009/51431-6), ao CNPQ (481350/2009-8) e ao Fundunesp (00571/09), pelo auxílio financeiro. Muito obrigado!

Finalmente, aos cavalos e minha cadelinha Hanna, peças fundamentais neste estudo e na minha vida.

*“Porque eu bem sei os pensamentos que  
tenho a vosso respeito, diz o Senhor;  
pensamentos de paz, e não de mal,  
para vos dar o fim que esperais.”*

*Jeremias 29:11*

*“Grandes coisas fez o Senhor por nós,  
e por isso estamos alegres.”*

*Salmo 126:3*



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - Mediana das variáveis hematológicas (hematócrito, proteína plasmática total, plaquetas, fibrinogênio, leucócitos totais, segmentados, linfócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos) obtidas antes e após os tratamentos nos equinos dos grupos tratados (GT) e controle (GC) ..... 59
- Tabela 2 - Mediana das variáveis líquóricas (densidade, pH, hemácias, células nucleadas, globulinas, proteínas, glicose, e pró-MMP2) obtidas antes e após os tratamentos nos equinos dos grupos tratados (GT) e controle (GC)..... 60

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Punção aspirativa da medula óssea. a) Bloqueio local com lidocaína a 2% com vasoconstrictor após sedação com xilazina a 10%. b) Punção aspirativa da medula óssea após fixação da agulha na esternébra. c) Amostra de medula óssea utilizada para isolamento e cultivo das CTMs. Fonte: arquivo pessoal..... 7
- Figura 2 - Células-tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea de equino. a) Nota-se a presença de CTMs com morfologia fibroblastóide, cultivadas em monocamada (setas). b) Nota-se a presença de CTMs com morfologia fibroblastóide e núcleo corado com hematoxilina (setas). Objetiva 10x (a) e 20x (b). Fonte: arquivo pessoal..... 10

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Análise imunofenotípica FACS das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea de equino para os marcadores CD90, CD44 e CD34. (A) Histograma do marcador CD90 expresso em média 95,39%. (B) Histograma do marcador CD44 expresso em média 69,43%. (C) Histograma do marcador CD34 (negativo)..... 35
- Figura 2 - Ensaio de diferenciação das células-tronco mesenquimais para as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. (A) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de cálcio marcada com Alizarin red (setas brancas) e a mudança de morfologia fibroblastóide para poligonal das células após a

diferenciação osteogênica (setas amarelas). (B) Diferenciação adipogênica. Note a presença de gotículas de gordura intracelular coradas com Oil red. (C, D, E, F) Diferenciação condrogênica. (C) Coloração com azul de toluidina. Nota-se a presença de áreas metacromáticas em rósea (seta preta) indicando a presença de matriz extracelular contendo proteoglicanos, além da presença de lacunas (seta branca) possivelmente contendo condrócitos. (D) Coloração com Alcian blue. Áreas coradas em azul demonstrando a deposição de proteoglicanos. (E) Imunocitoquímica para o colágeno do tipo II. Note marcação positiva para o colágeno do tipo II (marrom). (F) Controle negativo representado pela substituição do anticorpo primário pela imunoglobulina de coelho. Bar = 50  $\mu\text{m}$  ..... 36

Figura 3 - Caracterização imunocitoquímica das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea de equino para os marcadores CD44, vimentina, PCNA e CD13. Marcação positiva (marrom) para o CD44 (A), vimentina (B) e PCNA (C). Marcação negativa para o CD13 (D) e controle negativo representado pela substituição do anticorpo primário pela imunoglobulina de camundongo. Núcleo corado com hematoxilina. Bar = 50  $\mu\text{m}$ ..... 36

Figura 4 - Eletromicrografias da ultraestrutura das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea de equino. (A) A célula exibe um núcleo eucromático, pálido com localização excêntrica e nucléolo evidente. A membrana celular apresenta uma superfície irregular devido à presença de protruções citoplásticas. (B) O citoplasma exibe aparência granular devido à abundância de ribossomos livres e polirribossomo (setas). Nota-se a presença de retículo endoplasmático rugoso (rer) proeminente com cisternas dilatadas,

mitocôndrias (m) alongadas e grânulos de lipídeo (l) em metabolização. (C) Nota-se a presença de numerosas mitocôndrias (m) com aspecto arredondado distribuídas pelo citoplasma. (D) Observa-se a presença de feixes de microfilamentos (setas duplas) dispersos no citoplasma. Notar o aspecto extremamente dilatado do retículo endoplasmático rugoso (rer). núcleo: n; polirribossomo: r (detalhe). Aumentos de 9700x (A), 23000x (B) e 31500x (C, D)..... 37

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Linha do tempo. Previamente aos tratamentos (TRA) foi realizada a colheita da medula óssea, cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais (CTMs). No dia 1 (D1) foi realizada a colheita do sangue periférico (CS1), seguida da colheita do líquido (CL1) e finalmente o tratamento dos grupos estudados. No dia 6 (D6), pós-tratamento, foi realizada a colheita de novas amostras de sangue periférico (CS2) e líquido (CL2) dos animais estudados. Durante trinta dias todos os animais foram monitorados mediante exame físico e neurológico..... 61
- Figura 2 - Ensaio de diferenciação das células-tronco mesenquimais para as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. (A) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de cálcio marcada com Alizarin red. (B) Diferenciação adipogênica. Note a presença intracelular de gotículas de gordura coradas com Oil red. (C, D) Diferenciação condrogênica. (C) Coloração com azul de toluidina. Nota-se a presença de áreas metacromáticas em rósea (seta vermelha) indicando a presença de matriz extracelular contendo proteoglicanos. (D) Coloração com Alcian blue. Nota-se a presença de áreas em azul indicando a presença de matriz extracelular contendo proteoglicanos além

- da presença de lacunas (seta vermelha) possivelmente contendo condrócitos. Bar = 50µm..... 62
- Figura 3 - Zimograma representativo do LCR dos equinos dos grupos tratado e controle após os implantes. Note a presença apenas das bandas gelatinolítica para a pró-MMP2 (latente), não sendo observada a atividade da MMP2 na forma ativa e da MMP9. Bandas gelatinolíticas Grupo tratado: 10, 14, 16, 17, 19; Grupo controle: 11, 12, 13, 15, 18; PM: banda controle..... 63

## CAPÍTULO 4

- Figura 1 - Análise imunofenotípica FACS das células-tronco mesenquimais de equino para os marcadores CD34 e CD90. (A) Gráfico de distribuição e tamanho. (B) Controle. (C) Histograma do marcador CD90 expresso em média 97,94%. (D) Histograma do Marcador CD34 (negativo)..... 76
- Figura 2 - (A) CTMs indiferenciadas. Note a morfologia fibroblastóide característica das células. Obj.10x. (B,C) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de cálcio marcada com Alizarin red (seta azul). Obj.10x, 20x. (D) Note a mudança de morfologia fibroblastóide para poligonal das células após a diferenciação osteogênica (setas brancas). Obj.40x ..... 76
- Figura 3- Diferenciação neural das CTMs com forksolin e ácido retinóico (P1). (a) CTMs indiferenciadas demonstrando morfologia fibroblastóide. (b) Células após exposição ao meio de pré diferenciação demonstrando discreta mudança morfológica. (c,d) Células apresentando retração do corpo celular (setas vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) após 24 horas de exposição a P1. (e,f) Células apresentando retração do corpo celular (setas

vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) após 48 horas de exposição a P1. Obj.10x (c), 20x (a,b,d,e), 40x (f)..... 77

Figura 4 - (A, B) Diferenciação neural das CTMs com 2- $\beta$ mercaptoetanol (P2). Células apresentando intensa retração do corpo celular (setas vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) Obj.10x (A), 20x (B)..... 77

Figura 5 - Análise imunofenotípica FACS das células-tronco mesenquimais de equino transdiferenciadas (P1 e P2) e indiferenciadas (P3). (a, b, c) Histogramas das células tratadas com forskolin e ácido retinóico (P1); a- controle, b- GFAP, c-  $\beta$ 3 tubulina. d, e, f) Histogramas das células tratadas com 2- $\beta$ mercaptoetanol (P2); d- controle, e- GFAP, f-  $\beta$ 3 tubulina. g, h, i) Histogramas das CTMs indiferenciadas, não submetidas a nenhum tratamento (Controle); g- controle, h- GFAP, i-  $\beta$ 3 tubulina..... 78

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Células- Tronco.....	4
2.2 Biologia das células-tronco mesenquimais (CTMs).....	5
2.3 Principais fontes de obtenção das CTMs em equinos.....	6
2.3.1 Medula óssea.....	6
2.3.2 Tecido Adiposo (TA).....	8
2.4 Caracterização e diferenciação.....	9
2.4.1 Caracterização morfológica.....	10
2.4.2 Caracterização imunofenotípica de receptores de superfície celular ..	10
2.4.3 Diferenciação <i>in vitro</i> das CTMs.....	11
2.4.3.1 Diferenciação osteogênica.....	12
2.4.3.2 Diferenciação adipogênica.....	12
2.4.3.3 Diferenciação condrogênica.....	13
2.4.3.4 Diferenciação neural.....	14

2.5 Aplicação terapêutica das CTMs em equinos.....	14
2.5.1 Aplicação em enfermidades neurológicas.....	15
CAPÍTULO 2	
Artigo Científico nas normas e a ser submetido ao periódico “Biochemical and Biophysical Research Communications”: Caracterização imunofenotípica, imunocitoquímica, ultraestrutural e citogenética de células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino.....	17
CAPÍTULO 3	
Artigo Científico nas normas e a ser submetido ao periódico “Journal of Equine Veterinary Science”: Potencial de aplicação das células-tronco mesenquimais por via intratecal em equinos: avaliação clínica, laboratorial e expressão de metaloproteinases de matriz do tipo 2 e 9.....	39
CAPÍTULO 4	
Artigo Científico nas normas, submetido e publicado no periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira”: Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino.....	65
CAPÍTULO 5	
3 DISCUSSÃO GERAL.....	80
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	85
5 BIBLIOGRAFIA.....	86
Anexo.....	96



MAIA, L. **Coleta, processamento, caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais e sua viabilidade de aplicação por via intratecal em equinos.** Botucatu, 2012. 95p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O interesse terapêutico e biológico nas células-tronco tem aumentando nos últimos anos, fato este demonstrado pelo número crescente de pesquisas e publicações na área. Na espécie equina, as pesquisas envolvendo o uso da terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTMs) estão focadas, particularmente para o tratamento de lesões tendíneas e osteoarticulares, havendo poucos relatos da sua utilização em outros tecidos, tais como o sistema nervoso. Desta forma, as vias de aplicação mais utilizadas até então para uso clínico em equino são as intralesionais e intra-articulares, carecendo assim na medicina equina de estudos pré-clínicos que avaliem a segurança de administração das CTMs em outras vias, tais como a intratecal por via líquórica. Nesse sentido, o objetivo geral deste estudo foi a obtenção, o cultivo e a caracterização das CTMs provenientes da medula óssea (MO) de equinos, além da avaliação da viabilidade e da segurança de aplicação dessas células autólogas por via intratecal através do espaço atlanto-occipital. Também foi avaliado *in vitro* o potencial de transdiferenciação das CTMs-MO em fenótipos neurais, utilizando-se dois protocolos de diferenciação neural: P1 (forksolin e ácido retinóico) e P2 (2-β mercaptoetanol). Ao término do cultivo primário, a análise imunofenotípica revelou a presença de CTMs com elevada expressão do marcador CD90, seguida de menor expressão para o marcador CD44 e ausência de expressão do marcador CD34. Nos ensaios de diferenciação nas tri-linhagens mesodermiais ficou evidenciada a resposta positiva às diferenciações osteogênica (OST), condrogênica (CDG) e adipogênica (ADP) caracterizadas pela deposição de matriz extracelular rica em cálcio (OST), proteoglicanos e colágeno II (CDG) e deposição intracelular de gotículas de gordura (ADP). Na caracterização imunocitoquímica as CTMs foram imunoreativas para os marcadores CD44, vimentina, PCNA e negativas para o marcador CD13. Na análise ultraestrutural, a característica mais marcante foi a presença de um retículo endoplasmático rugoso com cisternas bastante dilatadas preenchidas com um material de baixa eletrondensidade. Adicionalmente, na análise citogenética as CTMs apresentaram cariotipagem normal (2n=64), não sendo observadas nas metáfases estudadas

perda ou ganho cromossomal. No implante intratatecal das CTMs previamente caracterizadas não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) nas variáveis hematológicas e líquóricas estudadas nos períodos pré e pós-implante entre os grupos tratado (GT) e controle (GC). Durante a avaliação neurológica realizada diariamente por trinta dias após os implantes, também não foram observadas alterações na integridade encefálica, dos nervos cranianos e coordenação motora dos animais do GC e CT. Adicionalmente, na análise das MMPs dos tipos 2 e 9 no LCR, somente foi observada a presença da pró-MMP-2 (latente) sem diferenças ( $P>0,05$ ) entre os grupos estudados. Com relação ao potencial de transdiferenciação neural *in vitro*, as CTMs apresentaram mudanças morfológicas em graus variados entre os protocolos testados (P1 e P2) caracterizadas principalmente por retração do corpo celular e presença projeções protoplasmáticas (filopodia). Na análise imunofenotípica foi observado uma maior ( $P<0,001$ ) expressão dos marcadores GFAP e  $\beta 3$  tubulina ao término do P2 quando comparado ao P1. De forma surpreendente e de acordo com outros achados na literatura em outras espécies, as CTMs que não foram submetidas a nenhum tratamento, ou seja, indiferenciadas também apresentaram expressão dos marcadores neurais estudados. Pode-se concluir baseado nos resultados observados: (1) que as CTMs foram adequadamente processadas e caracterizadas com as metodologias empregadas; (2) o implante intratrecal de CTMs-MO através do espaço atlanto-occipital demonstrou ser seguro sob o ponto de vista clínico e laboratorial, sendo uma alternativa viável para terapia celular das encefalopatias e mielopatias que acometem os equinos e; (3) a habilidade das CTMs em gerar tipos celulares relacionados à linhagem neural é complexa e multifatorial, dependendo não só dos agentes indutores, mas também do ambiente no qual estas células são cultivadas. Desta forma um maior número de estudos é necessário para o melhor entendimento do processo de transdiferenciação neural a partir de CTMs de equinos.

**Palavras-chave:** líquido, CTMs, implante, diferenciação, cavalo.

MAIA, L. **Collection, processing, phenotypic characterization of mesenchymal stem cells and their feasibility of application by intrathecally in horses.** Botucatu, 2012. 95p. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Biological and therapeutic interest in stem cells has increased in recent years, a fact demonstrated by the crescent number of research and publications in the area. In equine species, research involving the use of cell therapy with mesenchymal stem cells (MSCs) are focused, particularly for the treatment of tendineous and osteo-articular injuries, having scarces reports of its use in other tissues such as the nervous system. Thus, the pathways of administration most used so far for clinical use in equines are the intralesional and intra-articular, needing thereby in equine medicine of preclinical studies that asses the security of administration of MSCs in other pathways such as intrathecal by liquoric way. In this sense, the general aim of this study was the obtaining, cultivation and characterization of MSCs from bone marrow (BM) of equines, besides the evaluation of the feasibility and safety of application of these autologous cells by intrathecal pathway through atlanto-occipital space. It was also evaluated *in vitro* the potential of transdifferentiation of MSCs-MO in neural phenotypes, using two protocols of neural differentiation: P1 (forksolin and retinoic acid) and P2 (2-βmercaptoethanol). At the end of the primary culture immunophenotypic analysis revealed the presence of MSCs with high expression of marker CD90, followed by the lower expression for the marker CD44 and absence of expression of marker CD34. In tests of differentiation in the tri-lineage mesodermal became evidenced the positive response to osteogenic (OST), chondrogenic (CDG) and adipogenic (ADP) differentiation characterized by the deposition of extracellular matrix rich in calcium (OST), proteoglycans and collagen II (CDG) and deposition of intracellular lipid droplets (ADP). In immunocytochemical characterization MSCs were immunoreactivity for the markers CD44, vimentin, PCNA and negative for the marker CD13. In ultrastructural analysis the most outstanding features was the presence of a rough endoplasmic reticulum with dilated cisterns filled with material of low electrodensity. Additionally at cytogenetic analysis the MSCs showed normal karyotyping ( $2n = 64$ ), not being observed in the metaphases studied chromosomal loss or gain. At intrathecal implantation of MSCs previously characterized were not observed differences ( $P > 0.05$ ) in variables hematological and liquoric studied in the

period pre-and post-implant between the treated group (TG) and control (GC). During neurological evaluation performed daily for thirty days after the implants, it was not observed alterations the encephalic integrity, cranial nerves and motor coordination of animals of GC and CT. Additionally, at the analysis of MMP type 2 and 9 in the CSF, it was only observed the presence of pro-MMP-2 (latent) without differences ( $P > 0.05$ ) between the studied groups. With regard to the potential of *in vitro* neural transdifferentiation, MSCs showed morphological changes in varying degrees between the protocols tested (P1 and P2), mainly characterized by the retraction of the cellular body and presence of protoplasmic projections (filopodia). At immunophenotypic analysis it was observed a higher ( $P < 0.001$ ) expression of markers GFAP and  $\beta 3$  tubulin at the end of P2 when compared to P1. Surprisingly, in accordance with other findings in the literature in other species, MSCs that were not submitted to any treatment, it is, the undifferentiated also showed expression of neural markers studied. It can be concluded based on the results observed: (1) that the CTMs were properly processed and characterized with the methods employed; (2) intrathecal implantation of MSCs-MO through the space atlanto-occipital showed to be safe from the point of clinical and laboratory, being a viable alternative for therapy of encephalopathies and myelopathies that affect horses; (3) the ability of MSCs to generate cell types related to neural lineage is complex and multifactorial, depending not only of inducing agents, but also of the environment in which these cells are grown. Therefore a larger number of studies it is necessary for a better understanding of the process of neural transdifferentiation from horses MSCs.

**Key words:** liquor, MSCs, implant, differentiation, horse.

# **Capítulo 1**

## 1 Introdução

Estudos recentes tem demonstrado inúmeras propriedades biológicas das células-tronco mesenquimais (CTMs), bem como a sua possibilidade de aplicação em enfermidades complexas ou em lesões de difícil regeneração, como as que acometem o sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). Desta forma, a terapia celular aponta-se como uma alternativa promissora para o tratamento destas enfermidades, haja vista a grande capacidade de autorregeneração, a baixa imunogenicidade, os efeitos parácrinos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antiapoptóticos e neuroprotetores das CTMs.

A realização de estudos clínicos se faz necessária para transferência de resultados pré-clínicos a partir de experimentos com modelos animais para os seres humanos (WRIGHT et al., 2011). Os equinos, semelhantemente aos humanos, são muito afetados por enfermidades osteomusculares (ex: osteoartrites, tendinopatias), neurológicas (ex: neuropatias e mielopatias) e reprodutivas (ex: endometrites), sendo essa característica importante para utilização da espécie como modelo experimental para terapia celular com CTMs.

Na medicina equina, as CTMs provenientes da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo são consideradas os dois tipos mais comuns de células-tronco adultas utilizadas na abordagem terapêutica para regeneração de tecidos, sendo ambas facilmente obtidas para isolamento e expansão (VIDAL et al., 2008). Os estudos envolvendo terapia celular com CTMs em equinos estão focados, particularmente, para o tratamento de lesões tendíneas e osteoarticulares (CROVACE et al., 2007; PACINI et al., 2007; WILKE et al., 2007; NIXON et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; MCILWRAITH et al., 2011), havendo poucos relatos da sua utilização em outros tecidos, tais como o sistema nervoso (MAIA et al. 2009). Desta forma, as vias de aplicação mais utilizadas até então para uso clínico em equino são as intralesionais e intra-articulares, carecendo assim na medicina equina de estudos pré-clínicos que avaliem a segurança de administração das CTMs em outras vias, tais como a intratecal através do espaço subaracnóide. A comprovação da hipótese de que a via intratecal através do líquido é segura na espécie equina, não somente possibilitará a utilização da terapia celular nos processos neurodegenerativos e

inflamatórios, tal como a meningoencefalite protozoária equina, mas também fornecerá informações válidas para o uso das CTMs em várias enfermidades neurológicas que acometem as espécies domésticas.

Ressalta-se que também é essencial para o aprimoramento da terapia celular, que o processo de obtenção, manutenção, caracterização e diferenciação sejam dominados para o melhor aproveitamento terapêutico das CTMs. Embora, as CTMs já estejam disponíveis para uso na espécie equina e muitos estudos tenham demonstrado resultados satisfatórios, algumas questões práticas relacionadas aos protocolos de isolamento e caracterização celular, como a escolha dos melhores marcadores e técnicas ainda precisam ser melhor estudados.

Nesse contexto, o objetivo geral deste estudo foi a obtenção, o cultivo e a caracterização das CTMs-MO equina, além da avaliação da viabilidade e da segurança de aplicação dessas células autólogas por via intratecal através do espaço atlanto-occipital de equinos. Adicionalmente também foi avaliado *in vitro* o potencial das CTMs-MO em se transdiferenciarem em fenótipos neurais, utilizando-se dois protocolos de diferenciação neural.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Células-Tronco

As células-tronco (CT) podem ser definidas como células com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, além da capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas (PEREIRA, 2008).

De acordo com a origem tecidual, as CT podem ser classificadas em células-tronco embrionárias e adultas (CTAs). O primeiro tipo é derivado da massa celular interna do blastocisto, sendo totipotentes ou capazes de se transformar em qualquer tipo celular, e por sua vez em um organismo inteiro. O segundo tipo inclui as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e mesenquimais (CTMs), podendo ser isoladas de tecidos de origem mesodermal, tais como medula óssea, músculo, tendão, tecido adiposo (DAHLGREN, 2009a), sangue periférico (MARTINELLO et al., 2010), matriz do cordão umbilical (HOYNOWSKI et al., 2007) e líquido amniótico (LOVATI et al., 2011). As CTH são responsáveis pela produção da linhagem linfóide e mielóide e as CTMs são capazes de se diferenciar em tipos celulares de origem mesodermal, incluindo osso, músculo, cartilagem, tecido adiposo, ligamento e tendão (DAHLGREN, 2009a). Outros tipos de CTAs, além das mesenquimais incluem as epiteliais, as musculares e as neuronais, sendo que a plasticidade, ou seja, a capacidade de originar diferentes tipos de células maduras é muito elevada nas CTMs (NARDI, 2007).

As CT desempenham um papel fundamental na autorrenovação de tecidos adultos ao longo da vida. Alguns tecidos são caracterizados pela contínua perda de células, incluindo o sistema hematopoiético, intestino e a pele, sendo as CTAs responsáveis pela reposição celular e conseqüentemente homeostase tecidual (HUMPREYS e BONVENTRE, 2008). Segundo Nardi (2007), além da reposição de células que sofrem apoptose, as CTAs podem proporcionar a recuperação de lesões não fisiológicas decorrentes de acidentes ou agentes patogênicos.



## 2.2 Biologia das células-tronco mesenquimais (CTMs)

As CTMs são células adultas indiferenciadas que podem ser isoladas de diferentes tecidos, mas primariamente do estroma da medula óssea. A origem embrionária dessas células é mesodermal e elas surgem a partir de células mesenquimais que dão origem a tecidos conjuntivos, como ossos, cartilagens, gordura, bem como o sistema vascular e hematopoiético (HUMPREYS e BONVENTRE, 2008). Em condições especiais essas células possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos de origem ectodermal, mesodermal e endodermal, além de serem facilmente isoladas e expandidas *in vitro* (CHEN et al., 2008a). As CTMs possuem comportamento migratório, sendo esta característica a base para que as células-tronco possam atingir os sítios enfermos após a administração intravenosa, intralesional ou perilesional. As citocinas liberadas nos sítios de inflamação ou lesão promovem a sinalização química para orientar a migração das células implantadas (DAHLGREN, 2009a). Segundo Chen et al. (2008a), essas células migram seletivamente para áreas de lesão, inflamação e tumores, onde estão envolvidas na reparação tecidual e formação do estroma associado ao tumor. Esta característica as tornam candidatas atrativas para uso como veículo para terapia em sítios específicos.

As CTs são capazes de autorregular os fatores da cascata da inflamação, incluindo as citocinas pró-inflamatórias interleucinas-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$ . Estes efeitos anti-inflamatórios podem ter influências profundas no ambiente tecidual local e igualmente influenciar a habilidade de investigadores em utilizar células-tronco alogênicas sem induzir uma resposta imune do hospedeiro. Adicionalmente, essas células também secretam fatores de crescimento que promovem a efetiva revascularização tecidual, além de apresentarem efeito antiapoptótico, importante na restauração e manutenção da função tecidual (DAHLGREN, 2009a).

De acordo com Phinney e Prockop (2007), relatos tem revelado que as células-tronco progenitoras, particularmente as derivadas da medula óssea, promovem reparação tecidual mediante secreções de fatores que aumentam a regeneração das células lesadas, além de estimularem a proliferação e diferenciação de células-tronco endógenas em diversos tecidos e reduzirem as reações inflamatórias e imunes.

Chen et al. (2008b) demonstraram que as CTMs secretam diferentes citocinas e quimiocinas, tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-a), fator de crescimento ligado a insulina, (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), fator derivado de estroma-1, angiopoietina-1, proteína inflamatória alfa e beta-1 de macrófagos e eritropoietina em quantidades superiores aos fibroblastos da derme. Adicionalmente, foi evidenciado que a secreção desses fatores recruta macrófagos e células da linhagem endotelial, aumentando assim a cicatrização de feridas cutâneas.

### **2.3 Principais fontes de obtenção das CTMs em equinos**

Em equinos, as CTMs podem ser obtidas a partir da medula óssea (PACINI et al., 2007; VIDAL et al., 2008; COLLEONI et al., 2009; VIOLINI et al., 2009; KASASHIMA et al., 2011; MCILWRAITH et al., 2011), sangue do cordão umbilical (KOCH et al., 2007; REED e JONHSON, 2008), sangue periférico (KOERNER et al., 2006), tecido adiposo (VIDAL et al., 2008; COLLEONI et al., 2009; MAMBELLI et al., 2009), matriz do cordão umbilical (HOYNOWSKI et al., 2007) e líquido amniótico (LOVATI et al., 2011). Segundo Colleoni et al. (2009), as CTMs estão presentes em muitos tecidos, mas as células mais comumente utilizadas para uso clínico são as obtidas da medula óssea e tecido adiposo.

#### **2.3.1 Medula óssea**

A medula óssea (MO) é o maior órgão hematopoiético do corpo, sendo responsável pela produção de eritrócitos, plaquetas, granulócitos, monócitos e um pequeno número de linfócitos (LATIMER e ANDREASE, 2002). A concentração de CTMs na MO é considerada muito baixa (0,001 a 0,01%) (TAYLOR e CLEGG, 2011), podendo essa desvantagem ser contornada pela expansão *in vitro* por duas a quatro semanas (DAHLGREN, 2009a).

A técnica de colheita do sangue da MO é realizada tradicionalmente por punção do osso esterno (Figura 1), com o animal em estação utilizado-se a agulha de Jamshidi® ou de Komiyashiki® (MAIA et al., 2011), com prévia sedação e bloqueio anestésico local. Conforme Kasashima et al. (2011), o sítio anatômico mais seguro e factível para punção aspirativa da MO é na quinta esternébra, por sua localização cranial ao ápice do coração e adequada

espessura dorsoventral. Adicionalmente, de acordo com esses mesmos autores, a aspiração da MO também pode ser conduzida na quarta e na sexta esternébra, mas há o inconveniente da primeira estar localizada entre os membro torácicos e a última próximo ao coração.



FIGURA 1: Punção aspirativa da medula óssea. a) Bloqueio local com lidocaína a 2% com vasoconstrictor após sedação com xilazina a 10%. b) Punção aspirativa da medula óssea após fixação da agulha na esternébra. c) Amostra de medula óssea utilizada para isolamento e cultivo das CTMs. Fonte: arquivo pessoal.

De forma alternativa, outro sítio anatômico que pode ser utilizado para punção aspirativa da MO é a tuberosidade coxal (TC). A técnica de colheita consiste na contenção em brete, bloqueio anestésico local, seguido da introdução da agulha de punção de MO na angulação e sentido adequado

(MAIA et al., 2011). Segundo Kasashima et al. (2011), a agulha deve ser introduzida na proeminência óssea da TC no sentido dorsoventral e craniocaudal. Normalmente a penetração da agulha de 1 a 2 cm na TC é suficiente para colheita da MO no equino adulto, sendo necessária uma menor penetração em potros (LATIMER e ANDREASE, 2002).

Comumente, o aspirado de medula óssea é acondicionado em uma solução de gradiente de densidade e a fração de células mononucleares é separada por centrifugação previamente a sua aspiração e cultivo. As células mononucleares tem uma densidade de 1073 g/dL, portanto, são isoladas em gradiente Ficoll 1077 g/dL (TAYLOR e CLEGG, 2011). A solução de Ficoll é composta por uma mistura de polímeros de carboidratos e o composto iodado de metrazamida. Após centrifugação à baixa velocidade, as hemácias e os leucócitos granulócitos atravessam a fase orgânica (Ficoll-hipaque) e sedimentam. As células mononucleares (“anel celular”) localizam-se na interface entre as duas soluções, e as plaquetas e proteínas plasmáticas se localizam na fase aquosa (superior) (FONTES et al., 2006). Após a separação da fração mononuclear, as células são lavadas e cultivadas em meio de manutenção, acrescido de antibiótico e antimicótico em estufa a 5% CO<sub>2</sub> a 37° C.

A cultura da MO contém inicialmente uma mistura heterogênea de tipos celulares, que se torna mais homogênea após as três primeiras semanas de cultivo. Durante o início do cultivo, a proporção de células hematopoiéticas comprometidas com a diferenciação terminal é reduzida por apoptose espontânea, sendo removidas pela não aderência. Desta forma, a população de células mesenquimais torna-se mais homogênea (RADCLIFFE et al., 2010).

Uma das grandes vantagens dessa fonte é o seu elevado potencial osteogênico (TOUPADAKIS et al., 2010) e condrogênico (VIDAL et al., 2008), já comprovado experimentalmente.

### **2.3.2 Tecido adiposo (TA)**

O tecido adiposo (TA) é uma fonte promissora de CTAs com fenótipo similar ao das células isoladas do aspirado de medula óssea (DAHLGREN, 2009a).

A população de células isoladas do tecido adiposo é heterogênea e contém uma combinação fisiológica de fibroblastos, células e progenitores endoteliais, pericitos, macrófagos, pré-adipócitos, linfócitos B e T e células musculares lisas. O total da população de células-tronco é estimado em 1 a 3% do total de células nucleadas (DAHLGREN, 2009b).

A colheita do tecido adiposo é conduzida normalmente na região acima do músculo glúteo dorsal, na base da cauda, mediante a prévia sedação, tricotomia, antisepsia e bloqueio anestésico local em L invertido (VIDAL et al., 2008; CARVALHO et al., 2011). Após a colheita, o TA é acondicionado em frascos contendo solução fosfato tamponado (PBS) e encaminhado ao laboratório para digestão enzimática com colagenase, seguido do isolamento da fração vascular estromal (VIDAL et al., 2007; VIDAL et al., 2008; COLLEONI et al., 2009; MAMBELLI et al., 2009; CARVALHO et al., 2011) para cultivo ou direta aplicação terapêutica.

As vantagens do TA em comparação com a medula óssea como fonte de CTAs incluem: (I) mínima morbidade associada à colheita; (II) número de células-tronco clinicamente relevante, eliminando potencialmente a necessidade para propagação *in vitro*; (III) elevada proporção de células-tronco comparada com a medula óssea (2% vs 0,002%), e alta taxa de proliferação das células-tronco *in vitro* quando comparada com a medula óssea (DAHLGREN, 2009b). Por outro lado, uma das desvantagens do uso dessa fonte é estética (ferida cirúrgica), desencorajando algumas vezes os proprietários de animais de alto valor e rendimento a realizarem o procedimento.

#### **2.4 Caracterização e diferenciação**

Durante o cultivo, se faz necessária tanto a caracterização morfológica, imunofenotípica, quanto a diferenciação das CTMs em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) criou critérios mínimos para a caracterização das CTMs humanas (DOMINICI et al., 2006), sendo observada uma tendência para utilização de critérios semelhantes na medicina equina (HOYNOWSKI et al., 2007; ARNHOLD et al., 2007; GUEST et al., 2008; RADCLIFFE et al., 2010; LOVATI et al., 2011). Os critérios da SITC

incluem: (I) aderência ao plástico em cultura celular; (II) expressão dos receptores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 ( $\geq 95\%$  positivos) e ausência de expressão ( $\leq 2\%$  positivos) dos marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 $\alpha$  e HLA-DR, além da (III) demonstração *in vitro* para diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica (DOMINICI et al., 2006).

#### 2.4.1 Caracterização morfológica

Em cultivo, as CTMs equina caracterizam-se por apresentar crescimento em monocamada, morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico (Figura 2) (KOCH et al., 2007; LOVATI et al., 2011). É importante ressaltar que estes aspectos morfológicos são muito inespecíficos e também compartilhados por outros tipos celulares, como os fibroblastos, o que dificulta a utilização isoladamente desses parâmetros para caracterização das CTMs.

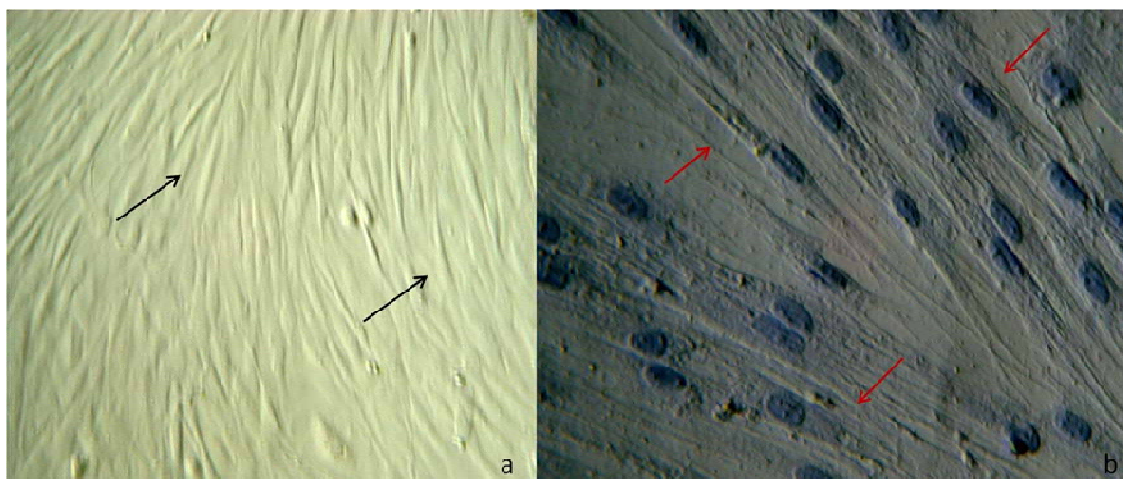


FIGURA 2: Células-tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea de equino. a) Nota-se a presença de CTMs com morfologia fibroblastóide, cultivadas em monocamada (setas). b) Nota-se a presença de CTMs com morfologia fibroblastóide e núcleo corado com hematoxilina (setas). Objetiva 10x (a) e 20x (b). Fonte: arquivo pessoal.

#### 2.4.2 Caracterização imunofenotípica de receptores de superfície celular

Marcadores de superfície celular são moléculas bioativas embebidas ou apostas a superfície externa de todas as células. Estas moléculas funcionam como receptores, possibilitando que as células se comuniquem umas com as

outras ou se liguem especificamente a determinadas estruturas biológicas ou celulares. Estas moléculas que refletem a função celular podem também ser utilizadas para efeito de marcação e identificação de tipos celulares particulares, incluindo as CT (COVAS, 2006a).

A designação “*Cluster of differentiation*” (CD) refere-se aos marcadores de superfície celular utilizados para caracterizar tipos celulares (TAYLOR e CLEGG, 2011). Até o momento nenhum marcador CD foi encontrado para identificar definitivamente as CTMs sendo necessária, na opinião de Taylor e Clegg (2011), uma combinação de marcadores para caracterização de uma população homogênea.

A capacidade para caracterizar as CTMs equinas é prejudicada pela limitada disponibilidade de anticorpos e variabilidade nas reações cruzadas (BORJESSON e PERONI, 2011). Em estudo, Ibrahim et al. (2007) demonstraram que de 379 anticorpos para marcadores de superfície celular (CD) humanos, apenas 14 (4%) apresentavam reação cruzada em leucócitos equinos. Carvalho et al. (2009) avaliaram a expressão dos marcadores CD44, CD90 e CD13 em CTMs provenientes do tecido adiposo de equinos. Os resultados revelaram expressão dos marcadores CD44 e CD90 na citometria de fluxo, em todas as passagens estudadas (1-4). Já o marcador CD13 não demonstrou reatividade.

Devido à dificuldade de reação cruzada, De Schauer et al. (2010) recentemente recomendaram um painel de marcadores de superfície celular para CTMs equina. As células devem expressar positivamente os marcadores CD29, CD44 e CD90 e serem negativas para os marcadores CD14, CD79 e MHCII.

#### **2.4.3 Diferenciação *in vitro* das CTMs**

A diferenciação é um processo que cursa com mudanças no tamanho, morfologia, potencial de membrana e atividade metabólica das células em resposta a modificações na expressão gênica (TAYLOR e CLEGG, 2011).

A característica fundamental das CTMs em cultivo é a sua capacidade de se diferenciar em osso, cartilagem e gordura (COVAS, 2006a).

### **2.4.3.1 Diferenciação osteogênica**

A diferenciação osteogênica das CTMs necessita da presença dos agentes indutores: betaglicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença dessas substâncias as CTMs adquirem morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular de cálcio rica em cálcio (COVAS, 2006b), que pode ser evidenciada pela coloração positiva com Alizarin red (TOUPADAKIS et al., 2010; KASASHIMA et al., 2011; MAIA et al., 2011; DE SCHAUWER et al., 2011) ou von Kossa (DE SCHAUWER et al., 2011; MÜLLER et al., 2011). Adicionalmente, outras técnicas para avaliar a diferenciação osteogênica, incluem a expressão dos genes Runx2 (Runt relacionado ao fator de transcrição 2), SPP1 (osteopontina), osteonectina e detecção das proteínas Runx2, colágeno do tipo I (COL1), osteocalcina,  $\beta$ 1 integrina e osteopontina (DE SCHAUWER et al., 2011).

Estudo conduzido por Toupadakis et al. (2010) comparou o potencial de diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea, tecido adiposo, matriz e sangue do cordão umbilical de equinos. Os resultados mediante a avaliação da expressão gênica, atividade de fosfatase alcalina e deposição da matriz extracelular de cálcio revelaram que as CTMs da MO diferenciam-se mais rapidamente e eficientemente para linhagem osteogênica do que as outras fontes estudadas. Esse excelente potencial osteogênico das CTMs provenientes da MO foi reafirmado recentemente por Maia et al. (2011), mediante a mudança da morfologia fibroblastóide das células para poligonal, além da precoce e abundante deposição de matriz de cálcio ao décimo dia de diferenciação.

### **2.4.3.2 Diferenciação adipogênica**

A diferenciação adipogênica das CTMs ocorre quando a monocamada celular é cultivada na presença de isobutilxantina. Nestas condições ocorre ativação do gene PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator activated receptor gama*) e a síntese de ácidos graxos. Desta forma, as células cultivadas rapidamente acumulam gotículas de lipídeos no citoplasma (COVAS, 2006b), que pode ser demonstrado pela coloração positiva ao Oil Red (MARTINELLO et al., 2010; RADCLIFFE et al., 2010; DE SCHAUWER et al., 2011; LOVATI et al., 2011).



Outros componentes importantes no meio de diferenciação adipogênica, além da isobutilmetilxantina, incluem a dexametasona, a indometacina, a insulina (MARTINELLO et al., 2010; LOVATI et al., 2011) e o soro de coelho (RADCLIFFE et al., 2010). De acordo com Stewart e Stewart (2011), a isobutilmetilxantina sensibiliza as células a insulina, que por sua vez estimula a síntese lipídica e o acúmulo no interior de vacúolos intracelulares.

A adipogênese também pode ser avaliada pela expressão do gene PPAR $\alpha$  e identificação das proteínas adiponectina e  $\beta$ 1 integrina (DE SCHAUWER et al., 2011).

#### **2.4.3.3 Diferenciação condrogênica**

A diferenciação condrogênica é conduzida em ambiente tridimensional com meio indutor enriquecido com fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (28, 42) e/ou proteína morfogênica óssea (BMPs) (VIDAL et al., 2008; KASASHIMA et al., 2011; STEWART e STEWART, 2011). De forma factível, esse procedimento pode ser realizado em tubos do tipo falcon de 15 mL com trocas de meio a cada três ou quatro dias. Estima-se que o tempo necessário para diferenciação seja de aproximadamente 14 a 25 dias (FONTES et al., 2006).

A resposta positiva à diferenciação pode ser avaliada histologicamente utilizando as colorações de azul de toluidina, alcian blue, safranina O e tricrômico de Mason ou também pela expressão dos genes Sox-9, colágeno do tipo II (COLII), relação do COLII/COL1 e de agrecan/versican, além da identificação das proteínas colágeno do tipo II e  $\beta$ 1 integrina (DE SCHAUWER et al., 2011).

Vidal et al. (2008) compararam o potencial condrogênico das CTMs provenientes da MO e tecido adiposo de equinos expostas ao meio de diferenciação condrogênico suplementado ou não com BMP-6 e TGF $\beta$ 3. Os resultados desse estudo revelaram que as CTMs provenientes da MO apresentam potencial condrogênico superior as do tecido adiposo na presença dos fatores de crescimento estimulatórios.

#### **2.4.3.4 Diferenciação neural**

Os primeiros estudos demonstrando o potencial de diferenciação das CTMs em fenótipos neurais foram conduzidos por Woodbury et al. (2000) e Sanchez-Ramoz et al. (2000), utilizando células provenientes da medula óssea de humanos e roedores. Woodbury et al. (2000) utilizaram protocolos baseados em agentes químicos antioxidantes ( $\beta$ -mercaptoetanol, butilato de hidroxianisole, dimetilsulfóxido), enquanto Sanchez-Ramoz et al. (2000) testaram protocolos com ácido retinóico e fatores neurotróficos em células previamente tratadas com EGF. Atualmente, além da utilização dos agentes químicos, os protocolos baseiam-se na utilização de fatores de crescimento (NAGHDI et al., 2009, BAE et al. 2011, NOURBAKHSI et al. 2011), fatores neurotróficos (BARZILAI et al. 2008,), líquido cefalorraquidiano autólogo (YE et al. 2011) e fitoterapia (HU et al. 2011). Particularmente em equinos, os ensaios de diferenciação estão focados na mudança das CTMs em linhagens de origem mesodermal, sendo escassa a avaliação do potencial de transdiferenciação em fenótipos neurais.

#### **2.5 Aplicação terapêutica das CTMs em equinos**

As CTMs provenientes da medula óssea e do tecido adiposo são os dois tipos mais comuns de células-tronco utilizadas na abordagem terapêutica para regeneração de tecidos em equinos, sendo ambos facilmente obtidos para isolamento e expansão (VIDAL et al., 2008).

Na medicina equina, os estudos com terapia celular utilizando CTMs estão focados principalmente para o tratamento de lesões tendíneas e osteoarticulares (BARREIRA, 2005; CROVACE et al., 2007; PACINI et al., 2007; WILKE et al., 2007; NIXON et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; MCILWRAITH et al., 2011), sendo sua utilização escassa em tecidos extra mesenquimais, tais como o sistema nervoso. Segundo Dalgren (2009a), os implantes intra-articulares e intralesionais em tendões e ligamentos são as principais aplicações clínicas das CTMs em equinos.

Para uso terapêutico, as células provenientes da medula óssea e do tecido adiposo podem ser utilizadas nas formas cultivadas ou não cultivadas (fração mononuclear e fração vascular estromal), com vantagens e limitações de acordo com cada fonte.

### **2.5.1 Aplicação em enfermidades neurológicas**

As lesões no sistema nervoso central (SNC) tais como as contusões encefálicas e lesões medulares, resultam em déficits funcionais decorrentes da morte das células neuronais e perdas das conexões axonais. A capacidade dos neurônios do SNC adulto se regenerarem é baixa quando comparado com os neurônios durante os primeiros estágios de desenvolvimento. O crescimento dos axônios durante o desenvolvimento é sustentado principalmente por mudanças no citoesqueleto, expressão gênica e síntese protéica, além de mudanças na resposta à estímulos extracelulares. Desta forma, a regulação desses fenômenos nos neurônios do SNC adulto pode ser uma poderosa estratégia para o re-estabelecimento de redes neuronais após lesões (MURAMATSU et al., 2009). Nesse contexto, a terapia celular e gênica envolvendo as células-tronco apontam-se como alternativas promissoras para a restauração funcional do sistema nervoso, haja vista a habilidade de suprimir o sistema imune, secretar fatores de crescimento e neurotróficos, reduzir a apoptose, regular a inflamação e servir de veículo para moléculas terapêuticas, como os peptídeos que inibem os fatores inibitórios derivados da mielina que impendem a regeneração axonal (Revisado por AZARI et al. 2009; JOYCE et al., 2010).

Na medicina equina, o uso terapêutico das CTMs para restauração neural ainda é considerado escasso. Todavia, Maia et al. (2009) demonstraram o potencial de aplicação das CTMs para restauração funcional da paralisia de nervo facial primária em equino. Os autores trataram por via perineural um equino de cinco anos que não respondia de forma satisfatória ao tratamento farmacológico, fisioterápico e acupuntura. Noventa dias após o tratamento foi observado ao exame neurológico melhora completa da ptose de lábio inferior, melhora na condição corporal e retorno à atividade atlética. Nesse caso, o resultado da recuperação clínica foi atribuído à melhora do microambiente neural em detrimento do efeito parácrino e imunomodulador das CTMs. Ressalta-se que, embora animadores os resultados, os estudos controlados são necessários para melhor compreensão dos possíveis mecanismos neuroprotetores e neuronoregenerativos das CTMs nas enfermidades neurológicas dos equinos.

## **Capítulo 2**

**Artigo Científico nas normas e a ser submetido ao periódico “Biochemical and Biophysical Research Communications”**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA, IMUNOCITOQUÍMICA,  
ULTRAESTRUTURAL E CITOGENÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE EQUINO**

Leandro Maia<sup>1\*</sup>, Fernanda C. Landim-Alvarenga<sup>2</sup>, Ligia S. L. Silveira da Mota<sup>3</sup>, Marjorie de Assis Golim<sup>4</sup>, Reneé Laufer Amorim<sup>1</sup>, Bruna De Vita<sup>2</sup>, Daniele Jaqueta Barberini<sup>1</sup>, Amanda Jeronimo Listoni<sup>2</sup>, Carolina Nogueira de Moraes<sup>2</sup>, Marta Thomas Heckler<sup>1</sup>, Rogério Martins Amorim<sup>1</sup>.

**RESUMO**

A proposta do presente estudo foi isolar, cultivar e caracterizar as células-tronco mesenquimais (CTMs) provenientes da medula óssea (MO) de equinos utilizando as técnicas de citometria de fluxo, imunocitoquímica, citogenética e microscopia eletrônica. A análise imunofenotípica revelou a presença de CTMs com elevada expressão do marcador CD90, seguida de menor expressão para o marcador CD44 e ausência de expressão do marcador CD34. Nos ensaios de diferenciação ficou evidenciada a resposta positiva às diferenciações osteogênica (OST), condrogênica (CDG) e adipogênica (ADP), caracterizadas pela deposição de matriz extracelular rica em cálcio (OST), proteoglicanos e colágeno II (CDG) e deposição intracelular de gotículas de gordura (ADP). Na caracterização imunocitoquímica as CTMs foram

---

<sup>1</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. Bolsista FAPESP. \*Autor para correspondência: [leandromvet@hotmail.com](mailto:leandromvet@hotmail.com)

<sup>2</sup> Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-Unesp, Botucatu, SP. Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Genética. Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, SP. Brazil.

<sup>4</sup> Hemocentro da Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu, SP, Brasil

imunopositivas para os marcadores CD44, vimentina, PCNA e negativas para o marcador CD13. Na análise ultraestrutural das CTMs a característica mais marcante foi a presença de um retículo endoplasmático rugoso com cisternas bastante dilatadas preenchidas com um material de baixa eletrondensidade. Adicionalmente, na análise citogenética as CTMs apresentaram cariotipagem normal ( $2n=64$ ), não sendo observadas nas metáfases estudadas aneuploidia. O protocolo de isolamento, cultivo e caracterização das CTMs equinas utilizado neste experimento demonstrou adequado para a produção de uma população celular com bom potencial de diferenciação e ausência de aneuploidia, a qual poderá ser utilizada para o estudo de futuras terapias celulares.

Palavras chaves: CTMs, diferenciação, marcadores de superfície, cavalo.

## **1. Introdução**

As células-tronco mesenquimais (CTMs) tem despertado grande interesse na medicina equina, fomentando diversas pesquisas que visam o uso terapêutico deste tipo celular. Entretanto, dados claros e inequívocos em relação às formas de obtenção, processamento e caracterização ainda precisam ser obtidos para melhor aproveitamento terapêutico.

As CTMs são células indiferenciadas que podem ser isoladas de diferentes tecidos, mas primariamente do estroma da medula óssea. A origem embrionária dessas células é mesodermal e, elas surgem a partir de células mesenquimais que dão origem a tecidos conjuntivos, como ossos, cartilagens, gordura, bem como o sistema vascular e hematopoiético [1]. Em condições especiais as CTMs possuem a capacidade de se diferenciarem em tecidos de origem ectodermal, mesodermal e endodermal, além de serem facilmente isoladas e expandidas *in vitro* [2].

Na espécie equina, as CTMs podem ser obtidas a partir da medula óssea [3 - 8], sangue do cordão umbilical [9, 10], sangue periférico [11], tecido adiposo [8, 5, 12], matriz do cordão umbilical [13], líquido amniótico [14], membrana amniótica [15], gengiva e ligamento periodontal [16]. Segundo Colleoni et al. [5], embora estejam presentes em muitos tecidos, as CTMs mais comumente utilizadas para uso clínico são as obtidas da medula óssea e tecido adiposo.

Em cultivo, as CTMs equinas caracterizam-se por apresentar crescimento em monocamada, morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico [9, 14, 17]. Estes aspectos morfológicos, embora importantes, são muito inespecíficos e também compartilhados por outros tipos celulares, como os fibroblastos, o que dificulta a utilização isoladamente desses parâmetros para caracterização das CTMs. Desta forma, a avaliação de expressão de marcadores de superfície celular (*cluster of differentiation* – CD) e os ensaios de diferenciação são fundamentais para adequada caracterização das CTMs.

Até o momento nenhum marcador CD foi encontrado para identificar definitivamente as CTMs, sendo necessária uma combinação de marcadores para caracterização de uma população homogênea [18]. Segundo Borjesson & Peroni [19], a capacidade para caracterizar as CTMs equinas é prejudicada pela limitada disponibilidade comercial de anticorpos e variabilidade nas reações cruzadas [19]. Ibrahim et al. [20] demonstraram que de 379 anticorpos para CD humanos, apenas 14 (4%) apresentavam reação cruzada com leucócitos equinos. No entanto, em detrimento da dificuldade de caracterização, De Schauer et al. [21], sugeriram um painel de marcadores de superfície celular para CTMs equina, no qual as células devem expressar positivamente os marcadores CD29, CD44 e CD90 e serem negativas para os marcadores CD14, CD79 e MHCII.

A proposta do presente estudo foi isolar, cultivar e caracterizar as CTMs provenientes da MO de equinos utilizando as técnicas de citometria de fluxo, imunocitoquímica, citogenética e microscopia eletrônica. Os resultados desse estudo podem contribuir e auxiliar na caracterização das CTMs equinas, além de maximizar seu uso terapêutico.

## **2. Material e Métodos**

### **Animais**

Foram utilizados sete equinos mestiços, hígidos, de ambos os sexos (4 machos e 3 fêmeas) e com idade entre 4 e 12 anos. Os animais foram selecionados mediante a avaliação clínica e hematológica prévia. O protocolo experimental (nº 76/2009- CEUA) foi aprovado pelo comitê de ética e bem estar animal da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, campus Botucatu. Todos os procedimentos foram realizados sob as diretrizes internacionais para o cuidado e uso de animais experimentais.

### **Colheita da MO**

A punção aspirativa da MO foi realizada no osso esterno conforme a metodologia descrita por Barreira et al. [22], com modificações que incluíram a não utilização do exame ultrassonográfico para identificação da esternébra a ser puncionada, a realização da punção na quinta esternébra, a utilização da agulha modelo Komiyashiki<sup>®</sup>, além da associação de 2 mL de heparina (Hemofol<sup>®</sup>, Cristália, BRA) com 2 mL de solução Salina-Fosfato pH 7,2 (PBS<sup>®</sup> 1x, LGC Biotecnologia, BRA) para acondicionamento da MO aspirada.



### **Isolamento e cultivo das CTMs**

A fração mononuclear das amostras da MO foi isolada em gradiente Ficoll- paque após a centrifugação a 350 g por 30 minutos. Após a centrifugação, a fração de células mononucleares foi lavada duas vezes em meio DMEM baixa glicose e, em seguida cultivada em meio DMEM baixa glicose/F12 (1:1), 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (1%) e anfotericina B (1,2%) (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>. O meio de manutenção foi trocado a cada 2 ou 3 dias até a confluência celular mínima de 80%, procedendo-se então a tripsinização para caracterização e diferenciação dos subcultivos das CTMs.

### **Análise na citometria de fluxo para os marcadores de superfície celular**

A análise imunofenotípica das CTMs foi realizada ao final do cultivo primário no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson<sup>®</sup> and Company, USA), utilizando os anticorpos monoclonais mouse anti-rat CD90 (Caltag<sup>®</sup> Laboratories, USA), mouse anti-human CD34 (Becton Dickinson<sup>®</sup> and Company, USA) marcados com a sonda isoticiato de fluoresceína (FITC) e mouse anti-horse CD44 (abD Serotec<sup>®</sup>, USA) que foi marcado com o anticorpo secundário goat anti-mouse FITC (Molecular Probes<sup>®</sup>, USA). Durante a análise foram contabilizados 10.000 eventos.

### **Imunocitoquímica para os marcadores CD44, CD13, PCNA, Vimentina**

Os subcultivos em placas de 24 wells (Sarstedt<sup>®</sup>, USA) foram inicialmente fixados e permeabilizados com Cytotfix/Cytoperm<sup>™</sup> (Becton Dickinson<sup>®</sup> and Company, USA), sendo em seguida conduzido o bloqueio da enzima peroxidase endógena. Após o bloqueio, as células foram incubadas por uma hora em solução de leite em pó a 3% para o bloqueio de proteínas inespecíficas. Em seguida, os anticorpos primários mouse anti-

horse CD44, CD13 (abD Serotec<sup>®</sup>, USA), mouse anti-human vimentin, PCNA (Dako Cytomation<sup>®</sup>, DNK) e o controle negativo IgG anti mouse (Dako Cytomation<sup>®</sup>, DNK) foram incubados por 18 horas a 4°C. Os anticorpos primários foram detectados por incubação no sistema de reagentes Advance (Dako Cytomation<sup>®</sup>, DNK). A revelação da reação foi conduzida utilizando a solução de substrato cromogênico DAB (Dako Cytomation<sup>®</sup>, DNK) por 5 minutos, seguida de contracoloração com Hematoxilina de Harris (Merck, BRA) por vinte segundos. A avaliação da reação foi realizada em microscópio de luz invertido (Leica<sup>®</sup> Microsystems, GER).

### **Ensaio para diferenciação na tri-linhagem**

Após confluência celular em cultivo primário, as CTMs foram tripsinizadas e acondicionadas em placas de seis Wells (Sarstedt<sup>®</sup>, USA). Quarenta e oito horas depois, o meio de manutenção foi removido e o meio de diferenciação osteogênico e adipogênico STEMPRO<sup>®</sup> (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) foram acrescentados ao subcultivos em triplicatas, de acordo com a recomendação do fabricante. Ao meio adipogênico foi realizada a suplementação com 5% de soro de coelho, protocolo este que resultou em melhor diferenciação em estudos pilotos realizados previamente em nosso laboratório. Os meios foram trocados a cada 2 a 3 dias e a confirmação da diferenciação osteogênica e adipogênica foi realizada, respectivamente, através da demonstração da deposição matriz de cálcio utilizando o método de coloração histológico Alizarin red a 2%, pH 4,2 e da presença intracitoplasmática de gotículas de gordura utilizando o corante Oil red a 0,5% (Sigma-Aldrich Corp, USA).

Para a diferenciação condrogênica, as CTMs foram cultivadas em um *pellet*-3D em um tubo do tipo Falcon (15 mL) por 21 dias, sendo o meio de diferenciação condrogênico STEMPRO<sup>®</sup> trocado a cada três dias. Para confirmar a diferenciação

condrogênica, os *pellets* foram corados com Alcian Blue pH 2,5 e Azul de Toluidina pH 1 para identificação de proteoglicanos, além da imunomarcação para o colágeno do tipo II utilizando o anticorpo rabbit anti-human colágeno II (Rockland<sup>®</sup>, USA).

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

As células ao final do cultivo primário foram fixadas em Karnovisk modificado (pH = 7,4) a 4°C por no mínimo 24 horas. Após a lavagem, no mesmo tampão, o *pellet* foi submetido a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% (Koch Instrumentos Científicos Ltda, BRA). Posteriormente, iniciou-se a desidratação em séries crescentes de acetona (Merck, BRA) (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 5 minutos cada, repetindo-se a lavagem na concentração 100% por três vezes. A polimerização foi feita com Araldite 502 (Koch Instrumentos Científicos Ltda, BRA) durante 72 horas a temperatura de 60°C. Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante e colhidos em grades de cobre, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Koch Instrumentos Científicos Ltda, BRA) e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão modelo Philips CM 100.

### **Análise citogenética**

De forma complementar, algumas amostras de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> passagem foram submetidas à análise do cariótipo usando a técnica de sincronização do ciclo celular pelo método do metotrexato (MTX) / timidina (Tdi). Para preparação das lâminas, as células foram tripsinizadas a 37.0°C, fixadas, coradas com Giemsa a 5% e posteriormente analisadas em microscopia de luz. Em cada amostra 12 metáfases foram analisadas.

### **Análise dos dados**

Os dados referentes à análise imunofenotípica foram expressos de forma descritiva através de média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão.

### **3. RESULTADOS**

As células provenientes da fração mononuclear da MO apresentaram aderência ao plástico entre 24 e 48 horas e começaram a adquirir morfologia fibroblastóide com quatro dias de cultivo. No período compreendido entre 15 a 22 dias (Mediana= 22) de cultivo foi alcançada a confluência celular  $\geq 80\%$ , sendo a partir deste momento conduzida a análise imunofenotípica para os marcadores CD90, CD44 e CD34, além da caracterização imunocitoquímica, ensaio de diferenciação na tri-linhagem, análise citogenética e ultraestrutural.

A análise imunofenotípica revelou a presença de células com elevada expressão do marcador CD90 ( $\bar{x} = 95,39 \pm 5,89\%$ ), seguida de menor expressão para o marcador CD44 ( $\bar{x} = 69,43 \pm 22,51\%$ ) e ausência de expressão do marcador CD34, conforme demonstrado na Figura 1.

O potencial de diferenciação *in vitro* das CTMs foi demonstrado pela resposta positiva à diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica ao décimo, oitavo e vigésimo primeiro dia de exposição aos meios de diferenciação, respectivamente.

As CTMs inicialmente com morfologia fibroblastóide adquiriram morfologia predominantemente poligonal após a exposição ao meio de diferenciação osteogênica e depositaram grande quantidade de matriz extracelular rica em cálcio comprovada pela coloração positiva com Alizarim red (Figura 2A).

A diferenciação adipogênica foi confirmada pela presença de gotículas de gordura no citoplasma evidenciadas pela coloração positiva com Oil red, conforme demonstrado

na Figura 2B. Já a diferenciação condrogênica foi confirmada pela deposição de matriz hialina rica em proteoglicanos e colágeno do tipo II (Figura 2C, D e E). Na coloração pelo azul de toluidina nota-se a presença de áreas metacromáticas em rósea indicando a presença de matriz extracelular contendo proteoglicanos, além da presença de lacunas possivelmente contendo condrócitos (Figura 2C). Na coloração pelo Alcian blue e na imunocitoquímica para o colágeno tipo II observa-se matriz extracelular corada, respectivamente em azul (Figura 2D) e marrom (Figura 2E).

Os resultados da análise imunocitoquímica revelaram imunomarcção positiva para os marcadores CD44, vimentina e PCNA (Figura 3A, B e C) bem como ausência de marcação para o CD13 (Figura 3D).

A análise ultraestrutural revelou que as CTMs se apresentaram cobertas por inúmeras protruções e microvilosidades (Figura 4A). O núcleo apresentou formato irregular e posição excêntrica, com somente um nucléolo, contendo uma grande quantidade de eucromatina e pouca heterocromatina (Figura 4A). No citoplasma foi observada a presença de mitocôndrias com morfologia predominantemente arredondas, além do aspecto granular indicando a presença de inúmeros ribossomos e polirribossomos (Figura 4B, C e D). Além disso, foram observados alguns grânulos de lipídeo (Figura 4C), inclusive em estado de metabolização (4B). A característica mais marcante foi a presença de um retículo endoplasmático rugoso com cisternas bastante dilatadas preenchidas com um material de baixa eletrondensidade (Figura 4B e D).

A análise citogenética baseada em 100% das metáfases estudadas revelou cariotipagem normal para espécie equina ( $2n=64$ ), não sendo constatada perda ou ganho de cromossomos (aneuploidia) ao longo do cultivo das CTMs.

#### 4. DISCUSSÃO

É essencial para o aprimoramento da terapia celular, que os processos de obtenção, manutenção, caracterização e diferenciação das CTMs sejam dominados a fim de aprimorar a aplicação terapêutica destas células na medicina equina. Embora, as CTMs já estejam disponíveis para uso na espécie equina e muitos estudos tenham demonstrado resultados satisfatórios [3, 23-27], algumas questões práticas relacionadas aos protocolos de isolamento e caracterização celular, como a escolha dos melhores marcadores e técnicas ainda precisam ser melhor exploradas.

No presente trabalho, as CTMs isoladas da MO de equinos adultos foram caracterizadas de acordo com critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para CTMs humanas [28], ou seja, apresentaram características de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, elevada expressão do marcador CD90 (>95% positividade), negatividade de expressão ao marcador de células hematopoiéticas CD34 e responderam positivamente a diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Algumas destas características também foram evidenciadas em outros estudos durante a caracterização de CTMs equinas provenientes do tecido adiposo [25, 29], medula óssea [30-32], sangue periférico [33], matriz do cordão umbilical [13], líquido amniótico, membrana amniótica [15], gengiva e ligamento periodontal [16].

A origem mesenquimal das células em cultivo pode também ser confirmada pela técnica de imunocitoquímica realizada diretamente na placa de cultivo, a qual permitiu a manutenção da morfologia fibroblastóide das CTMs. A marcação positiva para vimentina e CD44, confirmou a origem mesenquimal, complementando os resultados encontrados na citometria de fluxo. Adicionalmente, as CTMs também foram positivas para o marcador PCNA, demonstrando assim atividade proliferativa. Por outro lado, o marcador CD13 não foi expresso, conforme já relatado por Carvalho et al. [29] e

Radcliffe et al. [32] para CTMs provenientes, respectivamente, do tecido adiposo e medula óssea. É importante ressaltar que a marcação positiva para vimentina e PCNA revelou reação cruzada desses anticorpos humanos para espécie equina.

Durante a diferenciação osteogênica, as CTMs expostas aos agentes indutores adquirem morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular rica em cálcio [34], conforme demonstrado em nosso estudo pela coloração positiva ao Alizarin red. Toupadakis et al. [35] compararam o potencial de diferenciação osteogênico das CTMs provenientes da medula óssea, tecido adiposo, matriz e sangue do cordão umbilical de equinos. Os resultados mediante a avaliação da expressão gênica, atividade de fosfatase alcalina e deposição da matriz extracelular de cálcio revelaram que as CTMs da MO diferenciam-se mais rapidamente e eficientemente para linhagem osteogênica do que as demais fontes estudadas. Esse excelente potencial osteogênico das CTMs provenientes da MO foi também observado em nosso estudo, mediante a mudança da morfologia fibroblastóide das células para poligonal, além da precoce e abundante deposição matriz de cálcio já ao décimo dia de tratamento.

A diferenciação adipogênica ocorre quando a monocamada celular é cultivada na presença do agente indutor isobutilxantina. Nestas condições ocorre ativação do gene PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor gama) e a síntese de ácidos graxos. Desta forma, as células cultivadas rapidamente passam a acumular gotículas de lipídeos no citoplasma [34]. Este depósito também foi evidenciado em nosso estudo pela coloração positiva ao Oil Red ao oitavo dia de tratamento com o meio de diferenciação. Outros componentes importantes no meio de diferenciação adipogênico, além da isobutilmetilxantina, incluem a dexametasona, a indometacina, a insulina [14, 33] e o soro de coelho [32]. De acordo com Stewart & Stewart [36], a isobutilmetilxantina

sensibiliza as células a insulina, que por sua vez estimula a síntese lipídeos e o seu acúmulo no citoplasma.

A diferenciação condrogênica foi conduzida em ambiente tridimensional através do cultivo dos *pellets* em tubos do tipo Falcon, conforme já relatado por Reed & Johnson et al. [10], Kasashima et al., [7], Muller et al. [37], Ranera et al. [38]. O procedimento demonstrou-se factível e as técnicas histológicas azul de toluidina, alcian blue e a imunocitoquímica para colágeno tipo II foram adequadas para avaliar a deposição de matriz extracelular rica em proteoglicanos e colágeno.

A análise ultraestrutural é uma ferramenta importante para estudos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das CTMs. Os achados evidenciados em nosso estudo corroboram com os de Pascucci et al. [39] e Zeng et al. [40], que também observaram em CTMs indiferenciadas aspectos compatíveis com células com alta capacidade metabólica e de síntese.

A cariotipagem normal das CTMs cultivadas ( $2n=64$ ) demonstrou que o protocolo de isolamento e cultivo utilizado em nosso estudo não promoveu alterações cromossômicas inerentes a perda ou ganho de cromossomo, assegurando assim o uso terapêutico das células até a passagem estudada. Esses achados corroboram com os observados por Martinello [33] em células progenitoras do sangue periférico de equinos antes e após a criopreservação.

O protocolo de isolamento, cultivo e caracterização das CTMs equinas utilizado neste experimento demonstrou adequado para a produção de uma população celular com bom potencial de diferenciação e ausência de aneuploidia, a qual poderá ser utilizada para o estudo de futuras terapias celulares. Os dados obtidos no presente estudo irão contribuir não somente para o estabelecimento e aperfeiçoamento dos



critérios de caracterização das CTMs, mas também favorecerão o desenvolvimento de novas pesquisas fomentando uso terapêutico destas células na medicina equina.

**Agradecimento.-** À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Proc.2009/51431-6) e ao Fundunesp (Proc.00571/09), e CNPQ (Proc. 481350/2009-8) pelo auxílio financeiro. Ao professor Dr. Bruno Cogliati da Universidade de São Paulo pela concessão do anticorpo anti-colágeno II.

### **REFERÊNCIAS**

- 1- BD Humpreys, JV Bonventre, Mesenchymal stem cells in acute injury kidney, *Annu. Rev. Med.* 59 (2008) 311-325.
- 2- Y Chen, JZ Shao, LX Xiang, et al., Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 815-820.
- 3- S Pacini, S Spinabella, L Trombi, et al., Suspension of bone marrow-derived undifferentiae mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses, *Tissue Eng.* 12 (2007) 2949-2955.
- 4- MA Vidal, SO Robinson, MJ Lopez, et al., Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow, *Vet. Surg.* 37 (2008)713-724.
- 5- S Colleoni, E Bottani, I Tessaro, et al., Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor, *Vet. Res. Commun.* 33 (2009) 811-821.

6- S Violini, P Ramelli, LF Pisani, et al., Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by *in vitro* exposure to BMP-12, *BMC Cell Biol.* 10 (2009) 1-10.

7- Y Kasashima, T Ueno, A Tomita, et al., Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells, *Equine Vet. J.* 43 (2011) 288-294.

8- CW McIlwraith, DD Frisbie, WG Rodkey, et al., Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects, *Arthroscopic.* 27 (2011) 1552-1561.

9- TG Koch, T Heerckens, PD Thomsen, et al., Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord, *BMC Biotechnol.* 7 (2007) 1-9.

10- SA Reed, SE Johnson, Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types, *J. Cell. Physiol.* 215 (2008) 329–336.

11- J Koerner, D Nestic, JD Romero, et al., Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells.* 24 (2006) 1613-1619.

12- LI Mambelli, EJC Santos, PJR Frazão, et al., Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation, *Tissue Eng. Part C.* 15 (2009) 87-94.

13 - SM Hoynowski, MN Fry, BM Gardner, et al., Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 347–353

14- A Lovati, B Corradeti, CA Lange, et al., Comparison of equine bone marrow-umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells, *Vet. Res. Commun.* 35 (2011) 103-112.

15- E Iacono, L Brunori, A Pirrone, et al., Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse, *Reproduction* 143 (2012) 311-325.

16- N Mensing, H Gasse, N Hambruch, et al., Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse, *BMC Vet Res.* 7 (2011) 1-13.

17- L Maia, FC Landim-Alvarenga, MA Golim, et al., Potential of neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells from equine bone marrow, *Pesq. Vet. Bras.* 32 (2012) 444-452.

18- SE Taylor, PD Clegg, Collection and Propagation Methods for Mesenchymal Stromal Cells, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 27 (2011) 243-261.

19- DL Borjesson, JF Peroni, The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease, *Clin. Lab. Med.* 31 (2011) 109–123.

20- S Ibrahim, K Saundenrs, JH Kydd, et al., Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocyte, *Vet. Immunol. Immunop.* 119 (2007) 63-80.

21- C de Schauwer, E Meyer, GR van de Walle, et al., Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity, *Theriogenology.* 75 (2011) 1431-1443.

22- APB Barreira, DTL Bacellar, RG Kiffer et al., Punção aspirativa de medula óssea em equinos adultos para obtenção de células-tronco, *Rev. Bras. Ciênc. Vet.* 15 (2008) 56-59.

23- L Lacitignola, A Crovace, G Rossi, et al., Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report, *Vet. Res. Commun.* 32 (2008) 33-38.

24- AJ Nixon, LA Dahlgren, JL Haupt, et al., Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis, *Am. J. Vet. Res.* 69 (2008) 928-937.

25- AM Carvalho, ALG Alves, PGG Oliveira, et al., Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines, *J. Equine Vet. Sci.* 31 (2011) 26-34.

26- G Marfe, M Massaro-Giordano, Mranalli, et al., Blood derived stem cells: An ameliorative therapy in veterinary ophthalmology, *J. Cell. Physiol.* 227 (2012a) 1250-1256.

27- G Marfe, G Rotta, L De Martino, et al., A new clinical approach: Use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses, *Life Sci.* 90 (2012b) 825-830.

28- M Dominici, K Le Blanck, I Mueller, et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy.* 8 (2006) 315-317.

29- AM Carvalho, ALG Alves, MA Golim, et al., Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue, *Vet. Immunol. Immunop.* 132 (2009) 303-306.

30- SJ Arnhold, I Goletz, H Klein, et al., Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells, *Am. J. Vet. Res.* 68 (2007) 1095-1105.

31- DJ Guest, JC Ousey, MRW Smith, Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells, *Stem Cells and Cloning.* 1 (2008) 1-9.

32- CH Radcliffe, JBF Flaminio, L Fortier, Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations, *Stem Cells Dev.* 19 (2010) 269-281.

33- T Martinello, I Bronzini, L Maccatrozoo, et al., Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood, *Tissue Eng. Part C* 16 (2010) 771-781.

34- DT Covas, A identificação das células-tronco. In: MA Zago, DT Covas (Eds.), *Células-Tronco: a nova fronteira da medicina*. Atheneu, São Paulo, 2006, p.87-92.

35- CA Toupadakis, A Woung, DC Genetos, et al., Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue, *Am. J. Vet. Res.* 71 (2010) 1237-1245.

36- MC Stewart, AA Stewart, Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet. Clin. Equine* 27 (2011) 243-261.

37- M Müller, O Raabe, K Addicks, et al., Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cells, *Cell Biol. Int.* 1 (2011) 235-248.

38- B Ranera, L Ordovás, J Lyahyai, et al., Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells, *Equine Vet. J.* 44 (2012) 33-42.

39- L Pascucci, F Mercati, C Marini, et al., Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells, *Histol. Histopathol.* 25 (2010) 1277-1285.

40- HL Zeng, Q Zhong , YL Qin, et al., Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, *BMC Cell Biol.* 12:32 (2011) 1-10.

### Legenda das Figuras

Fig.1. Análise imunofenotípica FACS das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea de equino para os marcadores CD90, CD44 e CD34. (A) Histograma do marcador CD90 expresso em média 95,39%. (B) Histograma do marcador CD44 expresso em média 69,43%. (C) Histograma do marcador CD34 (negativo).

Fig.2. Ensaio de diferenciação das células-tronco mesenquimais para as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. (A) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de cálcio marcada com Alizarin red (setas brancas) e a mudança de morfologia fibroblastóide para poligonal das células após a diferenciação osteogênica (setas amarelas). (B) Diferenciação adipogênica. Note a presença de gotículas de gordura intracelular coradas com Oil red. (C, D, E, F) Diferenciação condrogênica. (C) Coloração com azul de toluidina. Nota-se a presença de áreas metacromáticas em rósea (seta preta) indicando a presença de matriz extracelular contendo proteoglicanos, além da presença de lacunas (seta branca) possivelmente contendo condrócitos. (D) Coloração com Alcian blue. Áreas coradas em azul demonstrando a deposição de proteoglicanos. (E) Imunocitoquímica para o colágeno do tipo II. Note marcação positiva para o colágeno do tipo II (marrom). (F) Controle negativo representado pela substituição do anticorpo primário pela imunoglobulina de coelho. Bar = 50  $\mu$ m.

Fig.3. Caracterização imunocitoquímica das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea de equino para os marcadores CD44, vimentina, PCNA e CD13. Marcação positiva (marrom) para o CD44 (A), vimentina (B) e PCNA (C).

Marcação negativa para o CD13 (D) e controle negativo representado pela substituição do anticorpo primário pela imunoglobulina de camundongo. Núcleo corado com hematoxilina. Bar = 50  $\mu$ m.

Fig.4. Eletromicrografias da ultraestrutura das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea de equino. (A) A célula exibe um núcleo eucromático, pálido com localização excêntrica e nucléolo evidente. A membrana celular apresenta uma superfície irregular devido à presença de protrusões citoplásticas. (B) O citoplasma exibe aparência granular devido à abundância de ribossomos livres e polirribossomo (setas). Nota-se a presença de retículo endoplasmático rugoso (rer) proeminente com cisternas dilatadas, mitocôndrias (m) alongadas e grânulos de lipídeo (l) em metabolização. (C) Nota-se a presença de numerosas mitocôndrias (m) com aspecto arredondado distribuídas pelo citoplasma. (D) Observa-se a presença de feixes de microfilamentos (setas duplas) dispersos no citoplasma. Notar o aspecto extremamente dilatado do retículo endoplasmático rugoso (rer). núcleo: n; polirribossomo: r (detalhe). Aumentos de 9700x (A), 23000x (B) e 31500x (C,D).

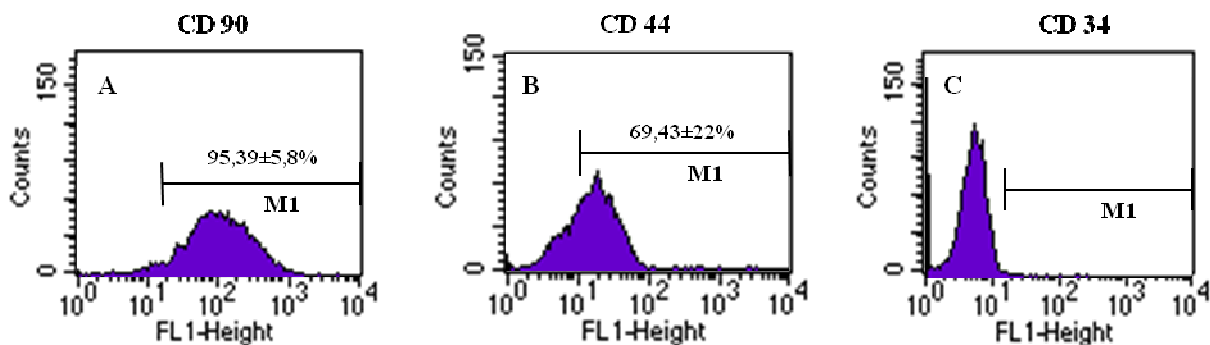


Fig. 1.

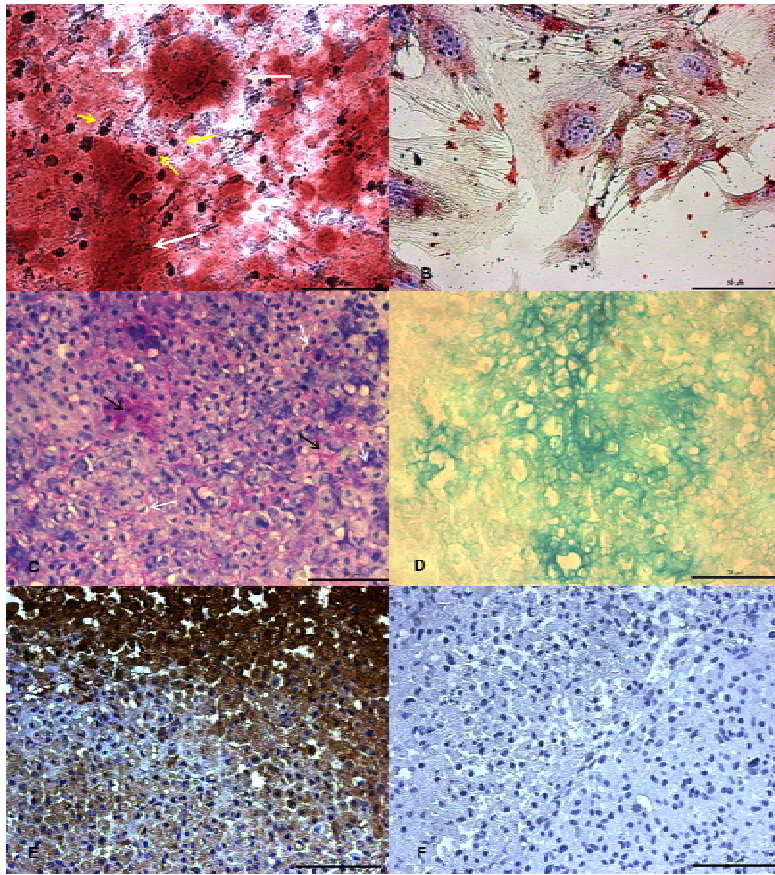


Fig. 2.

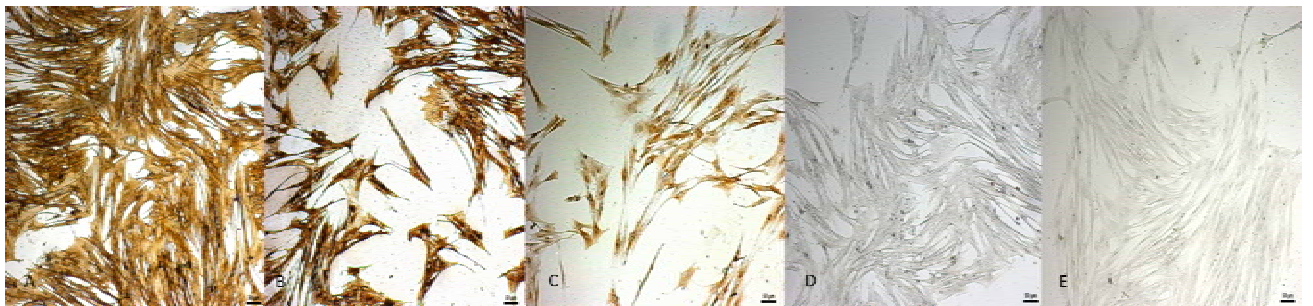


Fig.3.



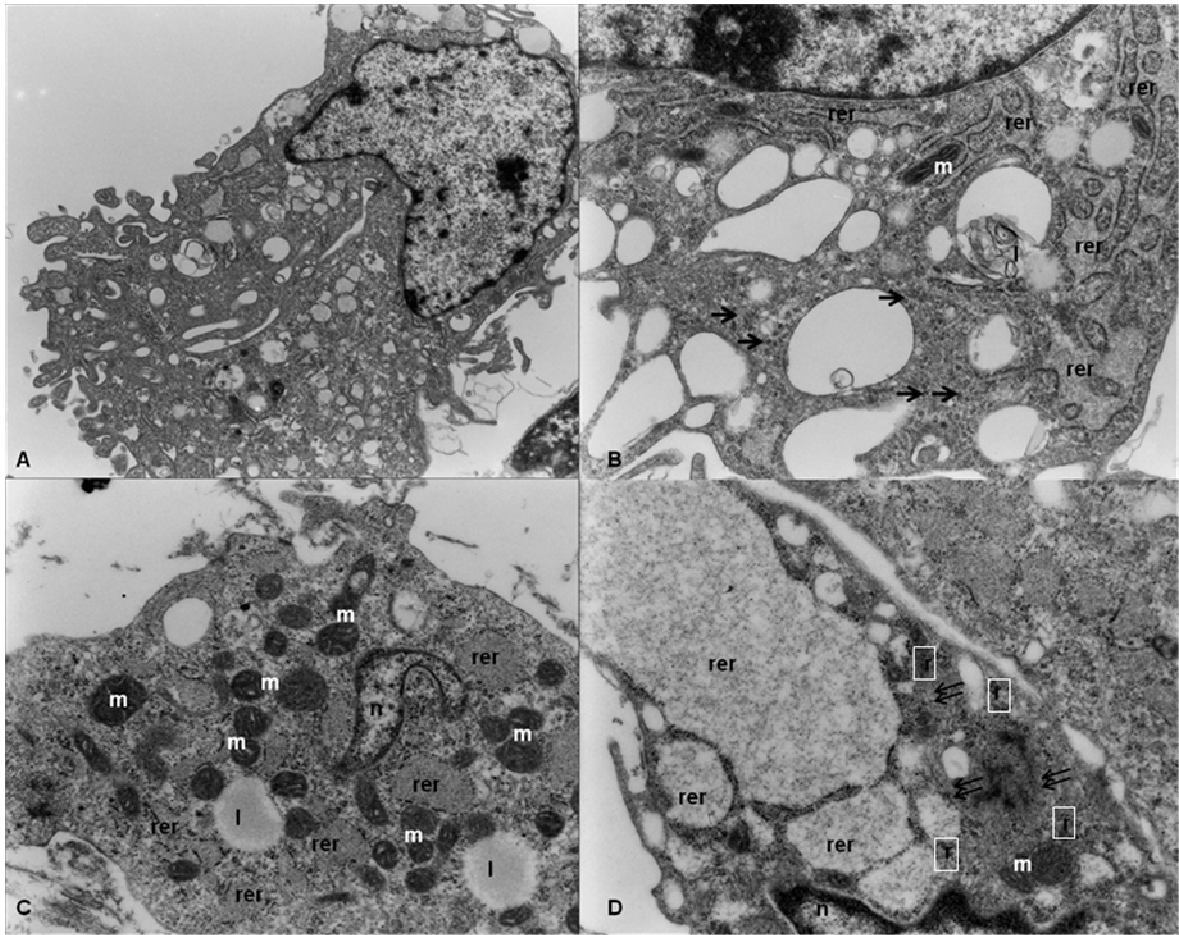


Fig.4.

## **Capítulo 3**

## **Artigo Científico nas normas e a ser submetido ao periódico “Journal of Equine Veterinary Science”**

### **Potencial de aplicação das células-tronco mesenquimais por via intratecal em equinos: avaliação clínica, laboratorial e expressão de metaloproteinases de matriz do tipo 2 e 9.**

Leandro Maia<sup>1\*</sup>, Fernanda C. Landim-Alvarenga<sup>2</sup>, Marilda O. Taffarel<sup>3</sup>, Renata Marconato Venturini<sup>1</sup>, Natália Pereira P. Freitas<sup>1</sup>, Guilherme Schiess Cardoso<sup>2</sup>, Gisele Fabrino Machado<sup>4</sup>, Guilherme Dias de Melo<sup>4</sup>, José Carlos de Figueiredo Pantoja<sup>5</sup>, Rogério M. Amorim<sup>1</sup>

#### **RESUMO**

Estudos recentes tem demonstrado inúmeras propriedades biológicas das células-tronco mesenquimais (CTMs), bem como a sua possibilidade de aplicação em enfermidades complexas ou em lesões de difícil regeneração, como as que acometem o sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). Desta forma, a terapia celular aponta-se como uma alternativa promissora para o tratamento destas enfermidades, haja vista a grande capacidade de autorregeneração, a baixa imunogenicidade, os efeitos parácrinos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antiapoptóticos e neuroprotetores das CTMs. Nesse contexto, a proposta do presente estudo foi avaliar por parâmetros clínicos, laboratoriais e expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), a viabilidade e a segurança de aplicação intratecal da CTMs através do espaço atlanto-occipital de equinos para uso futuro no tratamento de enfermidades neurológicas. Para isso, foram utilizados dez equinos mestiços hígidos, de ambos os sexos e com idade entre 4 e 12 anos. Esses animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, no qual um grupo recebeu as CTMs (grupo tratado: GT; n=5) e o outro PBS (grupo controle: GC; n=5) pela via intratecal. Previamente aos implantes, as CTMs foram adequadamente

---

<sup>1</sup> Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. Bolsista FAPESP. \*Autor para correspondência: [leandromvet@hotmail.com](mailto:leandromvet@hotmail.com)

<sup>2</sup> Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-Unesp, Botucatu, SP.

<sup>3</sup> Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ-Unesp, Botucatu, SP.

<sup>4</sup> Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Unesp, Araçatuba, SP.

<sup>5</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ-Unesp, Botucatu, SP.

caracterizadas pela positiva expressão dos marcadores CD90 e CD44, além da diferenciação *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Na análise das variáveis hematológicas e líquóricas estudadas nos períodos pré e pós-implante não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) entre o GT e GC. Durante a avaliação neurológica realizada diariamente por trinta dias após os implantes, também não foram observadas alterações na integridade encefálica e na medula espinhal dos animais do GC e CT. Adicionalmente, na análise das MMPs dos tipos 2 e 9 no LCR, somente foi observada a presença da pró-MMP-2 (latente) sem diferenças ( $P>0,05$ ) entre os grupos estudados. Os resultados demonstrados no presente suportam a hipótese de segurança e viabilidade de aplicação das CTMs autólogas pelo espaço atlanto-occipital, apontando assim esta via de administração como promissora para utilização da terapia celular para o tratamento de enfermidades neurológicas em equinos e possivelmente em outras espécies.

Palavras chaves: líquido, CTMs, implante, cavalo, MMPs, neurologia.

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes tem demonstrado inúmeras propriedades biológicas das células-tronco mesenquimais (CTMs), bem como a sua possibilidade de aplicação em enfermidades complexas ou em lesões de difícil regeneração, como as que acometem o sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). Desta forma, a terapia celular aponta-se como uma alternativa promissora para o tratamento destas enfermidades, haja vista a grande capacidade de autorregeneração, a baixa imunogenicidade, os efeitos parácrinos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antiapoptóticos e neuroprotetores das CTMs.

Durante os danos isquêmicos ou lesões teciduais graves, as CTMs podem ser atraídas para o sítio da lesão, onde secretam fatores bioativos que influenciam o processo de reparação e regeneração tecidual [1]. De acordo com Baraniak *et al.* [2], as células-tronco (CT) e progenitoras são capazes de produzir e secretar um grande número de fatores incluindo os de crescimento, os angiogênicos, os antifibróticos, os anti-inflamatórios, os imunossupresivos, os responsáveis pela homeostase da matriz extracelular (colágeno, TIMPs e MMPs), além de moléculas antioxidantes e antiapoptóticas que irão desempenhar importantes funções no processo de regeneração. Além da produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular, ressalta-se que as CT apresentam um importante papel no consumo

de fatores pró-apoptóticos e moléculas inflamatórias [2]. Todas essas propriedades são grandes atrativos para o uso da terapia celular em inúmeras enfermidades que acometem os animais e humanos.

A realização de estudos clínicos se faz necessária para transferência de resultados pré-clínicos a partir de experimentos com modelos animais para os seres humanos. A janela terapêutica, estratégia de implantação, melhor método de administração, número de células e os possíveis efeitos secundários devem ser testados finalmente em humanos em testes clínicos [1]. A espécie equina, de forma semelhante aos humanos, é muito afetada por enfermidades osteomusculares (ex: osteoartites, tendinites), neurológicas (neuropatias e mielopatias) e reprodutivas (endometrites), sendo esse aspecto importante na utilização da espécie equina como modelo experimental para terapia celular com CTMs.

Em equinos, as CTMs provenientes da medula óssea (MO) e do tecido adiposo são consideradas os dois tipos mais comuns de CT utilizadas na abordagem terapêutica para regeneração de tecidos, sendo ambas facilmente obtidas para isolamento e expansão [3]. Os estudos envolvendo terapia celular com CTMs em equinos estão focados principalmente para o tratamento de lesões tendíneas e osteoarticulares [4, 5, 6, 7, 8, 9], havendo poucos relatos da sua utilização em outros tecidos, tais como o sistema nervoso [10]. Desta forma, as vias de aplicação mais utilizadas até então para uso clínico em equino são as intralesionais e intra-articulares, carecendo assim na medicina equina de estudos pré-clínicos que avaliem a segurança de administração das CTMs em outras vias, tais como a intratecal por via líquórica no espaço subaracnóide. A comprovação da hipótese de que a via intratecal através do líquido é segura na espécie equina, não somente possibilitará a utilização da terapia celular nos processos neurodegenerativos e inflamatórios, tal como a meningoencefalite protozoária equina, mas também fornecerá informações válidas para o uso das CTMs em várias enfermidades neurológicas que acometem as espécies domésticas. Nesse contexto, a proposta do presente estudo foi avaliar por parâmetros clínicos e laboratoriais a viabilidade e segurança de aplicação intratecal da CTMs através do espaço atlanto-occipital de equinos para uso futuro no tratamento de enfermidades neurológicas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 *Animais*

Foram utilizados dez equinos mestiços, hípidos, de ambos os sexos (5 machos e 5 fêmeas) e com idade entre 4 e 12 anos. Os animais foram selecionados mediante a avaliação clínica, neurológica e hematológica prévia.

O protocolo experimental (nº 76/2009- CEUA) foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, campus Botucatu. Todos os procedimentos foram realizados sob as diretrizes internacionais para o cuidado e uso de animais experimentais.

### 2.2. *Delineamento experimental*

Os animais selecionados foram divididos aleatoriamente em dois grupos, no qual um grupo recebeu as células-tronco mesenquimais (GT; n=5) e outro a solução fosfato tamponado (PBS) (GC; n=5). Inicialmente foi feita a punção aspirativa da medula óssea para isolamento, expansão e caracterização das CTMs. Após prévia caracterização das CTMs, as células foram administradas no GT pela via intratecal utilizando-se o espaço atlanto-occipital. Nesse mesmo período os animais GC receberam o mesmo volume de PBS pela mesma via.

O monitoramento da segurança de aplicação das CTMs foi conduzido através de exames clínicos e neurológicos diários durante o período de trinta dias, bem como a análise hematológica, do líquido cefalorraquidiano (LCR) e expressão das metaloproteinases do tipo 2 e 9 nas formas latente e ativadas no LCR. As principais etapas do experimento estão representadas na Figura 1.

### 2.3. *Colheita da medula óssea*

A punção aspirativa da MO foi realizada conforme a metodologia descrita por Barreira *et al.* [12], com modificações que incluíram a não utilização do exame ultrassonográfico para identificação da esternébra a ser puncionada, a realização da punção na quinta esternébra, a utilização da agulha modelo Komiyashiki<sup>®</sup>, além da associação de 2 mL de heparina (Hemofol<sup>®</sup>, Cristália, BRA) com 2 mL de solução Salina-

Fosfato pH 7,2 (PBS<sup>®</sup> 1x, LGC Biotecnologia, BRA) para acondicionamento da MO aspirada.

#### *2.4. Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais*

O isolamento e o cultivo das CTMs foram realizados, conforme metodologia descrita por Maia *et al.* [ 12]. Para isso, a fração mononuclear das amostras da MO foram cultivadas em meio DMEM baixa glicose/F12 (1:1), 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (1%) e anfotericina B (1,2%) (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>. O meio de manutenção foi trocado a cada 2 ou 3 dias até a confluência celular mínima de 80%, onde se procedeu a tripsinização para caracterização e tratamento.

#### *2.5. Análise na citometria de fluxo para os marcadores de superfície celular*

A análise imunofenotípica das CTMs foi realizada ao final do cultivo primário no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson<sup>®</sup> and Company, USA), utilizando os anticorpos monoclonais mouse anti-rat CD90 (Caltag Laboratories<sup>®</sup>, USA), mouse anti-human CD34 (Becton Dickinson<sup>®</sup> and Company, USA) marcados com a sonda isoticiato de fluoresceína (FITC) e mouse anti-horse CD44 (abD Serotec<sup>®</sup>, USA) que foi marcado com o anticorpo secundário goat anti-mouse FITC (Molecular Probes<sup>®</sup>, USA). Durante a análise foram contabilizados 10.000 eventos.

#### *2.6. Ensaios para diferenciação osteogênica, adipogênica, condrogênica*

Após confluência celular em cultivo primário, as CTMs foram tripsinizadas e acondicionadas em placas de seis Wells (Sarstedt<sup>®</sup>, USA). Quarenta e oito horas depois, o meio de manutenção foi removido e o meio de diferenciação osteogênico e adipogênico STEMPRO<sup>®</sup> (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) foram acrescentados ao subcultivos em triplicatas, de acordo com a recomendação do fabricante. Ao meio adipogênico foi realizada a suplementação com 5% de soro de coelho. Os meios foram trocados a cada 2 a 3 dias e, a confirmação da diferenciação osteogênica e adipogênica foi realizada, respectivamente, através da demonstração da deposição matriz de cálcio utilizando o método de coloração histológico Alizarin red a 2%, pH 4,2 e da presença

intracitoplasmática de gotículas de gordura utilizando o corante Oil red a 0,5% (Sigma-Aldrich Corp, USA).

Para a diferenciação condrogênica, as CTMs foram cultivadas em um *pellet*-3D em um tubo do tipo Falcon (15 mL) por 21 dias, sendo o meio de diferenciação condrogênico STEMPRO<sup>®</sup> trocado a cada três dias. Para confirmar a diferenciação condrogênica, os *pellets* foram corados com Alcian Blue pH 2,5 e Azul de Toluidina pH 1 para identificação de proteoglicanos.

### 2.7. Colheita de sangue e análise hematológica

As amostras de sangue para realização dos exames hematológicos no GT e GC foram colhidas imediatamente antes dos tratamentos (D1) e posteriormente no dia seis (D6) após a aplicação intratecal.

Após antisepsia, foram obtidas amostras de 4 mL de sangue por punção da veia jugular externa, em tubos a vácuo com anticoagulante (BD Vacutainer<sup>®</sup>, USA). Os tubos com EDTA foram utilizados para determinação dos valores de hematócrito, proteína plasmática total, plaquetas, fibrinogênio, leucócitos totais e contagem diferencial. A contagem dos leucócitos totais e de plaquetas foi realizada em aparelho de contagem de células sanguíneas (HemaScreen, EBRAM<sup>®</sup> 18, BRA).

### 2.8. Colheita e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR)

A colheita do LCR foi realizada no espaço atlantoccipital antes dos tratamentos (D1) e posteriormente no D6. O procedimento foi conduzido com os animais posicionados em decúbito lateral sob anestesia inalatória com isoflurano (Isoforine, Cristália<sup>®</sup>, BRA), de acordo com a técnica descrita por Mayhew [13].

No exame físico do LCR as variáveis avaliadas foram o aspecto, a cor e a coagulação, além da densidade pela refratometria e o pH pela fita reagente. Na análise citológica, o número total de células foi mensurado em câmara de Neubauer, com o LCR não diluído e a contagem diferencial após citocentrifugação (Revan centrífuga 2000 D).

No exame bioquímico, a concentração de proteínas e glicose líquórica foi determinada utilizando-se kits comerciais (Kit Micropote, Doles<sup>®</sup>, BRA e Kit glicose, Katal<sup>®</sup>, BRA, respectivamente) de acordo com as recomendações dos fabricantes.



A análise da possível presença de globulinas líquóricas foi determinada pelo teste de Pandy através da mistura e homogeneização de 1 mL de reativo de Pandy com algumas gotas de LCR. No caso de teste positivo, os resultados eram apresentados utilizando até quatro cruzeiros de acordo com intensidade de turbidez observada macroscopicamente.

Imediatamente após as colheitas, amostras de LCR de todos os animais do GT e GC foram também criopreservadas para posterior avaliação das MMP-2 e MMP-9 pela técnica de Zimografia.

### 2.9. Tratamentos

Previamente aos tratamentos, as CTMs foram tripsinizadas e “lavadas” três vezes a 250 g em meio DMEM filtrado a fim de remover qualquer resíduo de soro fetal bovino que pudesse incitar respostas alérgicas e/ou imunológicas nos animais do grupo tratado (GT;  $N=5$ ). Após esse procedimento, o *pellet* de CTMs foi suspenso em 2 mL de PBS para imediato tratamento. O GT recebeu aproximadamente  $1 \times 10^6$  CTMs viáveis suspensas em 2 mL de PBS por via intratecal através do espaço atlanto-ocipital mediante anestesia e antisepsia prévia. O número de células viáveis foi determinado pelo método de coloração azul trypan a 0,4% (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA). O grupo controle (GC;  $N=5$ ) recebeu pela mesma via unicamente 2 mL de PBS (placebo).

### 2.10. Avaliação clínica

Após o tratamento do GC e GT, foi realizado exame físico diário por trinta dias, sendo avaliado o comportamento, a condição corporal, a postura, o grau de hidratação, a coloração de mucosa, o tempo de enchimento capilar, a frequência cardíaca, a frequência respiratória, a temperatura corporal e os movimentos intestinais.

A avaliação da integridade encefálica (estado mental, comportamento, posição da cabeça e avaliação dos pares de nervos cranianos) e da medula espinhal foi realizada segundo a descrição de Malikides *et al.* [14] e Mayhew [15].

Durante os exames neurológicos do GT e GC, para avaliação da locomoção, foi utilizado o sistema de classificação de ataxia e paresia descrito por Mayhew *et al.* [16], conforme abaixo:

*Grau 0 (normal)* - Déficit neurológico não detectado.

*Grau 1* - Déficit neurológico detectado apenas pelo andar ou postura.

*Grau 2* - Déficit neurológico facilmente detectado e exacerbado durante as provas de afastar, andar em círculos, deslocamento lateral, aplicação de força a região lombar e pela extensão do pescoço.

*Grau 3* - Os déficits neurológicos são bastante evidentes durante o andar, com tendência de quedas ou tropeços durante as provas de afastar, andar em círculos, deslocamento lateral, aplicação de força a região lombar e pela extensão do pescoço.

*Grau 4* - Déficit neurológico severo com tropeços e quedas espontâneas durante o andar

*Grau 5*- Tetraplegia.

### *2.11. Análise das MMPs utilizando a técnica de Zimografia em gel de gelatina*

A análise zimográfica e densitométrica das MMPs do tipo 2 e 9 nas formas latentes e ativadas foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Melo *et al.* [17] e Marangoni *et al.* [18].

### *2.12. Análise dos dados*

Os dados referentes à análise imunofenotípica foram expressos de forma descritiva através da média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão. Para comparação entre o GT e GC para as variáveis hematológicas e líquóricas em cada momento estudado (pré e pós-implante) foram utilizados o teste da soma de pontos de Wilcoxon (Wilcoxon rank-sum test). Para comparação das variáveis líquóricas e hematológicas entre os momentos estudados foi utilizado o teste de postos de sinais de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test) para amostras pareadas. Todas as análises foram conduzidas utilizando o programa estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2009) a 5 % de probabilidade.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Colheita aspirativa de medula óssea

A técnica foi realizada de forma segura e factível e o volume de MO aspirado foi adequado para o isolamento e cultivo das CTMs. Nenhuma complicação foi observada após a punção esternal.

#### 3.2. Cultivo, caracterização e ensaio de diferenciação das CTMs

As células provenientes da fração mononuclear da MO apresentaram aderência ao plástico entre 24 e 48 horas e morfologia fibroblastóide inicialmente com quatro dias de cultivo. A confluência ( $\geq 80\%$ ) e homogeneidade da cultura foram obtidas após a segunda semana de cultivo celular.

A análise imunofenotípica revelou elevada expressão do marcador CD90 ( $\bar{x}=97\pm 3\%$ ), seguida por menor expressão para o marcador CD44 ( $\bar{x}=71\pm 24\%$ ) e ausência de expressão para o marcador CD34.

O potencial de diferenciação *in vitro* das CTMs foi demonstrado pela resposta positiva à diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica ao décimo, oitavo e vigésimo primeiro dia de exposição aos meios de diferenciação, respectivamente.

As CTMs inicialmente com morfologia fibroblastóide adquiriram morfologia predominantemente poligonal após a exposição ao meio osteogênico e depositaram grande quantidade de matriz extracelular rica em cálcio comprovada pela coloração positiva com Alizarim red (Figura 2a).

A diferenciação adipogênica foi confirmada pela deposição de gotículas de gordura no citoplasma em resposta a coloração positiva ao Oil red, conforme demonstrado na Figura 2b. Já a diferenciação condrogênica foi confirmada pela deposição de matriz hialina rica em proteoglicanos demonstrada pela coloração positiva ao azul de toluidina e alcian blue (Figura 2 c,d).

#### 3.3. Implantes nos GT e GC

O protocolo anestésico utilizado para os implantes e colheita do LCR demonstrou ser adequado e seguro durante e após a realização dos procedimentos nos grupos

estudados. Nenhum animal apresentou alterações clínicas e reações alérgicas que pudessem ser atribuída ao implante das CTMs e PBS no GC.

### *3.4. Avaliação clínica e neurológica*

Durante os exames conduzidos nos períodos pré e pós-implantes não foram constatadas alterações clínicas e neurológicas nos GT e GC. Todos os animais apresentaram padrão de locomoção normal (grau 0), não sendo detectado déficit neurológico segundo a classificação descrita por Mayhew *et al.* [16]. Também não foram evidenciadas alterações na integridade encefálica (estado mental, comportamento, posição da cabeça e avaliação dos pares de nervos cranianos) durante as provas neurológicas realizadas nos dois grupos.

### *3.5. Avaliação hematológica*

A mediana das variáveis hematológicas (hematócrito, proteína total, plaquetas, fibrinogênio, leucócitos totais, segmentados, linfócitos, basófilos e monócitos) avaliadas no pré (D1) e pós implante (D6) estão apresentadas na Tabela 1. Observa-se que não houve diferenças ( $P>0,05$ ) entre os GT e GC e entre os momentos estudados.

### *3.6. Avaliação do LCR*

O LCR em ambos os grupos nos momentos pré e pós-implantes estava límpido, incolor e não coagulado.

Diferenças ( $p>0,05$ ) não foram observadas entre o GC e GT no pré (D1) e pós implante (D6) das CTMs em relação às variáveis líquóricas (densidade, pH, hemácias, células nucleadas, globulinas, proteínas, glicose, e pró-MMP2) estudadas, conforme demonstrado na Tabela 2. Também não foram observadas alterações ( $p>0,05$ ) nas variáveis líquóricas em função do tempo nos momentos pré e pós implante.

### *3.7. Expressão de metaloproteinases tipo 2 e 9 no LCR*

Nos grupos estudados somente foi detectada a presença da MMP2 na forma latente (não ativada) sem diferenças ( $P>0,05$ ) entre os grupos e momentos estudados

(Tabela 2, Figura 3). Em nenhuma das amostras de LCR foi detectada a MMP-9 na forma latente ou ativada, conforme pode ser observado no zimograma apresentado na Figura 3.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, a segurança de aplicação das CTMs através do LCR foi significativamente demonstrada pelos resultados observados nas análises laboratoriais, bem como pela ausência de alterações clínicas nos grupos estudados. O achado mais interessante de nosso estudo foi a ausência de expressão das MMP2 e MMP9, particularmente em suas formas ativadas após o implante das CTMs.

##### 4.1. Colheita aspirativa de medula óssea

A técnica e o sítio utilizado para colheita da MO nesse estudo mostrou-se apropriado e seguro, fato esse confirmado pela não ocorrência de complicações e adequada produção de CTMs a partir do volume aspirado. De acordo com Kasashima *et al.* [19], o sítio anatômico mais seguro e factível para punção aspirativa da MO é realmente a quinta esternébra, pela sua localização cranial ao ápice do coração e pela adequada espessura dorsoventral. Por outro lado, esse autores não descartam a possibilidade de aspiração da MO na quarta e na sexta esternébra, mesmo com inconveniente da primeira estar localizada entre os membro torácicos e a última próximo ao coração.

##### 4.2. Caracterização e ensaio de diferenciação das CTMs

No presente trabalho, as CTMs isoladas da MO de equinos foram caracterizadas de acordo com critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para CTMs humanas [20], ou seja, apresentaram características de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, elevada expressão do marcador CD90 (>95% positividade), negatividade de expressão ao marcador de células hematopoiéticas CD34 e responderam positivamente a diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Adicionalmente, também se observou a expressão do marcador CD44 (receptor de ácido

hialurônico), uma glicoproteína de superfície celular importante na interação e adesão celular das CTMs.

Algumas destas características observadas por nosso grupo também foram relatadas em outros estudos durante a caracterização de CTMs equinas provenientes do tecido adiposo [8, 21], medula óssea [22, 23, 24], sangue periférico [25], matriz do cordão umbilical [26], líquido amniótico, membrana amniótica [27], gengiva e ligamento periodontal [28].

#### 4.3. *Implantes nos GT e GC*

A preocupação com a segurança de aplicação das CTMs pela via intratecal através do espaço atlanto-occipital dos equinos do GT foi iniciada com a seleção do veículo a ser utilizado para os implantes e o modo de preparo das células. Desta forma, as CTMs foram “lavadas” três vezes a fim de se remover qualquer resíduo de soro fetal bovino (SFB) que pudesse incitar respostas alérgicas e/ou imunológicas nos animais. Esta medida demonstrou-se aparentemente adequada, uma vez que os animais não apresentaram alterações pós-implante. A preocupação a respeito da utilização ou não do SFB na composição do meio de cultura é uma realidade principalmente em humanos, haja vista que além da possibilidade de reações imunes, pode ocorrer a veiculação de príons, vírus e agentes zoonóticos [29, 30]. De acordo com Dimarakis e Levicar [29], o soro contém uma variedade de proteínas que podem se ligar as células em cultura funcionando assim, como substrato para ocorrência de reações imunológicas após transplantes. Devido a controvérsia em relação à utilização do SFB, Toupadaskis *et al.* [31] estudaram em CTMs equina a possibilidade de substituição do SFB pelo soro autólogo (SA) e evidenciaram que a taxa de proliferação celular com o SFB foi superior ( $P < 0,05$ ) ao do SA. Desta forma, os autores sugerem que a substituição unicamente pelo SA pode não ser uma alternativa viável para expansão celular nas condições experimentais e que os estudos futuros devem ser direcionados para determinar métodos através dos quais a imunogenicidade possa ser reduzida sem afetar a taxa de crescimento das CTMs. Adicionalmente, esses métodos poderiam incluir o cultivo inicial para expansão com SFB e posteriormente com AS para reduzir o potencial imunogênico [31].

O veículo PBS utilizado para o implante em ambos os grupos demonstrou-se adequado e seguro, fato esse demonstrado pela ausência de complicações,

particularmente no GC. Este mesmo veículo já foi utilizado em estudos controlados envolvendo, por exemplo, tendinopatias induzidas em equinos, com adequado desenvolvimento experimental [7].

A concentração de CTMs implantadas nesse ensaio pré clínico foi similar à utilizada por Lim *et al.* [32] através da via lombar de ratos submetidos ao modelo de acidente vascular cerebral por oclusão da artéria cerebral média. No estudo conduzido por esses autores as doses de  $10^5$  e  $10^6$  de CTMs derivadas do sangue do cordão umbilical humano aplicadas intratecalmente demonstraram efeitos significativos na recuperação dos danos isquêmicos. Os achados do nosso estudo e destes autores suportam a hipótese de segurança de aplicação de CTMs pela via líquórica, além de projetarem grande perspectivas para o uso da terapia celular no tratamento de enfermidades neurológicas em outras espécies, incluindo os equinos.

#### *4.4. Avaliação clínica e neurológica*

A ausência de alterações clínicas e neurológicas observadas após os implantes nos GT e GC nas condições deste estudo demonstram que os procedimentos realizados não cursam com mudanças a princípio que possam alterar o ambiente neural e que inviabilizem o uso dessa nova via de aplicação de CTMs em equinos. Em animais de laboratório e humanos a via líquórica tem sido utilizada para o implante de células mononucleares e CTMs alogênicas sem a evidência de sérios efeitos adversos [32,33].

Em um estudo conduzido com 114 humanos acometidos por condições degenerativas (ex: paraplegia, ataxia, esclerose múltipla), Yang *et al.* [33] realizaram um total de 592 aplicações de células mononucleares alogênicas provenientes do sangue do cordão umbilical pela via intratecal e intravenosa concomitantemente sem a observação de sérios efeitos adversos. Nesse estudo, o efeito colateral mais frequente (19/592- 3,2%) foi a dor de cabeça, a qual foi atribuída à hipotensão postural, uma conhecida complicação de punções lombares que se resolvem espontaneamente sem a necessidade de intervenções drásticas.

#### *4.5. Avaliação hematológica e do LCR*

O LCR desempenha quatro grandes funções no SNC, que incluem o suporte físico da estrutura neural, a excreção, o transporte intracerebral e o controle do ambiente

químico do SNC [34]. Dentre essas características, a que nos motivou para realização deste estudo foi a possibilidade de transporte das CTMs associado ao seu potencial migratório para eventuais sítios de lesões.

Os implantes realizados em nosso estudo não ocasionaram diferenças ( $p>0,05$ ) entre o GT e GC com relação às variáveis líquóricas estudadas, estando os valores de densidade [35], hemácias, células nucleadas, proteínas e glicose [36] pré e pós implante dentro da faixa de normalidade para espécie equina. Os valores de pH evidenciados com o uso da fita reagente pré e pós implante também foram considerados normais de acordo com o laboratório onde a análise foi conduzida.

Os valores de mediana da pró-MMP2 no LCR dos equinos do GC e GT pré e pós implante foram similares ao valor médio ( $43,12 \pm 13,90$ ) evidenciado por Melo *et al.* [17] em cães saudáveis utilizados como grupo controle em um estudo conduzido recentemente com o objetivo de avaliar a expressão das MMP2 e MMP9 no LCR e soro de cães com sintomas neurológicos e leishmaniose visceral. Os nossos resultados não foram confrontados com outros estudos conduzidos na espécie equina pela dificuldade de encontrar na literatura informações sobre a detecção de MMPs no LCR desta espécie. Desta forma, os valores observados particularmente no pré implante para pró-MMP2, servirão de referência para novos estudos.

Da mesma forma, as variáveis hematológicas também não sofreram mudanças ( $P>0,05$ ) entre os grupos e momentos estudados, demonstrando assim não haver influência dos tratamentos em relação a essas variáveis.

#### 4.6. Expressão de metaloproteinases tipo 2 e 9 no LCR

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases zinco e cálcio dependentes responsáveis pela degradação e remodelação da matriz extracelular, incluindo o colágeno, a elastina, a gelatina, glicoproteínas e proteoglicanos [37]. Uma característica importante das MMPs é a latência. Essas proteases são secretadas em uma pró-forma (inativa/latente) requerendo para ativação uma variedade de mecanismos, antes de desenvolverem suas funções [38]. No presente estudo somente foi identificada a atividade da pró-MMP-2 (gelatinase A) no LCR, sem diferenças ( $P>0,05$ ) entre os grupos e momentos estudados. De acordo com Rosemberg [38], a gelatinase A é uma molécula constitutivamente expressa que se encontra normalmente no tecido cerebral e LCR. A MMP-2 já foi evidenciada nos processos astrocíticos do cérebro normal,



particularmente nos vasos adjacentes, nas células endoteliais e da pia. A presença de MMP-2 contida nos processos astrocíticos próximo ao fluido que controla a superfície do cérebro sugere a função desta metaloenzima no balanço do fluido normal do cérebro ou na regulação da barreira hematoencefálica. Bergman *et al.* [39], estudando 23 cães clinicamente saudáveis encontraram também no LCR resultados semelhantes ao de nosso estudo, onde somente fora observada a presença da pró-MMP-2 e ausência da MMP-9.

A não evidência da MMP-9 (gelatinase B) latente ou ativada, principalmente no grupo tratado com CTMs, auxilia a hipótese de que a via de aplicação testada pelo nosso grupo é realmente segura, haja vista que de acordo com Rosemberg [38] a MMP-9 é marcadamente desregulada nas condições inflamatórias de muitas enfermidades. A elevada expressão da MMP-9 tem sido observada no LCR de pacientes humanos e animais acometidos por enfermidades neurológicas que envolvem intensa neuroinflamação, como leishmaniose visceral [17], acidente traumático cerebral [40], meningites [41, 42] e esclerose múltipla [43].

## 5. CONCLUSÃO

O implante intratecal das CTMs autólogas provenientes da MO não provoca alterações no exame neurológico, em variáveis hematológicas, líquóricas e na expressão das MMPs. Portanto a via intratecal, através do espaço atlanto-occipital, é segura para o implante das CTMs, sob o ponto de vista clínico, ocorrência de reações inflamatórias, alérgicas e imunes, sendo uma alternativa viável para terapia celular das encefalopatias e mielopatias que acometem os equinos.

**Agradecimento.-** À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Proc.2009/51431-6) e ao Fundunesp (Proc.00571/09), e CNPQ (Proc. 481350/2009-8) pelo auxílio financeiro

## REFERÊNCIAS

[1] Wright KT, Masri WE, Osman A, Chowdhury J, Johnson WEB. Concise review: bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical Applications. *Stem Cell* 2011; 29: 169-78.

- [2] Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med* 2010; 5: 121-43.
- [3] Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenius Johnson JR, Moore RM, et al. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet Surg* 2008; 37: 713-24.
- [4] Crovace A, Lacitignola L, De Siena R, Rossi G, Francioso E. Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet Res Commun* 2007; 31: 281-3.
- [5] Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Galimberti S, Dini F, Carulicci F, et al. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng* 2007; 13: 2949-55.
- [6] Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J Orthop Res* 2007; 25: 913-25.
- [7] Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res* 2008; 69: 928-37.
- [8] Carvalho AM, Alves ALG, Oliveira PGG, Alvarez LEC, Laufer-Amorim R, Hussni CA, et al. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J Equine Vet Sci* 2011; 31: 26-34.
- [9] McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, et al. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopic* 2011; 27: 1552-61.
- [10] Maia L, Amorim RM, Alvarenga FCL, Alvarenga ML, Joaquim JGF, Neto JFL, et al. Uso de la terapia celular en el tratamiento de parálisis del nervio facial: Reporte de caso. In: II Congreso Latinoamericano de Neurología Veterinaria, 2., 2009, Bogotá Proceedings... Bogotá: Neurolatinvet, 2009. p.1-6.
- [11] Barreira APB, Bacellar DTL, Kiffer RG, Alves ALG. Punção aspirativa de medula óssea em equinos adultos para obtenção de células-tronco. *Rev Bras Ciênc* 2008; 15: 56-9.
- [12] Maia L, Landim-Alvarenga FC, Golim MA, Sudano MJ, Taffarel MO, De Vita B, et al. Potential of neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Pesq Vet Bras* 2012; 32: 444-52.
- [13] Mayhew IG. Collection of cerebrospinal fluid from the horse. *Cornell Vet* 1975; 65: 500-11.

- [14] Malikides N, Hodgson DR, Rose RJ. Neurology. In: Rose RJ, Hodgson DR, editors. Manual equine practice. Philadelphia: Saunders; 2000, 503- 75.
- [15] Mayhew IGJ. Neurologic evaluation. In: Mayhew IGJ. Large Animal Neurology. West Sussex: Wiley-Blackwell Publishing; 2009, 11- 46.
- [16] Mayhew IG, De Lahunta A, Whitlock RH. Spinal cord disease in the horse. The Cornell Vet 1978; 68: 24-105.
- [17] Melo GD, Marcondes M, Machado GF. Canine cerebral leishmaniasis: Potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. Vet Immunol Immunopathol 2012; 148: 260-6.
- [18] Marangoni NR, Melo GD, Moraes OC, Souza MS, Perri SHV, Machado GF. Levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. Parasite Immunol 2011; 33: 330-4.
- [19] Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RKW. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. Equine Vet J 2011; 43: 288-94.
- [20] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krauses DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8: 315-17.
- [21] Carvalho AM, Alves ALG, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, Oliveira PGG, et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. Vet Immunol Immunop 2009; 132: 303-6.
- [22] Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, et al. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. Am J Vet Res 2007; 68: 1095-1105.
- [23] Guest DJ, Ousey JC, Smith MRW. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. Stem Cells and Cloning: Adv Appl 2008; 1: 1-9.
- [24] Radcliffe CH, Flaminio JBF, Fortier L. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. Stem Cells Dev 2010; 19: 269-81.
- [25] Martinello T, Bronzini I, Maccatrozoo L, Lacopetti I, Sampaolesi M, Mascarello F, et al. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. Tissue Eng Part C 2010; 16: 771-81.

- [26] Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, et al. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:347–53.
- [27] Iacono E, Brunori L, Pirrone A, Pagliaro PP, Ricci F, Tazzari PL, et al. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction* 2012; 143: 311-25.
- [28] Mensing N, Gasse H, Hambruch N, Haeger JD, Pfarrer C, Staszyc C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Vet Res* 2011; 7: 1-13.
- [29] Dimarakis I, Levicar N. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem cells* 2006; 24: 1407-8.
- [30] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem cells* 2006; 24: 1409-10.
- [31] Toupadakis CA, Woung A, Genetos DC, Cheung WK, Borjesson DL, Leach JK, et al. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am J Vet Res* 2010; 71: 1237-45.
- [32] Lim JY, Jeong CH, Jun JA, Kim SM, Ryu CH, Hou Y et al. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2: 1-13.
- [33] Yang WZ, Zhang Y, Wu F, Min WP, Minev B, Zhang M, et al.. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy form degenerative conditions. *J Transl Med* 2010; 8: 1-6.
- [34] Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. Burlington: Elsevier; 2008.
- [35] Green E, Constantinescu G, Kroll R. Equine cerebrospinal fluid: Analysis. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1993; 15: 288–301.
- [36] Mayhew IG, Whitlock RH, Tasker JB. 1977. Equine cerebrospinal fluid: reference values of normal horses. *Am J Vet Res* 1977; 38: 1271–4.
- [37] Verma PR, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q) SARs. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 2223-68.

- [38] Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 2002; 39: 279-91.
- [39] Bergman RL, Inzana KD, Inzana TJ. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1359-62.
- [40] Grossete M, Phelps J, Arko L, Yonas H, Rosemberg GA. Elevation of MMP-3 and MMP-9 in CSF and blood in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2009; 65: 702-4.
- [41] Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Holländer GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 80-4.
- [42] Williams PL, Leib SL, Kamberi P, Leppert D, Sobel RA, Bifrare Y, et al. Levels of matrix metalloproteinase-9 within cerebrospinal fluid in a rabbit model of coccidioidal meningitis and vasculitis. *J Infect Dis* 2002; 186: 1692-5.
- [43] Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 1998; 121: 2327-34.

### Legendas das Tabelas

**Tabela 1.** Mediana das variáveis hematológicas (hematócrito, proteína plasmática total, plaquetas, fibrinogênio, leucócitos totais, segmentados, linfócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos) obtidas antes e após os tratamentos nos equinos dos grupos tratados (GT) e controle (GC).

**Tabela 2.** Mediana das variáveis líquóricas (densidade, pH, hemácias, células nucleadas, globulinas, proteínas, glicose, e pró-MMP2) obtidas antes e após os tratamentos nos equinos dos grupos tratados (GT) e controle (GC).

### Legenda das Figuras

Fig. 1. Linha do tempo. Previamente aos tratamentos (TRA) foi realizada a colheita da medula óssea, cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais (CTMs). No dia 1 (D1) foi realizada a colheita do sangue periférico (CS1), seguida da colheita do

líquor (CL1) e finalmente o tratamento dos grupos estudados. No dia 6 (D6), pós-tratamento, foi realizada a colheita de novas amostras de sangue periférico (CS2) e líquido (CL2) dos animais estudados. Durante trinta dias todos os animais foram monitorados mediante exame físico e neurológico.

Fig. 2. Ensaio de diferenciação das células-tronco mesenquimais para as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. (A) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de cálcio marcada com Alizarin red. (B) Diferenciação adipogênica. Note a presença intracelular de gotículas de gordura coradas com Oil red. (C, D) Diferenciação condrogênica. (C) Coloração com azul de toluidina. Nota-se a presença de áreas metacromáticas em rósea (seta vermelha) indicando a presença de matriz extracelular contendo proteoglicanos. (D) Coloração com Alcian blue. Nota-se a presença de áreas em azul indicando a presença de matriz extracelular contendo proteoglicanos além da presença de lacunas (seta vermelha) possivelmente contendo condrócitos. Bar = 50µm.

Fig.3. Zimograma representativo do LCR dos equinos dos grupos tratado e controle após os implantes. Note a presença apenas das bandas gelatinolítica para a pró-MMP2 (latente), não sendo observada a atividade da MMP2 na forma ativa e da MMP9. Bandas gelatinolíticas Grupo tratado: 10, 14, 16, 17, 19; Grupo controle: 11, 12, 13, 15, 18; PM: banda controle.

Tabela 1.

Variáveis	Antes do implante		Após o implante		
	Grupos		Grupos		
	GC	GT	GC	GT	
<b>Hematócrito (%)</b>	<b>Mediana</b>	36a	33a	29a	32a
<b>Proteína (mg/dL)</b>	<b>Mediana</b>	7,2a	7,6a	7,0a	7,6a
<b>Plaquetas (plt/<math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Mediana</b>	182000a	151000a	193000a	176000a
<b>Fibrinogênio (mg/dL)</b>	<b>Mediana</b>	200a	200a	400a	400a
<b>Leucócitos (células <math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Mediana</b>	7300a	11000a	7300a	8700a
<b>Segmentados (células <math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Mediana</b>	3790a	4290a	4200a	5307a
<b>Linfócitos (células <math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Mediana</b>	2714a	4712a	2709a	3132a
<b>Eosinófilos (células <math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Mediana</b>	448a	284a	248a	174a
<b>Basófilos (células <math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Mediana</b>	0a	0a	126a	315a
<b>Monócitos (células <math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Mediana</b>	192a	426a	248a	312a

Medianas seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha, não se diferem ( $P>0,05$ ) pelo teste de Wilcoxon.

Tabela 2.

Variáveis	Antes do implante		Após o implante		
	Grupos		Grupos		
	GC	GT	GC	GT	
Densidade	<b>Mediana</b>	1006a	1006a	1006a	1006a
pH	<b>Mediana</b>	8,5a	8,5a	8,5a	8,5a
Hemácias (células $\mu\text{L}^{-1}$ )	<b>Mediana</b>	0a	1a	3a	1a
Cél. nucleadas (células $\mu\text{L}^{-1}$ )	<b>Mediana</b>	0a	0a	4a	0a
Globulinas	<b>Mediana</b>	0a	0a	0a	0a
Proteína ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	<b>Mediana</b>	34a	46,1a	42,5a	58,2a
Glicose ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	<b>Mediana</b>	54a	57a	57a	55a
pró-MMP2 (U.A)	<b>Mediana</b>	34,43a	31,86a	42,8a	28,69a

Medianas seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha, não se diferem ( $P>0,05$ ) pelo teste de Wilcoxon. U.A: unidades arbitrárias.



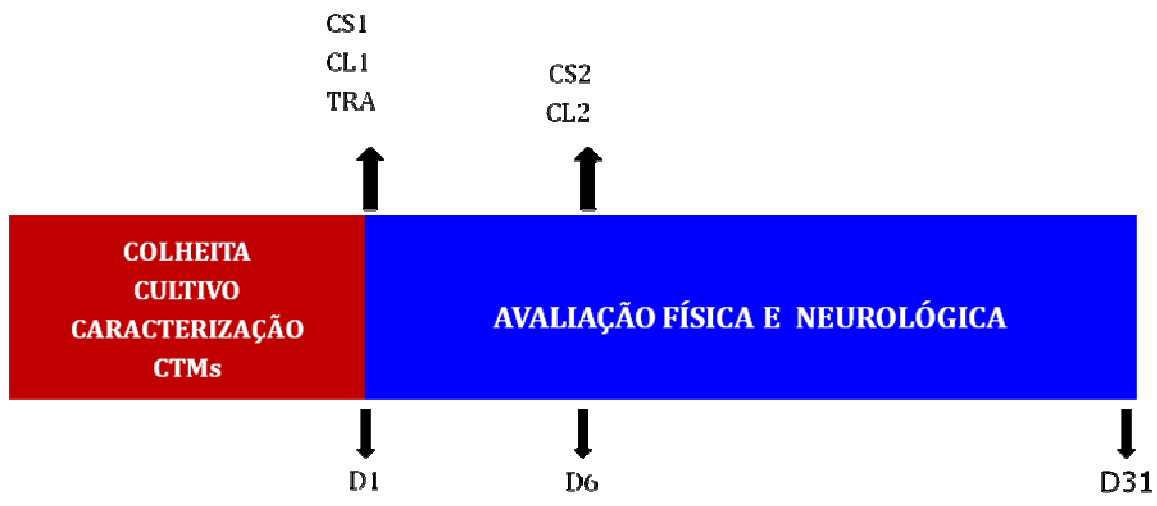


Fig. 1

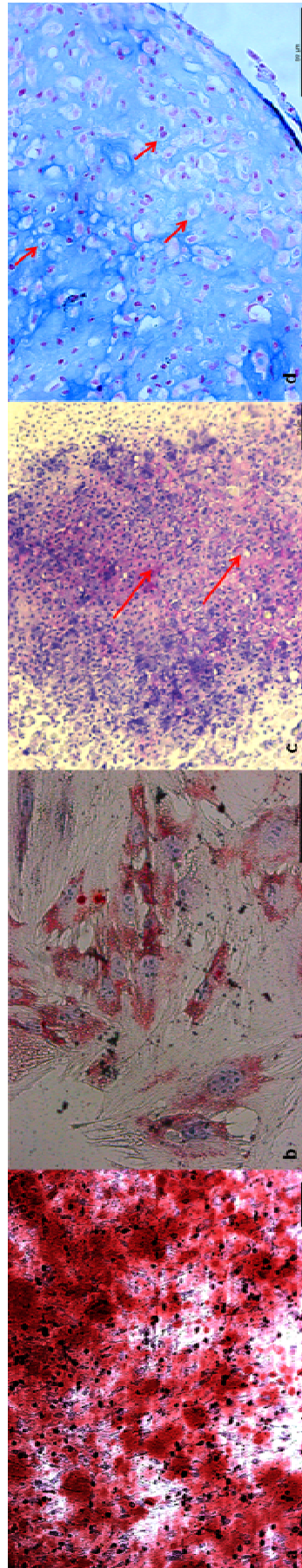


Fig. 2.

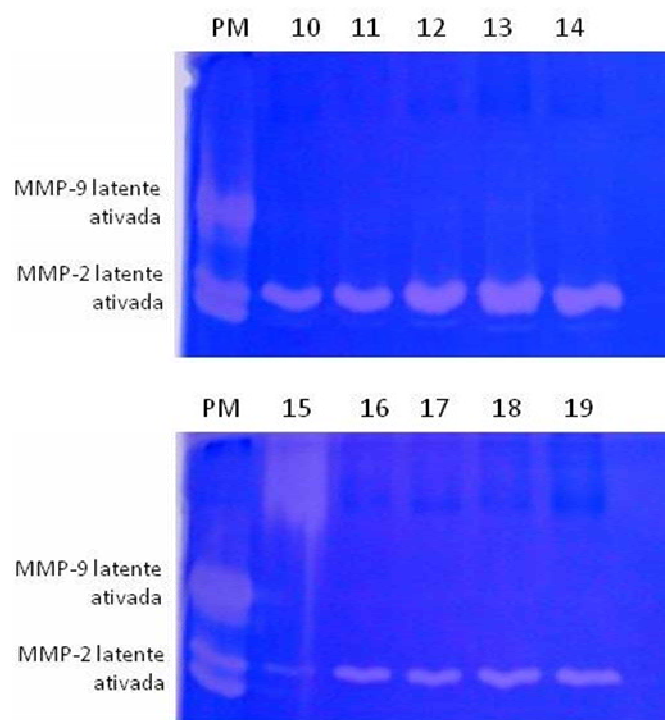


Fig. 3.

## **Capítulo 4**

Artigo Científico nas normas, submetido e publicado no periódico  
“Pesquisa Veterinária Brasileira”

## Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino<sup>1</sup>

Leandro Maia<sup>2\*</sup>, Fernanda C. Landim-Alvarenga<sup>3</sup>, Márjorie de Assis Golim<sup>4</sup>, Mateus José Sudano<sup>3</sup>, Marilda O. Taffarel<sup>5</sup>, Bruna De Vita<sup>3</sup>, Natália Pereira P. Freitas<sup>2</sup> e Rogério M. Amorim<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Maia L., Landim-Alvarenga F.C., Golim M.A., Sudano M.J., Taffarel M.O., De Vita B., Freitas N.P.P. & Amorim R.M. 2012. [Potential of neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells from equine bone marrow.] Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: [leandromvet@hotmail.com](mailto:leandromvet@hotmail.com)

The first studies showing the potential of neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow (BM) were conducted in camundogs and humans in the early 2000s. After this period, the number of research and publications with the same purpose increased, but with rare or scarce studies in horses. The aim of this study was to evaluate *in vitro* neuronal transdifferentiation potential of MSCs from equine BM using two protocols: P1 (forksolin and retinoic acid) and P2 (2-βmercaptoethanol). After confirming the mesenchymal lineages, by positivity for the marker CD90 (=97.94%), negative for the marker CD34 and positive response for osteogenic differentiation, MSCs were subjected to neural transdifferentiation (P1 and P2) for morphological analysis and expression of neural markers GFAP and β3 tubulin by flow cytometry. The results revealed morphological changes in varying degrees between the tested protocols. In protocol 1, twenty four hours after incubation with the media of neural differentiation, a large proportion of cells (> 80%) had similar morphology to neural cells, characterized by retraction of cellular body and a large number of cytoplasmic extension (filopodia). However, comparatively, within the first 30 minutes after exposure to the antioxidant β-mercaptoethanol (P2) MSCs showed rapid morphological changes characterized mainly by retraction of cellular body and less cytoplasmic extension. It was also evidenced with the use of this protocol, lower cellular adhesion after exposure to media when compared to P1. Regarding the immunophenotyping analysis it was observed a higher (P<0.001) expression of the markers GFAP and β3 tubulin at the end of P2 compared to P1. The ability of MSCs to generate cell types related to neural lineage is complex and multifactorial, depending not only of inducing agents, but also the environment in which these cells will be cultivated. Thus a greater number of studies are necessary to better understand the process of neural transdifferentiation of MSCs from equine.

INDEX TERMS: Horse, neural differentiation, adult stem cells, neural markers.

<sup>1</sup> Recebido em.

Aceito para publicação em.

<sup>2</sup> Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. Bolsista FAPESP. \*Autor para correspondência: [leandromvet@hotmail.com](mailto:leandromvet@hotmail.com)

<sup>3</sup> Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-Unesp, Botucatu, SP.

<sup>4</sup> Hemocentro da Faculdade de Medicina, Unesp, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP.

<sup>5</sup> Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ-Unesp, Cx. Postal 560, Botucatu, SP.

**RESUMO.-** Os primeiros estudos demonstrando o potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais (CTMs) provenientes da medula óssea (MO) foram conduzidos em camundogos e humanos no início da década de 2000. Após esse período, o número de pesquisas e publicações com o mesmo propósito tem aumentado, mas com raros ou escassos estudos na espécie equina. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial *in vitro* da transdiferenciação neural das CTMs provenientes da MO de equinos utilizando-se dois protocolos: P1 (forksolin e ácido retinóico) e P2 (2- $\beta$ -mercaptoetanol). Após a confirmação das linhagens mesenquimais, pela positividade para o marcador CD90 ( $\bar{x}$  = 97,94%), negatividade para o marcador CD34 e resposta positiva a diferenciação osteogênica, as CTMs foram submetidas a transdiferenciação neural (P1 e P2) para avaliação morfológica e expressão dos marcadores neurais GFAP e  $\beta$ 3 tubulina por citometria de fluxo. Os resultados revelaram mudanças morfológicas em graus variados entre os protocolos testados. No protocolo 1, vinte quatro horas após a incubação com o meio de diferenciação neural, grande proporção de células (>80%) apresentaram morfologia semelhante a células neurais, caracterizadas por retração do corpo celular e grande número de projeções protoplasmáticas (filopodia). Por outro lado, de forma comparativa, já nos primeiros 30 minutos após a exposição ao antioxidante  $\beta$ -mercaptoetanol (P2) as CTMs apresentaram rápida mudança morfológica caracterizada principalmente por retração do corpo celular e menor número de projeções protoplasmáticas. Também ficou evidenciado com o uso deste protocolo, menor aderência das células após tempo de exposição ao meio de diferenciação, quando comparado ao P1. Com relação a análise imunofenotípica foi observado uma maior ( $P < 0,001$ ) expressão dos marcadores GFAP e  $\beta$ 3 tubulina ao término do P2 quando comparado ao P1. A habilidade das CTMs em gerar tipos celulares relacionados a linhagem neural é complexa e multifatorial, dependendo não só dos agentes indutores, mas também do ambiente no qual estas células são cultivadas. Desta forma um maior número de estudos é necessário para o melhor entendimento do processo de transdiferenciação neural a partir de CTMs de equinos

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Equino, diferenciação neural, células-tronco adultas, marcadores neurais.

## INTRODUÇÃO

O interesse terapêutico e biológico nas células-tronco (CT) tem aumentando nos últimos anos, fato esse demonstrado pelo número crescente de pesquisas e publicações na área. De acordo com Frisbie & Smith (2010), a grande atenção ou interesse no uso das CT está relacionado ao seu potencial de regeneração, o qual poderia ser atribuído aos efeitos parácrinos, migratórios, imunomoduladores, antiinflamatórios e antiapoptóticos já descritos na literatura (Brooke et al. 2007, Dahlgren 2009).

As CT podem ser definidas como células com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, além da capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas. (Pereira 2008). De acordo com a origem tecidual as CT podem ser classificadas em células-tronco adultas e embrionárias. As CT embrionárias são aquelas derivadas da massa celular interna do blastócito, sendo totipotentes ou capazes de se transformar em qualquer tipo celular, e por sua vez em um organismo inteiro. As CT adultas incluem as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e mesenquimais (CTMs), podendo ser isoladas de tecidos de origem mesodermal, tais como medula óssea, músculo, tendão, tecido adiposo (Dahlgren 2009), sangue periférico (Martinello et al. 2010), matrix do cordão umbilical (Hoynowski et al. 2007) e líquido amniótico (Lovati et al. 2011). As CTH são responsáveis pela produção da linhagem linfóide e mielóide e as CTMs são capazes de se diferenciar em tipos celulares de origem estromal, incluindo osso, músculo, cartilagem, tecido adiposo, ligamento e tendão (Dahlgren, 2009). Adicionalmente, na opinião de Chen et al. (2008), em condições

especiais essas células também possuem a capacidade de diferenciar em tecidos de origem ectodermal e endodermal, sendo facilmente isoladas e expandidas *in vitro*.

Os primeiros estudos demonstrando o potencial de transdiferenciação das CTMs em células neurais foram conduzidos por Woodbury et al. (2000) e Sanchez-Ramoz et al. (2000) que utilizaram células provenientes da medula óssea de humanos e roedores. Woodbury et al. (2000) utilizaram protocolos de transdiferenciação baseados em agentes químicos antioxidantes ( $\beta$ -mercaptoetanol, butilato de hidroxianisole, dimetilsulfóxido), enquanto Sanchez-Ramoz et al. (2000) testaram protocolos com ácido retinóico e fatores neurotrópicos em células previamente tratadas com EGF. No primeiro estudo as células apresentam rápida mudança morfológica, além da expressão de marcadores neurais. Atualmente, além da utilização dos agentes químicos, os protocolos baseiam-se na utilização de fatores de crescimento (Naghdi et al. 2009, Bae et al. 2011, Nourbakhsh et al. 2011), fatores neurotrópicos (Barzilai et al. 2008), líquido cefalorraquidiano autólogo (Ye et al. 2011) e fitoterapia (Hu et al. 2011). Particularmente na espécie equina, os estudos estão focados na demonstração da capacidade de diferenciação das CTMs-MO principalmente em tecidos de origem mesodermal, sendo inexistente ou escassa a avaliação do potencial de transdiferenciação neural. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de transdiferenciação neural das CTMs provenientes da medula óssea de equinos utilizando dois protocolos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizadas oito amostras de medula óssea (20 mL/amostra) provenientes de quatro equinos mestiços hípidos, de ambos os sexos e com idade entre 4 a 12 anos, selecionados mediante a avaliação clínica e hematológica prévia. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética e bem estar animal da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, campus Botucatu. Todos os procedimentos foram realizados sob as diretrizes internacionais para o cuidado e uso de animais experimentais.

### Colheita da medula óssea

A punção aspirativa da medula óssea (MO) foi realizada conforme a metodologia descrita por Barreira et al. (2008) com modificações. Para isso, os animais foram mantidos em estação, contidos em brete e sedados com 0,5 mg kg<sup>-1</sup> xilazina (Sedomin®, Köning, ARG). Em seguida, foi realizada a tricotomia de uma área de 5 x 20 cm na região referente ao osso esterno de cada equino. Após a identificação da quinta esternebra foi realizado antissepsia e bloqueio anestésico local (Xylestesin® 2%, Cristália, BRA). Uma vez bem fixa a agulha de punção modelo Komiyashiki® dentro do esterno, o mandril foi retirado e se procedeu a aspiração da medula óssea com auxílio de duas seringas de 20 mL contendo 2 mL de heparina a 5000 UI/mL (Hemofol®, Cristália, BRA) e 2 mL de tampão Salina-Fosfato pH 7,2 (PBS® 1x, LGC Biotecnologia, BRA). Após a colheita, as amostras foram encaminhadas imediatamente ao laboratório e processadas.

### Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais

As amostras de MO foram previamente filtradas utilizando-se um equipo de transfusão (Biosani®, BRA), sendo em seguida procedida à primeira centrifugação (Centrifuga Hermle Z200A, GER) a 250 g por 10 minutos para descarte da gordura e plasma sobrenadante. Ao material remanescente adicionou-se meio DMEM baixa glicose (Invitrogen Gibco®, USA) na proporção 1:1, sendo posteriormente acrescido o Ficoll-paque™ premium 1073 (GE Healthcare Life Sciences®, SWE) lentamente (1:1) para separação da fração de células mononucleares a 350 g por 30 minutos. A fração mononuclear foi aspirada e lavada duas vezes em meio DMEM baixa glicose a 250 g por 10 minutos. Após a última lavagem o *pelet* de células mononucleares foi suspenso e cultivado

em meio DMEM baixa glicose/F12 (1:1), 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (1%) e anfotericina B (1,2%) (Invitrogen Gibco®, USA) a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>. O meio de manutenção foi trocado a cada 2 ou 3 dias até a confluência celular mínima de 80%, onde se procedeu a tripsinização para caracterização e diferenciação dos subcultivos das CTMs.

### **Análise na citometria de fluxo para os marcadores de superfície celular**

A caracterização imunofenotípica das CTMs previamente a transdiferenciação neural foi realizada ao final do cultivo primário no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson and Company, USA), utilizando os anticorpos monoclonais mouse anti-rat CD90 (Caltag Laboratories, EUA) e mouse anti-human CD34 (Becton Dickinson and Company, USA) marcados com a sonda isoticiato de fluoresceína (FITC). Durante a análise foram contabilizados 10.000 eventos.

### **Diferenciação osteogênica**

Após confluência de 80% em cultivo primário, as CTMs foram tripsinizadas com Triple express (Invitrogen Gibco®, USA) e acondicionadas em placas de seis poços (Sarstedt®, USA) com meio DMEM/F12 (1:1) acrescido de 20% soro fetal bovino, antibiótico e antifúngico. Quarenta e oito horas após a incubação, o meio de manutenção foi removido e o meio de diferenciação osteogênico STEMPRO® (Invitrogen Gibco®, USA) foi acrescido ao subcultivo. O meio foi trocado a cada dois a três dias e, a confirmação da diferenciação osteogênica foi realizada mediante a demonstração da deposição de matriz de cálcio utilizando o método de coloração histológico com Alizarin red pH 4,2 (Sigma-Aldrich Corp, USA).

### **Diferenciação neural**

A diferenciação neural foi conduzida testando-se dois protocolos de diferenciação para CTMs previamente caracterizadas. Os protocolos utilizados estão descritos abaixo:

Protocolo 1 (P1)- Meio basal para células-tronco neurais, acrescido de 5 mM forskolin (0,001%) e 500 µM ácido retinóico (0,002%) (Millipore Corporation®, USA) por 48 horas.

Protocolo 2 (P2)- Meio DMEM baixa glicose acrescido de 1mM 2-βmercaptoetanol (0,007%) (Sigma-Aldrich Corp®, USA) (Woodebury et al., 2000 com modificações) por 18 horas.

Protocolo Controle - CTMs indiferenciadas não submetidas a tratamento e mantidas em meio DMEM baixa glicose/F12 na proporção de 1:1 acrescido de 20%, soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (1%) e anfotericina B (1,2%) (Invitrogen Gibco®, USA).

As CTMs em primeira passagem e prévia caracterização foram mantidas em meio de manutenção do protocolo controle até a confluência celular de 80%. Uma vez confluentes o meio de manutenção foi removido e os meios de diferenciação foram acrescidos. No protocolo 1, previamente a indução neural as células foram mantidas por 18 horas em meio basal para células-tronco neurais acrescido de 10 ng/mL fator de crescimento fibroblástico básico (Millipore Corporation®, USA). Após esse período foi adicionado ao meio basal o forskolin e ácido retinóico durante dois dias nas proporções discriminadas acima e com troca diária.

No protocolo 2 as células não foram submetidas a pré-diferenciação, conforme descrito por Woodebury et al. (2000), pois em estudos pilotos prévios verificamos que as células modificavam-se muito morfológicamente logo na primeira hora de tratamento, interferindo assim na avaliação do protocolo proposto.

Após o período de diferenciação as células foram preparadas para análise fenotípica utilizando-se os marcadores GFAP e β3 tubulina. O processo de diferenciação, bem como de avaliação foram realizados em quadruplicatas para cada protocolo proposto.



### **Citometria de fluxo para os marcadores neurais**

A análise fenotípica foi conduzida utilizando os anticorpos primários anti GFAP (Invitrogen Gibco®, USA) e anti  $\beta$ 3 tubulina (Millipore Corporation®, USA) marcados com Alexa flúor 488. Para isso, as células provenientes de P1, P2 e CTMs indiferenciadas foram tripsinizadas, resuspendidas em PBS e acondicionadas em tubos de polipropileno (Becton Dickinson® and Company, USA). Previamente a incubação com os marcadores, as células foram fixadas e permeabilizadas com o kit (Becton Dickinson® and Company, USA) para facilitar a difusão dos anticorpos utilizados. Em seguida, os anticorpos foram adicionados e as células incubadas no escuro por uma hora para leitura no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson® and Company, USA).

### **Análise estatística dos dados**

Para análise estatística, a variável dependente binomial (expressão das proteínas na citometria fluxo) dos diferentes protocolos foi analisada através do teste de regressão logística utilizando o PROC LOGISTIC do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Quando o efeito de tratamento foi significativo utilizou-se o LSD com o comando LSMEANS PDIF do PROC GLM do SAS. Fontes de variação no modelo, incluindo tratamento, foram consideradas como efeito fixo. Como efeito aleatório adotou-se os animais (tratamento). Os resultados estão apresentados como porcentagem. Foi adotado o nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

As células provenientes da fração mononuclear da MO apresentaram aderência ao plástico entre 24 e 48 horas e morfologia fibroblastóide inicialmente com quatro dias de cultivo. No período compreendido entre 15 a 22 dias (Mediana= 22) de cultivo foi alcançada a confluência celular  $\geq 80\%$ , sendo conduzida análise imunofenotípica para os marcadores CD90 e CD34 previamente a diferenciação neural.

A análise revelou elevada expressão do marcador CD90 ( $\bar{x} = 97,94\%$ ) e ausência de expressão para o marcador CD34, conforme demonstrado na Figura 1. Adicionalmente, o potencial de diferenciação das CTMs em outra linhagem mesenquimal foi confirmado pela diferenciação osteogênica 10 dias após a exposição ao meio de diferenciação. As CTMs inicialmente com morfologia fibroblastóide adquiriram morfologia predominantemente poligonal e depositaram grande quantidade de matriz extracelular de cálcio comprovada pela coloração positiva com Alizarim red (Fig.2).

A exposição das CTMs aos protocolos de diferenciação neural ocasionaram mudanças morfológicas em graus variados. No protocolo 1, após a exposição ao meio de pré diferenciação, as CTMs demonstraram pequena retração celular. Vinte quatro horas após a incubação com o meio de diferenciação neural do protocolo 1, grande proporção ( $>80\%$ ) de células apresentaram morfologia semelhante a células neurais, caracterizadas por retração do corpo celular e grande número de projeções protoplasmáticas (filopodia) que se intensificaram ao término das 48 horas de exposição ao meio de diferenciação (Fig.3). Por outro lado, de forma comparativa, logo após a exposição ao antioxidante  $\beta$ -mercaptoetanol (P2), no protocolo 2, as CTMs apresentaram rápida mudança morfológica caracterizada principalmente por retração do corpo celular e menor número de projeções protoplasmáticas (Fig.4). Também ficou evidenciado com o uso deste protocolo, menor aderência das células após tempo de exposição ao meio de diferenciação, quando comparado ao P1.

Com relação a análise fenotípica foi observada uma maior ( $P < 0,001$ ) expressão do GFAP em P2 (95,2%) e no controle (91%) em comparação ao P1 (76,8%). Diferenças ( $P = 0,3095$ ) entre P2 e o controle não foram observadas. Já o marcador  $\beta$ 3 tubulina foi expresso em maior ( $p < 0,001$ ) proporção no P2 (86%), seguido de P1 (78,5%) e controle (69,1%). Os histogramas referentes à análise fenotípica estão apresentados na Figura 5. É

importante ressaltar, que de forma surpreendente as CTMs que não foram submetidas a nenhum tratamento também expressaram ambos os marcadores neurais (Fig.5).

## DISCUSSÃO

O potencial das células tronco mesenquimais (CTMs) de transdiferenciar em certos tipos de células neurais tem despertado grande interesse, fomentando diversas pesquisas que visam o uso terapêutico deste tipo celular para o tratamento de diversas enfermidades de origem neurológica. Entretanto, dados claros e inequívocos em relação a esta transdiferenciação ainda precisam ser obtidos para fundamentar a validade de tais terapias.

No presente trabalho, as CTMs isoladas da medula óssea de equinos adultos foram adequadamente caracterizadas de acordo com critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para CTMs humanas (Dominici et al. 2006), ou seja, apresentaram características de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, elevada expressão do marcador CD90 (>95% positividade), negatividade de expressão ao marcador de células hematopoiéticas CD34 e responderam positivamente a diferenciação osteogênica. Duas ou mais dessas características também foram encontradas em outros estudos durante a caracterização de CTMs equinas provenientes do tecido adiposo (Carvalho et al. 2009, Carvalho et al. 2011), medula óssea (Arnhold et al. 2007, Guest et al. 2008, Radcliffe et al. 2010), sangue periférico (Martinello et al. 2010) e matriz do cordão umbilical (Hoynowski et al. 2007).

Na última década diversos tratamentos tem sido descritos visando a indução da diferenciação de CTMs em precursores neurais em diferentes espécies. Todos os protocolos utilizados até o momento podem ser divididos em três categorias básicas: 1) uso de agentes químicos; 2) uso de fatores de crescimento, e 3) cultivo de neuro-esfera, bem como a combinação entre estas categorias (Montzka et al. 2009). Neste experimento foram testados dois protocolos de indução química da diferenciação neural, sendo que no primeiro deles as células foram pré-tratadas com o fator de crescimento bFGF. Em ambos os protocolos observou-se mudança morfológica após o tratamento, sendo que esta ocorreu de forma mais abrupta no P2. Resultados semelhantes foram relatadas por Woodbury et al. (2000) utilizando o mesmos agentes químico e por Mammadov et al. (2011) com ácido retinóico. Da mesma forma Hu et al. (2011) observaram alterações morfológicas usando *Salvia miltiorrhiza* e Nourbakhsh et al. (2011) utilizando fatores de crescimento.

Recentemente Mammadov et al. (2011) demonstraram que as CTMs submetidas a transdiferenciação neural com ácido retinóico modificam lentamente sua morfologia, enquanto que o uso de agentes químicos como o  $\beta$ -mercaptoetanol, o DMSO, e o KCl promoveram uma rápida mudança atribuída a um artefato técnico devido ao enrugamento celular e não a aquisição da morfologia neuronal. Segundo estes autores, mudanças morfológicas mais lentas estão correlacionadas com a regulação de genes que requerem tempo para conversão em um tipo celular totalmente diferente, enquanto as mudanças rápidas parecem ser simplesmente decorrentes da ação tóxica dos compostos. Esta mesma opinião é compartilhada por Neuhuber et al. (2004) que observaram que as mudanças morfológicas para o fenótipo neural durante a transdiferenciação com uso de agentes químicos podem ser resultantes da quebra do citoesqueleto e retração da borda celular. No presente trabalho a utilização do  $\beta$ -mercaptoetanol foi comparada a associação do ácido retinóico com o forskolin. O forskolin é um agente ativador da adenilato ciclase e está relacionado aos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC), sendo considerado um dos melhores indutores da diferenciação neural para CTMs (Jori et al., 2005). Entretanto, de acordo com Zang et al. (2011) a mudança morfológica causada pelo AMPC nas CTMs também é ocasionada por alterações do citoesqueleto e enrugamento celular, não sendo acompanhada por modificações da expressão gênica das células.

A estimativa da diferenciação neural tem sido fortemente baseada na morfologia das células, e na expressão de marcadores neurais (Deng et al. 2001, Jori et al. 2005). Apesar de ambos os protocolos utilizados, no presente experimento, induzirem alterações na morfologia celular que estão associadas a modificações do citoesqueleto, indicando uma ação inespecífica, a expressão de marcadores neurais foi detectada com sucesso. A expressão dos marcadores gliais (GFAP) e/ou neurais ( $\beta$ 3 tubulina) observadas na análise fenotípica após o tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol (P2), bem como com ácido retinóico e forksolin (P1) também foram relatadas por Safford et al. (2004), Kingham et al. (2007), Bae et al. (2011), Nourbakhsh et al. (2011) e Ni et al. (2010) utilizando diferentes protocolos de “diferencial neural”. Neste experimento a análise imunofenotípica demonstrou maior expressão dos marcadores GFAP e  $\beta$ 3 tubulina no P2 comparativamente ao P1. Apesar disso a quantidade de células aderidas no P1, bem como a manutenção do “fenótipo neural” foi qualitativamente superior a observada no P2. Essa melhor aderência e integridade celular observadas em P1 podem ser decorrentes da menor toxicidade do forksolin associado ao ácido retinóico quando comparado ao  $\beta$ -mercaptoetanol.

Por outro lado, as CTMs que não foram submetidas a nenhum tratamento (controle) também expressaram ambos os marcadores neurais. Estudos utilizando diferentes técnicas (citometria de fluxo, imunocitoquímica, wester blot, PCR em tempo real) tem demonstrado que as CTMs provenientes de diferentes fontes não expostas ao meio de diferenciação neural expressam naturalmente alguns marcadores neurais como nestin,  $\beta$  III tubulina, GFAP, tau e tirosina hidroxilase (TH) em proporções variáveis (Safford et al. 2004, Kingham et al. 2007, Pelegrino 2009, Neuhuber et al. 2011). Adicionalmente tentativas prévias para identificar a expressão genética basal de CTMs revelaram a presença de genes característicos de células da linhagem endotelial, epitelial e neural, sendo que os RNAs relacionados a linhagem neural estão entre os 50 genes mais abundantes encontrados em outras linhagens celulares incluindo o marcador nestin (Montzka et al. 2009).

É conhecido que CTMs que permanecem longo tempo em cultura (4 ou 5 passagens) podem sofrer diferenciação espontânea para linhagens semelhantes a neurais sem o estímulo de citocinas ou agentes químicos (Tseng et al. 2007). Além disso, neuroesteróides como a dexametasona e o estradiol são moduladores conhecidos de várias proteínas gliais induzindo a diferenciação de CTMs em células da linhagem neural que expressam nestin e a  $\beta$  III tubulina (Bronzi et al. 2010). Embora, no presente estudo as CTMs utilizadas não tenham sido cultivadas por longos períodos, foi adicionado ao cultivo 20% de SFB, substância esta sabidamente rica em esteróides como os glicocorticóides e o estrógeno. Estes hormônios podem ter interagido com outros fatores de crescimento, também presentes no soro, desencadeando uma cascata de eventos em certa população de CTMs mais propensa a indução da diferenciação neural, o que resultou na expressão dos marcadores observada no grupo controle.

Entretanto, deve-se considerar que embora a presença destes marcadores moleculares seja um aspecto importante na caracterização da linhagem neural de células em cultivo, o principal aspecto a ser considerado ainda é a avaliação da funcionalidade das células transdiferenciadas através da mensuração do seu potencial de ação. Neste sentido, poucos são os trabalhos que comprovam a funcionalidade das células transdiferenciadas *in vitro*. Pelegrino (2009) estudando CTMs provenientes da polpa dentária humana observou, não só a expressão dos marcadores nestin e  $\beta$ 3 tubulina, mas também o disparo do potencial de ação nas células não submetidas a nenhum tratamento. Resultados como este ressaltam que a expressão natural de marcadores neurais em CTMs previamente a exposição aos “meios de diferenciação neural” e até mesmo a deflagração do potencial de ação, embora possam ocasionar dúvidas em relação a diferenciação para o fenótipo neural, são achados importantes por demonstrar a possibilidade de aplicação das CTMs em estado indiferenciado para diferentes enfermidades neurais.

A análise dos resultados do presente experimento demonstra que a habilidade das CTMs em gerar tipos celulares relacionados a linhagem neural é complexa e multifatorial, dependendo não só dos agentes indutores, mas também do ambiente no qual estas células são cultivadas. Além disso o presente experimento indica que a seleção celular baseada na aderência ao plástico, plasticidade e fenotipagem origina o desenvolvimento de uma população ainda heterogênea que responde de forma individual e imprevisível aos estímulos do meio de cultivo e fatores de indução de diferenciação. Desta forma um maior número de estudos é necessário para o melhor entendimento do processo de transdiferenciação neural a partir de CTMs de equinos.

**Agradecimentos-** À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Proc.2009/51431-6) e ao Fundunesp (Proc.00571/09), e CNPQ (Proc. 481350/2009-8) pelo auxílio financeiro.

### REFERÊNCIAS

- Arnhold S.J., Goletz I., Klein H., Stumpf G., Beluche L.A., Rohde C., Addicks K. & Litzke L.E. 2007. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 68: 1095-1105.
- Bae K.S., Park J.B., Kim H.S., Kim D.S., Park, D.J. & Kang S.J. 2011. Neuron-Like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Yonsei. Med. J.* 52: 401-412.
- Barreira A.P.B., Bacellar, D.T.L., Kiffer R.G. & Alves A.L.G. 2008. Punção aspirativa de medula óssea em equinos adultos para obtenção de células-tronco. *Revta Bras. Ciênc. Vet.* 15: 56-59.
- Barzilay R., Kan I., Ben-zur T., Bulvik S., Melamed E. & Offen D. 2008. Induction of Human Mesenchymal Stem Cells into Dopamine-Producing Cells with Different Differentiation Protocols. *Stem Cells Dev.* 17: 547-554.
- Bronzi D., Bramanti V., Tomassoni D., Laureanti F., Grasso S., Volsi G.L. & Avola R. 2010. Neural markers expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells treated with neurosteroids. *Neurochem. Res.* 35: 2154-2160.
- Brooke G., Cook M., Blair C., Han R., Heazlewood C., Jones B., Kambouris M., Kolla K., McTaggart S., Pelekanos R., Rice A., Rossetti T. & Atkinson K. 2007. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18:846-858.
- Carvalho A.M., Alves A.L.G., Golim M.A., Moroz A., Hussni C.A., Oliveira P.G.G. & Deffune E. 2009. The isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132: 303-306.
- Carvalho A.M., Alves A.L.G., Oliveira P.G.G., Alvarez L.E.C., Laufer-Amorim R., Hussni C.A. & Deffune E. 2011. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J. Equine Vet. Sci.* 31:26-34.
- Chen Y., Shao J.Z., Xiang L.X., Dong X.J. & Zhang G.R. 2008. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 815-820.
- Dahlgren L.A. 2009. Stem Cell Therapy, p.908-911. In: Robinson N.E. & Sprayberry K.A. (Eds), *Current Therapy in Equine Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier, St Louis.

- Deng W., Obrocka M., Fischer I. & Prockop D.J. 2001. *In vitro* Differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 148-152.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krauses D.S., Deans R.J., Keatings A., Prockop D.J. & Horowitz E.M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.
- Frisbie D.D. & Smith R.K.W. 2010. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet. J.* 42: 86-89.
- Guest D.J. Ousey J.C. & Smith M.R.W. 2008. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Cloning, Advances and Applications* 1: 1-9.
- Hoynowski S.M., Fry M.M., Gardner B.M., Leming M.T., Tucker J.R., Black L., Sand T. & Mitchell K.E. 2007. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362: 347-353.
- Hu L., Yu J., Li F., Chen B., Li L. & Liu G. 2011. Effects of *Salvia miltorrhiza* in neural differentiation of rat mesenchymal stem cells with optimized protocol. *J. Ethnopharmacol.* 136: 334-340
- Jori F.P., Napolitano M.A., Melone M.A., Cipolaro M., Cascino A., Altucci L., Peluso G., Giordano A. & Galderisi U. 2005. Molecular pathways involved in neural *in vitro* differentiation of marrow stromal stem cells. *J. Cell Biochem.* 94: 645-655.
- Kingham P.J., Kalbermatten D.F., Mahay D., Armstrong S.J., Wiberg M. & Terenghi G. 2007. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 207: 267-274.
- Lovati A., Corradeti B., Lange C.A., Recordati C., Bonacina E., Bizarro D. & Cremonesi F. 2011. Comparison of equine bone marrow-umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet. Res. Commun.* 35: 103-12.
- Mammadov B., Karakas N. & Isik S. 2011. Comparison of long-term retinoic acid-based neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 47: 484-491.
- Martinello T., Bronzini I., Maccatrozoo L., Lacopetti I., Sampaolesi M., Mascarello F. & Patruno M. 2010. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Eng. C, Methods* 16: 771-781.
- Montzka K., Lassonczyk N., Tschoke B., Neuss S., Fuhrmann T., Fransen R., Smeets R., Brook G.A. & Woltje M. 2009. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.* 10: 1-12.
- Naghdi M., Tiraihi T., Mesbah-Namin S.A. & Arabkheradmand J. 2009. Induction of Bone Marrow Stromal Cells into Cholinergic-Like Cells by Nerve Growth Factor. *Iran Biomed. J.* 13:117-123.

- Neuhuber B., Gallo G., Howard L., Kostura L., Mackay A. & Fisher I. 2004. Reevaluation of In vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.* 77: 192-204.
- Ni W.F., Yin L.H., Lu J., Xu H.Z., Chi L.G., Wu J.B. & Zhang Nu. 2010. In vitro neural differentiation of bone marrow stromal cells induced by cocultured olfactory ensheathing cells. *Neurosci. Lett.* 475: 99-103.
- Nourbakhsh N., Soleimani M., Taghipour Z., Karbalaie K., Seeidbehrouz M.S., Talebi A., Nadali F., Tanhaei S., Kiyani G., Nematollahi M., Rabiei F., Mardani M., Bahramiyan M., Torabinejad, M., Nasr-Esfahani M.H. & Baharvand H. 2011. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 189-195.
- Pelegrino K.O. 2009. Caracterização e diferenciação neural in vitro de células-tronco de polpa dentária de dente decíduo humano. Dissertação de Mestrado em Biologia e Genética, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 102p.
- Pereira L.V. 2008. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciência e Saúde Coletiva* 13: 7-14.
- Radcliffe C.H., Flaminio J.B.F., Fortier L. 2020. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells and Dev.* 19:269-281.
- Safford K.M., Safford S.D., Gimble J.M., Shetty A.K. & Rice H.E. 2004. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp. Neurol.* 187: 319-328.
- Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T.B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D.R. & Sanberg P.R. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* 164: 247-256.
- Tseng P.Y., Chen C.J., Sheu C.C., Yu C.W. & Huang Y.S. 2007. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long term culture. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 235-244
- Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J. & Black L.B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61: 364-370.
- Ye Y., Zeng Y.M., Wan M.R. & Lu X.F. 2011. Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural-like cells using cerebrospinal fluid. *Cell Biochem. Biophys.* 59: 179-184.
- Zhang L., Seitz L.C., Abramczyk A.M., Liu L. & Chan C. 2011. CAMP initiates early phase neuron-like morphology changes and late phase neural differentiation in mesenchymal stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 863-876.

### Legenda das Figuras

Fig. 1. Análise imunofenotípica FACS das células-tronco mesenquimais de equino para os marcadores CD34 e CD90. (A) Gráfico de distribuição e tamanho. (B) Controle. (C) Histograma do marcador CD90 expresso em média 97,94%. (D) Histograma do Marcador CD34 (negativo).

Fig.2. (A) CTMs indiferenciadas. Note a morfologia fibroblastóide característica das células. Obj.10x. (B,C) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de cálcio marcada com Alizarin red (seta azul). Obj.10x, 20x. (D) Note a mudança de morfologia fibroblastóide para poligonal das células após a diferenciação osteogênica (setas brancas). Obj.40x.

Fig.3. Diferenciação neural das CTMs com forksolin e ácido retinóico (P1). (a) CTMs indiferenciadas demonstrando morfologia fibroblastóide. (b) Células após exposição ao meio de pré diferenciação demonstrando discreta mudança morfológica. (c,d) Células apresentando retração do corpo celular (setas vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) após 24 horas de exposição a P1. (e,f) Células apresentando retração do corpo celular (setas vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) após 48 horas de exposição a P1. Obj.10x (c), 20x (a,b,d,e), 40x (f).

Fig.4. (A,B) Diferenciação neural das CTMs com 2- $\beta$ mercaptoetanol (P2). Células apresentando intensa retração do corpo celular (setas vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) Obj.10x (A), 20x (B).

Fig.5. Análise imunofenotípica FACS das células-tronco mesenquimais de equino transdiferenciadas (P1 e P2) e indiferenciadas (P3). (a, b, c) Histogramas das células tratadas com forksolin e ácido retinóico (P1); a- controle, b- GFAP, c-  $\beta$ 3 tubulina. d, e, f) Histogramas das células tratadas com 2- $\beta$ mercaptoetanol (P2); d- controle, e- GFAP, f-  $\beta$ 3 tubulina. g, h, i) Histogramas das CTMs indiferenciadas, não submetidas a nenhum tratamento (Controle); g- controle, h- GFAP, i-  $\beta$ 3 tubulina.

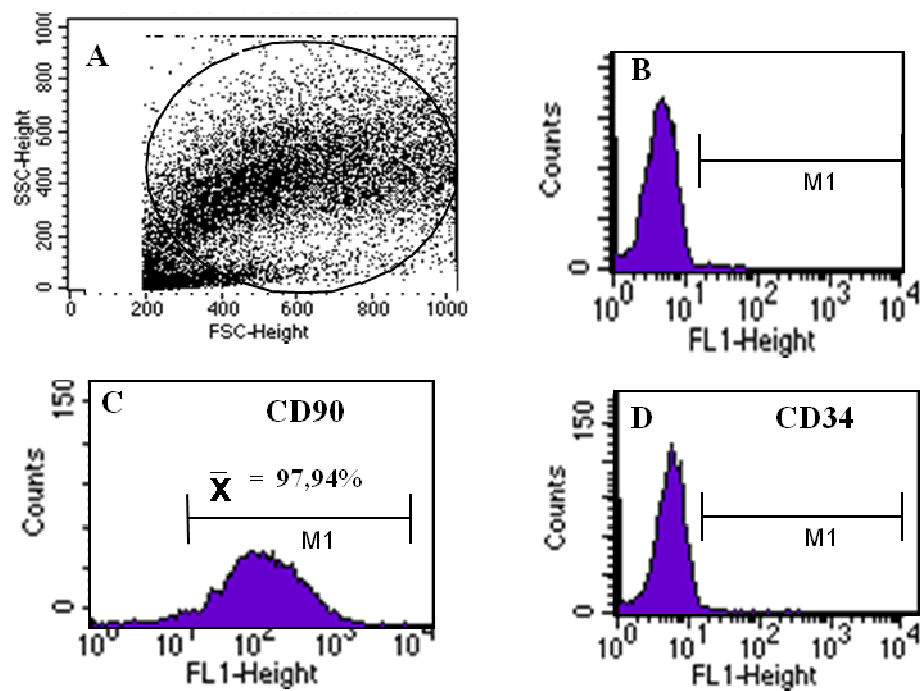


Figura 1.

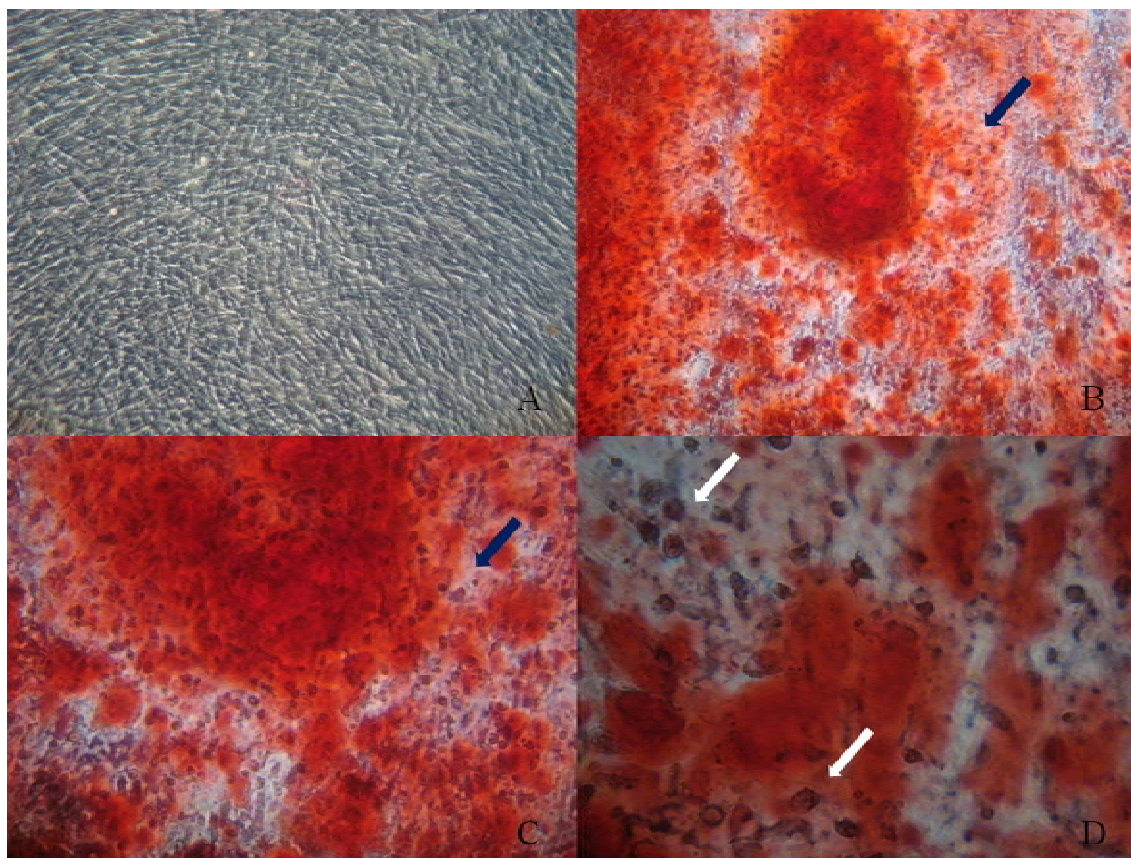
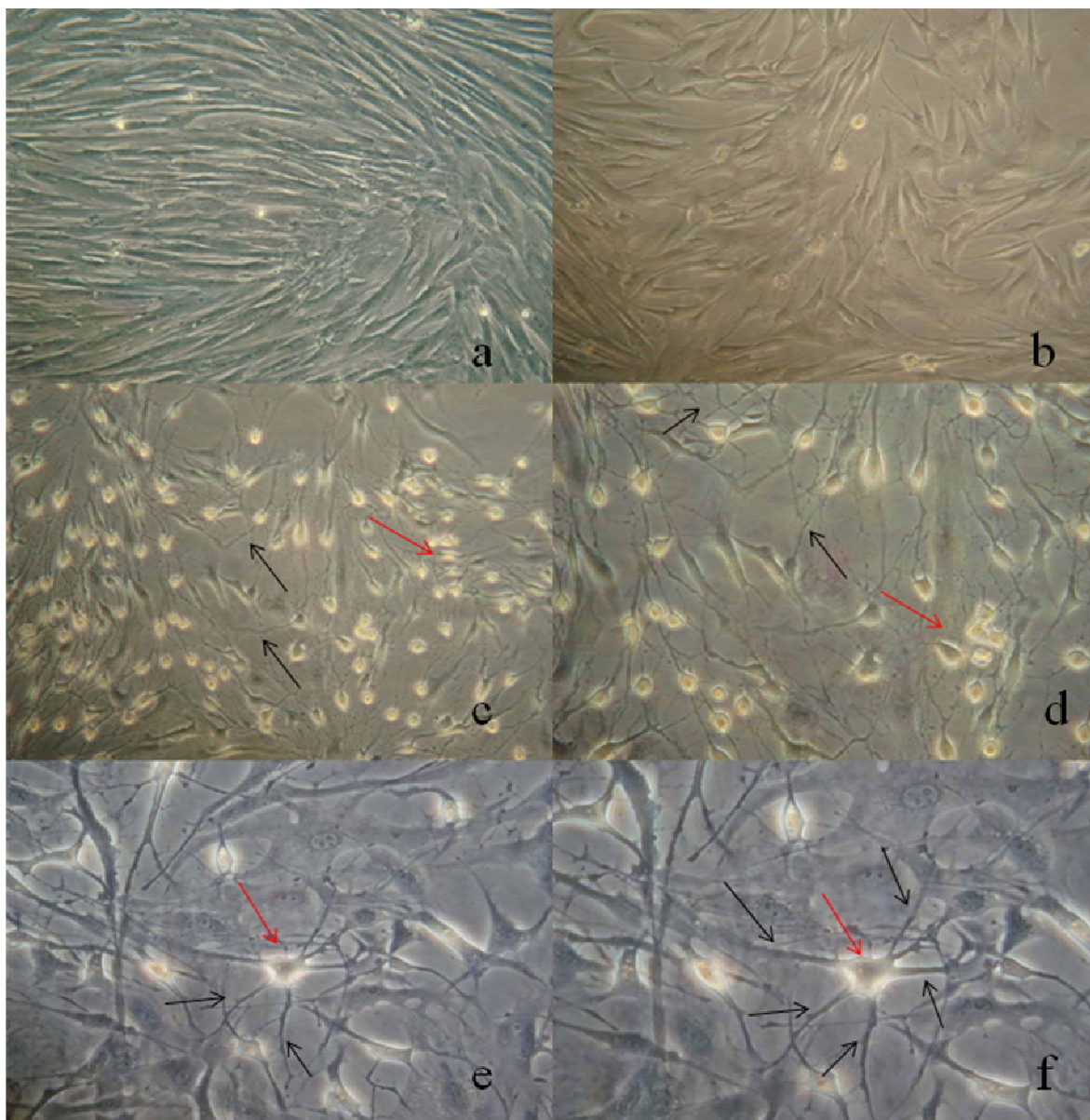
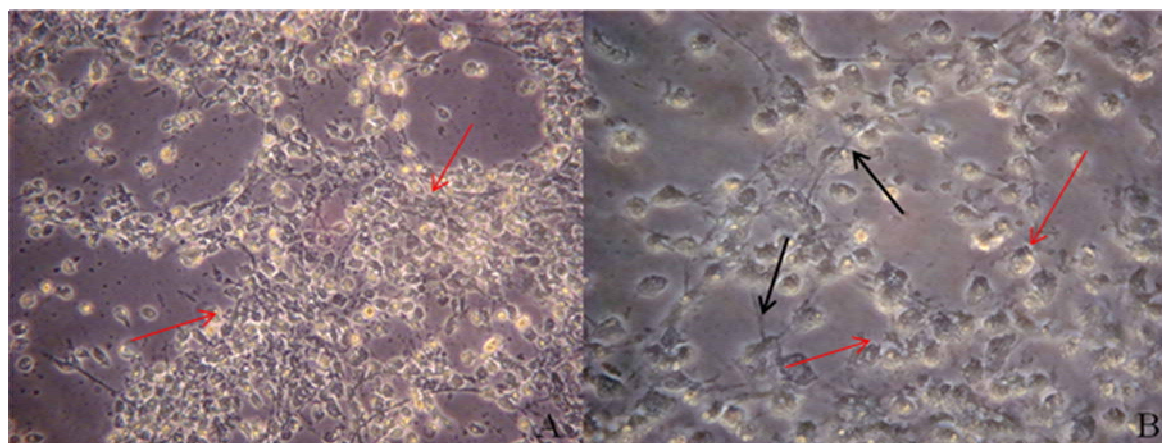


Figura 2.





**Figura 3.**



**Figura 4.**

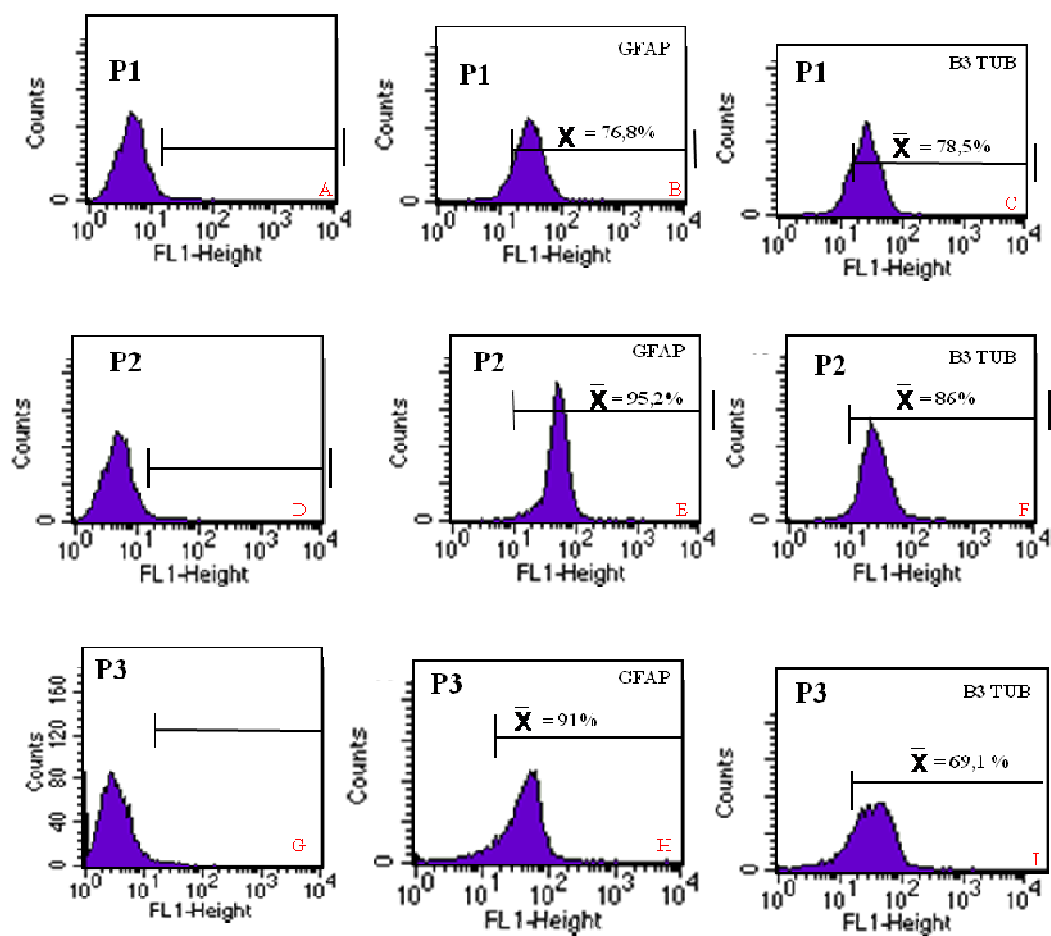


Figura 5.

## **Capítulo 5**

### 3 Discussão Geral

O aperfeiçoamento e o domínio das técnicas de colheita, processamento e caracterização das células-tronco, são alguns dos pré-requisitos necessários para o sucesso da terapia celular na espécie equina. Além disso, um melhor conhecimento dos mecanismos genéticos e moleculares de controle e diferenciação das CTMs propicia informações valiosas sobre os mecanismos de ação envolvidos na reparação tecidual mediada por estas células.

A técnica e o sítio utilizado para colheita da MO nesse estudo mostrou-se apropriado e seguro, fato esse confirmado pela não ocorrência de complicações e adequada produção de CTMs a partir do volume aspirado. De acordo com Kasashima et al. (2011), o sítio anatômico mais seguro e factível para punção aspirativa da MO é realmente a quinta esternébra, pela sua localização cranial ao ápice do coração e pela adequada espessura dorsoventral. Por outro lado, esses autores não descartam a possibilidade de aspiração da MO na quarta e na sexta esternébra, mesmo com o inconveniente da primeira estar localizada entre os membros torácicos e a última próximo ao coração.

No presente trabalho, as CTMs isoladas da MO de equinos foram caracterizadas de acordo com critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para CTMs humanas (Dominici et al. 2006), ou seja, apresentaram características de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, elevada expressão do marcador CD90 (>95% positividade), negatividade de expressão ao marcador de células hematopoiéticas CD34 e resposta positiva à diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Adicionalmente, também se observou a expressão do marcador CD44 (receptor de ácido hialurônico), uma glicoproteína de superfície celular importante na interação e adesão celular das CTMs. Algumas destas características observadas por nosso grupo também foram relatadas em outros estudos durante a caracterização de CTMs equinas provenientes do tecido adiposo (CARVALHO et al. 2009, CARVALHO et al. 2011), medula óssea (ARNHOLD et al. 2007, GUEST et al. 2008, RADCLIFFE et al. 2010), sangue periférico (MARTINELLO et al. 2010), matriz do cordão umbilical (HOYNOWSKI

et al. 2007), líquido amniótico, membrana amniótica (IACONO et al. 2012), gengiva e ligamento periodontal (MENSING et al. 2011).

A diferenciação é um processo que cursa com mudanças no tamanho, morfologia, potencial de membrana e atividade metabólica das células em resposta a modificações na expressão gênica (TAYLOR e CLEGG, 2011). Durante a diferenciação osteogênica, as CTMs expostas aos agentes indutores adquirem morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular rica em cálcio (COVAS, 2006b), conforme demonstrado em nosso estudo pela coloração positiva ao Alizarin red.

A diferenciação adipogênica ocorre quando a monocamada celular é cultivada na presença do agente indutor isobutilxantina. Nestas condições ocorre a ativação do gene PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor gama) e a síntese de ácidos graxos. Desta forma, as células cultivadas rapidamente passam a acumular gotículas de lipídeos no citoplasma (COVAS, 2006b). O abundante depósito intracitoplasmático de gotículas de gordura também foi demonstrado em nosso estudo pela coloração positiva ao Oil Red após a exposição das CTMs com o meio de diferenciação suplementado com 5% de soro de coelho.

A diferenciação condrogênica foi conduzida em ambiente tridimensional através do cultivo dos *pellets* em tubos do tipo Falcon, conforme já relatado por Reed e Johnson et al. (2007), Kasashima et al., (2011), Muller et al., (2011) e Ranera et al. (2012). O procedimento realizado se mostrou factível e as técnicas histológicas e imunocitoquímica foram adequadas para avaliar a deposição de matriz extracelular rica em proteoglicanos e colágeno do tipo II.

Na última década muitos tratamentos tem sido descritos visando a transdiferenciação de CTMs em precursores neurais. Todos os protocolos utilizados até o momento podem ser divididos em três categorias: 1) uso de agentes químicos; 2) uso de fatores de crescimento e 3) cultivo de neuroesfera, bem como a combinação entre estas categorias (MONTZKA et al. 2009). Neste estudo foram testados dois protocolos de indução química da diferenciação neural (P1: forksolin e ácido retinóico; P2: 2- $\beta$ mecarptoetanol) sendo que no primeiro deles as células foram pré-tratadas com o fator de crescimento bFGF. Em ambos os protocolos observou-se mudança morfológica após o tratamento, sendo que esta ocorreu de forma mais abrupta no P2.

Resultados semelhantes foram relatadas por Woodbury et al. (2000) utilizando o mesmos agentes químico e por Mammadov et al. (2011) com ácido retinóico. Da mesma forma Hu et al. (2011) observaram alterações morfológicas usando *Salvia miltiorrhiza* e Nourbakhsh et al. (2011) utilizando fatores de crescimento.

Recentemente Mammadov et al. (2011) demonstraram que as CTMs submetidas à transdiferenciação neural com ácido retinóico modificam lentamente sua morfologia, enquanto que o uso de agentes químicos como o  $\beta$ -mercaptoetanol, o DMSO, e o KCl promoveram uma rápida mudança atribuída a um artefato técnico devido ao enrugamento celular e não à aquisição da morfologia neuronal. Segundo estes autores, mudanças morfológicas mais lentas estão correlacionadas com a regulação de genes que requerem tempo para conversão em um tipo celular totalmente diferente, enquanto as mudanças rápidas parecem ser simplesmente decorrentes da ação tóxica dos compostos. Esta mesma opinião é compartilhada por Neuhuber et al. (2004) que observaram que as mudanças morfológicas para o fenótipo neural durante a transdiferenciação com uso de agentes químicos podem ser resultantes da quebra do citoesqueleto e retração da borda celular. No presente trabalho, a utilização do  $\beta$ -mercaptoetanol foi comparada a associação do ácido retinóico com o forskolin. O forskolin é um agente ativador da adenilato ciclase e está relacionado aos níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), sendo considerado um dos melhores indutores da diferenciação neural para CTMs (JORI et al., 2005). Entretanto, de acordo com Zang et al. (2011), a mudança morfológica causada pelo AMPc nas CTMs também é ocasionada por alterações do citoesqueleto e enrugamento celular, não sendo acompanhada por modificações da expressão gênica das células

No presente estudo, a segurança de aplicação das CTMs através do LCR foi significativamente demonstrada pelos resultados observados nas análises laboratoriais, bem como pela ausência de alterações clínicas nos grupos estudados. O achado mais interessante de nosso estudo foi a ausência de expressão das MMP2 e MMP9, particularmente em suas formas ativadas após o implante das CTMs.

A ausência de alterações clínicas e neurológicas observadas após os implantes nos GT e GC nas condições deste estudo demonstram que os procedimentos realizados não cursam com mudanças a princípio que possam

alterar o ambiente neural e que também inviabilizem o uso dessa nova via de aplicação de CTMs em equinos. Em animais de laboratório e humanos a via liquórica tem sido utilizada para o implante de células mononucleares e CTMs alogênicas sem a evidência de efeitos adversos. Em um estudo conduzido com 114 humanos acometidos por condições degenerativas (Ex: paraplegia, ataxia, esclerose múltipla), Yang et al. (2010) realizaram um total de 592 aplicações de células mononucleares alogênicas provenientes do sangue do cordão umbilical pela via intratecal e intravenosa concomitantemente sem a observação de sérios efeitos adversos. Nesse estudo, o efeito colateral mais frequente (19/592- 3,2%) foi a dor de cabeça, a qual foi atribuída a hipotensão postural, uma conhecida complicação de punções lombares que se resolvem espontaneamente sem a necessidade de intervenções drásticas.

O LCR desempenha quatro grandes funções no SNC, que incluem o suporte físico da estrutura neural, a excreção, o transporte intracerebral e o controle do ambiente químico do SNC (KANECO et al. 2008). Dentre essas características, a que nos motivou para realização deste estudo foi a possibilidade de transporte das CTMs associado ao seu potencial migratório para eventuais sítios de lesões.

Os implantes realizados em nosso estudo não ocasionaram diferenças ( $p > 0,05$ ) entre o GT e GC com relação às variáveis liquóricas estudadas, estando os valores de densidade (GREEN et al., 1993), hemácias, células nucleadas, proteínas e glicose (MAYHEW et al., 1977) pré e pós implante dentro da faixa de normalidade para espécie equina. Os valores de pH evidenciados com o uso da fita reagente pré e pós implante também foram considerados normais de acordo com o laboratório onde a análise foi conduzida.

Os valores de mediana da pró-MMP2 no LCR dos equinos do GC e GT pré e pós implante foram próximos e inferiores ao valor médio ( $43,12 \pm 13,90$ ) evidenciado por Melo et al. (2012) em cães saudáveis utilizados como grupo controle em um estudo conduzido recentemente com o objetivo de avaliar a expressão das MMP2 e MMP9 no LCR e soro de cães com sintomas neurológicos e leishmaniose visceral. Os nossos resultados não foram confrontados com outros estudos conduzidos na espécie equina pela dificuldade de encontrar na literatura informações sobre a detecção de MMPs

no LCR desta espécie. Desta forma, os valores observados particularmente no pré implante para pró-MMP2, servirão de referência para novos estudos.

Neste estudo somente foi identificado a atividade da pró-MMP-2 (gelatinase A) no LCR, sem diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os grupos e momentos estudados. De acordo com Rosemberg (2002), a gelatinase A é uma molécula constitutivamente expressa que se encontra normalmente no tecido cerebral e LCR. A não evidência da MMP-9 (gelatinase B) latente ou ativada, principalmente no grupo tratado com CTMs, auxilia a hipótese de que a via de aplicação testada pelo nosso grupo é realmente segura, haja vista que de acordo com Rosemberg (2002) a MMP9 é marcadamente desregulada nas condições inflamatórias de muitas enfermidades. A elevada expressão da MMP-9 tem sido observada no LCR de pacientes humanos e animais acometidos por enfermidades neurológicas que envolvem intensa neuroinflamação, como leishmaniose visceral (MELO et al., 2012), acidente traumático cerebral (GROSSETE et al. 2009), meningites (LEPPERT et al., 2000; WILLIAMS et al., 2002) e esclerose múltipla (LEPPERT et al., 1998).

A literatura tem demonstrado resultados animadores com o uso de CTMs, fomentando assim diversas pesquisas. No entanto, questões práticas relacionadas à concentração celular adequada para implante em cada tecido, o número de implantes a serem realizados, a melhor via de administração e o melhor tipo celular para cada enfermidade ainda precisam ser esclarecidos para otimizar a utilização da terapia celular. Mais importante que isso, os reais mecanismos de ação e efeitos biológicos das CTMs em cada fase da cicatrização e da reparação tecidual devem ser explorados e melhor compreendidos. Sendo assim, apesar dos enormes avanços obtidos nesta área nos últimos anos, este ainda é um tema que carece de inúmeras respostas, abrindo, portanto um vasto campo para novas pesquisas na medicina equina.



#### 4 Conclusões Gerais

De acordo com os objetivos propostos, podemos concluir que:

1- O protocolo de isolamento, cultivo e caracterização das CTMs provenientes da medula óssea (MO) utilizado neste estudo foi adequado para a produção de uma população celular com bom potencial de diferenciação e ausência de aneuploidia, a qual poderá ser utilizada para o estudo de futuras terapias celulares. Os dados obtidos irão contribuir não somente para o estabelecimento e aperfeiçoamento dos critérios de caracterização das CTMs, mas também favorecerão o desenvolvimento de novas pesquisas fomentando o uso terapêutico destas células na medicina equina.

2- A via intratecal, utilizando-se o espaço atlanto-occipital, é segura para o implante das CTMs autólogas, sendo uma alternativa viável para terapia celular das encefalopatias e mielopatias que acometem os equinos.

3- A habilidade das CTMs em gerar tipos celulares relacionados à linhagem neural é complexa e multifatorial, dependendo não só dos agentes indutores, mas também do ambiente no qual estas células são cultivadas. Desta forma, mesmo com a ocorrência de mudança morfológica similar às células neurais e expressão dos marcadores  $\beta$ 3-tubulina e GFAP, não foi possível comprovar que os protocolos de diferenciação neural utilizados promoveram a transdiferenciação das CTMs provenientes da MO, uma vez que as CTMs indiferenciadas também expressaram os marcadores neurais avaliados. Diante disso, técnicas mais sensíveis, marcadores neurais mais específicos e a avaliação da eletrofuncionalidade terão que ser utilizados futuramente para confirmar a transdiferenciação das CTMs da MO de equinos em fenótipos neurais, já que somente a mudança morfológica e a expressão destes marcadores neurais não foram suficientes nas condições experimentais.

## 5 Bibliografia

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

AZARI, M.F.; MATHIAS, L.; OZTURK, E.; CRAM, S.D.; BOYD, R.L.; PETRATOS, S. Mesenchymal stem cells for treatment of CNS injury. *Curr. Neuropharmacol.*, v.8, n.4, p.316-323, 2010.

BAE, K.S., PARK, J.B., KIM, H.S., KIM, D.S., PARK, D.J., KANG S.J. 2011. Neuron-Like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Yonsei. Med. J.* v. 52, n.3, p.401-412, 2011.

BARREIRA, A.P.B. *Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica.* 2005. 86f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BARZILAY, R., KAN, I., BEN-ZUR, T., BULVIK, S., MELAMED, E., OFFEN, D. Induction of Human Mesenchymal Stem Cells into Dopamine-Producing Cells with Different Differentiation Protocols. *Stem Cells Dev.* v. 17, n.3, p.547-554, 2008..

BORJESSON, D.L.; PERONI, J.F. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clin. Lab. Med.*, v. 31, n.1, p.109-123, 2011.

CARVALHO, A. M.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v. 132, n. 2-4, p.303-306, 2009.

CARVALHO A.M., ALVES A.L.G., OLIVEIRA P.G.G., ALVAREZ, L.E.C., LAUFER-AMORIM, R., HUSSNI C.A., DEFFUNE, E. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J. Equine Vet. Sci.*, v.31, n.1, p.26-34, 2011.

CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X.; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. of Biochem. Cell Biol.*, v.40, n.5, p.815-820, 2008a.

CHEN, L.; TREDGET, E.E.; WU, P.Y.G.; WU, Y. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *Plos One.*, v.3, n.4, p.1-12, 2008b.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI.; SPARDARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI,G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet. Res. Commun.*, v.33, n.8, p.811-821, 2009.

COVAS, D.T. Células-tronco Mesenquimais. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. *Células-Tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu, 2006a. cap. 3, p.35-48.

COVAS, D.T. A identificação das células-tronco. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. *Células-Tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu, 2006b. cap. 6. p.87-92.

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; DE SIENA, R.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Cell therapy for tendon repairin horses: an experimental study. *Vet. Res. Commun.*, v.31, suppl. 1, p.281-283, 2007.

DAHLGREN, L.A. Stem Cell Therapy. In: ROBINSON, N.E.; SPRAYBERRY, K.A. *Current therapy in equine medicine*. St. Louis: Saunders, 2009a. chap. 199, p. 908-911.

DAHLGREN, L.A. Management of tendon injuries. In: ROBINSON, N.E.; SPRAYBERRY, K.A. *Current therapy in equine medicine*. St. Louis: Saunders, 2009b. chap. 115, p. 518-523.

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

DOMINICI M.; LE BLANC K.; MUELLER I.; SLAPER-CORTENBACH I.; MARINI F.C.; KRAUSES D.S.; DEANS, R.J.; KEATINGS A.; PROCKOP D.J.; HORWITZ, E.M. 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.

FONTES, A.M.; ORELLANA, M.D.; PRATA, K.L. Células-tronco e seus métodos de estudo. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. *Células-Tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu, 2006. cap. 7, p.93-108.

GREEN, E.; CONSTANTINESCU, G.; KROLL R. Equine cerebrospinal fluid: Analysis. *Compend Contin Educ Pract Vet.*, v.15, n.2, p.288–301, 1993.

GROSSETE, M.; PHELPS, J.; ARKO, L.; YONAS, H.; ROSEMBERG, G.A. Elevation of MMP-3 and MMP-9 in CSF and blood in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery.*, v.65, n.4, p.702-704, 2009.

GUEST, D.J.; OUSEY, J.C.; SMITH, M.R.W. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Cloning: Adv Appl.*, v.1, p.1-9, 2008.

HOYNOWSKI S.M.; FRY M.M.; GARDNER B.M.; LEMING M.T.; TUCKER J.R.; BLACK L.; SAND T.; MITCHELL K.E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.362, n.2, p.347–353. 2007.

HU, L.; YU, J.; LI, F.; CHEN, B.; LI, L.; LIU, G. Effects of *Salvia miltorrhiza* in neural differentiation of rat mesenchymal stem cells with optimized protocol. *J. Ethnopharmacol.*, v.136,n.2,p.334-340, 2011.

HUMPREYS, B.D.; BONVENTRE, J.V. Mesenchymal stem cells in acute injury kidney. *Annu. Rev. Med.*, v.59, p.311-325, 2008.

IACONO, E.; BRUNORI, L.; PIRRONE, A.; PAGLIARO, P.P.; RICCI, F.; TAZZARI, PL.; MERLO, B. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction*, v.143, n.4, p.311-325, 2012.

IBRAHIM, S.; SAUDENRS, K.; KYDD, J.H.; LUNN, D.P.; STEINBACH, F. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocyte. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v.119, n.1-2, p.63-80, 2007.

JORI, F.P.; NAPOLITANO, M.A.; MELONE, M.A.; CIPOLARO, M.; CASCINO, A.; ALTUCCI, L.; PELUSO, G.; GIORDANO, A., GALDERISI U. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J. Cell Biochem.*, v.94,n.4, p.645-655, 2005.

JOYCE, N.; ANNETT, G.; WIRTHLIN, L.; OLSON, S.; BAUER, G.; NOLTA, J.A. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*, v.5, n.6, p.933-946, 2010.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. Burlington: Elsevier, 2008. 928p.

KASASHIMA, Y.; UENO, T.; TOMITA, A.; GOODSHIP, A.E.; SMITH, R.K.W. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet. J.*, v.43, n.3, p.288-294, 2011.

KOCH, T.G.; HEERCKENS, T.; THOMSEN, P.D.; BETTS, D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.*, v.7, n.26, p.1-9, 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,n.6,p.1613-1619, 2006.

LATIMER, K.S.; ANDREASE, C.B. Bone Marrow. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*. St. Louis: Mosby, 2002. chap. 15, p.217-226.

LEPPERT, D.; FORD, J.; STABLER, G.; GRYGAR, C.; LIENERT C.; HUBER S.; MILLER KM.; HAUSER S.L.; KAPPOS L. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain*. v.121, n.12, p.2327-2334, 1998.

LEPPERT, D. LEIB, S.L.; GRYGAR,C.; MILLER, K.M.; SCHAAD, U.B.; HOLLÄNDER, G.A. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin. Infect. Dis.*,v.31,n.1,p.80-84, 2000.

LOVATI A.; CORRADETI B.; LANGE C.A.; RECORDATI C.; BONACINA E.; BIZARRO D.; CREMONESI F. Comparison of equine bone marrow-umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet. Res. Commun.*, v.35, n.2, p.103-112, 2011.

MAIA, L.; AMORIM, R.M.; ALVARENGA, F.C.L.; ALVARENGA, M.L.; JOAQUIM, J.G.F.; NETO, J.FL.; OLIVEIRA, P.GG.; PAVÃO, G.D.; GALDINO, M.C.; PEREIRA, C.E. Uso de la terapia celular en el tratamiento de parálisis del nervio facial: Reporte de caso. In: II CONGRESO LATINOAMERICANO DE

NEUROLOGIA VETERINÁRIA, 2., 2009, Bogotá. *Anais...* Bogotá: Neurolatinvet, 2009. p.1-6.

MAIA, L.; FREITAS, N.P.P.; DE VITA, B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. Avaliação do potencial osteogênico das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equinos, isoladas com Ficoll-Paque de diferentes densidades. In: ANAIS DO XII CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 12., 2011, Campinas. *Anais...* Campinas: Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Eqüídeos, 2011. p.198-199.

MAMBELLI, L.I.; SANTOS, E.J.C.; FRAZÃO, P.J.R.; CHAPARRO.; KERKIS, A. ZOPPA, A.L.V.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng. Part c Method.*, v.15, n.1, p.87-94, 2009.

MAMMADOV, B.; KARAKAS, N.; ISIK, S. Comparison of long-term retinoic acid-based neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, v.47,n.7,p.484-491,2011.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZOO, L.; LACOPETTI, I.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; PATRUNO M. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Eng. Part c Methods.*, v.16, n.4, p.771-781, 2010.

MAYHEW, J. *Large Animal Neurology*. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell Publishing, 2009. 464p.

MAYHEW, I.G.; WHITLOCK, R.H.; TASKER JB. Equine cerebrospinal fluid: reference values of normal horses. *Am J Vet Res.*, v.38, n. p1271–1274, 1977.

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

MELO, G.D.; MARCONDES M.; MACHADO, G.F. Canine cerebral leishmaniasis: Potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v.148, n.3-4, p. 260-266, 2012.

MENSING, N.; GASSE, H.; HAMBRUCH, N.; HAEGER, JD.; PFARRER, C.; STASZYK, C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Vet. Res.*, v.7, n.42, p.1-13, 2011.

MONTZKA, K.; LASSONCZYK, N.; TSCHOKE, B.; NEUSS, S.; FUHRMANN, T.; FRANSEN, R.; SMEETS, R., BROOK, G.A.; WOLTJE, M. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.*, v.10, p.1-12, 2009.

MÜLLER, M.; RAABE, O.; ADDICKS, K.; WENISCH, S.; ARNHOLD, S. Effects of non-steroidal anti-1 inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.*, v.1, n.35, p.235-248, 2011.

MURAMATSU, R.; UENO, M.; YAMASHITA, T. Intrinsic regenerative mechanisms of central nervous system neurons. *Biosc. Trends*, v.3, n.5, p.179-183, 2009.

NARDI, N.B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. *Genética na Escola*. 2007. [citado em 16 novembro 2011]. Disponível em: <http://www.sbg.org.br/GeneticaEscola2/web/ano2vol2/05.pdf>.

NAGHDI, M., TIRAIHI, T., MESBAH-NAMIN, S.A; ARABKHERADMAND J.. Induction of Bone Marrow Stromal Cells into Cholinergic-Like Cells by Nerve Growth Factor. *Iran Biomed. J.* v.13, n.2, p.117-123, 2009.

NEUHUBER, B.; GALLO, G.; HOWARD, L.; KOSTURA, L.; MACKAY, A.; FISHER I. Reevaluation of In vitro differentiation protocols for bone marrow



stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.*, v.77,n.2,p.192–204, 2004.

NIXON, A.J.; DAHLGREN, L.A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A.E.; WARD, D.L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.69, n.7, p.928-937, 2008.

NOURBAKHSH, N.; SOLEIMANI, M.; TAGHIPOUR, Z.; KARBALAIE, K.; SEEIDBEHROUZ M.S., TALEBI, A.; NADALI, F.; TANHAEI, S.; KIYANI, G.; NEMATOLLAHI, M.; RABIEI, F.; MARDANI, M.; BAHRAMIYAN, M.; TORABINEJAD, M.; NASR-ESFAHANI, M.H., BAHARVAND, H. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int. J. Dev. Biol.*, v.55, n.2, p.189-195, 2011.

PACINI, S.; SPINABELLA, S.; TROMBI, L.; GALIMBERTI, S.; DINI, F.; CARULICCI, F. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.*, v.13, n.12, p. 2949-2955, 2007.

PEREIRA, L.V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciênc. Saúde Coletiva.*, v.13, n.1, p.7-14, 2008.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells*, v.25, n.11, p.2896-2902, 2007.

RADCLIFFE, C.H.; FLAMINIO, J.B.F.; FORTIER, L. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells Dev.*, v.19, n.2, p.269-281, 2010.

RANERA, B.; ORDOVÁS, L.; LYAHYAI, J.; BERNAL, M.L.; FERNANDES, F.; REMACHA A.R.; ROMERO, A.; VÁZQUEZ, F.J.; OSTA, R., CONS, C.; VARONA, L.; ZARAGOZA, P.; MARTÍN-BURRIEL, I.; RODELLAR, C.

Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet. J.*, v.44, n.1, p.33-42, 2012.

REED, S.A.; JONHSON, S.E. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J. Cell Physiol.*, v.215, n.2, p.329-336, 2008.

SANCHEZ-RAMOS, J.; SONG S.; CARDOZO-PELAEZ, F.; HAZZI, C.; STEDEFORD, T.; WILLING, A.; FREEMAN, T.B.; SAPORTA, S.; JANSSEN, W.; PATEL, N.; COOPER, D.R.; SANBERG P.R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.*, v.164, n.2, p. 247-256, 2000.

STEWART, M.C.; STEWART, A.A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.27, n.2, p.243–261, 2011.

TAYLOR, S.E.; CLEGG, P.D. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.*, v.27, n.2, p.263–274, 2011.

TOUPADAKIS, C.A.; WOUNG, A.; GENETOS, D.C.; CHEUNG, W.K.; BORJESSON, D.L.; 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. *Am. J. Vet. Res.*, v.71, n.10, p.1237-1245, 2010.

VIDAL, M.A.; KILROY, G.E.; LOPEZ, M.J.; JOHNSON, J.R.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.*, v.36, n.7, p.613-622, 2007.

VIDAL, M.A.; ROBINSON, S.O.; LOPEZ, M.J.; PAULSEN, D.B.; BORKHSENIIOUS 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. *Vet. Surg.*, v.37,n.8, p.713-724, 2008.

WILKE, M.M.; NYDAM, D.V.; NIXON, A.J. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J. Orthop. Res.*, v.25, n.7, p.913-925, 2007.

WILLIAMS, P.L.; LEIB, S.L.; KAMBERI, P.; LEPPERT, D.; SOBEL, R.A.; BIFRARE, Y.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Levels of matrix metalloproteinase-9 within cerebrospinal fluid in a rabbit model of coccidioid meningitis and vasculitis. *J. Infect. Dis.*, v.186, n.11, p.1692-1695, 2002.

WOODBURY, D.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J.; BLACK L.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.*, v.6, n.4, p.364-370, 2000.

WRIGHT, K.T.; MASRI, W.E.; OSMAN, A.; CHOWDHURY, J.; JOHNSON, W.E.B. Concise review: bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem Cells.*, v.29, n.2, p.169-178, 2011.

ZHANG, L.; SEITZ, L.C.; ABRAMCZYK, A.M.; LIU, L.; CHAN, C. cAMP initiates early phase neuron-like morphology changes and late phase neural differentiation in mesenchymal stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.68, n.5, p.863-876, 2011.

YANG, W.; ZHANG, Y.; WU, F.; MIN, W.; MINEV, B. ZHANG, M.; LUO, X.; RAMOS, F.; ICHIMS, T. E.; RIORDANS, N.H.; HU, X. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy form degenerative conditions. *J. Transl. Med.*, v.8, n.75, p.1-6, 2010.

YE, Y., ZENG, Y.M., WAN, M.R., LU X.F. 2011. Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural-like cells using cerebrospinal fluid. *Cell Biochem. Biophys.* v.59, n.3, p.179-184, 2011

**6 Anexo**

**Trabalho publicado no periódico “Pesquisa Veterinária Brasileira”:**

## Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino<sup>1</sup>

Leandro Maia<sup>2\*</sup>, Fernanda C. Landim-Alvarenga<sup>3</sup>, Márjorie de Assis Golim<sup>4</sup>, Mateus José Sudano<sup>3</sup>, Marilda O. Taffarel<sup>5</sup>, Bruna De Vita<sup>3</sup>, Natália Pereira P. Freitas<sup>2</sup> e Rogério M. Amorim<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Maia L., Landim-Alvarenga F.C., Golim M.A., Sudano M.J., Taffarel M.O., De Vita B., Freitas N.P.P. & Amorim R.M. 2012. [Potential of neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells from equine bone marrow.] Potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais da medula óssea de equino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(5):444-452. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: leandromvet@hotmail.com

The first studies showing the potential of neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow (BM) were conducted in camundogos and humans in the early 2000s. After this period, the number of research and publications with the same purpose increased, but with rare or scarce studies in horses. The aim of this study was to evaluate in vitro neuronal transdifferentiation potential of MSCs from equine BM using two protocols: P1 (forksolin and retinoic acid) and P2 (2-βmercaptoetanol). After confirming the mesenchymal lineages, by positivity for the marker CD90 ( $\bar{X}$ =97.94%), negative for the marker CD34 and positive response for osteogenic differentiation, MSCs were subjected to neural transdifferentiation (P1 and P2) for morphological analysis and expression of neural markers GFAP and β3 tubulin by flow cytometry. The results revealed morphological changes in varying degrees between the tested protocols. In protocol 1, twenty four hours after incubation with the media of neural differentiation, a large proportion of cells (>80%) had similar morphology to neural cells, characterized by retraction of cellular body and a large number of cytoplasmic extension (filopodia). However, comparatively, within the first 30 minutes after exposure to the antioxidant β-mercaptoethanol (P2) MSCs showed rapid morphological changes characterized mainly by retraction of cellular body and less cytoplasmic extension. It was also evidenced with the use of this protocol, lower cellular adhesion after exposure to media when compared to P1. Regarding the immunophenotyping analysis it was observed a higher ( $P<0.001$ ) expression of the markers GFAP and β3 tubulin at the end of P2 compared to P1. The ability of MSCs to generate cell types related to neural lineage is complex and multifactorial, depending not only of inducing agents, but also the environment in which these cells will be cultivated. Thus a greater number of studies are necessary to better understand the process of neural transdifferentiation of MSCs from equine.

INDEX TERMS: Horse, neural differentiation, adult stem cells, neural markers.

<sup>1</sup> Recebido em 15 de outubro de 2011.

Aceito para publicação em 23 de fevereiro de 2012.

<sup>2</sup> Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. Bolsista FAPESP.

\*Autor para correspondência: leandromvet@hotmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-Unesp, Botucatu, SP.

<sup>4</sup> Hemocentro da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, SP.

<sup>5</sup> Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ-Unesp, Botucatu, SP.

**RESUMO.**- Os primeiros estudos demonstrando o potencial de transdiferenciação neural das células-tronco mesenquimais (CTMs) provenientes da medula óssea (MO) foram conduzidos em camundongos e humanos no início da década de 2000. Após esse período, o número de pesquisas e publicações com o mesmo propósito tem aumentado, mas com raros ou escassos estudos na espécie equina. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial *in vitro* da transdiferenciação neural das CTMs provenientes da MO de equinos utilizando-se dois protocolos: P1 (forksolin e ácido retinóico) e P2 (2- $\beta$ -mercaptoetanol). Após a confirmação das linhagens mesenquimais, pela positividade para o marcador CD90 ( $\bar{X}$ =97,94%), negatividade para o marcador CD34 e resposta positiva a diferenciação osteogênica, as CTMs foram submetidas a transdiferenciação neural (P1 e P2) para avaliação morfológica e expressão dos marcadores neurais GFAP e  $\beta$ 3 tubulina por citometria de fluxo. Os resultados revelaram mudanças morfológicas em graus variados entre os protocolos testados. No protocolo 1, vinte quatro horas após a incubação com o meio de diferenciação neural, grande proporção de células (>80%) apresentaram morfologia semelhante a células neurais, caracterizadas por retração do corpo celular e grande número de projeções protoplasmáticas (filopodia). Por outro lado, de forma comparativa, já nos primeiros 30 minutos após a exposição ao antioxidante  $\beta$ -mercaptoetanol (P2) as CTMs apresentaram rápida mudança morfológica caracterizada principalmente por retração do corpo celular e menor número de projeções protoplasmáticas. Também ficou evidenciado com o uso deste protocolo, menor aderência das células após tempo de exposição ao meio de diferenciação, quando comparado ao P1. Com relação a análise imunofenotípica foi observado uma maior ( $P<0,001$ ) expressão dos marcadores GFAP e  $\beta$ 3 tubulina ao término do P2 quando comparado ao P1. A habilidade das CTMs em gerar tipos celulares relacionados a linhagem neural é complexa e multifatorial, dependendo não só dos agentes indutores, mas também do ambiente no qual estas células são cultivadas. Desta forma um maior número de estudos é necessário para o melhor entendimento do processo de transdiferenciação neural a partir de CTMs de equinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Equino, diferenciação neural, células-tronco adultas, marcadores neurais.

## INTRODUÇÃO

O interesse terapêutico e biológico nas células-tronco (CT) tem aumentando nos últimos anos, fato esse demonstrado pelo número crescente de pesquisas e publicações na área. De acordo com Frisbie & Smith (2010), a grande atenção ou interesse no uso das CT está relacionado ao seu potencial de regeneração, o qual poderia ser atribuído aos efeitos parácrinos, migratórios, imunomoduladores, antiinflamatórios e antiapoptóticos já descritos na literatura (Brooke et al. 2007, Dahlgren 2009).

As CT podem ser definidas como células com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, além da capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas. (Peireira 2008). De acordo com a origem tecidual as CT podem

ser classificadas em células-tronco adultas e embrionárias. As CT embrionárias são aquelas derivadas da massa celular interna do blastócito, sendo totipotentes ou capazes de se transformar em qualquer tipo celular, e por sua vez em um organismo inteiro. As CT adultas incluem as células-tronco hematopoéticas (CTH) e mesenquimais (CTMs), podendo ser isoladas de tecidos de origem mesodermal, tais como medula óssea, músculo, tendão, tecido adiposo (Dahlgren 2009), sangue periférico (Martinello et al. 2010), matriz do cordão umbilical (Hoynowski et al. 2007) e líquido amniótico (Lovati et al. 2011). As CTH são responsáveis pela produção da linhagem linfóide e mielóide e as CTMs são capazes de se diferenciar em tipos celulares de origem estromal, incluindo osso, músculo, cartilagem, tecido adiposo, ligamento e tendão (Dahlgren 2009). Adicionalmente, na opinião de Chen et al. (2008), em condições especiais essas células também possuem a capacidade de diferenciar em tecidos de origem ectodermal e endodermal, sendo facilmente isoladas e expandidas *in vitro*.

Os primeiros estudos demonstrando o potencial de transdiferenciação das CTMs em células neurais foram conduzidos por Woodbury et al. (2000) e Sanchez-Ramoz et al. (2000) que utilizaram células provenientes da medula óssea de humanos e roedores. Woodbury et al. (2000) utilizaram protocolos de transdiferenciação baseados em agentes químicos antioxidantes ( $\beta$ -mercaptoetanol, butilato de hidroxianisole, dimetilsulfóxido), enquanto Sanchez-Ramoz et al. (2000) testaram protocolos com ácido retinóico e fatores neurotrópicos em células previamente tratadas com EGF. No primeiro estudo as células apresentaram rápida mudança morfológica, além da expressão de marcadores neurais. Atualmente, além da utilização dos agentes químicos, os protocolos baseiam-se na utilização de fatores de crescimento (Naghdi et al. 2009, Bae et al. 2011, Nourbakhsh et al. 2011), fatores neurotrópicos (Barzilai et al. 2008), líquido cefalorraquidiano autólogo (Ye et al. 2011) e fitoterapia (Hu et al. 2011). Particularmente na espécie equina, os estudos estão focados na demonstração da capacidade de diferenciação das CTMs-MO principalmente em tecidos de origem mesodermal, sendo inexistente ou escassa a avaliação do potencial de transdiferenciação neural. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de transdiferenciação neural das CTMs provenientes da medula óssea de equinos utilizando dois protocolos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizadas oito amostras de medula óssea (20mL/amostra) provenientes de quatro equinos mestiços hígdos, de ambos os sexos e com idade entre 4 a 12 anos, selecionados mediante a avaliação clínica e hematológica prévia. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética e bem estar animal da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, campus Botucatu. Todos os procedimentos foram realizados sob as diretrizes internacionais para o cuidado e uso de animais experimentais.

### Colheita da medula óssea

A punção aspirativa da medula óssea (MO) foi realizada conforme a metodologia descrita por Barreira et al. (2008) com modificações. Para isso, os animais foram mantidos em estação,

contidos em brete e sedados com 0,5mg kg<sup>-1</sup> xilazina (Sedomin<sup>®</sup>, Köning, ARG). Em seguida, foi realizada a tricotomia de uma área de 5x20cm na região referente ao osso esterno de cada equino. Após a identificação da quinta esternebra foi realizado anti-sepsia e bloqueio anestésico local (Xylestesin<sup>®</sup> 2%, Cristália, BRA). Uma vez bem fixa a agulha de punção modelo Komiyashiki<sup>®</sup> dentro do esterno, o mandril foi retirado e se procedeu a aspiração da medula óssea com auxílio de duas seringas de 20mL contendo 2mL de heparina a 5000 UI/mL (Hemofol<sup>®</sup>, Cristália, BRA) e 2mL de tampão Salina-Fosfato pH 7,2 (PBS<sup>®</sup> 1x, LGC Biotecnologia, BRA). Após a colheita, as amostras foram encaminhadas imediatamente ao laboratório e processadas.

#### Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais

As amostras de MO foram previamente filtradas utilizando-se um equipo de transfusão (Biosani<sup>®</sup>, BRA), sendo em seguida procedida à primeira centrifugação (Centrifuga Hermle Z200A, GER) a 250g por 10 minutos para descarte da gordura e plasma sobrenadante. Ao material remanescente adicionou-se meio DMEM baixa glicose (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) na proporção 1:1, sendo posteriormente acrescido o Ficol- paque<sup>™</sup> premium 1073 (GE Healthcare Life Sciences<sup>®</sup>, SWE) lentamente(1:1) para separação da fração de células mononucleares a 350g por 30 minutos. A fração mononuclear foi aspirada e lavada duas vezes em meio DMEM baixa glicose a 250g por 10 minutos. Após a última lavagem o *pelet de células mononucleares* foi suspenso e cultivado em meio DMEM baixa glicose/F12 (1:1), 20% soro fetal bovino, penicilina/estrep-tomicina (1%) e anfotericina B (1,2%) (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>. O meio de manutenção foi trocado a cada 2 ou 3 dias até a confluência celular mínima de 80%, onde se procedeu a tripsinização para caracterização e diferenciação dos subcultivos das CTMs.

#### Análise na citometria de fluxo para os marcadores de superfície celular

A caracterização imunofenotípica das CTMs previamente a transdiferenciação neural foi realizada ao final do cultivo primário no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson and Company, USA), utilizando os anticorpos monoclonais mouse anti-rat CD90 (Caltag Laboratories, EUA) e mouse anti-human CD34 (Becton Dickinson and Company, USA) marcados com a sonda isoticiato de fluoresceína (FITC). Durante a análise foram contabilizados 10.000 eventos.

#### Diferenciação osteogênica

Após confluência de 80% em cultivo primário, as CTMs foram tripsinizadas com Triple express (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) e acondicionadas em placas de seis poços (Sarstedt<sup>®</sup>, USA) com meio DMEM/F12 (1:1) acrescido de 20% soro fetal bovino, antibiótico e antifúngico. Quarenta e oito horas após a incubação, o meio de manutenção foi removido e o meio de diferenciação osteogênico STEMPRO<sup>®</sup> (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) foi acrescido ao subcultivo. O meio foi trocado a cada dois a três dias e, a confirmação da diferenciação osteogênica foi realizada mediante a demonstração da deposição de matriz de cálcio utilizando o método de coloração histológico com Alizarin red pH 4,2 (Sigma-Aldrich Corp, USA).

#### Diferenciação neural

A diferenciação neural foi conduzida testando-se dois protocolos de diferenciação para CTMs previamente caracterizadas. Os protocolos utilizados estão descritos abaixo:

Protocolo 1 (P1)- Meio basal para células-tronco neurais, acrescido de 5 mM forskolin (0,001%) e 500 µM ácido retinóico (0,002%) (Millipore Corporation<sup>®</sup>, USA) por 48 horas.

Protocolo 2 (P2)- Meio DMEM baixa glicose acrescido de 1mM 2-βmercaptoetanol (0,007%) (Sigma-Aldrich Corp<sup>®</sup>, USA) (Woodebury et al. 2000, com modificações) por 18 horas.

Protocolo Controle - CTMs indiferenciadas não submetidas a tratamento e mantidas em meio DMEM baixa glicose/F12 na proporção de 1:1 acrescido de 20%, soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (1%) e anfotericina B (1,2%) (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA).

As CTMs em primeira passagem e prévia caracterização foram mantidas em meio de manutenção do protocolo controle até a confluência celular de 80%. Uma vez confluentes o meio de manutenção foi removido e os meios de diferenciação foram acrescidos. No protocolo 1, previamente a indução neural as células foram mantidas por 18 horas em meio basal para células-tronco neurais acrescido de 10ng/mL fator de crescimento fibroblástico básico (Millipore Corporation<sup>®</sup>, USA). Após esse período foi adicionado ao meio basal o forskolin e ácido retinóico durante dois dias nas proporções discriminadas acima e com troca diária.

No protocolo 2 as células não foram submetidas a pré-diferenciação, conforme descrito por Woodebury et al. (2000), pois em estudos pilotos prévios verificamos que as células modificavam-se muito morfológicamente logo na primeira hora de tratamento, interferindo assim na avaliação do protocolo proposto.

Após o período de diferenciação as células foram preparadas para análise fenotípica utilizando-se os marcadores GFAP e β3 tubulina. O processo de diferenciação, bem como de avaliação foram realizados em quadruplicatas para cada protocolo proposto.

#### Citometria de fluxo para os marcadores neurais

A análise fenotípica foi conduzida utilizando os anticorpo primários anti GFAP (Invitrogen Gibco<sup>®</sup>, USA) e anti β3 tubulina (Millipore Corporation<sup>®</sup>, USA) marcados com Alexa flúor 488. Para isso, as células provenientes de P1, P2 e CTMs indiferenciadas foram tripsinizadas, resuspendidas em PBS e acondicionadas em tubos de polipropileno (Becton Dickinson<sup>®</sup> and Company, USA). Previamente a incubação com os marcadores, as células foram fixadas e permeabilizadas com o kit (Becton Dickinson<sup>®</sup> and Company, USA) para facilitar a difusão dos anticorpos utilizados. Em seguida, os anticorpos foram adicionados e as células incubadas no escuro por uma hora para leitura no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson<sup>®</sup> and Company, USA).

#### Análise estatística dos dados

Para análise estatística, a variável dependente binomial (expressão das proteínas na citometria fluxo) dos diferentes protocolos foi analisada através do teste de regressão logística utilizando o PROC LOGISTIC do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, USA). Quando o efeito de tratamento foi significativo utilizou-se o LSD com o comando LSMEANS PDIF do PROC GLM do SAS. Fontes de variação no modelo, incluindo tratamento, foram consideradas como efeito fixo. Como efeito aleatório adotou-se os animais (tratamento). Os resultados estão apresentados como percentagem. Foi adotado o nível de significância de 5% (P<0,05).

## RESULTADOS

As células provenientes da fração mononuclear da MO apresentaram aderência ao plástico entre 24 e 48 horas e morfologia fibroblastóide inicialmente com quatro dias de cultivo. No período compreendido de 15 a 22 dias ( $\bar{X}$  = 22) de cultivo foi alcançada a confluência celular ≥ 80%, sendo conduzida análise imunofenotípica para os marcadores CD90 e CD34 previamente a diferenciação neural.

Fig.1. Análise imunofenotípica FACS das células-tronco mesenquimais de equino para os marcadores CD34 e CD 90. (A) Gráfico de distribuição e tamanho. (B) Controle. (C) Histograma do marcador CD90 expresso em média 97,94%. (D) Histograma do marcador CD34 (negativo).

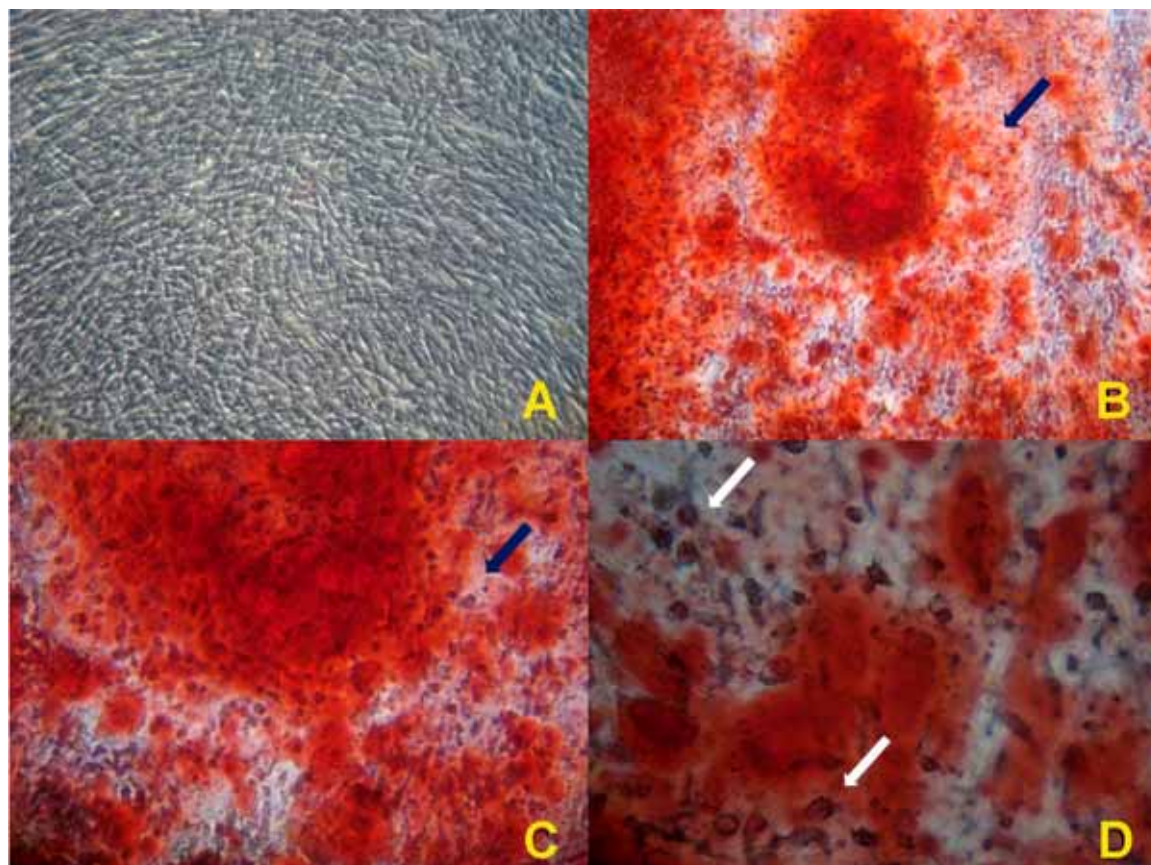
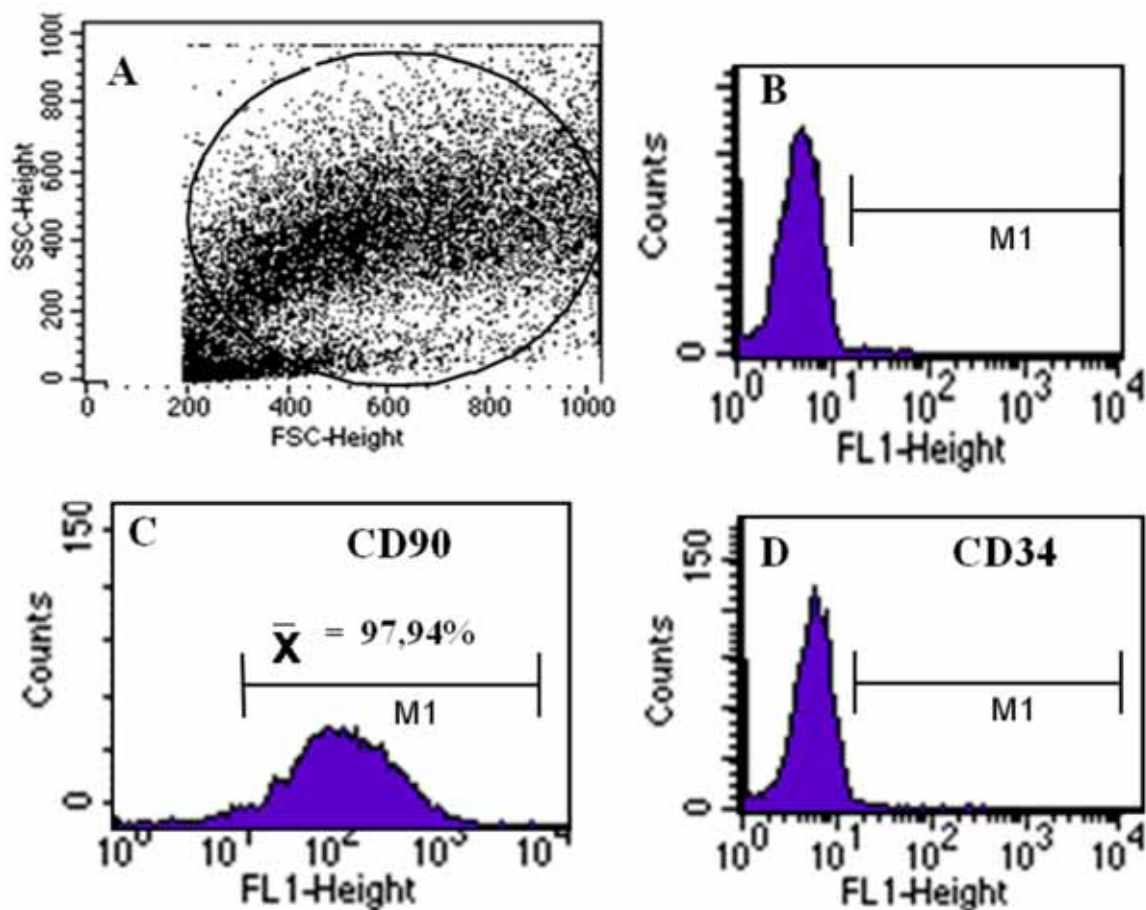


Fig.2. (A) CTMs indiferenciadas. Note a morfologia fibroblástica característica das células. Obj.10x. (B,C) Diferenciação osteogênica. Note a deposição de cálcio marcada com Alizarin red (seta azul). Obj.10x, 20x. (D) Note a mudança de morfologia fibroblástica para poligonal das células após a diferenciação osteogênica (setas brancas). Obj.40x.



A análise revelou elevada expressão do marcador CD90 ( $\bar{X} = 97,94\%$ ) e ausência de expressão para o marcador CD34, conforme demonstrado na Figura 1. Adicionalmente, o potencial de diferenciação das CTMs em outra linhagem mesenquimal foi confirmado pela diferenciação osteogênica 10 dias após a exposição ao meio de diferenciação. As CTMs inicialmente com morfologia fibroblastóide adquiriram morfologia predominantemente poligonal e depositaram

grande quantidade de matriz extracelular de cálcio comprovada pela coloração positiva com Alizarim red (Fig.2).

A exposição das CTMs aos protocolos de diferenciação neural ocasionaram mudanças morfológicas em graus variados. No protocolo 1, após a exposição ao meio de pré-diferenciação, as CTMs demonstraram pequena retração celular. Vinte quatro horas após a incubação com o meio de diferenciação neural do protocolo 1, grande proporção (>80%) de

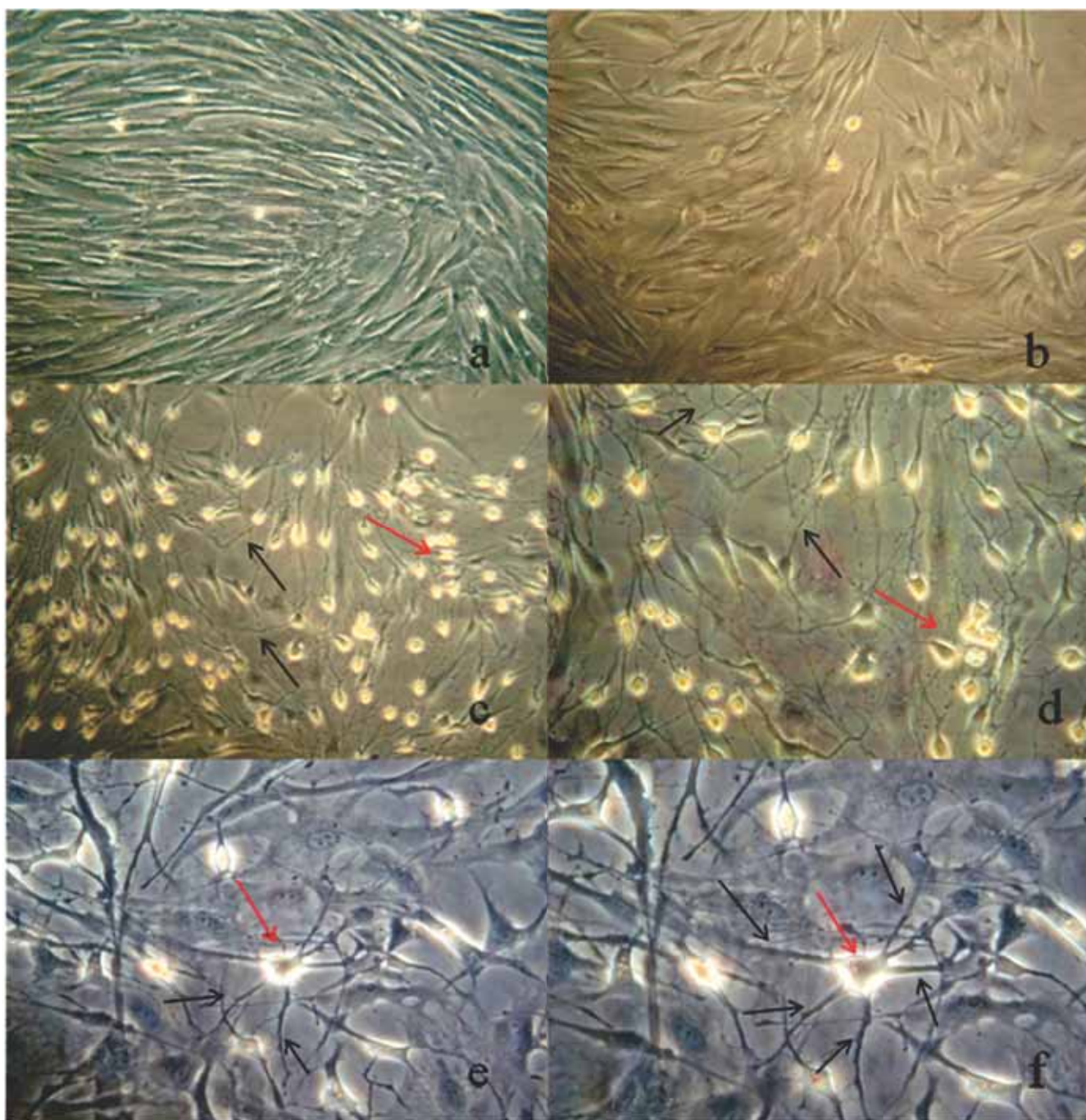


Fig.3. Diferenciação neural das CTMs com forksolin e ácido retinoico (P1). (a) CTMs indiferenciadas demonstrando morfologia fibroblastóide. (b) Células após exposição ao meio de pré-diferenciação demonstrando discreta mudança morfológica. (c,d) Células apresentando retração do corpo celular (setas vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) após 24 horas de exposição a P1. (e,f) Células apresentando retração do corpo celular (setas vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) após 48 horas de exposição a P1. Obj.10x (c), 20x (a,b,d,e), 40x (f).

células apresentaram morfologia semelhante a células neurais, caracterizadas por retração do corpo celular e grande número de projeções protoplasmáticas (filopodia) que se intensificaram ao término das 48 horas de exposição ao meio de diferenciação (Fig.3). Por outro lado, de forma comparativa, logo após a exposição ao antioxidante  $\beta$ -mercaptoetanol (P2), as CTMs apresentaram rápida mudança morfológica caracterizada principalmente por retração do corpo celu-

lar e menor número de projeções protoplasmáticas (Fig.4). Também ficou evidenciada com o uso deste protocolo, menor aderência das células após tempo de exposição ao meio de diferenciação, quando comparado ao P1.

Com relação a análise fenotípica foi observada uma maior ( $P < 0,001$ ) expressão do GFAP em P2 (95,2%) e no controle (91%) em comparação ao P1 (76,8%). Diferenças ( $P = 0,3095$ ) entre P2 e o controle não foram observadas. Já

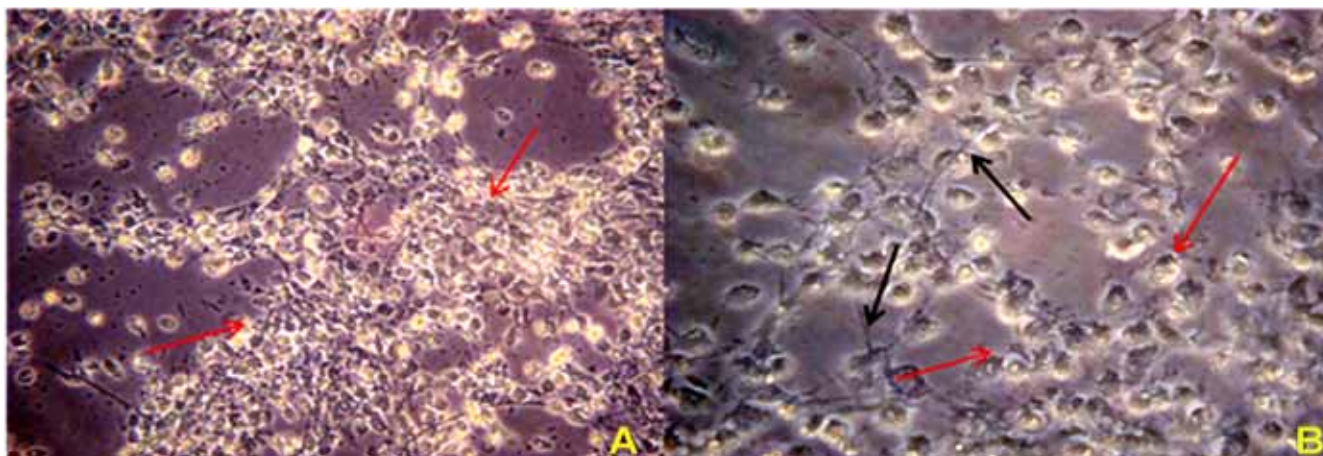


Fig.4. (A,B) Diferenciação neural das CTMs com 2- $\beta$ mercaptoetanol (P2). Células apresentando intensa retração do corpo celular (setas vermelhas) e presença de inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (setas pretas) Obj.10x (A), 20x (B).

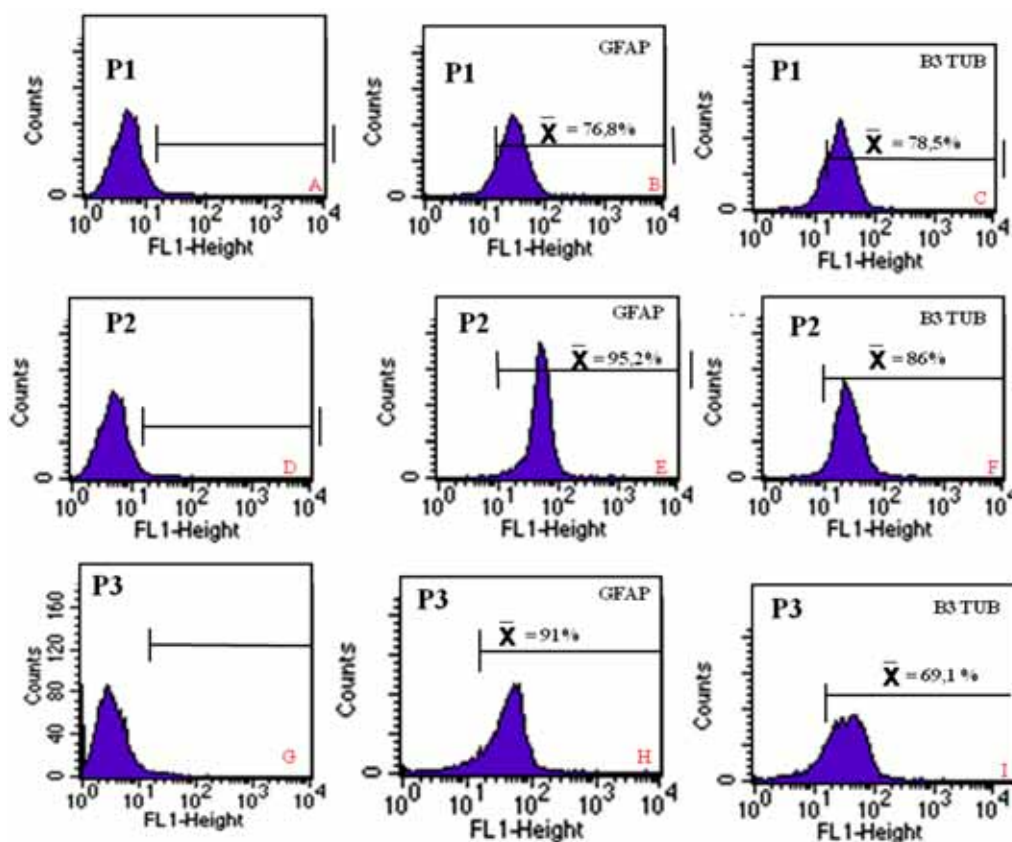


Fig.5. Análise imunofenotípica FACS das células-tronco mesenquimais de equino transdiferenciadas (P1 e P2) e indiferenciadas (P3). a, b, c) Histogramas das células tratadas com forskolin e ácido retinóico (P1); a- controle, b- GFAP, c-  $\beta$ 3 tubulina. d, e, f) Histogramas das células tratadas com 2- $\beta$ mercaptoetanol (P2); d- controle, e- GFAP, f-  $\beta$ 3 tubulina. g, h, i) Histogramas das CTMs indiferenciadas, não submetidas a nenhum tratamento (Controle); g- controle, h- GFAP, i-  $\beta$ 3 tubulina.

o marcador  $\beta 3$  tubulina foi expresso em maior ( $p < 0,001$ ) proporção no P2 (86%), seguido de P1 (78,5%) e controle (69,1%). Os histogramas referentes à análise fenotípica estão apresentados na Figura 5. É importante ressaltar, que de forma surpreendente as CTMs que não foram submetidas a nenhum tratamento também expressaram ambos os marcadores neurais (Fig.5).

## DISCUSSÃO

O potencial das células tronco mesenquimais (CTMs) de transdiferenciar em certos tipos de células neurais tem despertado grande interesse, fomentando diversas pesquisas que visam o uso terapêutico deste tipo celular para o tratamento de diversas enfermidades de origem neurológica. Entretanto, dados claros e inequívocos em relação a esta transdiferenciação ainda precisam ser obtidos para fundamentar a validade de tais terapias.

No presente trabalho, as CTMs isoladas da medula óssea de equinos adultos foram adequadamente caracterizadas de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para CTMs humanas (Dominici et al. 2006), ou seja, apresentaram características de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, elevada expressão do marcador CD90 (>95% positividade), negatividade de expressão ao marcador de células hematopoiéticas CD34 e responderam positivamente a diferenciação osteogênica. Duas ou mais dessas características também foram encontradas em outros estudos durante a caracterização de CTMs equinas provenientes do tecido adiposo (Carvalho et al. 2009, Carvalho et al. 2011), medula óssea (Arnhold et al. 2007, Guest et al. 2008, Radcliffe et al. 2010), sangue periférico (Martinello et al. 2010) e matriz do cordão umbilical (Hoynowski et al. 2007).

Na última década diversos tratamentos têm sido descritos visando a indução da diferenciação de CTMs em precursores neurais em diferentes espécies. Todos os protocolos utilizados até o momento podem ser divididos em três categorias básicas: 1) uso de agentes químicos; 2) uso de fatores de crescimento, e 3) cultivo de neuro-esfera, bem como a combinação entre estas categorias (Montzka et al. 2009). Neste experimento foram testados dois protocolos de indução química da diferenciação neural, sendo que no primeiro deles as células foram pré-tratadas com o fator de crescimento bFGF. Em ambos os protocolos observou-se mudança morfológica após o tratamento, sendo que esta ocorreu de forma mais abrupta no P2. Resultados semelhantes foram relatados por Woodbury et al. (2000) utilizando o mesmos agentes químico e por Mammadov et al. (2011) com ácido retinóico. Da mesma forma Hu et al. (2011) observaram alterações morfológicas usando *Salvia miltiorrhiza* e Nourbakhsh et al. (2011) utilizando fatores de crescimento.

Recentemente Mammadov et al. (2011) demonstraram que as CTMs submetidas a transdiferenciação neural com ácido retinóico modificam lentamente sua morfologia, enquanto que o uso de agentes químicos como o  $\beta$ -mercaptoetanol, o DMSO, e o KCl promovem uma rápida mudança atribuída a um artefato técnico devido ao enrugamento celular e não a aquisição da morfologia neuronal. Segundo estes autores, mudanças morfológicas mais lentas

estão correlacionadas com a regulação de genes que requerem tempo para conversão em um tipo celular totalmente diferente, enquanto as mudanças rápidas parecem ser simplesmente decorrentes da ação tóxica dos compostos. Esta mesma opinião é compartilhada por Neuhuber et al. (2004) que observaram que as mudanças morfológicas para o fenótipo neural durante a transdiferenciação com uso de agentes químicos podem ser resultantes da quebra do citoesqueleto e retração da borda celular. No presente trabalho a utilização do  $\beta$ -mercaptoetanol foi comparada a associação do ácido retinóico com o forskolin. O forskolin é um agente ativador da adenilato ciclase e está relacionado aos níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), sendo considerado um dos melhores indutores da diferenciação neural para CTMs (Jori et al. 2005). Entretanto, de acordo com Zang et al. (2011) a mudança morfológica causada pelo AMPc nas CTMs também é ocasionada por alterações do citoesqueleto e enrugamento celular, não sendo acompanhada por modificações da expressão gênica das células.

A estimativa da diferenciação neural tem sido fortemente baseada na morfologia das células, e na expressão de marcadores neurais (Deng et al. 2001, Jori et al. 2005). Apesar de ambos os protocolos utilizados no presente experimento, induzirem alterações na morfologia celular que estão associadas a modificações do citoesqueleto, indicando uma ação inespecífica, a expressão de marcadores neurais foi detectada com sucesso. A expressão dos marcadores gliais (GFAP) e/ou neurais ( $\beta 3$  tubulina) observadas na análise fenotípica após o tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol (P2), bem como com ácido retinóico e forskolin (P1) também foram relatadas por Safford et al. (2004), Kingham et al. (2007), Bae et al. (2011), Ni et al. (2010) e Nourbakhsh et al. (2011) utilizando diferentes protocolos de "diferenciação neural". Neste experimento a análise imunofenotípica demonstrou maior expressão dos marcadores GFAP e  $\beta 3$  tubulina no P2 comparativamente ao P1. Apesar disso a quantidade de células aderidas no P1, bem como a manutenção do "fenótipo neural" foi qualitativamente superior a observada no P2. Essa melhor aderência e integridade celular observadas em P1 podem ser decorrentes da menor toxicidade do forskolin associado ao ácido retinóico quando comparado ao  $\beta$ -mercaptoetanol.

Por outro lado, as CTMs que não foram submetidas a nenhum tratamento (controle) também expressaram ambos os marcadores neurais. Estudos utilizando diferentes técnicas (citometria de fluxo, imunocitoquímica, western blot, PCR em tempo real) têm demonstrado que as CTMs provenientes de diferentes fontes não expostas ao meio de diferenciação neural expressam naturalmente alguns marcadores neurais como nestin,  $\beta$  III tubulina, GFAP, tau e tirosina hidroxilase (TH) em proporções variáveis (Safford et al. 2004, Kingham et al. 2007, Pelegrino 2009, Neuhuber et al. 2011). Adicionalmente tentativas prévias para identificar a expressão genética basal de CTMs revelaram a presença de genes característicos de células da linhagem endotelial, epitelial e neural, sendo que os RNAs relacionados a linhagem neural estão entre os 50 genes mais abundantes encontrados em outras linhagens celulares incluindo o marcador nestin (Montzka et al. 2009).

É conhecido que CTMs que permanecem longo tempo em cultura (4 ou 5 passagens) podem sofrer diferenciação espontânea para linhagens semelhantes a neurais sem o estímulo de citocinas ou agentes químicos (Tseng et al. 2007). Além disso, neuroesteróides como a dexametasona e o estradiol são moduladores conhecidos de várias proteínas gliais induzindo a diferenciação de CTMs em células da linhagem neural que expressam nestin e a  $\beta$  III tubulina (Bronzi et al. 2010). Embora, no presente estudo as CTMs utilizadas não tenham sido cultivadas por longos períodos, foi adicionado ao cultivo 20% de SFB, substância esta sabidamente rica em esteróides como os glicocorticóides e o estrógeno. Estes hormônios podem ter interagido com outros fatores de crescimento, também presentes no soro, desencadeando uma cascata de eventos em certa população de CTMs mais propensa a indução da diferenciação neural, o que resultou na expressão dos marcadores observada no grupo controle.

Entretanto, deve-se considerar que embora a presença destes marcadores moleculares seja um aspecto importante na caracterização da linhagem neural de células em cultivo, o principal aspecto a ser considerado ainda é a avaliação da funcionalidade das células transdiferenciadas através da mensuração do seu potencial de ação. Neste sentido, poucos são os trabalhos que comprovam a funcionalidade das células transdiferenciadas *in vitro*. Pelegrino (2009) estudando CTMs provenientes da polpa dentária humana observou, não só a expressão dos marcadores nestin e  $\beta$ 3 tubulina, mas também o disparo do potencial de ação nas células não submetidas a nenhum tratamento. Resultados como este ressaltam que a expressão natural de marcadores neurais em CTMs previamente a exposição aos “meios de diferenciação neural” e até mesmo a deflagração do potencial de ação, embora possam ocasionar dúvidas em relação a diferenciação para o fenótipo neural, são achados importantes por demonstrar a possibilidade de aplicação das CTMs em estado indiferenciado para diferentes enfermidades neurais.

A análise dos resultados do presente experimento demonstra que a habilidade das CTMs em gerar tipos celulares relacionados a linhagem neural é complexa e multifatorial, dependendo não só dos agentes indutores, mas também do ambiente no qual estas células são cultivadas. Além disso o presente experimento indica que a seleção celular baseada na aderência ao plástico, plasticidade e fenotipagem origina o desenvolvimento de uma população ainda heterogênea que responde de forma individual e imprevisível aos estímulos do meio de cultivo e fatores de indução de diferenciação. Desta forma um maior número de estudos é necessário para o melhor entendimento do processo de transdiferenciação neural a partir de CTMs de equinos.

**Agradecimento.-** À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (Proc.2009/51431-6) e ao Fundunesp e CNPQ pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

Arnhold S.J., Goletz I., Klein H., Stumpf G., Beluche L.A., Rohde C., Addicks K. & Litzke L.E. 2007. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 68:1095-1105.

Bae K.S., Park J.B., Kim H.S., Kim D.S., Park D.J. & Kang S.J. 2011. Neuron-

- Like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Yonsei. Med. J.* 52:401-412.
- Barreira A.P.B., Bacellar D.T.L., Kiffer R.G. & Alves A.L.G. 2008. Punção aspirativa de medula óssea em equinos adultos para obtenção de células-tronco. *Revta Bras. Ciênc. Vet.* 15:56-59.
- Barzilay R., Kan I., Ben-zur T., Bulvik S., Melamed E. & Offen D. 2008. Induction of Human Mesenchymal Stem Cells into Dopamine-Producing Cells with Different Differentiation Protocols. *Stem Cells Dev.* 17:547-554.
- Bronzi D., Bramanti V., Tomassoni D., Laureanti F., Grasso S., Volsi G.L. & Avola R. 2010. Neural markers expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells treated with neurosteroids. *Neurochem. Res.* 35: 2154-2160.
- Brooke G., Cook M., Blair C., Han R., Heazlewood C., Jones B., Kambouris M., Kolla K., McTaggart S., Pelekanos R., Rice A., Rossetti T. & Atkinson K. 2007. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18:846-858.
- Carvalho A.M., Alves A.L.G., Golim M.A., Moroz A., Hussni C.A., Oliveira P.G.G. & Deffune E. 2009. The isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132:303-306.
- Carvalho A.M., Alves A.L.G., Oliveira P.G.G., Alvarez L.E.C., Laufer-Amorim R., Hussni C.A. & Deffune E. 2011. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J. Equine Vet. Sci.* 31:26-34.
- Chen Y., Shao J.Z., Xiang L.X., Dong X.J. & Zhang G.R. 2008. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:815-820.
- Dahlgren L.A. 2009. Stem Cell Therapy, p.908-911. In: Robinson N.E. & Sprayberry K.A. (Eds), *Current Therapy in Equine Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. Saunders Elsevier, St Louis.
- Deng W., Obrocka M., Fischer I. & Prockop D.J. 2001. In vitro Differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:148-152.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krauses D.S., Deans R.J., Keatings A., Prockop D.J. & Horowitz E.M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
- Frisbie D.D. & Smith R.K.W. 2010. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet. J.* 42:86-89.
- Guest D.J., Ousey J.C. & Smith M.R.W. 2008. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Cloning, Advances and Applications* 1:1-9.
- Hoynowski S.M., Fry M.M., Gardner B.M., Leming M.T., Tucker J.R., Black L., Sand T. & Mitchell K.E. 2007. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362:347-353.
- Hu L., Yu J., Li F., Chen B., Li L. & Liu G. 2011. Effects of *Salvia miltorrhiza* in neural differentiation of rat mesenchymal stem cells with optimized protocol. *J. Ethnopharmacol.* 136:334-340
- Jori F.P., Napolitano M.A., Melone M.A., Cipolaro M., Cascino A., Altucci L., Peluso G., Giordano A. & Galderisi U. 2005. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J. Cell Biochem.* 94:645-655.
- Kingham P.J., Kalbermatten D.F., Mahay D., Armstrong S.J., Wiberg M. & Terenghi G. 2007. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 207:267-274.
- Lovati A., Corradetti B., Lange C.A., Recordati C., Bonacina E., Bizarro D. & Cremonesi F. 2011. Comparison of equine bone marrow-umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet. Res. Commun.* 35:103-12.
- Mammadov B., Karakas N. & Isik S. 2011. Comparison of long-term retinoic acid-based neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 47:484-491.

- Martinello T, Bronzini I, Maccatrozoo L, Lacopetti I, Sampaolesi M, Mascarello F & Patruno M. 2010. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Eng. C, Methods* 16:771-781.
- Montzka K, Lassonczyk N, Tschoke B, Neuss S, Fuhrmann T, Fransen R, Smeets R, Brook G.A. & Woltje M. 2009. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.* 10:1-12.
- Naghdi M, Tiraihi T, Mesbah-Namin S.A. & Arabkheradmand J. 2009. Induction of Bone Marrow Stromal Cells into Cholinergic-Like Cells by Nerve Growth Factor. *Iran Biomed. J.* 13:117-123.
- Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A. & Fisher I. 2004. Reevaluation of In vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.* 77:192-204.
- Ni W.F., Yin L.H., Lu J., Xu H.Z., Chi L.G., Wu J.B. & Zhang Nu. 2010. In vitro neural differentiation of bone marrow stromal cells induced by cocultured olfactory ensheathing cells. *Neurosci. Lett.* 475:99-103.
- Nourbakhsh N., Soleimani M., Taghipour Z., Karbalaie K., Seeidbehrouz M.S., Talebi A., Nadali F., Tanhaei S., Kiyani G., Nematollahi M., Rabiei F., Mardani M., Bahramiyan M., Torabinejad M., Nasr-Esfahani M.H. & Baharvand H. 2011. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 55:189-195.
- Pelegriño K.O. 2009. Caracterização e diferenciação neural in vitro de células-tronco de polpa dentária de dente decíduo humano. Dissertação de Mestrado em Biologia e Genética, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 102p.
- Pereira L.V. 2008. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciência e Saúde Coletiva* 13:7-14.
- Radcliffe C.H., Flaminio J.B.F., Fortier L. 2020. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells and Dev.* 19:269-281.
- Safford K.M., Safford S.D., Gimble J.M., Shetty A.K. & Rice H.E. 2004. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp. Neurol.* 187:319-328.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A., Freeman T.B., Saporta S., Janssen W, Patel N, Cooper D.R. & Sanberg P.R. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* 164:247-256.
- Tseng P.Y., Chen C.J., Sheu C.C., Yu C.W. & Huang Y.S. 2007. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long term culture. *J. Vet. Med. Sci.* 69:235-244.
- Woodbury D, Schwarz E.J., Prockop D.J. & Black L.B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61:364-370.
- Ye Y, Zeng Y.M., Wan M.R. & Lu X.F. 2011. Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural-like cells using cerebrospinal fluid. *Cell Biochem. Biophys.* 59:179-184.
- Zhang L., Seitz L.C., Abramczyk A.M., Liu L. & Chan C. 2011. CAMP initiates early phase neuron-like morphology changes and late phase neural differentiation in mesenchymal stem cells. *Cell Mol. Life Sci.* 68:863-876.